



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

**EFFECTO DE LA RESISTENCIA DE INHALADORES FARMACÉUTICOS
DE POLVO SECO EN LA GEOMETRÍA DE PLUMA Y LA EFICIENCIA DE
AERODISPERSIÓN**

Unidad de investigación II para optar al título de Química Farmacéutica

MARIANA CONTRERAS SANZ

DIRECTOR: DANIEL MORAGA ESPINOZA

2024

Agradecimientos

Expresar mi más profundo agradecimiento a mi director Daniel Moraga por su paciencia, su comprensión y su esfuerzo por formar grandes profesionales, otorgándonos oportunidades de crecimiento personal y profesional. El profesor ha contribuido en mi crecimiento como persona y su fe en mis habilidades me ayudaron a salir adelante cuando creía que no podría. Me alentó a seguir mis metas y me felicitó siempre por ello. Al equipo Latefar por el trabajo en equipo y por hacer de este laboratorio un lugar grato para convivir. El laboratorio fue mi lugar seguro muchos años, el lugar donde pude estudiar, aprender, descansar, desahogarme, hacer vida social y sobre todo, ser muy feliz. Sin duda lo que más voy a extrañar.

Agradecer a la empresa italiana Berry Global Inc. por la facilitación de los inhaladores utilizados en este estudio, muchas gracias por la oportunidad y espero que las conversaciones con el equipo Latefar sigan adelante.

Infinitas gracias a mis padres por su apoyo y amor incondicional. Ellos han tenido fe en mí en los momentos más difíciles, me han dado todo lo que he necesitado en la vida, han luchado día a día para que nada me falte y estaré profundamente agradecida siempre. A mis hermanos por ser un pilar fundamental en mi estabilidad emocional, por escucharme y aconsejarme cuando los necesité. Sin mi familia no hubiese podido recorrer este largo y difícil camino. A Cosito, mi gran apoyo y compañero fiel en noches de insomnio y estrés durante 7 años, fuiste más que una mascota, siempre serás parte de mi familia, me llenaste de alegría con tus locuras y tu carácter, te extrañare siempre.

A mi pareja por su apoyo incondicional, por ser mi amigo, mi compañero, mi confidente, gracias por creer en mí, por escucharme, ayudarme y por estar a mi lado en los momentos de incertidumbre y de cansancio, por intentar siempre resolver y acompañarme en todo.

A todos mis amigos que estuvieron en mis momentos de estrés para brindarme alegría, fueron un gran soporte, un gran equipo de estudio con caídas y triunfos.

Resumen

La administración por inhaladores de polvo seco son una alternativa sobre los inhaladores presurizados debido a sus variadas ventajas en la administración por vía pulmonar. Los principales factores que afectan el desempeño de los DPI se relacionan tanto con el paciente como con el inhalador. Pero la formulación y las características aerodinámicas de las partículas que la componen son también cruciales. El ángulo de pluma ha sido una técnica de caracterización que se utiliza para evaluar la integridad de la válvula dosificadora y la boquilla, la calidad y consistencia de la actuación del dispositivo en inhaladores presurizados, lo que permite la evaluación del rendimiento de un inhalador. Sin embargo, los DPI no pueden ser actualmente evaluados para calcular su ángulo de pluma ya que no pueden dispersar el polvo sin que el paciente inhale.

Este estudio sugiere llevar a cabo una medición del efecto de la resistencia de inhaladores DPI sobre la geometría de pluma con PIPE permitiendo una medición más parecida a la realidad. Buscamos conocer el comportamiento del efecto de la resistencia y los diferenciales de presión en el ángulo de pluma MMPA utilizando las mismas condiciones de estudios anteriores a modo de reducir las variables y obtener resultados reproducibles.

En este estudio se determinó que el ángulo de pluma aumenta cuando el flujo de inhalación se hace mayor, el rendimiento de los inhaladores aumenta cuando el ángulo se encuentra entre 15 y 20 grados y que el puerto de inducción debe ser recubierto para no sobreestimar los resultados de eficiencia de aerosolización. Estos resultados son puertas que se abren a futuras investigaciones donde pueden evaluarse otras variables propias de los inhaladores y como estas influyen en los ángulos de pluma y su eficiencia en entrega de principio activo a las zonas más profundas del pulmón.

Effect of the resistance of dry powder pharmaceutical inhalers on plume geometry and aerosol dispersion efficiency

Dry powder inhalers (DPI) are an alternative to pressurized inhalers due to their various advantages in pulmonary administration. The main factors affecting the performance of DPIs are related to both the patient and the inhaler. However, the formulation and the aerodynamic characteristics of the particles that make up the powder are also crucial.

The plume angle has been a characterization technique used to evaluate the integrity of the metering valve and the nozzle, as well as the quality and consistency of the device's performance in pressurized inhalers, allowing the assessment of an inhaler's performance. However, DPIs cannot currently be evaluated to calculate their plume angle as they cannot disperse the powder without patient inhalation.

This study suggests measuring the effect of DPI resistance on the plume geometry using PIPE, allowing a more realistic measurement. We aim to understand the behavior of the resistance effect and pressure differentials on the MMPA plume angle using the same conditions as previous studies to reduce variables and obtain reproducible results.

In this study, it was determined that the plume angle increases when the inhalation flow is greater, the performance of the inhalers improves when the angle is between 15 and 20 degrees, and the induction port must be coated to avoid overestimating aerosolization efficiency results. These findings open doors to future research where other variables specific to inhalers can be evaluated and how they influence plume angles and their efficiency in delivering the active ingredient to the deeper areas of the lung.

Glosario de términos

Impactador de cascada Next Generation Impactor: Instrumento utilizado para la caracterización de aerosoles, como inhaladores presurizados, inhaladores de polvo seco, nebulizadores, entre otros.

Inhaladores de polvo seco: Dispositivo que permite la entrega de medicamentos a nivel respiratorio sin la necesidad de propelentes, estos poseen distintas resistencias, la cual se define como la fuerza de oposición que el dispositivo genera al inhalar.

Abreviaciones

DPI: Inhaladores de polvo seco

NGI: Impactador de cascada Next Generation Impactor

PIPE: Puerto de inducción evaluador de plumas o puerto de inducción segmentado

MMAD: Diámetro de masa media aerodinámica

MMPA: Ángulo geométrico de la pluma

FPF: Fracción de partículas finas

ED: Dosis emitida

FPD: Dosis de partículas finas

RF: Fracción respirable

MOC: Colector de microorificios

Índice

Introducción	7
Objetivos.....	14
General.....	14
Específicos	14
Materiales y métodos.....	14
Materiales	15
Obtención de cromoglicato de sodio mediante secado por atomización	15
Inhaladores de polvo seco de diferentes resistencias	15
Preparación impactador en cascada.....	16
Prueba de recubrimiento.....	17
Flujo para evaluación aerodinámica.....	18
Determinación de la distribución de la droga en el impactador de cascada y PIPE...	18
Cuantificación de cromoglicato de sodio	20
Cálculo de MMPA	20
Caracterización de la eficiencia del inhalador	21
Resultados.....	22
Efecto del flujo y el recubrimiento de PIPE en el ángulo de pluma.....	22
Efecto del flujo y recubrimiento en los parámetros de eficiencia	24
Efecto del flujo y recubrimiento en la deposición total y distribución dentro de PIPE	26
Discusión	30
Conclusión.....	34
Referencias	35

Introducción

La administración de medicamentos por vía pulmonar ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias tales como asma, fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC)¹. La administración por inhaladores de polvo seco también conocidos como DPI por sus siglas en inglés (dry powder inhaler) son una alternativa sobre los inhaladores presurizados debido a sus ventajas como el fácil transporte, la alta capacidad de dosis, no usan propelentes que contaminan el medio ambiente y son fáciles de usar pues no requieren coordinar la inhalación del paciente con la activación del dispositivo. Sin embargo, debido a que la activación del dispositivo DPI depende de la fuerza de inhalación del paciente, **puede generar variaciones en la cantidad y forma** en que sus principios activos son aerosolizados.

El aumento del interés por las tecnologías de DPI ha incrementado significativamente los últimos 15 años. Esto se ve reflejado en la cantidad de estudios enfocados a entender los mecanismos de acción de los activos administrados por esta vía². Pero no solo el activo tiene un impacto en el efecto farmacológico. El diseño de los DPI también tiene un efecto significativo en el éxito de la terapia. Por lo tanto, hoy en día, la evaluación de la capacidad de los DPI de dispersar un polvo a lo largo del árbol respiratorio es una de las áreas más estudiadas pues permite asegurar que las drogas alcancen su diana biológica. El siguiente trabajo busca extender el alcance de dichas metodologías y dilucidar como esta información puede mejorar el desempeño y diseño de los DPI.

Debido a la alta prevalencia de las enfermedades respiratoria mencionadas y considerando la reducción de tratamientos con inhaladores presurizados debido al daño ambiental (pronto reemplazo de HFA 134a por HFA152 y 1234a) los DPI han comenzado a aumentar su

participación en el mercado. Por esto es necesario aumentar estudios de desarrollo e investigación tanto de formulaciones como de los dispositivos que las transportan^{3,4}.

Esta popularidad también se debe a que los activos administrados a través del pulmón disminuyen los efectos adversos a nivel sistémico, pues reducen la concentración plasmática de los mismos y evitan el metabolismo de primer paso⁵. Por lo tanto, si consideramos que el pulmón es un compartimento separado del torrente sanguíneo (**Figura 1**), es más eficiente tratar una enfermedad pulmonar por un inhalador que por la ruta oral.

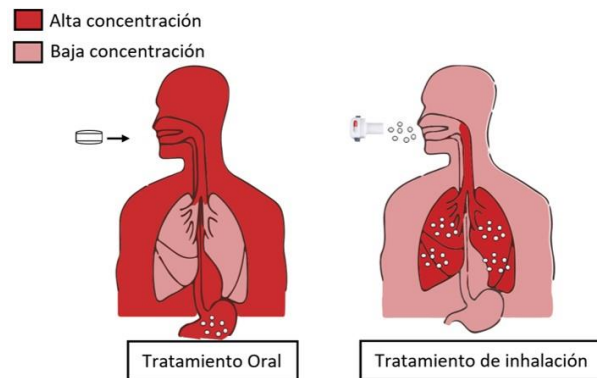


Figura 1: Comparación entre la administración de medicamentos por vía oral versus vía inhalatoria.

Los principales factores que afectan el desempeño de los DPI se relacionan tanto con el paciente (capacidad pulmonar y entrenamiento) como con el inhalador (resistencia, turbulencia, forma de boquilla, tamaño de capsula y tamaño de mesh). Pero la formulación y las características aerodinámicas de las partículas que la componen son también cruciales pues la combinación de estos tres factores dicta que tan eficaz será una terapia¹.

Aunque el factor humano es algo transversal en el uso de los medicamentos, la gran diferencia entre una forma farmacéutica oral y un inhalador es que en el primero, una vez se traga, el paciente tiene pocas probabilidades de influir en cómo se despliega la

tecnología. Pero, en el caso de los inhaladores, la aerosolización del activo dentro de las vías respiratorias, incluyendo la zona orofaríngea, es altamente dependiente de la técnica del paciente. Esto último significa que una pobre técnica puede llevar a la disminución de la eficiencia de la terapia debido a la deposición orofaríngea o una entrega parcial del principio activo en el caso que el paciente no pueda inhalar con todas sus fuerzas para dispersar el polvo⁶. En tal caso, un paciente con su capacidad respiratoria disminuida no logrará que las partículas lleguen las zonas más distales del pulmón, presentando un desafío importante debido al equilibrio entre el flujo generado al inhalar y la resistencia que opone el inhalador para desagregar las partículas micronizadas en un DPI⁷.

