



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

**“DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROESFERAS  
DE EUDRAGIT® CONTENIENDO L-ARGININA”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

IBI. CINDY GUADALUPE PÉREZ SOTELO

2132800403

**COMITÉ TUTORAL**

DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

ASESOR: DR. EFRÉN HERNÁNDEZ BALTAZAR

ASESOR: DR. ÁNGEL HORACIO SANDOVAL TRUJILLO

OCTUBRE DEL 2015

**DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROESFERAS  
DE EUDRAGIT® CONTENIENDO L-ARGININA**

**COMITÉ TUTORAL**

TUTOR: DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

---

Vo. Bo.

ASESOR: DR. EFRÉN HERNÁNDEZ BALTAZAR

---

Vo. Bo.

ASESOR: DR. ÁNGEL HORACIO SANDOVAL TRUJILLO

---

Vo. Bo.

ALUMNA: IBI. CINDY GUADALUPE PÉREZ SOTELO

MATRÍCULA: 2132800403

---

**DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROESFERAS  
DE EUDRAGIT® CONTENIENDO L-ARGININA**

**JURADO**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

---

Vo. Bo.

VOCAL: M. en C. ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

---

Vo. Bo.

SECRETARIO: DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

---

Vo. Bo.

## Resumen

La microencapsulación es uno de los métodos más utilizados para la protección y conservación de las propiedades fisicoquímicas de diversas sustancias, como por ejemplo, L-arginina, el cual es un aminoácido que regula las vías metabólicas que son críticas para la salud, crecimiento y reproducción de animales rumiantes. Obtener sistemas de administración oral que resistan las condiciones fisiológicas del tracto digestivo de estos animales y que garanticen su liberación en el sitio de acción, resulta un reto en la medicina veterinaria. El objetivo del presente trabajo fue elaborar microesferas del polímero Eudragit® conteniendo L-arginina·HCl mediante el método de emulsión/evaporación del solvente como técnica de protección para su liberación en medios que simulan el intestino de rumiantes, evaluando su funcionalidad con la prueba de disolución.

Se prepararon 9 lotes de microesferas utilizando el sistema acetona/parafina líquida y la combinación de polímero Eudragit S 100/RS 100, con relación aminoácido:polímeros 1:10 y 1:20. Las microesferas fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología y tamaño. Se evaluó el rendimiento del proceso y la eficiencia de encapsulación. La liberación in vitro fue estudiada en tres diferentes medios (los cuales simulan las condiciones de pH del tracto gastrointestinal de los rumiantes): pH 6 por 10 h, pH 3 por 50 min y pH 7.5 por 105 min.

Se obtuvieron micropartículas esféricas, translúcidas, con tamaño entre 415-1120  $\mu\text{m}$ . El rendimiento del proceso fue alto para todas las formulaciones (90-96%). La eficiencia de encapsulación varió desde 59 a 93%. La velocidad de liberación fue dependiente de la proporción de polímeros en la formulación. Lotes con mayor contenido de Eudragit S100 liberaron rápidamente su contenido en el primer medio, mientras que la liberación de L-arginina·HCl fue lenta e incompleta para formulaciones que contenían 60% o más de Eudragit RS en su composición. El método fue eficiente y económico a esta escala. La combinación de polímeros pH-dependiente y tiempo-dependiente fue efectiva para controlar la liberación de L-arginina·HCl. Proporciones equivalentes de Eudragit S y Eudragit RS fueron las más adecuadas para controlar la liberación en los medios de prueba y permitir la liberación en el sitio de acción.

## **Agradecimientos institucionales**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca económica otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de estudiar esta maestría.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y su cuerpo de profesores por todas sus enseñanzas y apoyo en este proceso de formación.

A Helm de México, a través del Q.F.B. Luis Morales, por las donaciones de polímeros Eudragit®, materia prima esencial en este trabajo.

A Laboratorios Best, por permitir la realización de los estudios de tamaño de partícula y DSC en sus instalaciones.

Al Ing. Iván Puente Lee, del laboratorio de Microscopía de la UNAM, por el préstamo del microscopio Olympus SZX7 y por las Micrográficas Electrónicas de Barrido.

Al Laboratorio de Farmacotecnia (N110) y a la Dra. Luz María Melgoza, responsable del laboratorio, por la oportunidad y confianza de usar todo lo necesario para la realización de este trabajo.

## **Agradecimientos personales**

Sé que este apartado será uno de los más leídos y por lo tanto me cuesta escribirlo, porque no es fácil ponerle palabras a los sentimientos. Quiero comenzar por agradecer a Dios (desde mi perspectiva), por cada bendición en mi vida, y ésta, es una más.

A Senito y Pachito, por hacer todo en la vida para que yo pueda lograr mis sueños, por ser los mejores padres y amigos; por apoyar mis decisiones y por formar la “phamilia” que hoy tenemos. Hermanos: Leonel, Carlos y Ani, gracias por nunca dejarme sola, porque con su ejemplo, me han enseñado el concepto del trabajo y superación. Por escuchar siempre mis inquietudes y darme siempre su apoyo incondicional. Los amo phamilia.

Luis Alberto, por todo tu apoyo, paciencia, ejemplo, por impulsarme a ser mejor cada día ya que eres mi motivo de inspiración y admiración. Por el sólo hecho de estar conmigo, ¡Gracias!.

A mi Comité Tutorial: Dra. Luz Ma, por TODO el apoyo, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo, por su confianza, por conducir este proyecto de la mejor manera y por algo muy valioso: su amistad. Porque de los mejores se aprende algo más que ciencia. Dr. Efrén, antes de agradecer, quiero reconocer la aportación de sus conocimientos a este trabajo. Gracias por llegar en el momento más difícil. Por ser el impulsor y generador de ideas, por ser tan original y crítico conmigo. Al Dr. Horacio, agradezco sus amenas asesorías y el apoyo con materiales y reactivos. Sé que aprendo de los mejores.

A mis sinodales, por ser pieza clave en la obtención del grado, por sus observaciones y aportaciones críticas al escrito.

A mis amigos de laboratorio, ya que sin ustedes nada hubiera sido igual. Vero, Angie, Zac *nite*, Balo y Cynthia, gracias chicos por su granito de arena, por su amistad, por estar siempre atentos para brindarme su apoyo.

Y por último y no menos importante, a los chicos de la Maestría. Como les he dicho ya, somos una familia. El orden no importa, Karen, Luisa, Daniel, Gerardo, Osvaldo,

Alma, Mari Tere, Maribel, Betzy, Adolfo, Rosaura, Alfonso, David, Yadira; gracias por hacer de ésto, la mejor experiencia. Por ser más que mis amigos.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
3.1 Sistemas de liberación modificada.....	7
3.2 Sistemas de liberación de fármacos para uso veterinario.....	8
3.3 Retos farmacéuticos en el desarrollo de productos veterinarios.....	10
3.4 Sistemas multiparticulados .....	11
3.5 Micropartículas.....	12
3.6 Microencapsulación .....	13
3.6.1 Métodos de microencapsulación.....	14
3.6.2 Emulsión/evaporación del solvente.....	15
3.6.3 Influencia de las variables de proceso .....	17
3.7 Polímeros de cubierta .....	17
3.8 Mezcla de polímeros para el control de liberación de fármacos .....	20
3.9 Rumiantes.....	20
3.10 Sistema digestivo de rumiantes .....	21
3.10.1 Rumen .....	22
3.10.2 Retículo.....	22
3.10.3 Omaso .....	23
3.10.4 Abomaso.....	23
3.10.5 Intestino .....	23
3.11 Importancia económica de la reproducción en rumiantes.....	24
3.12 Suplementación alimenticia y reproducción en rumiantes .....	25
3.13 L-arginina .....	26
3.14 L-arginina y su importancia en reproducción .....	27
3.15 Cuantificación de aminoácidos por el método de Moore y Stein.....	28
3.16 Mecanismo y cinética de liberación.....	28
3.16.1 Cinética de orden cero.....	30
3.16.2 Cinética de primer orden.....	30
3.16.3 Higuchi.....	31

3.16.4 Korsmeyer-Peppas .....	31
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>33</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>34</b>
6.1 Objetivos específicos .....	34
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
7.1 Reactivos .....	35
7.2 Método .....	35
7.2.1 Determinación del tamaño de partícula de L-arginina·HCl.....	35
7.2.2 Selección previa de L-arginina·HCl.....	35
7.2.3 Estudio de compatibilidad .....	36
7.2.4 Preparación de microesferas .....	36
7.2.4.1 Desarrollo del método por coacervación-adición de un no-solvente ...	36
7.2.4.2 Desarrollo del método emulsión-evaporación del solvente.....	38
7.2.5 Rendimiento del proceso .....	40
7.2.6 Eficiencia de encapsulación.....	40
7.2.7 Análisis microscópico.....	41
7.2.8 Determinación del tamaño de partícula .....	41
7.2.9 Estudio de liberación <i>in vitro</i> .....	41
7.2.10 Cuantificación de L-arginina por el método de Moore y Stein.....	42
7.2.11 Aplicación de modelos de cinética de liberación.....	43
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
8.1 Determinación del tamaño de partícula de L-arginina·HCl.....	43
8.2 Selección previa de L-arginina· HCl.....	44
8.3 Estudio de compatibilidad .....	45
8.4 Preparación de microesferas .....	47
8.4.1 Desarrollo del método por coacervación-adición de un no-solvente.....	47
8.4.2 Desarrollo del método emulsión-evaporación del solvente.....	50
8.5 Rendimiento del proceso y eficiencia de la encapsulación .....	52
8.6 Análisis microscópico.....	54
8.7 Determinación del tamaño de partícula.....	56
8.8 Evaluación <i>in vitro</i> de las Microesferas .....	59

8.8.1 Perfiles de liberación de los lotes 1 a 6.....	59
8.8.2 Perfiles de liberación de los lotes 7 y 8.....	64
8.8.3 Perfil de liberación lote 9: Efecto de la proporción fármaco:polímero (lote 9) .....	66
8.8.4 Perfil de liberación Número 10: Mezcla de dos lotes .....	68
8.9 Aplicación de modelos de cinética de liberación.....	69
8.10 Selección de la Mejor formulación .....	70
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Avances y nuevas metas impulsan a la industria farmacéutica a enfocarse al área de la medicina veterinaria y en especial al de complementación nutricional dirigida a un grupo de gran importancia económica como son los rumiantes (Melgoza *et al.*, 2007). En la nutrición de rumiantes, suministrar todos los aminoácidos (AA) esenciales a nivel sistémico es de gran importancia para asegurar las demandas requeridas para el mantenimiento y la reproducción. L-arginina, es uno de los AA más versátiles que sirve como precursor para la síntesis de urea, óxido nítrico y poliaminas; también regula vías metabólicas que son críticas para la salud, crecimiento, homeostasis y reproducción de animales (Chache *et al.*, 2013). Tanto el óxido nítrico como las poliaminas son importantes para la supervivencia embrionaria así como para el crecimiento y desarrollo de la placenta (Kim *et al.*, 2011). A pesar del hecho de que los rumiantes pueden sintetizarla, la L-arginina se considera un AA esencial porque la *síntesis de novo* no es suficiente para satisfacer los requerimientos particularmente en las etapas tempranas del crecimiento (Morris, 2009).