Para que un DPI pueda administrar polvo en el alveolo, estas partículas deben tener un tamaño aerodinámico menor a $5\mu\text{m}$ ⁸. El problema es que dichas partículas tienden a agregarse unas a otras, por lo que terminan comportándose como una partícula de mayor tamaño.

El ángulo de pluma ha sido una técnica de caracterización que se utiliza para evaluar la integridad de la válvula dosificadora y la boquilla¹⁷, la calidad y consistencia de la actuación del dispositivo en inhaladores presurizados¹⁹. Este parámetro permite la evaluación del rendimiento de un inhalador, basado en su eficacia en dirigir el aerosol por las vías orofaríngeas y de llegar al pulmón la mayor cantidad de partículas. Dicho de otra forma, un ángulo de pluma adecuado permite que la mayor cantidad del activo llegue a destino y no quede depositado en las vías aéreas superiores.

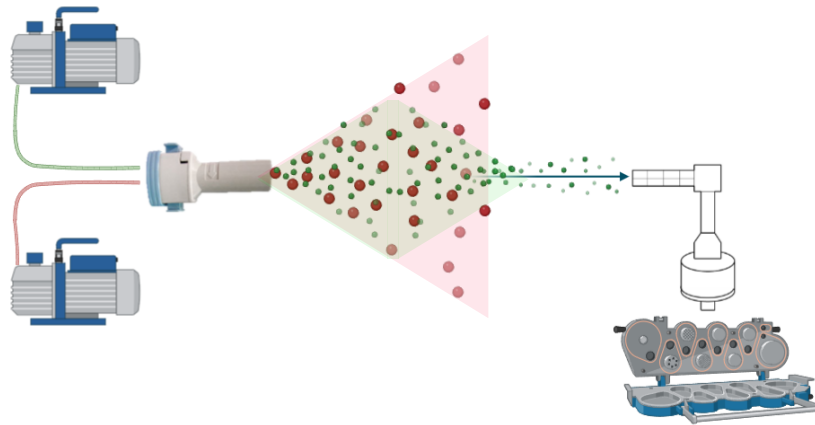
Por lo tanto, es fundamental el desarrollo de técnicas de caracterización in vitro capaces de predecir y correlacionar el ángulo de pluma de un aerosol con su potencial efecto in vivo y ayudar a comprender como afecta el rendimiento del mismo.¹⁷

La caracterización general de la pluma se convirtió por primera vez en un requisito reglamentario en 1998¹⁸ para inhaladores presurizados de dosis medida. Esto se evalúa generalmente con análisis de imagen de alta velocidad asistido por láser o también conocido como High Speed Laser Imaging (HSLI). Este es un método analítico que consiste en la obtención de imágenes bidimensionales mediante una cámara de alta velocidad utilizando un láser que ilumina las gotas de aerosol, midiendo su ancho y su ángulo.²⁰ En estas tecnologías, la prueba puede ser realizada debido a que la aerosolización de la formulación ocurre gracias a la energía cinética que el propelente entrega.

Sin embargo, los DPI no pueden ser actualmente evaluados para calcular su ángulo de pluma o su patrón de atomización ya que no pueden dispersar el polvo sin que el paciente inhale. Es por esto que actualmente los dispositivos DPI no tienen ningún requisito para la medición del ángulo de pluma debido a su complejidad en la obtención de las imágenes del flujo¹⁹.

Algunos investigadores en los últimos años han intentado solucionar este problema al utilizar bombas que fuerzan flujos de aire a través de los puertos de entrada de los DPI para artificialmente imitar la inhalación, y activar la dispersión del polvo fuera del dispositivo. El problema de esta estrategia, como se vé en la **figura 2**, es que la trayectoria de las partículas es guiada por un flujo de aire que las empuja (esferas y cono rojo) y no las direcciona de la misma forma que ocurre en un conducto cerrado como es la vía respiratoria superior (esferas y contorno verde). Esto tiene el potencial de afectar su ángulo haciendo que no sea un método fisiológicamente relevante.

De esta manera, si se implementara la aerodispersión asistida por la bomba de aire en conjunto con un impactador en cascada como el NGI las partículas serían dirigidas hacia las zonas distales independientemente del flujo utilizado, como se muestra en la **figura 2**.



Created in BioRender.com 

Figura 2: Representación del ángulo de pluma afectado por un puerto de inducción (verde), representación del ángulo de pluma afectado por la desaceleración de partículas en el aire libre (rojo).

A pesar de esto, un estudio realizado por Murphy demostró que el método aprobado por la FDA para dispositivos pMDI puede ser aplicado y la pluma puede ser caracterizable utilizando el sistema OL EnVision con cámara de prueba DPI.

Debido a que los métodos actuales de evaluación de geometría de pluma no permiten la simulación del flujo de aire, Moraga-Espinoza y colaboradores desarrollaron una versión de un puerto de inducción que permite su segmentación en 10 partes en donde se puede caracterizar cuanta muestra cae en cada segmento lo que permite realizar un mapeo de la distribución y por lo tanto, determinar el ángulo de pluma. Brevemente, el puerto de inducción segmentado se compone de tres partes generales: un cilindro desmontable de 8 segmentos, un codo de 90 grados y un cilindro secundario que permite la conexión a la

instrumentación del impactador. Todos juntos, tienen la misma geometría y área superficial interna que un puerto de inducción tradicional y reciben el nombre de PIPE.

PIPE fue probado en investigaciones realizadas por el Moraga-Espinoza y colaboradores utilizando inhaladores presurizados con diferentes características y se concluyó que es altamente reproducible su uso para la medición del ángulo de pluma mediante el cálculo de parámetro de ángulo de pluma de masa media o MMPA por sus siglas en inglés (Mass Median Plume Angle).

Un estudio anterior realizado por Iturriaga²⁵, utilizo dos inhaladores diferentes (plastiape y Handi-Haler de medianas resistencias) con una formulación de cromoglicato de sodio micronizado sin carrier, impactador en cascada y PIPE, muestra que el flujo de aire si puede tener un efecto significativo en la forma de pluma dependiendo del inhalador, donde **se observó que el ángulo de pluma disminuyó a medida que aumentaba la diferencial de presión**. Sin embargo, los datos obtenidos provienen de distintas combinaciones de resistencia e inhaladores, por lo tanto, se requiere que cada caso sea estudiado individualmente. Es por esto que en este trabajo se decidió utilizar inhaladores con la **misma geometría y distintas resistencias** y usarlos a distintos flujos de aire para generar distintos diferenciales de presión.

Este estudio sugiere llevar a cabo una medición del efecto de la resistencia de inhaladores DPI sobre la geometría de pluma con PIPE permitiendo una medición más parecida a la realidad, ya que las partículas son guiadas por el flujo de aire de inhalación, lo que simula el tracto respiratorio superior. Buscamos conocer el comportamiento el efecto de la resistencia y los diferenciales de presión en el ángulo de pluma MMPA utilizando las mismas condiciones que el estudio anterior a modo de reducir las variables y obtener resultados reproducibles.

A pesar de que en Chile no existen registros en el ISP de cromoglicato de sodio para su administración inhalada²¹, sigue siendo una buena alternativa para este proyecto, ya que podría ser un referente para su utilización en un futuro. Se espera con estos resultados contribuir a una teoría sobre la importancia del ángulo de pluma al crear una ecuación que permita entender como el ángulo de pluma se correlaciona con la eficiencia de inhalación (%RF), la deposición temprana y la resistencia del dispositivo.

La principal pregunta que este trabajo busca responder es si la amplitud del ángulo de pluma emitida por un DPI se correlaciona con el aumento de la deposición en el puerto de inducción. El objetivo último de este y otros trabajos de nuestro laboratorio es resolver esta pregunta diseñando una ecuación que permita determinar el peso que tiene el ángulo de pluma sobre la eficiencia de inhalación. Por lo tanto, busca generar la primera ecuación que considere el ángulo de pluma como un factor para predecir la eficiencia de inhalación total o comúnmente conocida como la fracción respirable.

Los resultados obtenidos en este estudio permitirán proyectar el efecto que tiene la variable capacidad respiratoria de los pacientes en el desempeño del inhalador.

Por último he de destacar que esta investigación fue posible gracias al trabajo colaborativo y patrocinado por la empresa Berry Global Inc, la cual nos facilitó todo su portafolio de inhaladores Plastiape para desarrollo de nuevas investigaciones en torno a eficiencia y desempeño de los inhaladores de polvo seco. Este apoyo nos permitió estudiar el efecto de la resistencia del inhalador sin modificar su geometría interna, lo que no podría ser posible si se compararan inhaladores de proveedores distintos.

Objetivos

General

- Determinar el efecto de la resistencia de un inhalador de polvo seco en el ángulo de pluma.

Específicos

- Cuantificar el efecto que tiene la resistencia de los inhaladores DPI en el ángulo de pluma
- Determinar el efecto que tiene el ángulo de pluma en el desempeño de los inhaladores DPI
- Desarrollar una ecuación que permita predecir el efecto de la pluma sobre el desempeño del inhalador.

Materiales y métodos

Materiales

Se utilizaron inhaladores de polvo seco de igual geometría interna pero diferentes resistencias obtenidas gracias a la compañía Berry Global Inc. Materias primas como el cromoglicato de sodio, el buffer fosfato pH 7,4 preparado con hidróxido de sodio y fosfato mono potásico di hidratado obtenidos de Merk. La vaselina y el hexano utilizados para el recubrimiento fueron obtenidos de Vimaroni S.A, las cápsulas utilizadas Coni-Snap de hipromelosa tamaño 3 fueron obtenidas de Capsugel-Lonza, las placas de 96 pocillos de fondo plano fueron obtenidas de Thermo Scientific.

La **figura 3** resume la línea de trabajo que se llevó a cabo durante el proyecto, donde se destacan puntos clave como la aerodispersión del principio activo, su masado y carga en capsula, preparación del equipo NGI con su respectivo inhalador, recolección de las muestras, traspaso a placas 96 pocillos y lectura en espectrofotómetro UV/Vis Synergy H1M (Biotek Instruments, Santa Clara, CA, US), obtención de resultados y posterior discusión.