Un inconveniente que presenta este aminoácido cuando es ingerido por los animales rumiantes, es su rápida degradación en el rumen. De hecho, las características propias de la fisiología digestiva de los rumiantes hacen que, prácticamente la totalidad de los alimentos ingeridos o de las sustancias administradas vía oral, se vean sometidos a la acción digestiva ruminal (hidrólisis, biohidrogenación y fermentación microbiana, principalmente) antes de ser digeridos en el abomaso y absorbidos en el intestino (Asplund, 1994). Por esta razón, las nuevas líneas de investigación en nutrición de rumiantes buscan diseñar productos de liberación prolongada en el rumen.

El empleo de sistemas de liberación modificada y el diseño de partículas protegidas contra los diferentes pH's y microorganismos de los compartimentos estomacales de los animales rumiantes es un modelo ideal que está tratando de alcanzarse por medio de numerosas investigaciones.

Uno de los métodos más utilizados para la protección y conservación de las propiedades fisicoquímicas de una variedad de sustancias químicas es la microencapsulación. El término “microencapsulación” se utiliza para designar una categoría de tecnologías utilizadas para proteger sólidos, líquidos o gases en el interior de una matriz polimérica o coraza. En contraste con otras técnicas de recubrimiento, la formación de partículas se produce en un solo paso, lo que hace de la microencapsulación, un proceso sencillo, rápido y económico para la obtención de micropartículas (Benita, 2006), que se utilizan para obtener sistemas de liberación prolongada y controlada, para mejorar la biodisponibilidad, estabilidad y además permiten que el principio activo alcance sitios específicos de liberación (Haznedar y Dortunç, 2004). Para seleccionar un método de microencapsulación, se debe tener en cuenta varios requisitos: La estabilidad y la actividad biológica de la sustancia a encapsular, ya que no debe verse afectada durante el proceso de microencapsulación, el rendimiento del proceso, la eficacia de encapsulación, la calidad de las microesferas y el perfil de liberación del fármaco debe ser reproducible dentro de los límites especificados (Benita, 2006).

Debido a que resulta un proceso complejo el hecho de que los nutrientes lleguen hasta el intestino de los rumiantes para su absorción, es importante diseñar estrategias para lograrlo; sin embargo, esto significa un gran reto para los formuladores de productos veterinarios con aplicación en rumiantes, ya que obtener un sistema de administración oral que resista las cambiantes condiciones fisiológicas que existen en el rumen, y que garanticen su liberación en el sitio de acción, resulta una área de oportunidad para los tecnólogos farmacéuticos.

El objetivo de este trabajo fue preparar y caracterizar microesferas de Eudragit® (polímero formador de cubierta) conteniendo L-arginina en su sal clorhidrato (L-arginina·HCL), mediante un método adecuado, que permita obtener microesferas que resistan el paso a través de los diferentes compartimentos del sistema digestivo de rumiantes, para alcanzar un perfil de liberación controlada en su intestino, evaluándose la funcionalidad del producto con una prueba de disolución *in vitro*.

## 2. ANTECEDENTES

En los últimos años, el desarrollo de productos comerciales basados en micropartículas se ha extendido a diversos sectores industriales como el farmacéutico, alimentario, cosmético y agrícola por mencionar algunos. Sin embargo, la microencapsulación ha sido ampliamente utilizada en la industria desde hace varias décadas. El principio de encapsulación es muy antiguo, si la Bioquímica es un principio de vida, nada hubiera sido posible sin la integración de estructuras dentro de membranas (por ejemplo, las mismas células y las mitocondrias). Partiendo de ello, el objetivo primordial de los procesos de encapsulación es aislar, proteger, liberar y funcionalizar ingredientes activos (Poncelet, 2006).

En el ámbito farmacéutico las primeras investigaciones sobre microencapsulación fueron reportados por Bungen Burg de Jong y Kan en 1931, quienes prepararon esferas de gelatina mediante un proceso de coacervación. El método de coacervación se ha considerado como el más antiguo para la producción de microcápsulas (Gupta y Dey, 2012). En 1933 Hickey *et al*, prepararon microcápsulas utilizando la técnica de evaporación del disolvente, pero ésta fue desarrollada plenamente hasta 1979. El método se basa en la evaporación de la fase interna de una emulsión mediante agitación (Hwisa *et al.*, 2013). A partir de entonces, se han diseñado nuevos métodos químicos, físicos y fisicoquímicos para producir microcápsulas, que han sido preparadas con una gran variedad de polímeros y distintas proporciones de principio activo, utilizando diversos métodos tales como el de la evaporación del solvente, secado por aspersion, gelación ionotrópica, suspensión de aire y polimerización interfacial.

La preparación de microcápsulas a nivel industrial se remonta a 1950 cuando Barry Green y Schleicher investigadores de la Compañía National Cash Register produjeron microcápsulas de colorantes por coacervación compleja empleando gelatina y goma arábica para emplearse en la fabricación del papel autocopiante sin carbón (Benita, 2006).

Hasta la década de 1950, toda la medicación oral incluso la más moderna, tenía una gran desventaja: no era posible controlar el tiempo o el lugar de liberación de los principios activos. El desarrollo de los polímeros Eudragit® por Röhm & Haas GmbH en Alemania fue la solución a este problema. Hoy en día, existen variantes de Eudragit® que se encuentran disponibles en el mercado con diferentes aplicaciones que han sido empleados en la preparación microesferas (Evonik, 2011; González *et al.*, 2005).

La combinación de polímeros Eudragit® pH-dependiente y tiempo-dependiente como materiales de recubrimiento y en procesos de microencapsulación ha sido reportado previamente en el ámbito farmacéutico. En la mayoría de los casos se ha utilizado Eudragit S en combinación con Eudragit RL, sin embargo, sólo existen pocos reportes en el diseño de microesferas utilizando Eudragit S y Eudragit RS para controlar la liberación de fármacos en colon (Akbuga, 1991; Lamprecht *et al.*, 2003). En productos de uso veterinario Claro de Souza y Maldonado (2011) prepararon Microesferas de Eudragit RS conteniendo Albendazol.

Los rumiantes son animales eficientes en la degradación de alimentos fibrosos. Durante su evolución, en su tracto digestivo se desarrolló el compartimento de fermentación conocido como retículo-rumen. En estos órganos se forma un microambiente que almacena alimentos y alberga microorganismos anaerobios, tales como hongos, bacterias y protozoarios.

Muchos estudios han sido desarrollados usando micropartículas como sistemas de liberación de fármacos en el área de la tecnología farmacéutica. El mercado de la industria farmacéutica veterinaria ha explotado muchas estrategias para mejorar la eficacia de fármacos y reducir la frecuencia de administración a través del desarrollo de sistemas de liberación modificada. Una de estas estrategias es el uso de Micropartículas, las cuales son sistemas versátiles que, de acuerdo a sus características pueden ser administradas a través de diversas vías, como la parenteral, oral, ocular, nasal y pulmonar. El primer producto comercialmente disponible basado en micropartículas para uso veterinario fue lanzado en Nueva Zelanda; se trata de un

producto que contiene vitamina B12 que es liberada continuamente por más de 200 días (Rathbone y Martínez, 2002).

En años recientes sistemas de liberación de fármacos de uso veterinario con polímeros biodegradables tales como el ácido poli (láctico-co-glicólico) PLGA, han sido ampliamente utilizados para la formación de microesferas, en su mayoría de uso parenteral, evaluados en el área del control del estro, promoción del crecimiento, control de ectoparásitos y vacunas. SMARTShot™ B12 es una suspensión oleosa que contiene microesferas de PLGA de liberación prologada, conteniendo 12 mg/mL de selenio y 3 mg/mL de clorhidrato hidroxocobalamina que ha utilizado para la administración en ovejas y corderos (Medlicott, *et al.* 2004).

El ácido poli L-láctico (PLA), también un polímero biodegradable se ha utilizado para producir microesferas que contienen esteroides por un proceso de extracción de solvente y en la actualidad la formulación comercial (Lutamete Plus) disponible para el control preciso de la ovulación en yeguas contiene 100 mg de estradiol y 1250 mg de progesterona (Winzenburg *et al.*, 2004).

Los animales rumiantes han evolucionado para consumir y subsistir con pastos y arbustos compuestos predominantemente de celulosa. De ahí que el uso de excipientes celulósicos (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa) que se utilizan comúnmente en el campo humano para retrasar la velocidad de liberación de un fármaco no se pueden utilizar en la elaboración de formas de dosificación para rumiantes porque el excipiente sería digerido rápidamente por los microorganismos del rumen (Rathbone, 2012).

En el laboratorio de Farmacotecnia de esta casa de estudios, previamente se han diseñado distintas formulaciones conteniendo urea, L-arginina y metionina para uso en rumiantes utilizando la familia de polímeros Eudragit® y Surelease® (Melgoza, *et al.*, 2007; Sánchez, 2014), sin embargo, hasta el momento no se han utilizado combinaciones de polímeros pH-dependientes y tiempo-dependientes de baja permeabilidad para controlar la liberación en el sitio de acción. En este trabajo se

propuso un método para la obtención de microesferas de Eudragit® conteniendo L-arginina·HCl que permitan la liberación del aminoácido en el intestino de rumiantes.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Sistemas de liberación modificada

Se denomina sistema de liberación modificada (SLM) a cualquier preparación farmacéutica que se ha diseñado de tal manera que se modifica la velocidad o el lugar de liberación del principio activo respecto a las formas farmacéuticas de liberación inmediata del mismo principio activo y destinadas a la misma vía. De esta forma de liberación se distinguen tres tipos: Liberación acelerada, prolongada o extendida y diferida o retardada (Bernad *et al.*, 2003). La terminología empleada para estos sistemas no es muy precisa y todavía no existe armonización. El término “liberación modificada” es el que emplean las Farmacopeas Europea y Americana como alternativa a la expresión convencional *formas retard*. Estrictamente la denominación de *formas retard* sólo debería utilizarse para las formas de liberación retardada (Paredero, 2008).

Los sistemas de liberación acelerada, son aquellas formas sólidas que se disuelven instantáneamente en la cavidad oral sin necesidad de administración de agua o líquidos. Los sistemas de liberación prolongada son diseñados para prolongar la concentración plasmática del fármaco y el efecto terapéutico, o para mejorar las características farmacocinéticas del medicamento. El principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir su efecto, y después se libera de forma lenta a una velocidad no necesariamente constante, manteniendo la concentración eficaz durante más tiempo que con las formas de liberación inmediata. Para muchos autores el término liberación prolongada, extendida, controlada o sostenida es utilizado indistintamente (Qiu y Zhou, 2011). La liberación retardada hace referencia a aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del activo es retardada en el organismo gracias a un modo de fabricación; esto es, la preparación libera el principio activo en un momento diferente a inmediatamente después de su administración. Se permite retardar la entrega del principio activo hasta que el sistema alcanza un cierto punto en el tracto gastrointestinal (Bernad *et al.*, 2003).

Todos los SLM comparten el objetivo común de mejorar la farmacoterapia respecto a la alcanzada con sus contrapartes convencionales. Para el diseño de un SLM se deben considerar factores fisicoquímicos, biológicos y terapéuticos, además de si es o no justificable la elección del principio activo dentro del sistema. Entre otras características, se deberá considerar el tamaño y estado físico del sistema, la anatomía del sitio de acción y el microambiente. La comprensión de esto es críticamente importante en el diseño de sistemas de liberación controlada. La utilización de materiales poliméricos como soportes de fármacos para regular y dosificar su liberación en aplicaciones específicas es una perspectiva que ha adquirido gran interés (Weiser y Saltzman, 2014).