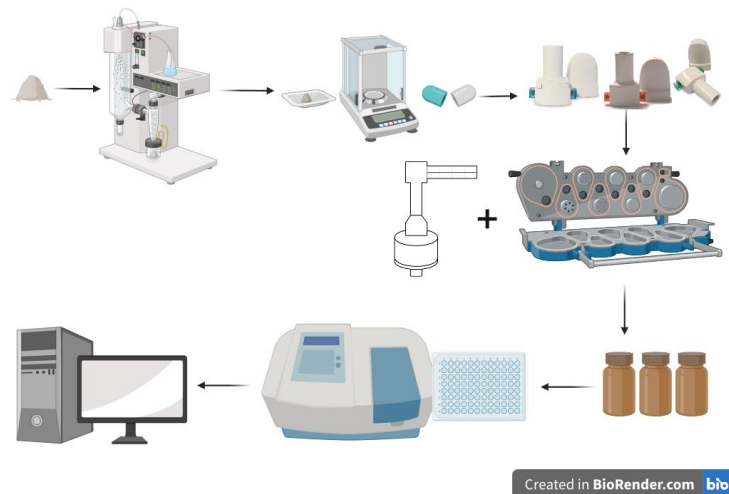


Figura 3: Diagrama para caracterización aerodinámica

Obtención de cromoglicato de sodio mediante secado por atomización

El cromoglicato de sodio usado como activo fue procesado por secado por atomización en el equipo Buchi B290 para la obtención de partículas en el rango inhalable (1-5 μm) utilizando los siguientes parámetros de secado: 60mmHg, 120 grados secado y 3 mL de flujo de alimentación.

Inhaladores de polvo seco de diferentes resistencias

Se utilizaron tres inhaladores Plastiapae con igual geometría interna pero diferentes resistencias, siendo media, alta y ultra alta, todos provenientes de la compañía Berry Global Inc. Los inhaladores fueron cargados con una capsula con 20 miligramos de cromoglicato de sodio previamente procesado. Cada prueba se realizó por triplicado para cada flujo e inhalador. Los flujos que se utilizaron fueron calculados mediante un flujómetro y

manómetro utilizando una capsula perforada para generar un diferencial de presión de 1, 2, 3 y 4 kpa.

Los inhaladores DPI de Berry Global Inc son identificados en base a sus características de resistencia (MR, HR y UHR), tamaño de capsula (#2 y #3) y tamaño de boquilla (Mod 7 y Mod 8). Los inhaladores utilizados en esta investigación corresponden a RS01 Mod 7 MD #3, RS01 Mod 7 HR #3 y RS01 Mod 7 #3. Como se muestra en la **figura 4**.



Figura 4: DPI utilizados donados por la compañía Berry Global

Preparación impactador en cascada

El equipo fue ensamblado según lo señala el capítulo <601> de la farmacopea estadounidense y el manual del fabricante (Copley S.A.)⁹. Para una correcta captura y recolección de las partículas se recubrieron los platillos del NGI con 1 mL de una solución vaselina líquida en hexano al 1% (v/v) para el platillo 1 y el MOC; y con 0,5 mL en los platillos 2 al 7 (**figura 5**). Este recubrimiento permite prevenir el rebote de partículas, asegurando que su impacto por inercia ocurra en los niveles que corresponden sin generar artefactos en las mediciones.

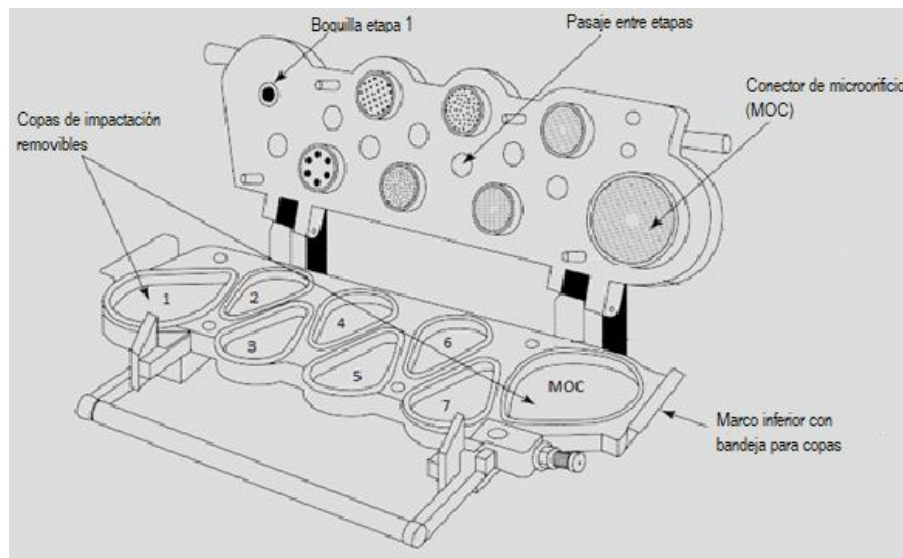


Figura 5: Impactador de cascada Next Generation Impactador⁹

Una vez que los platillos estuvieron secos, se dispusieron en la bandeja del impactador y se cerró su tapa asegurándose de que el equipo quedó hermético. Finalmente se ensambló

el pre-separador (encargado de capturar partículas mayores a $10\mu\text{m}$) y por último PIPE según indica la **figura 6**.

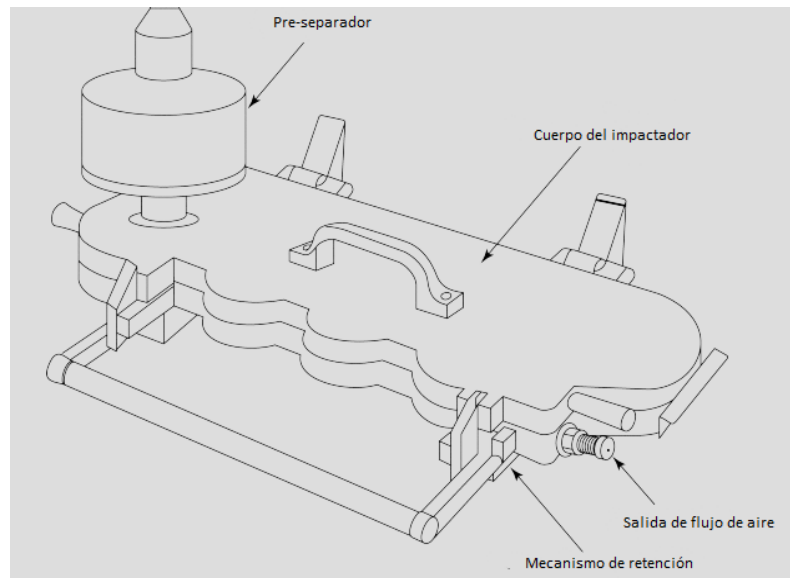


Figura 6: Impactador de cascada Next Generation Impactador⁹

Prueba de recubrimiento

Para determinar el efecto del recubrimiento del puerto de inducción en el desempeño del inhalador, la mitad de las pruebas fueron llevadas a cabo con PIPE sin recubrir, y la segunda mitad de pruebas fue recubierto con una solución de vaselina en hexano 1% de la misma forma que los platillos del NGI. Esto se realizó con la finalidad de comprobar si la velocidad aumentada del flujo de aire en inhaladores de alta resistencia aumenta la fracción respirable por fraccionamiento o friabilidad de las partículas tras impactar en la superficie de PIPE al comparar resultados con y sin recubrir. Tener en cuenta que la cantidad de pruebas realizadas tanto para PIPE recubierto como para PIPE sin recubrir fueron las mismas y bajo los mismos parámetros.

Para recubrir a PIPE se utilizó la solución de vaselina en hexano al 1% considerando para TOP y BOT 0,1 mL, Elb con 0,2 mL y Th con 0,5 mL. Una vez seco se procedió al ensamblado de PIPE como se muestra en la **figura 7**.

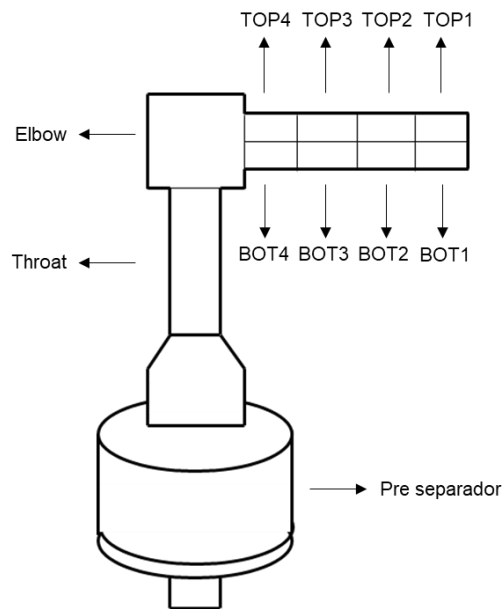


Figura 7: Diseño de PIPE

Flujo para evaluación aerodinámica

Para el ajuste del flujo que cumpla con alcanzar una diferencial de presión de 1, 2, 3 o 4 kPa entre el inhalador y la presión ambiental se utilizó un flujómetro para determinar el volumen de aire que pasa por el dispositivo en un tiempo específico. A cada flujo se midió la presión con un manómetro en mbar y con esto se realiza el cálculo del tiempo que se dejará pasar el flujo de aire, que corresponde al tiempo que tarda la bomba en succionar 4L de aire. Lo último debido a que un pulmón en promedio tiene una capacidad de 4L cuando se llena con aire en su máxima capacidad.

Determinación de la distribución de la droga en el impactador de cascada y PIPE

Para determinar la distribución del activo debemos conocer las secciones en las que está dividida y que fueron recolectadas. Primero se encuentra el inhalador DPI unido al molde, el cual permite unir el inhalador con PIPE. Posteriormente viene el preseparador y finalmente los platillos del 1 al MOC. Como se muestra la **figura 8**.



Figura 8: *Impactador en cascada Next Generation Impactor (NGI) preparado para el ensayo de impactador en cascada junto al Puerto de Inducción Evaluador de Plumas (PIPE)*

La prueba se llevó a cabo a cuatro diferentes flujos para generar diferenciales de presión de 1, 2, 3 y 4 kPa, esto debido a que la distribución de partículas depende de la capacidad inspiratoria del paciente. El ensayo de 4kPa y los resultados correspondientes a ellos para cada inhalador fueron analizados por separado pues se considera la condición normal de análisis para los inhaladores farmacéuticos ¹⁰.

El flujo que simula la inhalación es controlado por una bomba de vacío de alta capacidad (Copley Ltda), la cual permite modificar el flujo de aire hasta alcanzar el diferencial de presión requerido. El tiempo de inhalación será calculado teniendo en cuenta el tiempo necesario para llenar a máxima capacidad pulmonar, que en promedio son 4L, y el flujo utilizado, siendo controlado por una válvula doble solenoide.

Luego de hacer la simulación de la inhalación se procede a la recolección del activo por medio de buffer fosfato pH 7,4¹². Esta recolección se hizo dependiendo de la cantidad de polvo depositada en cada sección tanto del NGI como de PIPE (en cantidades conocidas), el cual luego fue leído por espectrofotometría UV-VIS.

Los parámetros que son evaluados en este ensayo son los siguientes: Análisis de diámetro de masa media aerodinámica (MMAD), caracterización de la eficiencia por determinación de la fracción de partículas finas (FPF), que nos permite evaluar la eficiencia de los DPI al modificar los flujos. El FPF determina que fracción de las partículas se encuentra bajo las 5 micras^{13, 14}. También se calculará la dosis emitida (ED), que toma en cuenta la cantidad de sustancia depositada en la totalidad del equipo solo considerando la sustancia emitida desde el dispositivo¹⁵ y dosis de partículas finas (FDP) que corresponde a la masa de partículas que tiene un tamaño menor a 5 μm respecto a la ED ¹⁶.

MMAD fue calculado para todos los tiros como parámetro para determinar el tamaño de las partículas donde el 50% de ellas se depositan a lo largo del NGI¹⁰. Este parámetro permite categorizar a la mayoría de las partículas que son aerosolizadas por el DPI, entregando un valor que de ser $< 5 \mu\text{m}$, significa que la mayoría del aerosol que es emitido se deposita a lo largo del árbol respiratorio hasta su zona distal (alveolo)¹¹.

Al obtener este resultado para los cuatro flujos diferentes, se pudo comparar y demostrar si el flujo era un factor que afecta al ángulo de pluma. Para recolectar la droga depositada en PIPE, igualmente se recolectó con buffer fosfato de pH 7.4.

Cuantificación de cromoglicato de sodio

Todos los datos obtenidos fueron leídos en espectrofotómetro UV-Vis por el lector de placas Synergy H1M a 345 nm^{22} mediante placas de 96 pocillos. Cabe mencionar que para esto fue necesario la construcción de una curva de calibrado utilizada para el cálculo de masa depositada a lo largo de PIPE y el impactador en cascada.

Cálculo de MMPA

El ángulo de pluma de masa media para inhaladores de polvo seco o MMPA (Mass Median Plume Angle) es evaluado gracias al puerto de inducción evaluador de plumas o PIPE (Plume Induction Port Evaluator) y corresponde a la determinación del ángulo de pluma basado en masa depositada a lo largo de una tubería. Al estar seccionado PIPE permite recolectar la masa de droga depositada a lo largo de sus secciones. La distribución de partículas depositadas sigue un modelo de distribución normal lo que permite caracterizar a la población depositada como el ángulo medio donde el 50% de las partículas impactan dentro del puerto de inducción.

El MMPA se calcula en base a los ángulos geométricos o ángulos efectivos (E_a), formados desde el mesh del inhalador DPI hasta Elbow, como muestra en la **figura 9**. La distancia que hay entre el mesh y la salida del inhalador se llamó N_0 y el diámetro interno de la boquilla se llamó M_0 . Así, la ecuación fue utilizada para calcular los ángulos medios de cada sección (ej. sección 1 = Top1 + Bot1). Estos ángulos medios permiten caracterizar a las partículas depositadas en cada sección y determinar cómo se distribuyen a lo largo del cilindro inicial. El cálculo de la media de dicha distribución permite calcular los valores de MMPA, lo que fue calculado para cada flujo.

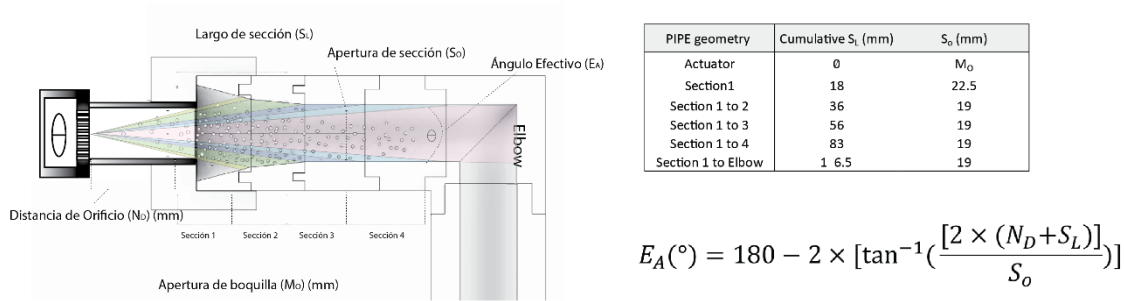


Figura 9: Cálculo de los Ángulos Efectivos (E_a) formados entre la malla de impacto en el inhalador y cada sección de PIPE. Figura readaptada de Moraga-Espinoza et al.

Caracterización de la eficiencia del inhalador

Para la determinación de la eficiencia de los inhaladores fueron utilizados los siguientes parámetros:

Dosis total emitida (ED): Toma en cuenta la cantidad de sustancia depositada en la totalidad del equipo, sin tomar en cuenta lo que queda en el inhalador y en la capsula, es decir, solo considera lo que es emitido desde el dispositivo.²³

Fracción de partículas finas (FPF): Corresponde a la fracción o porcentaje de partículas que se encuentra bajo las cinco micras respecto a la dosis emitida ([partículas <5 μ m/dosis emitida]*100). Solo estas partículas tienen la capacidad de penetrar hasta las zonas profundas del pulmón y ejercer un efecto farmacológico^{13,14}.

Dosis de partículas finas (FPD): Este parámetro posee el mismo concepto de FPF, pero referido a masa depositada en el NGI, tomando en cuenta de los platillos que representan dicho rango de tamaño de partícula. Es importante considerar que dicho rango cambia según el flujo de aire utilizado en el NGI y se presenta como masa y no como porcentaje²³.

Fracción respirable (RF): es la fracción de las partículas inhalables capaces de penetrar en las vías respiratorias no ciliadas²⁴ con respecto a la dosis total cargada en la cápsula ([partículas <5 μ m/ dosis total]*100).

Resultados

Efecto del flujo y el recubrimiento de PIPE en el ángulo de pluma

Los datos obtenidos mediante espectrofotometría fueron interpolados en sus respectivas curvas de calibrado para obtener las concentraciones en miligramos de cada sección tanto de NGI como de PIPE. Se calculó el promedio y desviación estándar para cada parámetro indicados previamente, los que están reflejados en las siguientes figuras:

La **figura 10** muestra la variación del ángulo de pluma cuando aumenta la diferencial de presión para el inhalador de ultra alta resistencia (UHR). El gráfico muestra adicionalmente el efecto de recubrir el puerto de inducción con vaselina siendo generalmente MMPA menor para PIPE con recubrimiento.

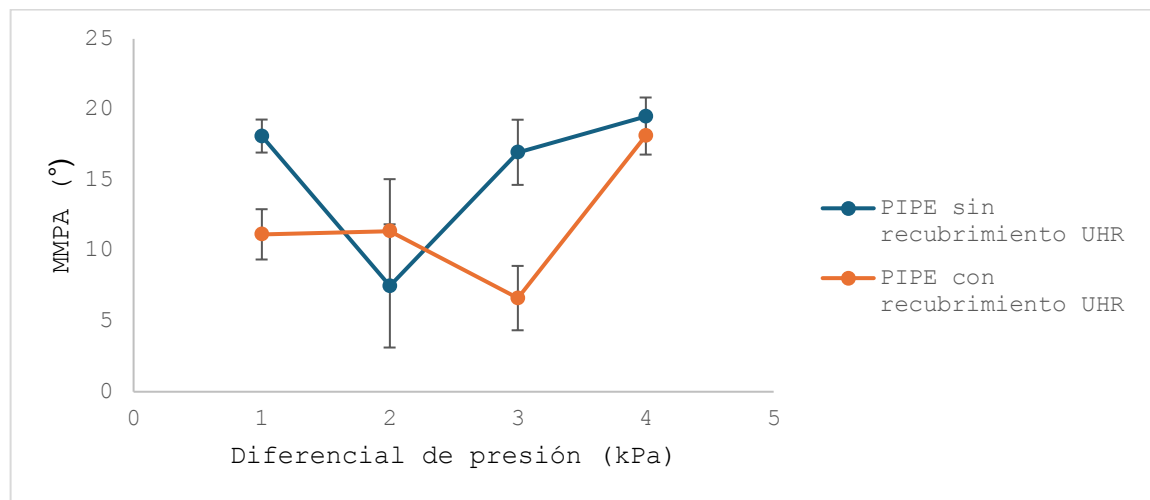


Figura 10: Comparación de MMPA entre PIPE con y sin recubrimiento frente al cambio diferencial de presión en el inhalador de ultra alta resistencia (UHR).

En el caso de la **figura 11** se observa que los ángulos generados por el inhalador de alta resistencia (HR) no cambiaron de forma significativa cuando PIPE fue recubierto.

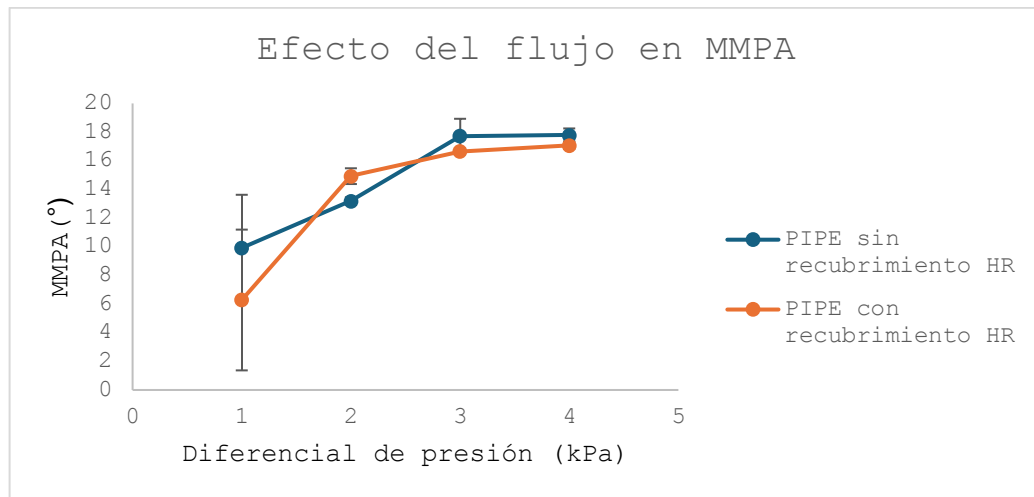


Figura 11: Comparación de MMPA entre PIPE con y sin recubrimiento frente al cambio diferencial de presión en el inhalador de alta resistencia (HR).

Finalmente, la **figura 12** muestra el efecto del recubrimiento en presencia del flujo de aire que asciende. En este caso, a la mayoría de los diferenciales de presión evaluados no se ven diferencias en los ángulos con o sin recubrimiento, aunque a 2 kPa si hay una diferencia significativa.

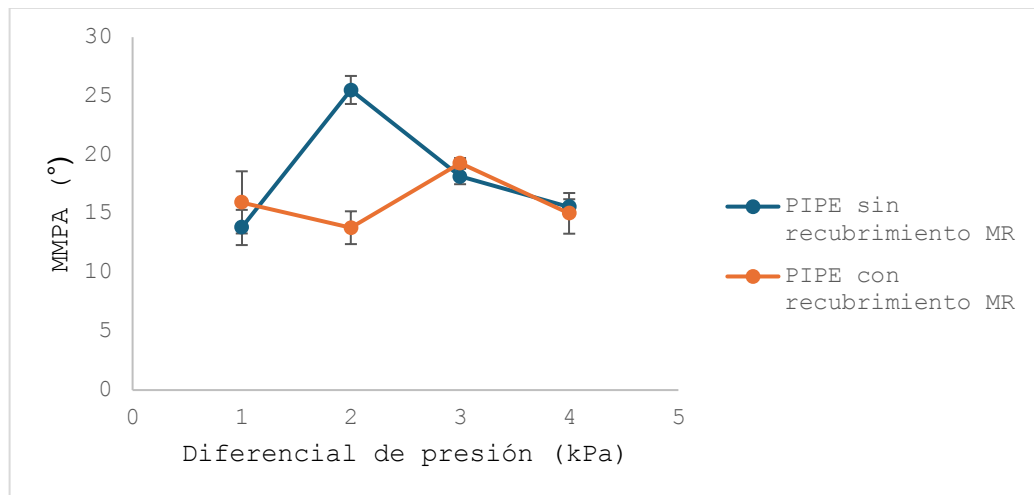


Figura 12: Comparación de MMPA entre PIPE con y sin recubrimiento frente al cambio diferencial de presión en el inhalador de alta resistencia (MR).