La posibilidad económica y tecnológica de desarrollar un nuevo sistema es otro factor importante a tomar en cuenta, ya que muchos SLM actualmente desarrollados no han podido ser comercializados debido a los altos costos de implementación tecnológica (Bernad *et al.*, 2003).

### **3.2 Sistemas de liberación de fármacos para uso veterinario**

El valor cada vez mayor de los animales a la sociedad humana permite la aplicación de los avances farmacéuticos que se han desarrollado en la medicina humana al sector veterinario. Los SLM de uso veterinario poseen ventajas sobre las formas de administración convencional: permiten que la cantidad de fármaco administrado sea conocida, permiten la reducción de efectos secundarios, a menudo se reduce el estrés en los animales provocado por la manipulación. Además, la disminución en la frecuencia de administración minimiza la exposición humana a compuestos veterinarios que no son seguros de manipular (Winzenburg, 2004).

En medicina veterinaria, las formas de dosificación de liberación modificada son productos que se han posicionado bastante bien en el mercado. Sistemas que minimizan la necesidad de administraciones repetidas mientras alcanzan efectos terapéuticos por periodos extendidos ofrecen beneficios que hacen que el desarrollo

comercial de estos productos sea favorable. Para ciertos usos ya sea profilácticos o de tratamiento, la administración única o poco frecuente se ha convertido en un procedimiento estándar. Por ejemplo, existen productos que previenen parasitosis en el corazón y se encuentran disponibles en formas de administración mensual. El tiempo de liberación puede variar desde pocas horas hasta varios meses dependiendo del objetivo para el cual fue diseñado (Tabla 1). La mayoría de los productos veterinarios de liberación modificada están indicados como promotores para la producción de leche, control de ectoparásitos, antibióticos, promotores del crecimiento, sincronizadores del estro y como suplementos nutricionales (Medlicott *et al.*, 2004).

<b>Tabla 1. Ejemplos de productos de uso veterinario de liberación modificada</b>			
<b>Nombre Comercial (presentación)</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Indicación</b>	<b>Tiempo de liberación</b>
<b>Heartgard® Plus</b> <b>(Tabletas masticables)</b>	Ivermectina/pirantel	Filariosis canina (parasitosis en corazón de caninos)	1 mes
<b>Compudose®200</b> <b>(implante)</b>	estradiol	Promotor del crecimiento del ganado bovino	200 días
<b>Posilac®</b> <b>(suspensión estéril)</b>	Somatotropina bovina recombinante	Promotor de leche en bovinos	14 días
<b>ProHeart®6</b> <b>(solución inyectable)</b>	Moxidectina	Control de endo y ecto parásitos en perros.	6 meses
<b>Nuflor®</b> <b>(solución inyectable)</b>	Florfenicol	Antibiótico sintético de amplio espectro, para bovinos y porcinos	48 horas
<b>Revalor®</b> <b>(implante sólido)</b>	Trenbolona/Estradiol	Promotor del crecimiento del ganado bovino	70-90 días

Los animales rumiantes son considerados en este estudio, desde una comprensión de su anatomía y fisiología, ya que proporcionan al formulador una visión no sólo en los retos a los que se enfrentará, sino también las oportunidades que pueden explotarse.

### **3.3 Retos farmacéuticos en el desarrollo de productos veterinarios**

Existen similitudes entre las industrias de la salud humana y animal; ambas se encuentran en constante investigación, tienen presencia global, son altamente reguladas y tienen que obtener beneficios en un entorno empresarial competitivo. Sin embargo, también hay diferencias notables como la diversidad de especies y razas, variabilidad en el rango del tamaño y peso de los animales, las diferencias regionales, la velocidad de biotransformación y otros factores hacen que el desarrollo de los sistemas de liberación de uso veterinario sea más complicado (Ahmed y Kasraian, 2002).

Pocas veces se reconoce que los problemas asociados al desarrollo de formulaciones de productos de salud animal son equivalentes o incluso superiores a los de los productos farmacéuticos de uso humano. En el sector ganadero, el reto es desarrollar formas de dosificación que reduzcan al mínimo el tiempo y el costo asociado al tratamiento masivo de rebaños enfocándose al bienestar de los animales, la facilidad de administración, la protección durante toda la temporada y la seguridad humana. Dentro del grupo de los animales de granja se encuentran los rumiantes. La singular anatomía y fisiología del tracto digestivo de los rumiantes demanda considerar dos factores importantes cuando se desarrollan dispositivos destinados a ellos: el reflejo de regurgitación y las condiciones ambientales del rumen (Vandamme y Ellis, 2004).

Los retos para el desarrollo de productos de acción prolongada son numerosos, éstos giran en torno a las cuestiones de eficacia, retención, administración y eliminación de productos en pacientes que son de gran tamaño y difíciles de manipular, que pueden causar daño no intencionado al administrador. Añadir a esto, el hecho de que la carga de fármaco debe ser alta, requieren un método de administración especial, el producto

necesita algún mecanismo de retención integrado y sobre todo, la preocupación por la seguridad alimentaria humana (residuos en tejidos comestibles). Todo esto representa un desafío en esta área de la ciencia farmacéutica (Rathbone, 2012).

### **3.4 Sistemas multiparticulados**

El concepto de sistemas multiparticulados es caracterizado por el hecho de que la dosis es administrada en un número de subunidades, cada una conteniendo el principio activo. La dosis es entonces, la suma de las subunidades individuales, y la funcionalidad de la dosis completa es directamente relacionada con la funcionalidad de las subunidades individuales (Dey, 2008).

Dentro de los sistemas de partículas múltiples se encuentran los gránulos, pellets, microtabletas y las micropartículas. Hoy en día, ocupan una posición muy destacada en el amplio conjunto de las formas de administración oral de medicamentos. El objetivo del diseño de sistemas multiparticulados es desarrollar una formulación confiable que tenga todas las ventajas de una formulación de unidad simple sin comprometer la alteración del perfil de liberación y el comportamiento de la formulación debido a la variación entre subunidades. Los perfiles plasmáticos que proporcionan se caracterizan por presentar una reproducibilidad sensiblemente superior a la que se observa cuando los fármacos se administran en formas monolíticas (Borgquist *et al.*, 2004). Esta importante ventaja tiene su origen en una más baja variabilidad del vaciamiento gástrico que se debe, a su vez, a que el tiempo que se requiere para que las partículas pequeñas (menores de 3 mm en el caso de humanos y de 2 mm para rumiantes) pasen a través del píloro se vea poco afectado por la ingesta de alimentos, cualquiera que sea la naturaleza de éstos (Pedrosa, 2008). También tienen la ventaja de que, al extenderse las partículas con facilidad sobre la mucosa gástrica, se minimizan los efectos adversos que pueden producir algunos fármacos a nivel local. El principal mecanismo por el cual el fármaco es liberado de las unidades depende del tipo de cubierta y del método por el cual fueron elaborados así como de las propiedades físicas y cantidades del núcleo y excipientes presentes en la

formulación y del ambiente fisiológico en el cual el fármaco es liberado (Roy y Shahiwala, 2009).

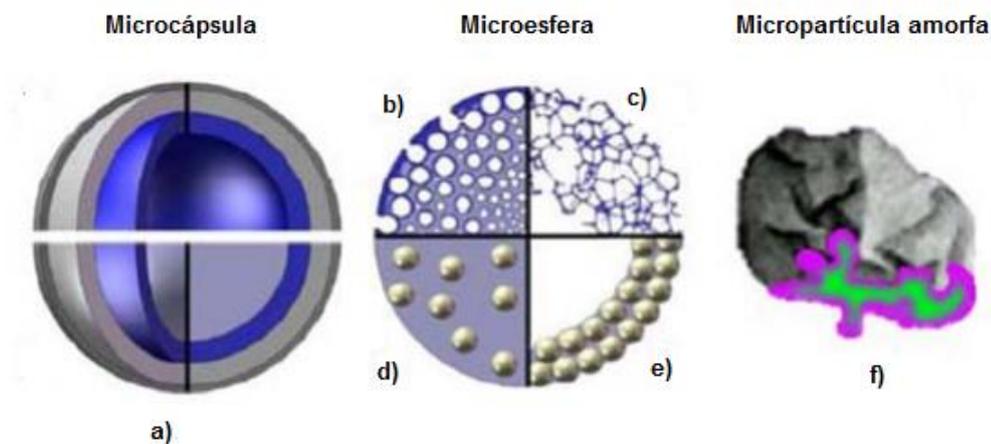
### 3.5 Micropartículas

Las micropartículas son definidas como partículas coloidales cuyo tamaño oscila entre de 0.1 a 1000  $\mu\text{m}$  y son ampliamente usadas como transportadoras de fármacos para liberación sostenida. Estos sistemas tienen una significancia importante dentro de aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

Las micropartículas consisten de dos componentes: el material del núcleo que es el ingrediente activo y el material de cubierta o pared, que protege al núcleo y puede ser de una amplia variedad de materiales poliméricos y no poliméricos, incluyendo polietilenglicol, polimetacrilatos, poliestirenos, celulosa, ácido poli láctico, ácido poli-láctico-co-glicólico, gelatina, entre otros. (Jyothi *et al.*, 2010).

Del proceso de microencapsulación pueden obtenerse “microcápsulas” o “microesferas” dependiendo de su morfología y estructura interna. En el primer caso, el principio activo que puede ser de naturaleza líquida o sólida, se encuentra incluido en una especie de reservorio recubierto por una fina película de material. En la Figura 1a, se observa el caso de una partícula con el interior lleno o parcialmente vacío, creando una microcápsula hueca. En el caso de las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. Se puede tener una estructura en forma de espuma en donde el material activo se localiza repartido en toda la microcápsula (Figura 1b), o bien en una estructura abierta en forma de red (Figura 1c). También existe el caso en el que el material activo está disperso en la matriz que sirve como cubierta, ya sea como esfera llena (Figura 1d) como en la periferia (Figura 1e). La forma de la micropartícula podrá ser esférica o bien presentar una forma irregular (Figura 1g). La obtención de un tipo de estructura u otro, depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del material de recubrimiento, así como del proceso tecnológico elegido, sin embargo, a menudo se utiliza el término micropartícula para

generalizar partículas en la escala micrométrica y frecuentemente los términos se usan indistintamente (Lopretti *et al.*, 2007; Rivas, 2010).



**Figura 1.** Morfología de los diferentes tipos de micropartículas. (Tomado de Rivas, 2010).

Se han de tener presentes una serie de consideraciones farmacéuticas en el desarrollo de estos sistemas de liberación modificada: Tipo de material, método de preparación, tamaño de las micropartículas, cantidad de fármaco incorporado, carga, fármaco liberado, propiedades de la superficie, toxicidad del sistema de liberación y biocinética del sistema de liberación (Dubey *et al.*, 2009). Los ensayos que aseguran la calidad y homogeneidad de las microcápsulas son: características morfológicas (tamaño de partícula, estructura interna, densidad), rendimiento de producción, eficacia de encapsulación, contenido y liberación del principio activo, estado físico e interacciones polímero-material activo. (Pérez-Leonard *et al.*, 2013).