Los resultados del ángulo de pluma (MMPA) a diferentes diferenciales de presión y el efecto de la resistencia de los inhaladores (media, alta y ultra alta resistencia) puede ser observado en la **figura 13**. La Figura pone en comparación los resultados con (colores lisos) y sin recubrimiento (colores con patrón), reflejando que, en su mayoría, el valor de MMPA disminuye ligeramente cuando el puerto de inducción esta recubierto.

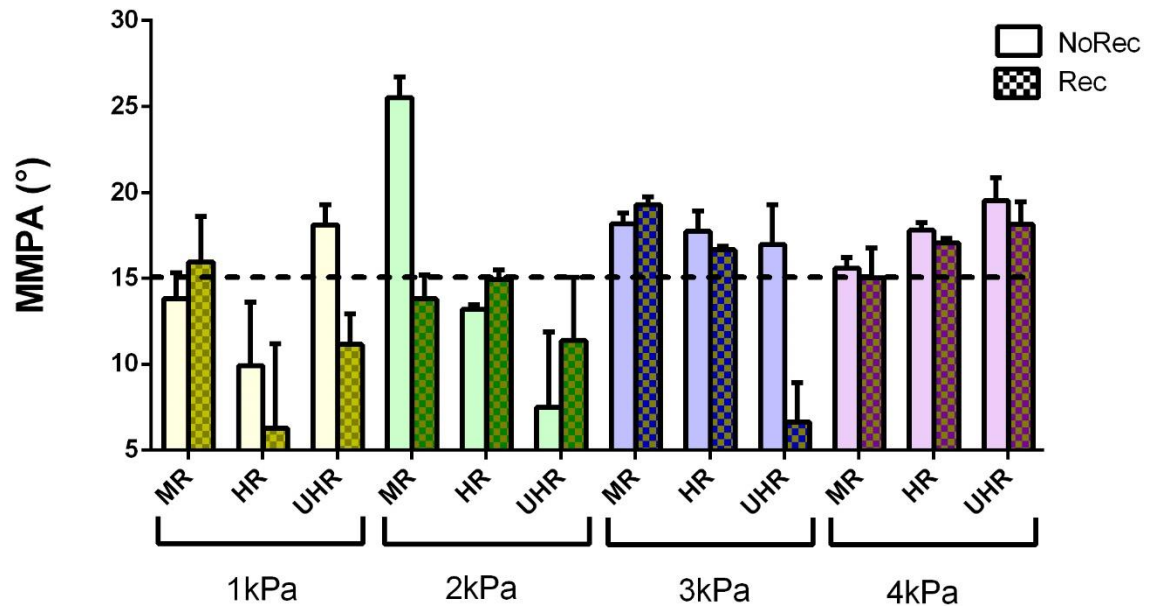


Figura 13: Efecto de dispositivo y el flujo de aire durante la inhalación del paciente sobre el ángulo de pluma de masa media (MMPA). A medida que aumenta el diferencial de presión mayor es el flujo utilizado para evaluar los inhaladores. Se comparan los patrones cuando el puerto de inducción está recubierto y cuando no lo está.

Efecto del flujo y recubrimiento en los parámetros de eficiencia

La **figura 14** muestra la variación de la fracción de partículas finas (%FPF) al utilizar diferentes diferenciales de presión. Cada diferencial de presión generado es alcanzado con diferentes flujos de inhalación, dependiendo de la resistencia de los inhaladores. Nuevamente los resultados son presentados como una comparación entre los resultados de PIPE recubierto y no recubierto.

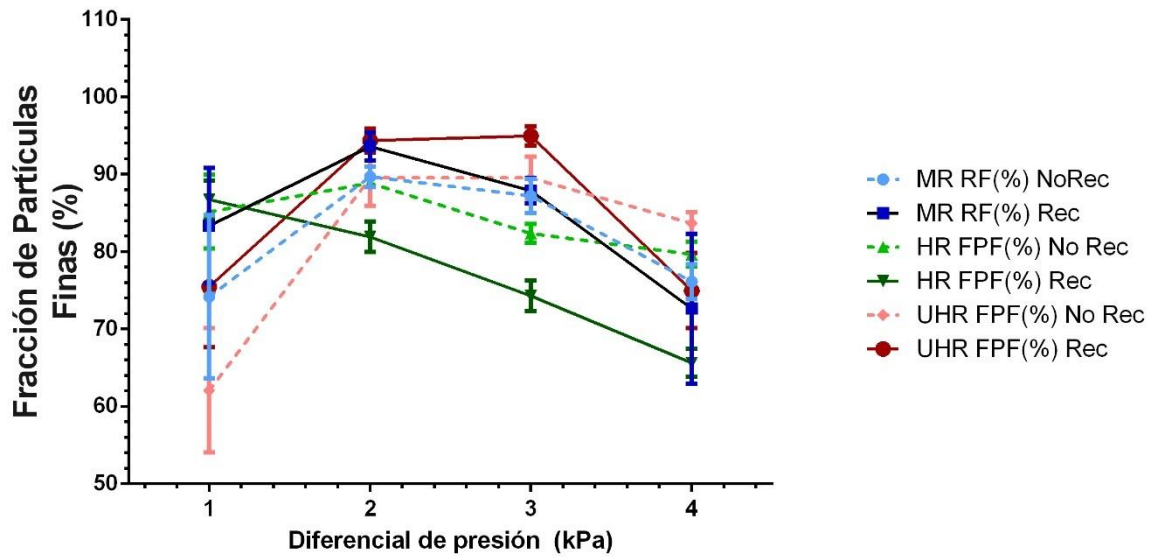


Figura 14: Efecto del flujo de inhalación sobre la fracción de partículas finas (%FPF) utilizando PIPE con y sin recubrimiento en inhaladores de polvo seco con diferentes resistencias: media (MR), alta (HR) y ultra alta (UHR). Los flujos de inhalación se presentan normalizados como el diferencial de presión generado durante la activación del inhalador.

Debido a que los valores de FPF resultaron ser elevados a todas las condiciones, se consideró evaluar la fracción respirable (RF) como un indicador que pueda evidenciar mejor la eficiencia de aerosolización. La **figura 15** representa el efecto del flujo de aire en la fracción respirable.

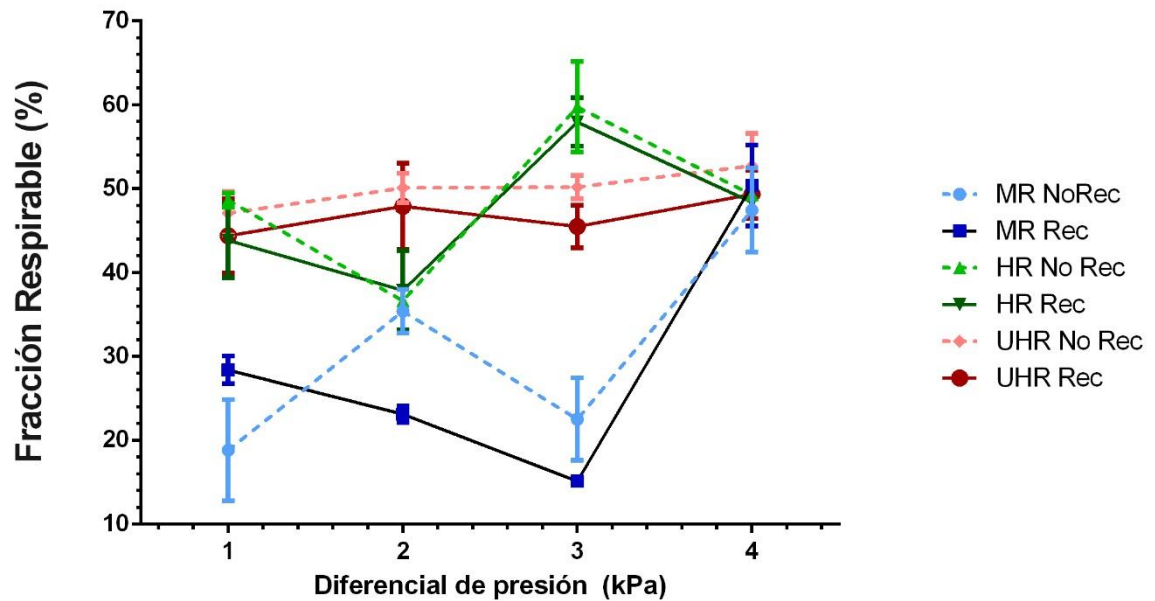


Figura 15: Efecto del flujo de inhalación sobre la fracción respirable (%RF) utilizando PIPE con y sin recubrimiento en inhaladores de polvo seco con diferentes resistencias: media (MR), alta (HR) y ultra alta (UHR). Los flujos de inhalación se presentan normalizados como el diferencial de presión generado durante la activación del inhalador.

De forma similar se evaluó el efecto del flujo sobre el diámetro aerodinámico de masa media (MMAD) cuando el puerto de inducción estaba sin y con recubrimiento. La **figura 16** muestra el efecto del flujo de aire sobre el MMAD considerando el efecto que tiene la resistencia de los inhaladores.

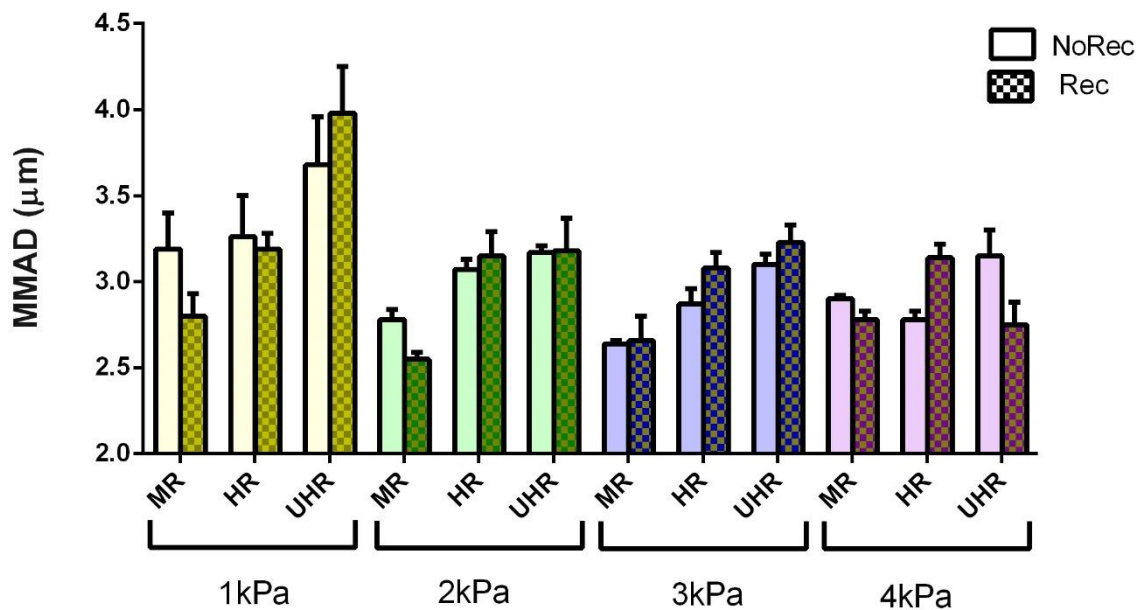


Figura 16: Efecto de dispositivo y el flujo de aire durante la inhalación del paciente sobre el diámetro aerodinámico de masa media (MMAD). A medida que aumenta el diferencial de presión mayor es el flujo utilizado para evaluar los inhaladores. Se comparan los patrones cuando el puerto de inducción esta recubierto y cuando no lo está.

Efecto del flujo y recubrimiento en la deposición total y distribución dentro de PIPE

El efecto del flujo y el recubrimiento del puerto de inducción en la masa de principio activo depositada fue evaluada y calculada (**Figura 17**). En general, el porcentaje de droga depositada en PIPE aumenta a medida que aumenta el flujo de aire y más aún si esta recubierto.

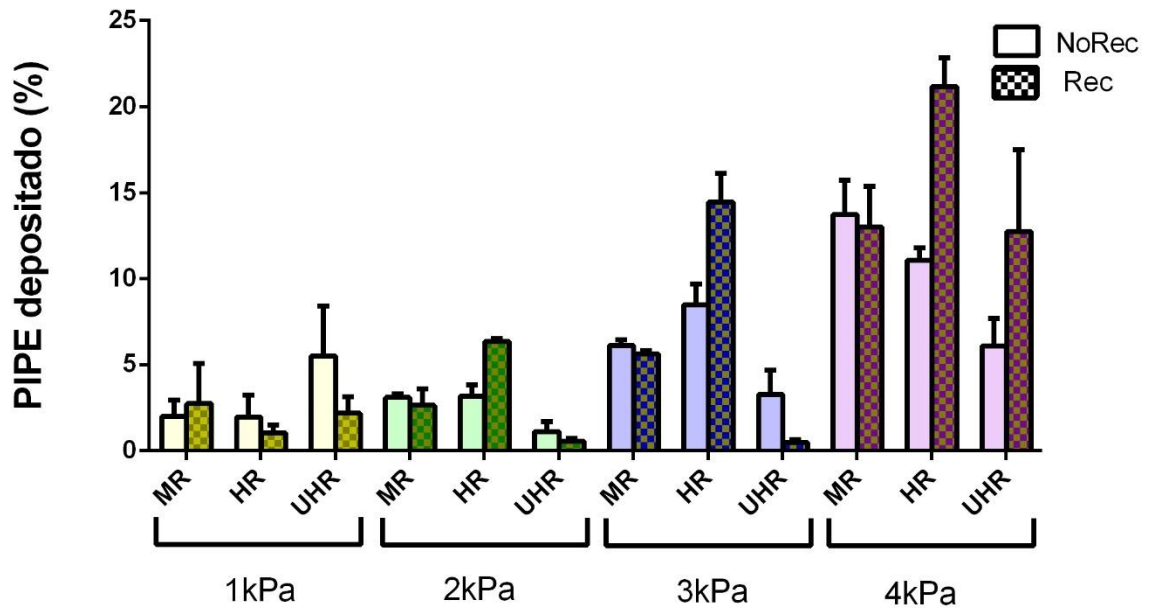


Figura 17: Efecto de dispositivo y el flujo de aire durante la inhalación del paciente sobre la fracción depositada en el puerto de inducción segmentado PIPE. Se comparan la deposición prematura en el puerto de inducción cuando está o no recubierto.

El puerto de inducción presenta un incremento en la masa depositada cuando esta recubierto. La distribución del polvo emitido por los tres inhaladores a lo largo del cilindro de entrada del puerto de inducción segmentado es reportada en las **figuras 18, 19 y 20** según los ángulos de corte. En general, la deposición avanza hacia los ángulos más pequeños a medida que aumenta el flujo en todos los casos.

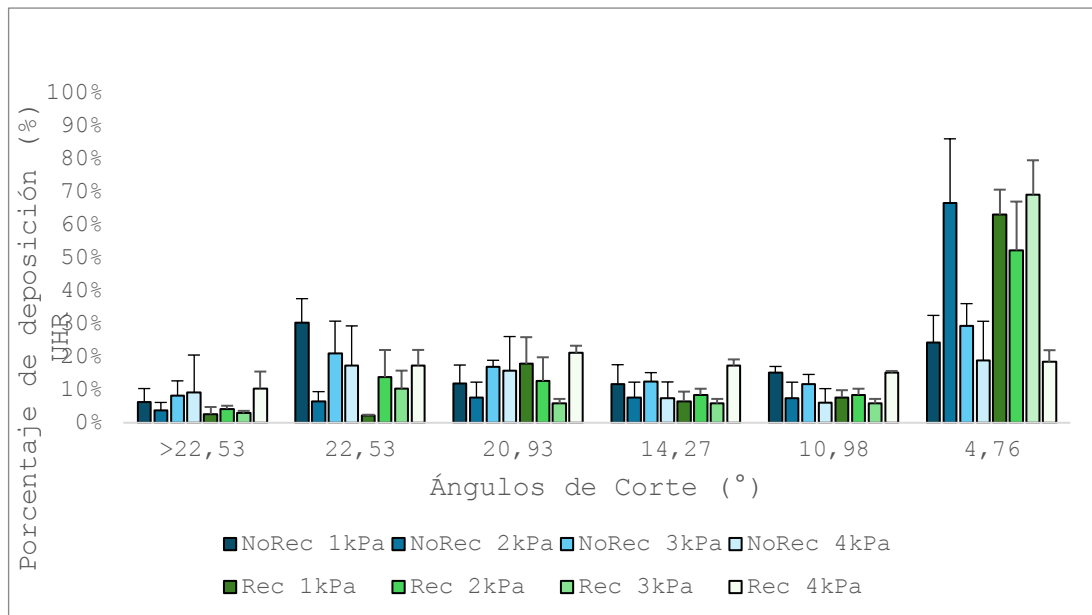


Figura 18: Comparación de la distribución de cromoglicato de sodio según la diferencial de presión aplicada en PIPE recubierto y no recubierto en el inhalador UHR.

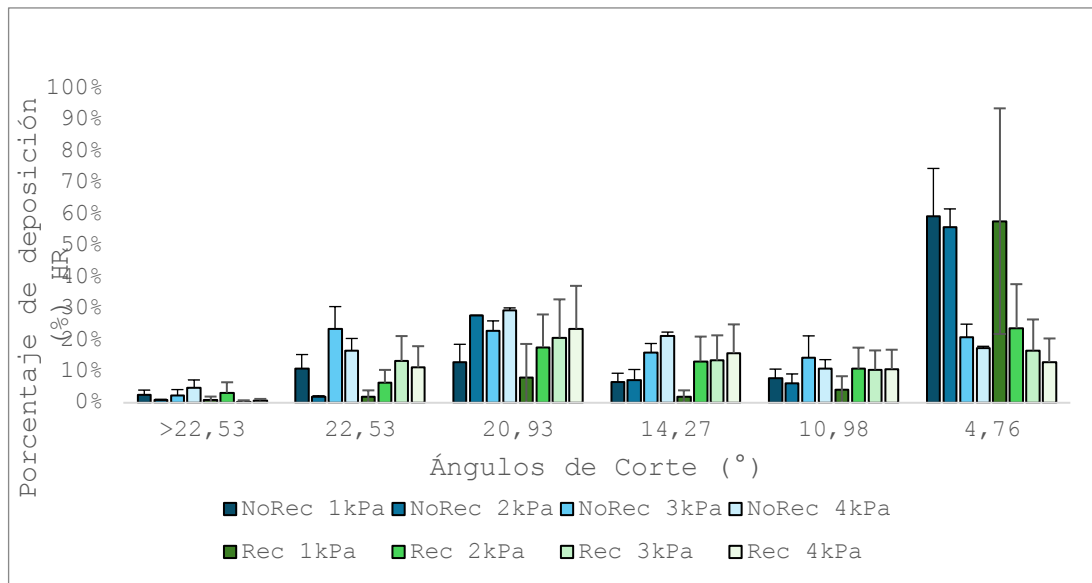


Figura 19: Comparación de la distribución de cromoglicato de sodio según la diferencial de presión aplicada en PIPE recubierto y no recubierto en el inhalador HR.

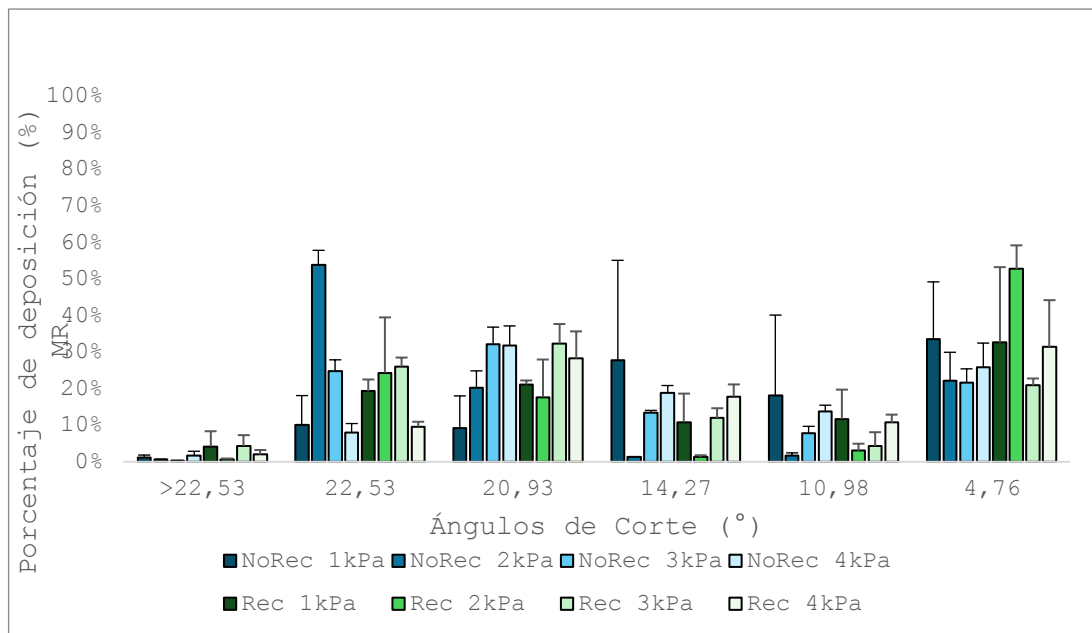


Figura 20: Comparación de la distribución de cromoglicato de sodio según la diferencial de presión aplicada en PIPE recubierto y no recubierto en el inhalador MR.

Como resumen de esta la información mostrada en los gráficos anteriores, se presenta la **figura 21**, la que calcula la sumatoria de masa depositada en cada sección para los cuatro flujos probados en cada inhalador. La figura por lo tanto refleja el efecto general del recubrimiento en la distribución a lo largo del puerto de inducción y no busca representar la variable del flujo.