### 3.6 Microencapsulación

La microencapsulación se describe como un proceso de atrapamiento de partículas de tamaño micrométrico, que pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas, en una pared inerte, que a su vez aísla y protege del ambiente externo. Este proceso es ampliamente usado en la farmacéutica y otras ciencias para proteger sustancias

sensibles a la humedad y pH, enmascarar propiedades organolépticas como olor, sabor o color, para manipular de manera segura materiales tóxicos, impartir estabilidad al principio activo, mejorar la biodisponibilidad y como formas de dosificación multiparticuladas para obtener liberación controlada o dirigida y evitar efectos adversos como irritación gástrica (Paul *et al.*, 2012; Jyothi *et al.*, 2010).

### 3.6.1 Métodos de microencapsulación

Se han reportado varios métodos de preparación de micropartículas, a grosso modo, pueden agruparse en dos principales categorías: métodos químicos y métodos físicos. La primera categoría incluye aquellos métodos en los cuales los materiales de partida son monómeros/prepolímeros. En estos métodos reacciones químicas son involucradas con la formación de las microesferas.

La segunda categoría consiste de aquellos métodos en los cuales no hay reacciones químicas involucradas en el proceso y sólo se considera la forma de preparación (Dubey *et al.*, 2009). Los métodos físicos pueden subdividirse en métodos fisicoquímicos y fisicomecánicos. La tabla 2 resume esta clasificación, sin embargo, otros autores los han clasificado de diferente manera considerando sus propios criterios (Ghosh, 2006).

Tabla 2. Métodos de microencapsulación

Métodos químicos	Métodos fisicoquímicos	Fisicomecánicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>Polimerización interfacial</li> <li>Policondensación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coacervación</li> <li>Encapsulación sol-gel</li> <li>Microencapsulación asistida por CO<sub>2</sub> supercrítico</li> <li>Evaporación/extracción del solvente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Secado por aspersión</li> <li>Lecho fluido</li> <li>Encapsulación electrostática</li> <li>Encapsulación al vacío.</li> </ul>

La selección del proceso de microencapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante además de la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo.

### **3.6.2 Emulsión/evaporación del solvente**

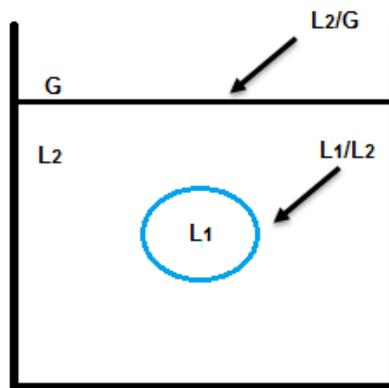
La técnica de evaporación del solvente ha sido ampliamente usada en los últimos años para la preparación de microesferas con varias aplicaciones y muestra un futuro prometedor por sus ventajas sobre otras técnicas, por ejemplo, su simplicidad, rápido procesamiento y con el mínimo de variables a controlar durante el proceso que pueden ser fácilmente implementadas a escala industrial. Con este método, se han producido micro y nano esferas para la liberación controlada de fármacos, péptidos y vacunas (Hwisa *et al.*, 2013; Rawat, 2007).

Este método es frecuentemente usado para encapsular fármacos insolubles en agua, ya que la eficiencia de encapsulado para fármacos hidrosolubles es baja debido a la pérdida del principio activo antes de la etapa de solidificación de la fase polimérica, y esto puede considerarse una desventaja del método (Rawat, 2007). Sin embargo, se han realizado una serie de modificaciones a la técnica para mejorar la eficiencia de encapsulación de fármacos hidrosolubles. Por ejemplo, la aplicación de una emulsión no acuosa (o/o) proporciona una barrera protectora entre el fármaco y el solvente del polímero y para evitar una partición del fármaco hacia la fase externa. La fase continua es frecuentemente un aceite mineral o vegetal y la fase dispersa un solvente orgánico volátil (Hwisa *et al.*, 2013).

Este método es basado en la evaporación de la fase interna de una emulsión por agitación. De manera general, la cubierta que es de naturaleza polimérica es disuelta en un solvente orgánico con bajo punto de ebullición. El material del núcleo es disuelto o dispersado en la solución del polímero para formar una suspensión o una solución. Esta fase orgánica es emulsificada bajo agitación en una fase dispersante que consiste

de un no solvente del polímero que es inmisible con el disolvente orgánico, y que contiene un agente emulsificante apropiado. Una vez que la emulsión es estabilizada, la agitación se mantiene hasta que el disolvente se evapora después de la difusión a través de la fase continua resultando en microesferas sólidas. Las Micropartículas son recuperadas por filtración, lavadas y secadas (Hwisa *et al* 2013).

A pesar de que el método de evaporación del solvente es simple, los procesos fisicoquímicos que gobiernan el proceso son muy complejos. Este sistema es caracterizado por la existencia de varias interfaces a través de las cuales ocurre una transferencia de masa durante la formación de las partículas. La Figura 2 ayuda a ejemplificar el proceso por el que ocurre la formación de microesferas en este proceso.



**Figura 2.** Representación esquemática de las diferentes interfaces en el proceso de evaporación del solvente.

La formación de microesferas se lleva a cabo por el flujo de masa en dos etapas: 1) el solvente difunde de las gotas de la fase dispersa (L1) hacia la fase continua (L2). La partición a través de la interfase L1/L2 no sólo está limitada al solvente, parte del principio activo también puede emigrar; 2) el solvente se difunde en la fase continua y ocurre la evaporación en la interfase L2/G). Acompañado de la evaporación del solvente, las gotas de la fase dispersa se vuelven ricas en polímero debido a la eliminación del disolvente y comienzan a solidificar (Hwisa *et al.*, 2013; Li, 2008).

### **3.6.3 Influencia de las variables de proceso**

La esfericidad, tamaño y rendimiento de las microesferas son influenciados por muchas variables de proceso como la naturaleza del solvente, concentración del polímero, tipo y concentración de emulsificante, relación de volúmenes entre las fases, temperatura y relación polímero:principio activo.

La selección de solventes y la fase continua determinan la formación de las microesferas y la eficiencia de atrapamiento. La selección del solvente debería incluir:

- Buen solvente para el polímero para mejorar el atrapamiento del principio activo
- Pobre solvencia para el principio activo para minimizar su partición hacia la fase externa
- Bajo punto de ebullición para facilitar la evaporación
- Inmiscible con la fase continua
- No debe provocar la degradación del principio activo y
- Ser aceptable para uso humano y veterinario

Mientras que para la selección de la fase externa debería considerarse aquella que tenga un elevado punto de ebullición, no tóxico, inmiscible con el solvente orgánico y económico (Hwisa, 2013).

La microencapsulación de principios activos hidrosolubles requiere el uso de una fase dispersante polar, tal como el aceite mineral (parafina). El sistema acetona/parafina es frecuentemente usado en el método de la emulsión-evaporación del solvente porque ambas fases cumplen con lo especificado anteriormente (Jelvehgari y Montazam, 2012).

### **3.7 Polímeros de cubierta**

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la microencapsulación será la selección de una matriz de encapsulación

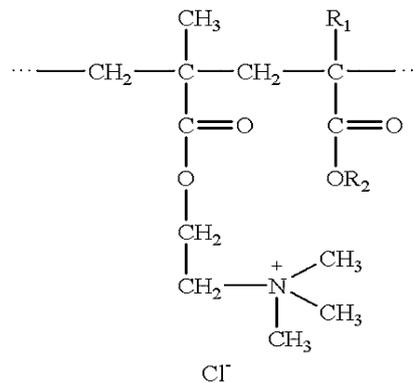
adecuada. El material de cubierta debe tener la capacidad de formar películas que sean cohesivas con el material del núcleo, químicamente compatibles con el material a encapsular y proporcionar las propiedades de protección deseadas. Entre los agentes encapsulantes destacan los alginatos, etilcelulosa, el ácido poli (láctico-co-glucónico) y los polimetacrilatos (Ghosh, 2006).

Los polímeros Eudragit son copolímeros derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico. Las propiedades fisicoquímicas de los diferentes tipos de polímeros son determinados por el tipo de grupos funcionales. Estos polímeros están disponibles en diferentes formas físicas (dispersiones acuosas, soluciones orgánicas, gránulos y polvos) y son ampliamente usados para sistemas de liberación dirigida y controlada (Tabla 3).

Tabla 3. Variedades de polímeros Eudragit y sus propiedades de disolución

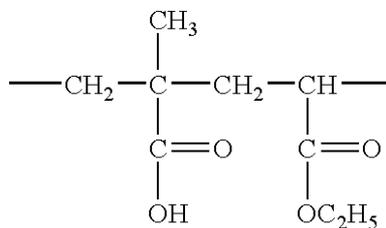
	<b>Polímero Eudragit®</b>	<b>Disponibilidad</b>	<b>Propiedades de disolución</b>
<b>Copolímeros metacrílicos. Grupo funcional: ácido carboxílico R=COOH (Aniónico). Gastrorresistentes y enterosolubles.</b>	L 30 D-55	Dispersión acuosa al 30%	Disolución a pH por encima de 5,5
	L 100-55	Polvo	
	L 100	Polvo	
	L 12,5	Solución orgánica al 12,5%	Disolución a pH por encima de 6,0
	S 100	Polvo	
	S 12,5	Solución orgánica al 12,5%	
	FS 30 D	Dispersión acuosa al 30%	
<b>Copolímeros de amonioalquil-metacrilato Grupo funcional: trimetilamonioetil R=COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sup>-</sup> (neutro)</b>	RL 100	Gránulos	Insoluble, Alta permeabilidad, Hinchamiento independiente del pH
	RL PO	Polvo	
	RL 30 D	Dispersión Acuosa al 30%	
	RS 100	Gránulos	Insoluble, Baja permeabilidad, Hinchamiento independiente del pH.
	RS PO	Polvo	
	RS 30 D	Dispersión Acuosa al 30%	
<b>Copolímeros del metacrilato Grupo funcional: ésteres neutros R= COOCH<sub>3</sub> o COOC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (neutro)</b>	NE 30 D	Dispersión Acuosa al 30%	Insoluble, baja permeabilidad, Hinchamiento independiente del pH, No requiere plastificante, Altamente flexible.
	NE 40 D	Dispersión Acuosa al 40%	
	NM 30 D	Dispersión Acuosa al 30%	

Eudragit RS 100 es un copolímero de etil acrilato, metil metacrilato y bajo contenido de ésteres del ácido metacrílico con grupos amonio cuaternario. Es un polímero insoluble en medio acuoso, pero es permeable y tiene la capacidad de producir perfiles de liberación independientes del pH. La permeabilidad de este polímero en medio acuoso es consecuencia de la presencia de grupos amonio cuaternario. La composición molar de etilacrilato, metilmetacrilato y cloruro de metacrilato de trimetilamonio-etilo es de 10:20:1 y tiene un peso molecular de 150 000. La Figura 3, muestra la estructura molecular de las unidades de repetición del Eudragit RS.



**Figura 3.** Estructura molecular de las unidades de repetición del Eudragit RS 100

Eudragit S100 es un copolímero aniónico compuesto de ácido metacrílico y metilmetacrilato (1:2) cuyo pH de disolución es por encima de 7, por lo que se clasifica como un polímero pH-dependiente (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura molecular de las unidades de repetición del Eudragit S 100

Las siguientes propiedades beneficiosas de Eudragit S han sido consideradas para el desarrollo de micropartículas. Ellos son i) aceptados como excipientes farmacéuticos, ii) generalmente considerados como no tóxicos, iii) pH sensibles con disolución por encima de 7 cuya disolución ocurre como resultado de cambios estructurales del polímero asociados con la ionización del grupo funcional carboxílico (Evonik, 2011).