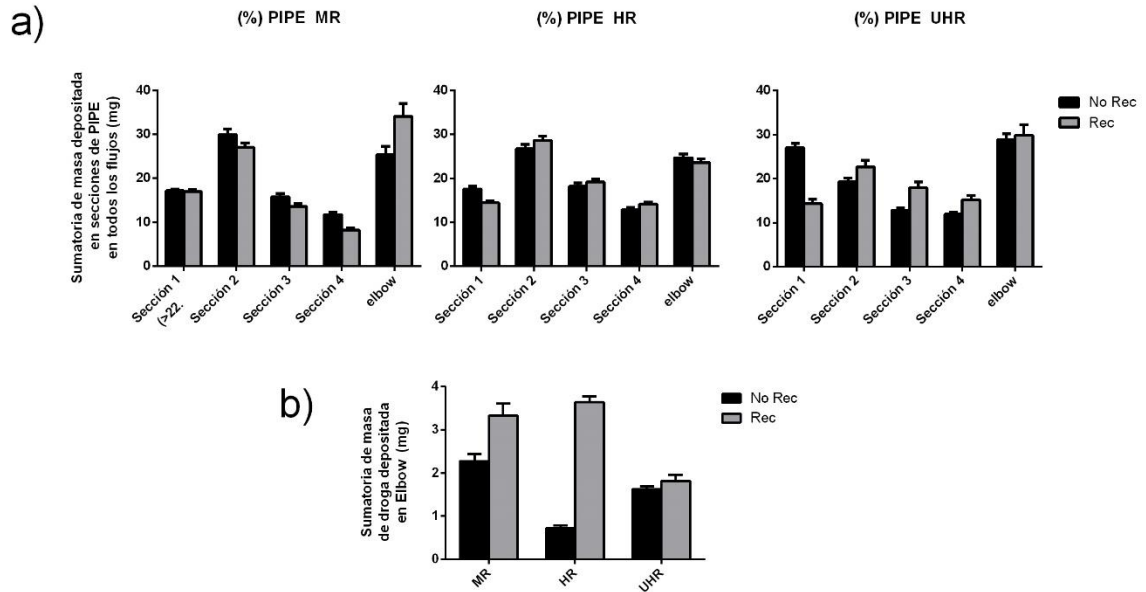


Figura 21: a) Comparación de la distribución de cromoglicato de sodio (Cs) como sumatoria de masa depositada a todos los flujos de aire evaluados en PIPE recubierto y no recubierto. b) Sumatoria de Cs depositado solo en la región del codo (Elbow). Los datos se presentan para los tres inhaladores de resistencia media (MR), alta (HR) y ultra alta (UHR).

Discusión

El ángulo de pluma de DPIs aumenta cuando el flujo de inhalación se hace mayor

De igual forma a lo reportado por Moraga-Espinoza y colaboradores en su investigación con PIPE e inhaladores presurizados, el flujo de aire tiene un efecto significativo en el ángulo de pluma²⁶. Sin embargo, en esta ocasión ocurre lo contrario. Los ángulos aumentan a medida que el flujo crece (**Figura 13**). En lo reportado por Moraga-Espinoza (2018), los inhaladores presurizados o pMDI por sus siglas en inglés (pressurized metered dose inhaler) habían sido evaluados en ausencia de flujo (0 L/min) y a un flujo de 30 L/min para determinar el efecto del flujo sobre el ángulo. En dicho estudio, el uso de un flujo que simula la inhalación del paciente redujo los valores de MMPA en $\sim 5^\circ$ (0 L/min = $\sim 30^\circ$ a 30 L/min = $\sim 25^\circ$). Los pMDIs son considerados dispositivos de baja resistencia y, por lo tanto, su diferencial de presión en kPa no puede ser calculado para hacer un equivalente con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, en nuestro caso, a medida que el flujo aumenta y por consiguiente el diferencial de presión generado, mayor fue el valor de MMPA calculado. Tras analizar los patrones de deposición sin recubrimiento dentro de PIPE (**Figuras 18,19 y 20**) se pudo apreciar que, para todos los inhaladores, la deposición en sección 2 (ángulo medio = $22,53^\circ$) aumentó y en el codo de la tubería (elbow) disminuyó a medida que el flujo aumentaba. Esto último permite hipotetizar que a medida que el flujo aumenta, las partículas son guiadas de forma más eficiente en el flujo de inhalación, reduciendo así su prematuro impacto en la zona distal del puerto de inducción lo que cambia la distribución hacia ángulos de mayor amplitud.

Los datos reportados en este estudio coinciden con grabaciones obtenidas en un inhalador comercial (Aerolizer®) cargado con lactosa y con aerosolización asistida con una bomba de aire (**Figura 22**). En dicho estudio se aprecia un aumento de la altura de la pluma emitida por el inhalador cuando el flujo se incrementa lo que refleja que es posible que los datos obtenibles por HSLI, sean hasta cierto punto comparables con los obtenidos por PIPE.

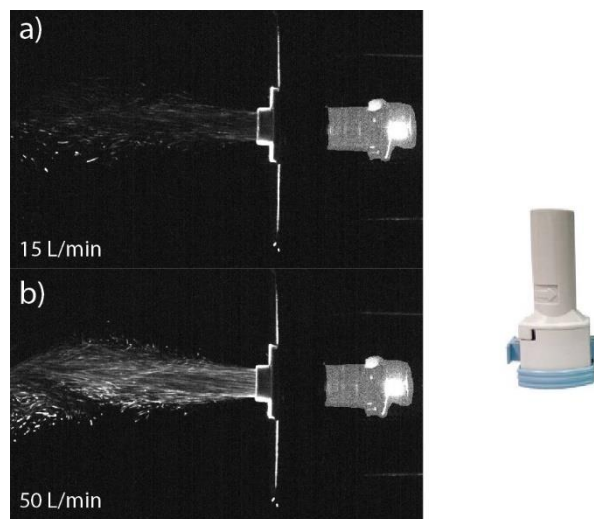


Figura 22: Estudio de aerosolización de inhalador de polvo seco Aerolizer® asistido por flujo de aire administrado a través de los puertos de entrada laterales. La imagen es un fotograma obtenido por una cama de alta velocidad asistida por un láser lineal que ilumina la pluma. La imagen representa la emisión de la pluma a) con un flujo.

El aumento de ángulo observado en la imagen asistida por láser y el aumento en la deposición en la sección 2 y 3 (ángulos sobre 20°~) a medida que el flujo aumenta (**Figuras 18 a 20**) permiten validar por técnicas separadas nuestros hallazgos. Por lo tanto, es posible decir que existe una relación directa del flujo de inhalación en el ángulo de pluma, el cual se abre a medida que el flujo de inhalación aumenta.

El rendimiento de los inhaladores aumenta cuando el ángulo se encuentra entre 15 y 20 grados

Para determinar el efecto del ángulo sobre la eficiencia de inhalación, una correlación entre MMPA y la fracción respirable (RF) fue llevada a cabo. La **figura 23** muestra la relación entre ángulo de pluma (MMPA) y la eficiencia entendida como la fracción de partículas con tamaño menor a 5 micras respecto al total de la dosis cargada en el inhalador.

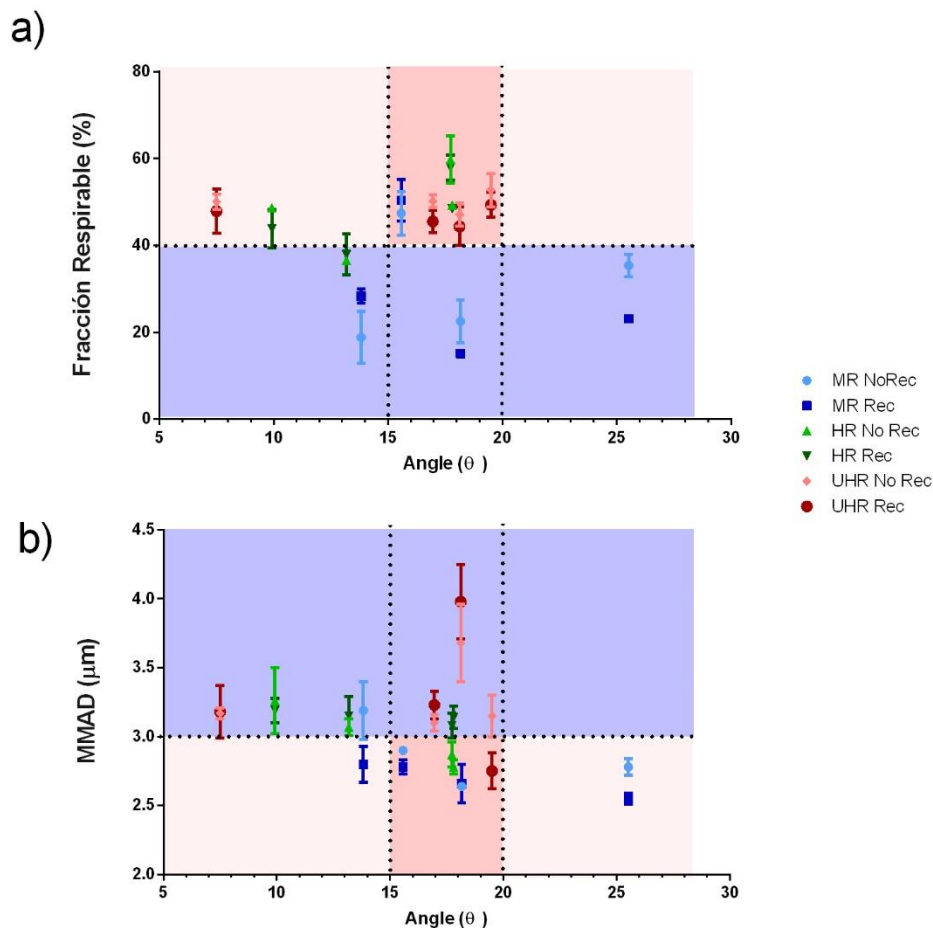


Figura 23: *Gráfico de eficiencia de aerosolización y tamaño aerodinámico (MMAD) de partícula en función del ángulo de pluma promedio (MMPA). Los datos de MMPA, RF y MMAD se obtuvieron del mismo estudio con un impactador en cascada conectado al puerto de inducción evaluador de plumas (PIPE) y son el promedio de un n=3. Las líneas punteadas representan el límite superior de RFs reportados en productos de mercado para DPI, y el rango de ángulos que contiene a la mayoría de los resultados sobresalientes. La eficiencia se presenta para los tres inhaladores de polvo seco con resistencias media (MR), alta (HR) y ultra alta (UHR).*

En una primera instancia, un modelo basado en diseño experimental tipo box behnken fue evaluado para determinar el efecto del flujo de aire y la resistencia (calculada) de los inhaladores en el desempeño del mismo. En ese modelo se consideró como respuesta a la fracción respirable (RF). El modelo mostró una pobre correlación ($R^2=0,25$), por lo que no pudo ser usado para describir cuál rango de ángulo podía optimizar el RF. Sin embargo, para buscar una zona de optimización, se graficaron los resultados encasillando la zona de ángulos de pluma donde se encontrara el 50% de los datos más altos en RF. El punto de corte que se consideró como alta fracción respirable (RF) fue 40% basado en los reportes de la literatura para productos de mercado tipo DPI²⁷. Así, se determinó que los inhaladores con plumas de ángulos entre 15 y 20 grados parecen ser los que maximizan la eficiencia del inhalador, sin importar la resistencia que este tenga pues los tres tipos de inhaladores residen en el mismo cuadrante (**Figura 23 (a)**). Este método de acotamiento de datos es claramente insuficiente si el objetivo es aprender a modular la eficiencia de los inhaladores basado en el ángulo de pluma. Sin embargo, permite dar las primeras directrices para comenzar la siguiente etapa de la investigación.