### **3.8 Mezcla de polímeros para el control de liberación de fármacos**

Un tema de indudable interés es el relativo a la utilización de combinaciones, habitualmente binarias, de diferentes variedades de Eudragit con el objetivo de ampliar las posibilidades de modulación de los perfiles de liberación del fármaco. Mezclas de polímeros pueden tener propiedades significativamente mejores que el polímero individual para alcanzar la liberación controlada. El uso de mezclas de polímeros como materiales de cubierta para sistemas de liberación controlada puede ofrecer mayores ventajas incluyendo i) facilidad de ajustar los patrones de liberación deseados, de las propiedades mecánicas y mecanismos de liberación, y ii) la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias para conseguir el sitio específico de liberación del principio activo dentro del tracto gastrointestinal. Sin embargo, estos sistemas son más complejos que cuando se trabaja con un único polímero (Siepmann, et al., 2008; Akhgari et al., 2006).

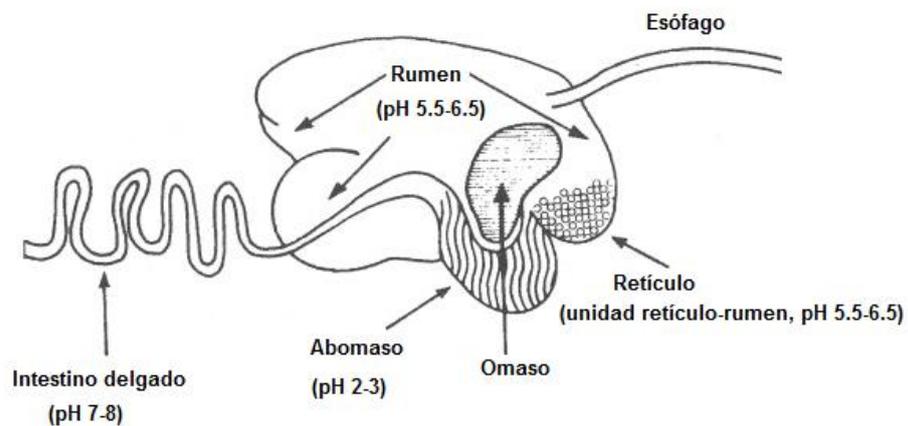
### **3.9 Rumiantes**

El grupo más importante de los mamíferos herbívoros son los rumiantes. Pertenecen al orden artiodactila que se distinguen de otros animales (monogástricos) por el desarrollo de una serie de compartimentos anteriores a su verdadero estómago, el abomaso. Conforman uno de los más grandes grupos de animales de granja. Entre las diferentes especies, los rumiantes son considerados los animales más importantes para la humanidad, ya que son fuente principal de alimentos y fibras de origen animal (Van Soest, 1982).

### 3.10 Sistema digestivo de rumiantes

Los animales domésticos pueden clasificarse de acuerdo a sus capacidades alimenticias en herbívoros y carnívoros. Una característica distintiva de los herbívoros es su dependencia nutricional sobre procesos de fermentación bacteriana. Una clasificación diferente pero relacionada con los animales domésticos refiere a la disposición anatómica del tracto gastrointestinal.

Los rumiantes son animales con sistema digestivo caracterizado por un pre-estómago que comprende el rumen, retículo y omaso; y un estómago, el abomaso (Figura 5). Los compartimentos del pre-estómago son principalmente sitios de digestión microbiana de los alimentos. Esta disposición unida a la enorme capacidad de su estómago, los hace especialmente aptos para alimentarse de forrajes con alto contenido de celulosa, mejora la utilización de nitrógeno no proteico y la síntesis de ácidos grasos volátiles. (Vandamme y Ellis, 2004).



**Figura 5.** Anatomía ruminal y pH de cada compartimento

### **3.10.1 Rumen**

Es el más grande de los cuatro compartimentos. El rumen es esencialmente una cámara de fermentación de gran tamaño, con capacidad de 100 a 225 L en vacas y de 10 a 25 L en ovejas y cabras (Vandamme y Ellis, 2004). Provee un ambiente anaeróbico, con una gran cantidad de bacterias y protozoarios, mantiene una temperatura y pH constante (5.5-6.5) así como un medio con una homogenización adecuada. Éste es un ambiente que producirá fuerzas sobre una forma farmacéutica que serán suficientes para causar erosión o abrasión. Éste no es un buen sitio para la absorción ya que la mucosa del rumen comprende un epitelio escamoso estratificado, actúa como un compartimento que puede localizar y retener la acción de un fármaco (Rathbone, 2012).

En el proceso de fermentación la celulosa es hidrolizada a cadenas cortas de ácidos grasos como ácido acético, propiónico o butírico que son utilizados por el animal en otros procesos metabólicos. Algunas especies bacterianas son capaces de utilizar ácidos grasos y nitrógeno no proteico como amoníaco para sintetizar sus aminoácidos y proteínas. De este modo, la fermentación puede ser beneficiosa por un lado, pero por otro, puede ser perjudicial porque reduce el valor nutritivo de algunos carbohidratos, proteínas de alto valor biológico y permite la hidrogenación de lípidos insaturados (Vandamme y Ellis, 2004).

### **3.10.2 Retículo**

El rumen y retículo frecuentemente son considerados como como una sola unidad funcional separada por el pliegue retículo-rumen, la separación es sólo parcial para todos los objetivos prácticos, permitiendo el libre intercambio del contenido. El retículo toma su nombre de la disposición en forma de red de los pliegues de su mucosa y está situado cranealmente y en contacto con el diafragma (Relling y Mattioli, 2003). En la unidad retículo-rumen el alimento ingerido se mezcla con agua y saliva y queda a merced de la microbiota del rumen.

### **3.10.3 Omaso**

Es el tercer compartimento y es caracterizado por un número de pliegues que le sirven al animal para absorber agua y nutrientes, y su función más importante es actuar como un filtro. El omaso se ubica a la derecha del retículo y posee forma esférica. Después de la rumia y digestión microbiana, el contenido ruminal pasa a través del omaso al abomaso (Relling y Mattioli, 2003).

### **3.10.4 Abomaso**

Es la única parte del tracto gastrointestinal que secreta jugos gástricos. El pH es mucho más bajo que en rumen y generalmente tiene un valor cercano a 3. La gran diferencia en pH puede ser usada para modificaciones adicionales a los agentes suministrados para facilitar su absorción en esta parte o en intestino. Esta región se conoce como estómago verdadero, en muchos aspectos éste actúa de manera similar a la del estómago de los animales monogástricos y es el sitio de secreciones considerables de ácido y pepsina que ayudan a la digestión (Vandamme y Ellis, 2004; Van Soest, 1982). Una característica física de este órgano que merecen mención en relación con la administración de fármacos es el amplio plegado del revestimiento de la mucosa del órgano, que proporcionan un área de superficie ampliada para procesos excretores y de absorción, sino que también pueden utilizarse para retener el material particulado por períodos de tiempo prolongado.

Las significantes diferencias entre el sistema digestivo de los herbívoros y los no-herbívoros permiten explicar la mayoría de las variaciones observadas en la absorción de principios activos entre las especies animales (Vandame y Ellis, 2004).

### **3.10.5 Intestino**

No presenta mayores diferencias con el de los herbívoros no rumiantes salvo el intestino grueso que tiene menor desarrollo ya que la mayor parte de la fermentación

bacteriana se produjo en el rumen. En el intestino se terminan de digerir las proteínas, se digieren las grasas y se absorben todos los productos finales de la digestión.

### 3.11 Importancia económica de la reproducción en rumiantes

Los rumiantes domesticados han tenido una relación simbiótica con el hombre desde tiempos prehistóricos. A pesar de que no todas las sociedades poseen rumiantes domesticados, existen aquellas que los han convertido en una manera de supervivencia, de hecho conforman uno de los más grandes grupos de animales de granja; miembros comunes de esta clase son ovejas, vacas, cabras y ciervos, pero hay muchas otras especies de herbívoros que han evolucionado a lo largo de líneas similares. Se han utilizado con diversos fines, desde fuentes alimenticias para proveer carne y leche hasta usos no alimentarios como los que se enlistan en la Tabla 4 (Soest, 1982; Sabnis y Rathbone, 2013).

Tabla 4. Clasificación de contribuciones no alimentarias de animales rumiantes		
Clasificación	Contribución	Fuente principal
Fibra	Lana Cabello	Ovejas, cabras, camélidos,
Piel	Cueros pieles	Todos los rumiantes Ovejas, camélidos
Productos no comestibles	Grasas no comestibles Cuernos, huesos Extractos endócrinos	Vacas, ovejas y búfalos Vacas, búfalos Vacas, ovejas
Residuos	Fertilizante Combustible (estiércol) Gas metano	Rumiantes domésticos Vacas, ovejas, camellos, Vacas, búfalo
Conservación	Pastoreo Distribución de semillas Ecología (mantenimiento y restauración)	Todos los rumiantes

En una sociedad como la nuestra, la diversidad de productos tales como carne, leche, cuero y lana, son factores de importancia económica. En vacunos, ovinos y caprinos, la reproducción es un aspecto de vital importancia en su explotación; una alta eficiencia reproductiva es requisito indispensable para el éxito económico del productor y debido a ello se han tenido que desarrollar tecnologías para hacer más eficiente su producción y mejorar su reproducción (Wagner y Marmolejos, 1995).

En la ganadería contemporánea es necesario entender la teoría de la regulación de las funciones sexuales sobre la base de los conocimientos científicos, porque sólo desde este punto de vista es posible dirigir y organizar concretamente la crianza, así como valorar y resolver con éxito las perturbaciones reproductoras. De ahí que diseñar sistemas que garanticen la optimización y mejora en la reproducción es un reto al que se enfrenta la medicina veterinaria (Rathbone, 2012).

### **3.12 Suplementación alimenticia y reproducción en rumiantes**

En condiciones tropicales es muy difícil encontrar un forraje que sea capaz de suministrar, en cantidad y calidad, todos los nutrientes que requiere el animal. Así se impone la necesidad de suministrar suplementos alimenticios. La actividad reproductiva de los rumiantes es nutricionalmente exigente y requiere de un suministro constante y adecuado de energía, proteína y minerales. En bovinos, ocurren una serie de cambios fisiológicos durante la gestación tardía, en el momento del parto y durante la lactación que imponen sobre el animal fuertes demandas de nutrientes, y además debe quedar una reserva metabólica para reiniciar la actividad reproductiva. Así el proceso reproductivo, la producción de carne y leche establecen la necesidad de suministrar diariamente los nutrientes requeridos ya que condiciones de desnutrición afectan considerablemente la respuesta animal (Garmendia, 2005).

Generalmente, para maximizar el rendimiento de los animales de granja se ofrecen suplementos ricos en proteínas, los cuales pueden perjudicar la ureogénesis e incrementar la concentración de amoníaco en plasma, resultando en infertilidad,

disminución de la producción de leche, incremento en la excreción de nitrógeno en orina y heces contribuyendo a la contaminación ambiental. Por lo tanto, la suplementación de nutrientes específicos puede mejorar la fertilidad, la producción de leche, la utilización del Nitrógeno en la reproducción mediante una disminución de amoniaco en plasma mediante una regulación eficiente del ciclo de la urea (Chacher *et al.*, 2013).