Por otro lado, la misma estrategia se utilizó para determinar el ángulo de pluma de los aerosoles con menor tamaño de partícula aerodinámico (MMAD). En este caso se utilizó como punto de corte las 3 μm descritas por Peter Byron en su conocida publicación de 1986, donde se sientan las bases de la aerodinámica de partículas respirables²⁸. Así la **figura 23 (b)**, se puede observar que, aunque todos los ensayos presentaron un MMAD menor a 5 μm , un pequeño grupo con representantes de todos los inhaladores logro el menor tamaño de partícula solo cuando se situaba en el cuadrante dentro del mismo rango de 15 y 20 grados.

Debido a la falta de correlaciones, no se pudo llegar a la formula deseada que permita integrar todas las variables que afectan el desempeño en DPIs. Se espera en una segunda instancia, dicha formula se pueda escribir y validar, utilizando como punto inicial el rango de ángulo reportado en este trabajo.

El puerto de inducción debe ser recubierto para no sobreestimar resultados: Rebote y reentrada de partículas ocurre dentro del puerto de inducción si no es recubierto.

Los resultados muestran diferencias entre valores recubiertos y no recubiertos para todos los parámetros evaluados en este estudio. Así se observa que MMAD tiende a ser menor en PIPE recubierto (**Figura 16**). Esto tiene sentido si se considera que PIPE recubierto tiende a retener en promedio (sin importar el flujo) más cantidad de droga (**Figura 21 (a)**) que cuando se usa sin recubrir (uso estándar). La **figura 21(a)** demuestra como el

recubrimiento hace que más activo quede depositado en el fondo de la tubería (Elbow) y porque se observa una reducción de MMPA en la mayoría de los casos cuando el puerto de inducción esta recubierto (**Figura 13**). Por otro lado, **la figura 21 (b)** confirma que la masa retenida cuando hay recubrimiento aumenta mayoritariamente el codo del puerto de inducción. Esto demuestra que el conocido riesgo de los inhaladores presurizados (pMDI) de depositar su aerosol al fondo de la garganta es también una realidad y hasta mucho más posible si se comparan los mapas de calor de Moraga-Espinoza y colaboradores 2018, en su publicación sobre el efecto de flujos de inhalación y los presentados en este trabajo. Bajo este mismo punto de vista, se observa que el aumento de la masa depositada en el codo (**Figura 21 (b)**), la reducción de la eficiencia (RF) (**figura 13**) y el consiguiente aumento del MMAD (**figura 16**) cuando se recubre, se coordinan para hipotetizar que el polvo emitido por DPIs se deposita en el fondo de la garganta/puerto de inducción. Además, como reduce el RF, esto significa que las partículas que impactan en dicha zona no logran llegar al pulmón profundo, por lo que es posible que los resultados ligeramente más altos que se reportan cuando el impactador en cascada se opera de forma compendial pueden estar relacionados a rebote de partículas en dicha zona y reentrada del material al flujo aéreo, tal como se sugiere en los platillos del impactador (motivo por el cual es necesario recubrirlas).

Conclusión

Este estudio es una línea investigativa que inicia con el trabajo de Moraga-Espinoza y colaboradores, quien es el diseñador del puerto de inducción segmentado utilizado en este estudio, basado en el puerto de inducción estándar, lo que permite su utilización en NGI. Gracias a esto se pudo caracterizar el ángulo de pluma y el comportamiento aerodinámico de una droga aerosolizada a través de inhaladores de polvo seco bajo flujos de aire que simulan condiciones de uso fisiológicamente relevantes. El estudio demostró que la técnica es aplicable a inhaladores de diferentes resistencias permitiendo calcular el ángulo de pluma de cada uno de ellos y explicar cómo las partículas se depositan de forma temprana y afectan al desempeño general del inhalador.

Frente a la utilización de PIPE con o sin recubrimiento, los resultados obtenidos muestran que si es necesario recubrir ya que de esta forma obtenemos resultados más cercanos a la realidad, donde la vía respiratoria superior esta recubierta por mucosidad y las partículas se adhieren a ella. El no uso de recubrimiento sobrestima algunos parámetros de eficiencia y debe ser incluido como un estándar de la misma manera que se requiere por las farmacopeas para los platillos del impactador de cascada con el fin de evitar rebote y reentrada de partículas al flujo de inhalación.

Para finalizar, este estudio prueba que debe incluirse el parámetro de geometría de pluma para la selección de un inhalador para un paciente como estrategia de optimización de terapias de inhalación. Los inhaladores en general son ineficientes y existen pocas variables para modular su eficiencia siendo la mayoría enfocadas a la formulación o a la resistencia del dispositivo. Este trabajo presenta una alternativa que puede ser aplicada a cualquier otra tecnología, poniendo en valor un ensayo por mucho tiempo reconocido como un requerimiento, pero nunca antes asociado directamente a su impacto con el desempeño de los inhaladores.

En esta oportunidad no hemos podido llegar a una ecuación que permita predecir y modular el desempeño de los inhaladores. Sin embargo, nuestros resultados han permitido reducir a un rango 5 grados para modificar el ángulo de pluma y así optimizar el desempeño aunque para ello, una nueva etapa de diseño de dispositivos debe ser llevada a cabo para cambiar el flujo sin afectar la resistencia del dispositivo.

Así, PIPE es el único puerto de inducción disponible a la fecha que permite corregir el error técnico del rebote y reentrada de partículas permitiendo su fácil acceso, alta reproducibilidad de datos sin necesidad de adquirir equipamiento de alto costo, y facilita la manipulación para recubrir el puerto de inducción.

Estos resultados son puertas que se abren a futuras investigaciones donde pueden evaluarse otras variables propias de los inhaladores y como estas influyen en los ángulos de pluma y su eficiencia en entrega de principio activo a las zonas más profundas del pulmón.

Referencias

1. Ibrahim, M., Verma, R., & Garcia-Contreras, L. (2015). Inhalation drug delivery devices: technology update. *Medical Devices (Auckland, NZ)*, 8, 131.
2. Crowder TM, Donovan MJ. Science and technology of dry powder inhalers. *Controlled Pulmonary Drug Delivery*. 2011:203-22.
3. Protocol M. Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer. Washington, DC US Gov Print Off. 1987;26:128–136.
4. Global UE. The Kigali Amendment to the Montreal protocol: another global commitment to stop climate change. <https://www.unenvironment.org/news-and-stories/news/kigali-amendment-montreal-protocol-another-global-commitment-stop-climate>. Published 2019
5. Smyth HDC, Hickey AJ. *Controlled pulmonary drug delivery*. Springer; 2011
6. Laube, BL, Janssens, HM, de Jongh, FH, Devadason, SG, Dhand, R., Diot, P., ... y Chrystyn, H. (2011). Lo que el neumólogo debe saber sobre las nuevas terapias inhalatorias.
7. Islam, N. y Cleary, MJ (2012). Desarrollo de un inhalador de polvo seco eficiente y confiable para la administración pulmonar de fármacos: una revisión para investigadores multidisciplinarios. *Ingeniería médica y física*, 34 (4), 409-427.
8. Chow, A. H., Tong, H. H., Chattopadhyay, P., & Shekunov, B. Y. (2007). Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharmaceutical research*, 24(3), 411-437.
9. United States Pharmacopeial Convention (USP). *United States Pharmacopeia*
10. United States Pharmacopeial Convention (USP). *United States Pharmacopeia 41/National Formulary 36*. Chapter <601>, Aerosols, Nasal Sprays, Metered Dose Inhalers and Dry Powder Inhalers. USP, Rockville, MD, 2018.
11. Instituto de Salud Pública de Chile I. Sistema de consulta de productos registrados: cromoglicato. <http://registrosanitario.ispch.gob.cl/>. Published 2020. Accedido octubre 23, 2022.
12. United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP 35 - NF 30). Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention; 2012
13. Guo C, Ngo D, Ahadi S, Doub WH. Evaluation of an abbreviated impactor for fine particle fraction (FPF) determination of metered dose inhalers (MDI). *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(3):1004-1011. doi:10.1208/s12249-013-9984-7
14. Stephen P. Newman. Fine Particle Fraction: The Good and the Bad. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*.

15. Tarsin WY, Pearson SB, Assi KH, Chrystyn H. Emitted dose estimates from Seretide® Diskus® and Symbicort® Turbuhaler® following inhalation by severe asthmatics. *Int J Pharm.* 2006;316(1-2):131-137.
16. Janson, C., Löf, T., Telg, G., & Stratelis, G. (2017). Impact of inhalation flow, inhalation volume and critical handling errors on delivered budesonide/formoterol dose in different inhalers: an in vitro study. *Pulmonary Therapy*, 3(1), 243-253.
17. Moraga-Espinoza, DF (2018). Desarrollo de un nuevo método para determinar la geometría de la pluma de aerosoles farmacéuticos basado en la masa del fármaco y el flujo de inhalación (Tesis doctoral).
18. Guidance for Industry: Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) October 1998 CMC
19. Murphy, S. D. (2013). Evaluation of Plume Geometry and Spray Pattern from a Dry Powder Devices using FDA Guidance. *Dru delivery to the Lung*, 242013.
20. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Draft guidance on albuterol sulfate. In.
21. Instituto de Salud Pública de Chile I. Sistema de consulta de productos registrados: cromoglicato. <http://registrosanitario.ispch.gob.cl/>. Published 2020. Accedido octubre 23, 2022.
22. El Zahar NM, Tadros MM, Ayoub BM. Development of Advanced Chemometric-Assisted Spectrophotometric Methods for the Determination of Cromolyn Sodium and Its Alkaline Degradation Products. *Molecules.* 2020;25(24):5953.
23. Tarsin WY, Pearson SB, Assi KH, Chrystyn H. Emitted dose estimates from Seretide® Diskus® and Symbicort® Turbuhaler® following inhalation by severe asthmatics. *Int J Pharm.* 2006;316(1-2):131-137. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.02.040
24. Brown, J. S., Gordon, T., Price, O., & Asgharian, B. (2013). Thoracic and respirable particle definitions for human health risk assessment. *Particle and fibre toxicology*, 10, 1-12.
25. Iturriaga, R. (2023). Determinación de la geometría de pluma para inhaladores de polvo seco utilizando un puerto de inducción segmentado (tesis). Chile. UV. Facultad de Farmacia.
26. Moraga-Espinoza, D. F., Eshaghian, E., Shaver, A., & Smyth, H. D. (2018). Effect of inhalation flow rate on mass-based plume geometry of commercially available suspension pMDIs. *The AAPS Journal*, 20, 1-12.
27. Wachtel H, Emerson-Stadler R, Langguth P, Hohlfeld JM, Ohar J. Aerosol Plumes of Inhalers Used in COPD. *Pulmonary Therapy.* 2024 Jan 9:1-4
28. Byron PR. Prediction of drug residence times in regions of the human respiratory tract following aerosol inhalation. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1986 May 1;75(5):433-8.