### **3.13 L-arginina**

Los aminoácidos constituyen un grupo de nutrientes muy especiales. Su principal función es la incorporación a proteínas, también forman parte de péptidos de gran interés fisiológico y son precursores de todas las sustancias nitrogenadas del organismo (con excepción de las vitaminas). La arginina está clasificada como un aminoácido hidrófobo básico teniendo un carbono alfa asimétrico, lo que le confiere actividad óptica; por esta propiedad, los aminoácidos se dividen en dos tipos de compuestos, que son Levógiro (L) y Dextrógiro (D). L-arginina es la única forma que se encuentra disponible en el medio natural y biológicamente la más metabolizable por el organismo. La L-arginina es un aminoácido alcalino en soluciones fisiológicas y, por lo tanto, para evitar un desequilibrio ácido-base, su sal HCl (L-arginina·HCl), se utiliza generalmente para administraciones intravenosas en animales y humanos (Ruíz de Chávez, 2014).

L-arginina·HCl juega un rol importante en la regulación del ciclo de la urea, sirve como sustrato para la síntesis de una de las más importantes fuentes de energía celular como lo es la creatina. Tiene un papel significativo en la eliminación del nitrógeno, el lactato y amoniaco en plasma, favorece la síntesis de aminoácidos como Glutamato y Prolina, puede estimular la liberación de insulina y tiene efectos antioxidantes (Bulbarela *et al.*, 2009).

### 3.14 L-arginina y su importancia en reproducción

L-arginina, juega un rol importante en la fisiología reproductiva de los mamíferos; ha demostrado estimular la liberación de hormonas anabólicas, mejora el balance de nitrógeno, es inmuno estimulador y timotrófico; además incrementa la tasa ovulatoria en mamíferos. Se ha observado que es un potente estimulador en la producción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnH) y la secreción de Hormona luteinizante. Por lo anterior, la suplementación en la dieta con L-arginina durante la gestación ha demostrado evitar la muerte embrionaria y con ello favorecer la prolificidad (Chacher, *et al.*, 2013).

L-arginina es un precursor para la síntesis de óxido nítrico (ON) y poliaminas. Tanto el ON como las poliaminas tienen funciones fisiológicas importantes sobre la reproducción en rumiantes. El ON es un importante factor angiogénico, que juega un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo vascular de la placenta, lo cual favorece el flujo sanguíneo útero-placentario permitiendo la entrega de nutrientes y oxígeno de la madre al feto (Chacher *et al.*, 2013). Participa en la función ovárica, el desarrollo folicular y la ovulación (Bulbarela *et al.*, 2009), del mismo modo al ON se le ha relacionado en la capacitación espermática, la implantación del embrión y en el mantenimiento de la gestación (Faletti, 1999).

Las poliaminas (putrecina, espermina y espermidina) también son esenciales para el desarrollo de la placenta y embriogénesis en mamíferos, síntesis de proteínas, atrapan especies reactivas de oxígeno y estimulan la proliferación y diferenciación celular (Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.* 2014). A pesar del hecho de que los rumiantes pueden sintetizarla, la L-arginina se considera un AA esencial porque la *síntesis de novo* no es suficiente para satisfacer los requerimientos particularmente en las etapas tempranas del crecimiento (Chacher *et al.*, 2013).

Un inconveniente que presenta L-arginina, es su rápida degradación en el rumen. La ingesta de este aminoácido con impacto en la salud y reproducción del ganado ha tomado cierta preocupación ya que administrada oralmente aún en grandes cantidades, no entra en la circulación sistémica debido a que el 40% de ésta, se

degrada en el rumen (Kingston-Smith, 2013). Por ello, es necesario diseñar suplementos alimenticios conteniendo L-arginina·HCl que resistan la degradación ruminal y que permitan su absorción para mejorar la reproducción en este grupo de animales.

### **3.15 Cuantificación de aminoácidos por el método de Moore y Stein**

Para la investigación sobre la separación cromatográfica de aminoácidos, Moore y Stein (1948) propusieron la técnica de reacción con ninhidrina. Hoy en día se considera que es la técnica más antigua para cuantificación de aminoácidos, sin embargo ésta presenta alta sensibilidad, ya que desde que se propuso fue diseñada para permitir la determinación de bajas concentraciones de aminoácidos en el efluente del sistema cromatográfico (Moore y Stein, 1948). El procedimiento se basa en la reacción de aminoácidos con ninhidrina reducida (tricetohidrindenhidrato) a pH 5; introduciendo un agente reductor en el sistema para prevenir la oxidación de la hidridantina formada como resultado de la desaminación oxidativa. Años más tarde Moore y Stein (1968) presentaron modificaciones a su método para utilizar Dimetilsulfóxido en lugar de metilcelosolve (agente teratogénico y de difícil manipulación) como solvente de la ninhidrina y añadir directamente la hidridantina. El color púrpura formado por la reacción de aminoácidos en solución con ninhidrina se atribuye al anión de dicetohidrindylidenedicetohidridandamina (Moore, 1968).

### **3.16 Mecanismo y cinética de liberación**

El término mecanismo de liberación ha sido utilizado como una descripción del camino por el cual las moléculas del fármaco son transportadas o liberadas desde la forma farmacéutica que lo contiene y como una descripción del proceso o evento que determina su velocidad de liberación (Fredenberg *et al.*, 2011). Los principales mecanismos de liberación de micropartículas incluyen difusión, disolución, ósmosis y erosión.

1. Difusión es el mecanismo más comúnmente involucrado, el fluido de disolución penetra la pared, disuelve el núcleo y éste se libera a través de canales intersticiales. Por lo tanto, la liberación total depende de la velocidad a la cual el fluido de disolución penetra la pared de la micropartícula, la velocidad a la que el fármaco se disuelve y la velocidad a la que el fármaco disuelto se libera y dispersa hacia la superficie. La cinética de liberación obedece a la ecuación de Higuchi.
2. Disolución: la velocidad de disolución de la cubierta de polímero determina la velocidad de liberación del fármaco desde la micropartícula cuando la capa es soluble en el medio de disolución. El espesor de la capa y su solubilidad en el medio, influyen en la velocidad de liberación.
3. Ósmosis: la capa de polímero actúa como una membrana semipermeable y permite la creación de una diferencia de presión osmótica entre el interior y el exterior de la cápsula a través de pequeños poros en la cubierta.
4. Erosión: la erosión de la cubierta debido al pH y/o a la hidrólisis enzimática provoca la liberación del fármaco.

Estudiar la liberación del principio activo desde las micropartículas se ha vuelto complicado debido a la gran diversidad en las formas físicas de las micropartículas, el tamaño, forma, arreglo del núcleo y la cubierta (Gupta y Dey, 2012).

Los modelos matemáticos desarrollados hasta el momento desempeñan un papel muy importante en la liberación controlada de fármacos, ya que permiten determinar los principales parámetros y los mecanismos que sigue la liberación de la molécula desde la matriz (Machín, 2013). Las propiedades fisicoquímicas del material del núcleo tales como solubilidad, difusibilidad y coeficiente de partición, así como las propiedades del material de la cubierta como porosidad, grosor e inercia, dificultan el modelaje de la liberación del fármaco. Sin embargo, con base en varios estudios relativos a las características de liberación, la liberación puede ajustarse a los siguientes modelos:

### 3.16.1 Cinética de orden cero

Una cinética de orden cero es el modelo ideal que debe seguir la liberación de un fármaco si el objetivo es conseguir una actividad constante y prolongada, debido a que se libera durante todo el proceso la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo. Este modelo suele adecuarse cuando el mecanismo predominante es la relajación/erosión del polímero, (Valor de  $n$  cercano a 1 en el modelo de Korsmeyer-Peppas), y de manera simple viene expresado por la siguiente ecuación:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t$$

Donde  $Q_t$  es la cantidad de fármaco disuelto en el tiempo  $t$ ,  $Q_0$  es la cantidad inicial del fármaco en la solución (la mayoría de las veces  $Q_0=0$ ) y  $k_0$  es la constante de liberación de orden cero (Costa y Sousa, 2001).

### 3.16.2 Cinética de primer orden

Este modelo muestra, por lo general, buena correlación con los perfiles de liberación que presentan un mecanismo mixto o transporte anómalo, en el que influyen, en distinta proporción, tanto la difusión según Fick como la relajación/erosión de la matriz polimérica. Las formas farmacéuticas que siguen este perfil de liberación, tales como las que contienen fármacos hidrosolubles en matrices porosas, liberan el fármaco de manera proporcional a la cantidad de fármaco remanente en su interior, de tal manera que la cantidad de fármaco liberado por unidad de tiempo disminuye (Costa y Sousa, 2001).

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 t$$

### 3.16.3 Higuchi

Higuchi publicó en 1963 probablemente la más famosa y frecuente ecuación matemática utilizada para describir la velocidad de liberación controlada de un fármaco en un sistema matricial (Andreetta, 2003). El modelo de Higuchi se emplea en los estudios de liberación de fármacos desde matrices no erosionables. Higuchi describió la liberación como un proceso de difusión simple que sigue la ley de Fick y que depende de la raíz cuadrada del tiempo. El modelo de Higuchi simplificado puede expresarse de la siguiente manera:

$$Q_t = k_H \sqrt{t}$$

Donde  $t$  es el tiempo de liberación,  $k_H$  es la constante de disolución de Higuchi.

### 3.16.4 Korsmeyer-Peppas

Se trata de un modelo simple, semiempírico, que relaciona exponencialmente la liberación del fármaco con el tiempo transcurrido. Se emplea para determinar si la cinética de liberación sigue un mecanismo de difusión que obedece a la ley de Fick o si por el contrario sigue un mecanismo diferente:

Según Peppas, el valor de  $n$  se relaciona con los diferentes mecanismos de liberación, de la siguiente manera (Tabla 5):

- Valores cercanos a 0,5 indican que la liberación sigue un comportamiento fickiano, siendo la difusión el principal mecanismo implicado.
- Valores de  $n$  cercanos a 1 indican que la liberación está controlada por procesos de relajación/erosión del polímero, lo que se denomina transporte "Caso II". Estos perfiles se ajustan al modelo de cinética de orden cero, por lo que presentan una liberación constante en el tiempo (Costa & Sousa Lobo, 2001).
- Valores comprendidos entre los dos anteriores (variables según geometría) son indicativos de un mecanismo más complejo, en el que influyen ambos procesos,

difusión y relajación/erosión de la matriz polimérica. Es lo que se denomina un transporte “anómalo”.

- Valores superiores a 1,0 muestran lo que algunos autores denominan transporte tipo “Súper Caso II”, donde se tiene un proceso de difusión no fickiano.

<b>Tabla 5. Intervalos de uso del valor de n</b>		
<b>n</b>	<b>Mecanismo de transporte del fármaco</b>	<b>Tipo de liberación en función del tiempo</b>
<b>0.5</b>	Difusión fickiana	$t^{-0.5}$
<b>0.5&lt;n&lt;1.0</b>	Transporte anómalo	$t^{n-1}$
<b>1.0</b>	Transporte caso II	Liberación de orden cero
<b>&gt;1.0</b>	Transporte súper caso II	$t^{n-1}$

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los rumiantes representan el mayor sector dentro de los animales de granja, actualmente desempeñan un papel importante para la sociedad humana, ya que además de proveer alimento como carne y leche, de ellos se obtienen otros productos como cueros, lanas, etc. Por lo tanto, el mantenimiento de su salud es de suma importancia debido al impacto económico que representa para la industria del ganado. La reproducción de rumiantes domesticados es un punto clave en la explotación de este grupo de animales. L-arginina juega un rol importante en los procesos reproductivos, ya que es el sustrato de la enzima óxido nítrico sintetasa para la producción de óxido nítrico (NO), el cual influye en la fisiología reproductiva. El óxido nítrico participa a nivel de Sistema Nervioso, sugiriéndose que puede estimular las terminaciones nerviosas de las neuronas secretoras de la Hormona Liberadora de gonadotropinas (GnRH), aumentar su producción y obtener mayor actividad ovulatoria.

Los rumiantes poseen un sistema digestivo único. Debido al proceso fermentativo que ocurre en el rumen, la mayoría de los compuestos bioactivos no son estables en el duro ambiente ruminal. Debido a que resulta un proceso complejo el hecho de que los nutrientes lleguen hasta el intestino para su absorción, es importante diseñar estrategias para lograrlo. Las micropartículas son particularmente interesantes para el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación modificada. Con el fin de optimizar el crecimiento y la reproducción, desarrollar un sistema multiparticulado de liberación prolongada, conteniendo L-arginina·HCl que permita alcanzar el sitio de acción es un reto que se pretende alcanzar para mejorar el ciclo reproductivo de los rumiantes y con ello obtener mejor beneficio de su explotación.

## 5. HIPÓTESIS

La elaboración de microesferas de L-arginina·HCl formuladas con dos tipos de Eudragit®, uno pH-dependiente y otro de baja permeabilidad preparadas por el método de emulsión-evaporación de solvente evitarán que el aminoácido sea degradado por el pH del rumen y abomaso de los rumiantes, siendo la prueba de disolución el indicativo de selección de la mejor formulación.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Elaborar microcápsulas de L-arginina mediante el método de emulsión/evaporación del solvente como técnica de protección para su liberación intestinal en rumiantes, y evaluar su funcionalidad con la prueba de disolución.

### 6.1 Objetivos específicos

- i. Realizar un estudio de compatibilidad entre las materias primas utilizadas.
- ii. Establecer las condiciones experimentales del proceso de microencapsulación: tipo de emulsión, velocidad y tipo de agitación, sistema de solventes.
- iii. Determinar las variables de la formulación: proporción de polímeros, relación polímero:aminoácido, estabilizante de la emulsión.
- iv. Evaluar el proceso de fabricación y caracterizar el producto microencapsulado.
- v. Evaluar *in vitro* la cantidad liberada de L-arginina·HCl mediante la prueba de disolución.
- vi. Cuantificación de L-arginina·HCl mediante la técnica de Moore y Stein.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Reactivos**

- Eudragit® S100 (Evonik Pharma Polymer). Donado por Helm de México.
- Eudragit® RS100 (Evonik Pharma Polymer). Donado por Helm de México.
- Estearato de Magnesio. (Skant Healthcaren LTD.) Donado por Merck Sharp & Dome.
- L-arginina·HCl. (Sehyex S.A. de C.V.)
- L-arginina grado reactivo (Merck).
- Parafina líquida (Droguería Cosmopolita)
- Etanol (J.T. Baker).
- Acetona (J.T. Baker).
- Ninhidrina (Reactivos Meyer)
- Hexano (Reactivos Meyer)
- El resto de los reactivos para pruebas de evaluación y caracterización, son grado reactivo de J.T. Baker.

### **7.2 Método**

#### **7.2.1 Determinación del tamaño de partícula de L-arginina·HCl**

Se determinó el tamaño promedio de L-arginina·HCl como materia prima con un analizador de tamaño de partícula por difracción láser (Beckman Coulter LS 13 320), utilizando 3 g de muestra.

#### **7.2.2 Selección previa de L-arginina·HCl**

Una muestra de 25 g de L-arginina·HCl fue tamizada en un equipo de tamizado en cascada (Retsch AS200) utilizando mallas estándar ASTM con aperturas desde 425 µm hasta 38 µm. (Mallas: 40, 50, 60, 70, 100, 170, 400, Base). Se eliminaron los

cristales que tenían un tamaño mayor a 90  $\mu\text{m}$  y los cristales más finos, menores a 38  $\mu\text{m}$ . Se utilizaron únicamente los que se retuvieron en malla 400 (38-90  $\mu\text{m}$ ).

### **7.2.3 Estudio de compatibilidad**

Para evaluar posibles interacciones entre los polímeros y L-arginina·HCl, se realizó un estudio de compatibilidad por Calorimetría Diferencial de Barrido en un equipo Mettler Toledo DSC-1. Se analizó una muestra de L-arginina·HCl, Eudragit S100, Eudragit RS100 y la mezcla 1:1 de cada uno de estos polímeros con L-arginina·HCl. Las mezclas fueron estresadas con temperatura, manteniéndolas a 40 °C en un horno (Felisa), por 30 días sin presentar algún cambio físico característico en color o consistencia. Aproximadamente 5 mg de cada muestra fueron calentados en crisoles de aluminio sellados y perforados. La muestra fue equilibrada a 10°C por 2 min. La velocidad de calentamiento fue a 10°C/min. Las mediciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno de 20 °C a 300 °C.

### **7.2.4 Preparación de microesferas**

#### *7.2.4.1 Desarrollo del método por coacervación-adición de un no-solvente*

Con base en la metodología propuesta por Villamizar, *et al.*, (2008) y Martín *et al.*, (2008), se establecieron las condiciones para trabajar con este método. Se prepararon soluciones de Eudragit S100 en acetona con dos diferentes concentraciones: 0.5% y 0.75%. Se emplearon relaciones de solvente:no-solvente: 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 (Tabla 3). Acetona fue elegida como solvente del polímero y hexano como no-solvente.

La solución del polímero en el solvente se vertió en un matraz de fondo redondo con un agitador magnético de 1 cm de longitud. A esta solución se adicionó una cantidad de L-arginina·HCl igual a la cantidad de Eudragit S100 utilizada, formándose una dispersión. El matraz balón se colocó sobre una parrilla de agitación magnética (Barnstead|Thermolyne SP131325) con una velocidad de agitación de 400 rpm. El no-

solvente (Hexano) fue adicionado por goteo a una velocidad de 1 y 2 mL/min utilizando una bureta. Durante todo el tiempo de adición del no-solvente se registraron cualitativamente los cambios en el aspecto de la dispersión coloidal.

Una vez terminada la adición del no-solvente el sistema se colocó sobre una cama de hielo, para endurecer las micropartículas. El producto se recuperó por filtración al vacío con lavados de hexano frío. Las micropartículas se secaron en un horno (Felisa®) a 60°C por 12 horas para remover trazas de disolventes.

La Tabla 6 muestra las condiciones de experimentación del método de coacervación por adición de un no-solvente.

Tabla 6. Condiciones de experimentación por el método de coacervación	
Código de formulación	Condiciones
<b>CP 1</b>	Relación polímero:L-arginina·HCl 1:1 Relación solvente:No-solvente 1:1 Concentración del polímero: 0.5% p/v Velocidad de adición del no-solvente: 1mL/min
<b>CP 2</b>	Relación polímero: L-arginina·HCl 1:1 Relación solvente:No-solvente 1:2 Concentración del polímero: 0.5% p/v Velocidad de adición del no-solvente: 2mL/min Nota: se utilizó un matraz bola
<b>CP 3</b>	Relación polímero: L-arginina·HCl 1:1 Relación solvente:No-solvente 1:3 Concentración del polímero: 0.5% p/v Velocidad de adición del no-solvente: 1mL/min
<b>CP 4</b>	Relación polímero: L-arginina·HCl 1.5:1 Relación solvente:No-solvente 1:1 Concentración del polímero: 0.75% p/v Velocidad de adición del no-solvente: 2mL/min
<b>CP 5</b>	Relación polímero: L-arginina·HCl 1:1 Relación solvente:No-solvente 1:4 Concentración del polímero: 0.5% p/v Velocidad de adición del no-solvente: 2mL/min

El producto intermedio y final del proceso fue monitoreado mediante observación en un estereomicroscopio (Cole parmer 48929-20). Por las características morfológicas que presentó el producto del CP 3, las micropartículas fueron analizadas en un Microscopio Electrónico de Barrido (Jeol JSM-59000LV) para evaluar el grado de protección. Las microfotografías del CP 3 pueden observarse en la Figura 9.

#### *7.2.4.2 Desarrollo del método emulsión- evaporación del solvente*

Se estableció el método de emulsión simple o/o- evaporación del solvente para la preparación de microesferas de L-arginina·HCl. El siguiente método fue desarrollado después de una extensa investigación y experimentación sobre la elección de solventes, tipo de emulsión, diferentes combinaciones de dos polímeros, naturaleza y concentración del agente emulsificante, proporción polímero:aminoácido y métodos de agitación- evaporación.

Solventes como acetona y etanol fueron seleccionados en este método. Se empleó una combinación de copolímeros del ácido metacrílico (Eudragit's). Polisorbato 80 (span 80) y Estearato de Magnesio fueron evaluados como estabilizantes de la emulsión, pero este último fue seleccionado en el método. Se utilizaron dos diferentes relaciones de L-arginina·HCl:polímero y se probaron velocidades de agitación desde 400 rpm hasta 1000 rpm en dos diferentes tipos de agitación: mecánica y magnética.

#### *Microesferas principio activo:polímero (1:10)*

En la preparación de las microesferas se utilizó 1 g de los polímeros Eudragit® con diferentes proporciones (Tabla 7) y fueron disueltos en 12 mL de una solución de acetona:etanol (3:1) usando agitación magnética (Barnstead|Thermolyne SP131325). 100 mg de L-arginina·HCl y 20 mg de Estearato de Mg (20% de la cantidad del principio activo) fueron dispersados en la solución anterior del polímero para preparar Microesferas con una relación arginina:polímeros de 1:10. La dispersión resultante fue

emulsificada en 120 mL de parafina líquida, equivalente a 10 veces el volumen de la solución del polímero. Se utilizó un agitador magnético de 5 cm, agitando a 900 rpm en una parrilla de agitación magnética durante 4 h hasta eliminación del solvente. Después de la evaporación de la mezcla acetona:etanol las microesferas formadas fueron recolectadas por filtración al vacío (filtro Whatman 541) y lavadas 3 veces con 50 mL de hexano para endurecerlas y eliminar residuos de parafina. Las microesferas se dejaron secar por un mínimo de 12 h a temperatura ambiente. A partir de ahora, las combinaciones de los polímeros se mencionarán considerando el primer término como Eudragit S100 y el segundo como Eudragit RS100.

<b>Tabla 7. Formulaciones de los lotes preparados</b>				
<b>Lote</b>	<b>Eudragit® S 100 (mg)</b>	<b>Eudragit® RS 100 (mg)</b>	<b>L-arginina (mg)</b>	<b>Estearato de magnesio (mg)</b>
<b>1</b>	800	200	100	20
<b>2</b>	700	300	100	20
<b>3</b>	600	400	100	20
<b>4</b>	500	500	100	20
<b>5</b>	400	600	100	20
<b>6</b>	300	700	100	20
<b>7</b>	450	550	100	20
<b>8</b>	550	450	100	20
<b>9</b>	500	500	50	30

### *Microesferas principio activo:polímero (1:20)*

Se siguió la metodología descrita anteriormente con algunas modificaciones: la relación principio activo:polímero se cambió a 1:20. La cantidad de estabilizante utilizada es mayor, utilizándose un 60 % de la cantidad de L-arginina·HCl (Tabla 7). El resto de las condiciones fueron las mismas que en el método anterior.

#### **7.2.5 Rendimiento del proceso**

El rendimiento del proceso de preparación de todos los lotes fue calculado usando el peso en gramos del producto final después de haber sido secado con respecto al peso total inicial de L-arginina·HCl y polímeros usados para la preparación de las Microesferas. Con la siguiente ecuación se determinó el porcentaje de rendimiento:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Peso (g) de microesferas obtenidas}}{\text{peso (g) de L - arginina \cdot HCl + polímero + Estearato de Mg}} \times 100$$

#### **7.2.6 Eficiencia de encapsulación**

Para cada lote, el contenido de L-arginina·HCl en las microesferas fue determinado de la siguiente manera: se pesó 1 g de microesferas y con ayuda de un mortero fueron trituradas y extraídas con 150 mL de Buffer pH 7. Esta dispersión se agitó por 20 min, se filtró (papel whatman 541) y se tomó una alícuota de 15  $\mu$ L que fue analizada espectrofotométricamente (UV-Vis Varian Cary 50) a 570 nm con la técnica de Moore y Stein. Este procedimiento se realizó por triplicado. La eficiencia de encapsulación en términos porcentuales se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia encapsulación} = \frac{\text{Contenido de L - arginina en las microesferas}}{\text{Contenido teórico de L - arginina}} \times 100$$

### **7.2.7 Análisis microscópico**

Las características de superficie y morfología externa e interna de las Microesferas fueron investigadas y fotografiadas usando un estereomicroscopio Olympus SZX7. El microscopio cuenta con una cámara digital conectada a una computadora, donde las micrografías son analizadas con un programa específico para análisis de imagen.

### **7.2.8 Determinación del tamaño de partícula**

Para determinar el tamaño de las Microesferas se utilizó un analizador de tamaño de partículas por difracción láser Horiba LA-950V2. De los lotes elaborados, 8 fueron analizados por este método. Las Microesferas fueron suspendidas en una solución acuosa de tween 80 al 1% y posteriormente fueron vertidas a la celda de difracción de flujo continuo.

A un lote se le determinó el tamaño promedio mediante microscopía. Se utilizó un estereomicroscopio (Amscope) que cuenta con una cámara digital que se integró a una computadora, y las micrografías fueron analizadas con un programa específico para análisis de imagen (AmScopex64). Un total de 100 Microesferas fueron evaluadas y se reportó el tamaño promedio.

### **7.2.9 Estudio de liberación *in vitro***

La prueba de disolución se realizó en un disolutor Hanson Research utilizando el aparato 1. Se colocó 1 g de Microesferas dentro de las canastillas y la prueba se realizó con 500 mL de medio a  $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 50 rpm. Como medios de disolución se utilizaron tres diferentes buffers, los cuales simularon los pH's del tracto gastrointestinal de rumiantes (rumen, abomaso e intestino). Se inició con 500 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 6.0 (rumen). Se tomaron alícuotas (con reposición del medio) de 0.3 mL cada hora hasta completar 10 horas. Posteriormente, se sustituyó el medio con un buffer de acetatos pH 3.0 (abomaso), tomando 0.3 mL de muestra

cada 10 minutos durante 50 minutos y finalmente, se cambió el medio a pH 7.5 (intestino) utilizando 500 mL de buffer de fosfatos; se tomaron muestras de 0.3 mL cada 15 minutos durante 105 min. En cada muestreo, un volumen igual al retirado fue reemplazado con el mismo medio para mantener constante el volumen. La prueba se realizó por triplicado.

De cada muestra, se tomaron 15  $\mu$ L para cuantificar la cantidad de L-arginina·HCl liberada siguiendo el método de Moore y Stein que se describirá en el siguiente apartado.

#### **7.2.10 Cuantificación de L-arginina por el método de Moore y Stein**

Con este método se determinó el contenido de L-arginina·HCl en las microesferas (Eficiencia de encapsulación) y la cantidad de aminoácido liberado en la prueba de disolución. Las muestras se prepararon como se especifica en cada apartado y se procedió de la siguiente manera:

##### *Solución reactivo*

Por cada mL de solución reactivo, se pesaron 20 mg de Ninhidrina que fueron disueltos en 0.75 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Por separado, 3 mg de hidridantina se disolvieron en 0.25 mL de buffer de acetatos pH 5.5. Ambas soluciones fueron mezcladas antes de usarse ya que se oxidan fácilmente.

La cantidad de muestra que fue vertida en un tubo de ensaye con tapa rosca fue de 15  $\mu$ L y posteriormente se adicionaron 485  $\mu$ L de agua purificada y 200  $\mu$ L de reactivo de ninhidrina. Los tubos se taparon, se agitaron manualmente para homogenizar la solución y se llevaron a ebullición en un baño de temperatura constante (Scorpion Scientific) durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, los tubos fueron retirados del baño y se agregó 1 mL de una mezcla etanol:agua (1:1). Estas soluciones fueron leídas en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Cary 50) a una longitud de onda de 570 nm.

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de L-arginina (Merck) al 0.028% (14 mg de L-arginina/500mL de agua destilada). A cada punto de la curva, se añadió agua destilada, solución reactivo (200  $\mu$ L) y después de 30 min en ebullición, se agregó 1 mL de etanol al 50% y se procedió a leer en espectrofotómetro como se describió anteriormente. Con la ecuación obtenida a partir de esta curva, se determinó el contenido de L-arginina·HCl presente en las muestras problema.

### **7.2.11 Aplicación de modelos de cinética de liberación**

Para investigar el mecanismo de liberación *in vitro* de las formulaciones, los datos de liberación fueron analizados usando los modelos cinéticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. El mejor modelo de ajuste fue identificado calculando el coeficiente de regresión ( $R^2$ ), donde el mayor valor representó el mejor ajuste.

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1 Determinación del tamaño de partícula de L-arginina·HCl**

El control del tamaño de partícula de la materia prima es esencial para lograr uniformidad en el tamaño del producto final así como para controlar la precisión y reproducción de la dosis. En la figura 6, se muestra el resultado de la distribución de tamaño de partícula de L-arginina·HCl. Los cristales tienen un tamaño promedio de 240.1  $\mu$ m, pero es una distribución sesgada hacia la derecha y existen partículas de casi el doble de tamaño (468.9  $\mu$ m). Por lo tanto, fue necesario homogenizar el tamaño de la materia prima antes de utilizarse en el proceso de microencapsulación por el método de evaporación del disolvente.

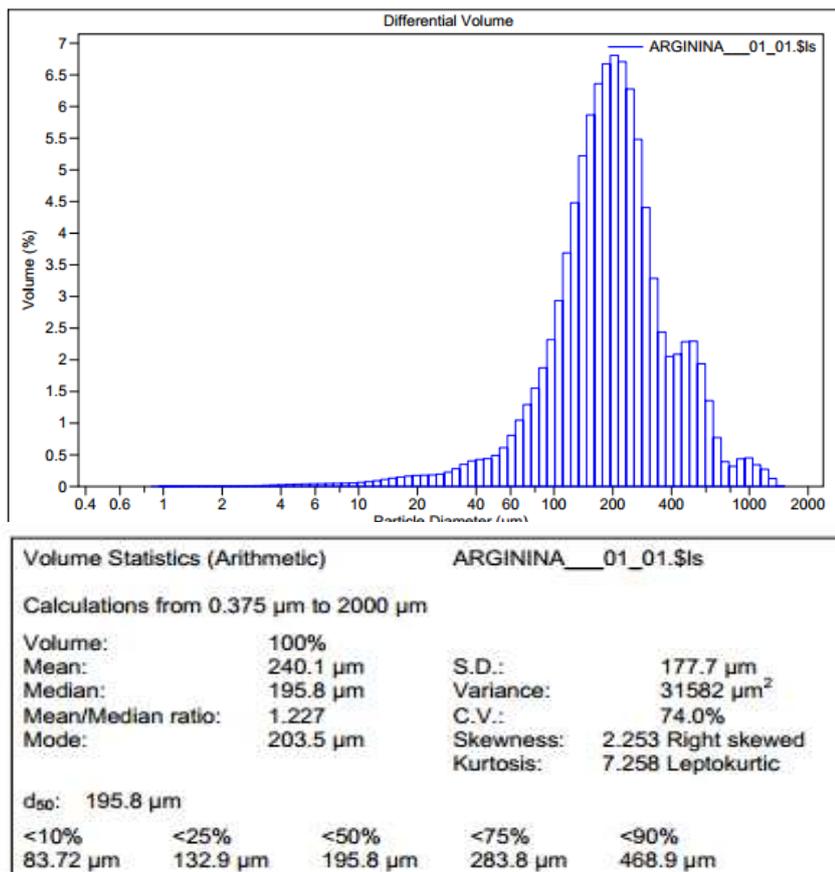


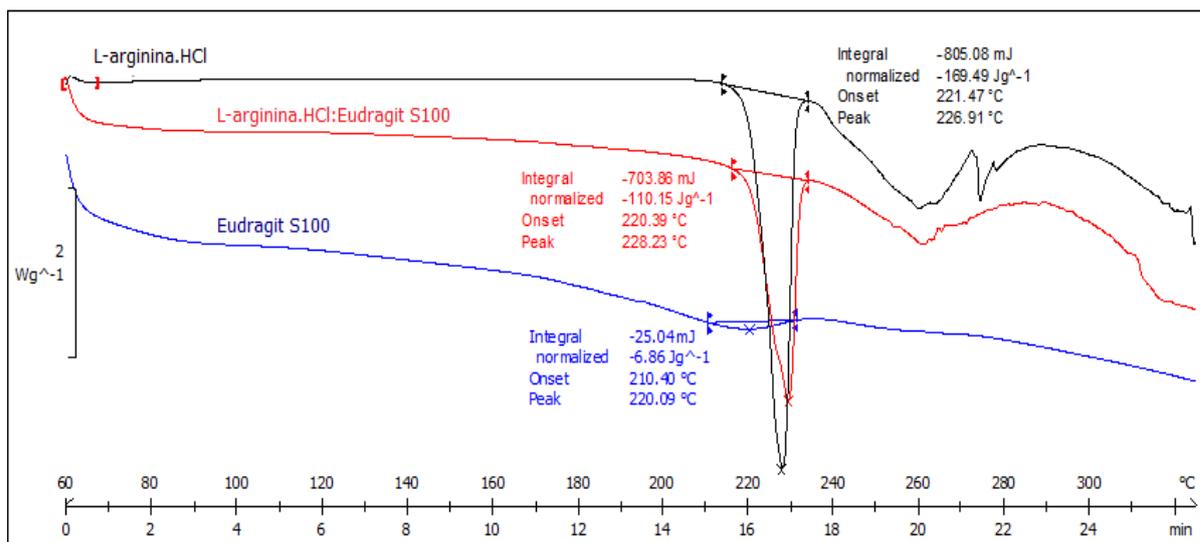
Figura 6. Distribución del tamaño de partícula de L-arginina·HCl

## 8.2 Selección previa de L-arginina· HCl

En el caso de los productos sólidos puede ser necesario seleccionar el tamaño de las partículas o efectuar transformaciones en su forma. L-arginina·HCl fue previamente seleccionada para utilizar cristales de tamaño entre 38 y 90 µm en la preparación de microesferas. El tamaño medio del producto final dependerá entre otras cosas, del tamaño de partícula del material a encapsular. Si se hubiese utilizado la materia sin una previa selección, aquellos cristales de mayor tamaño conducirían a Microesferas más grandes, que rebasarían la escala micrométrica. Además, una variación significativa en el tamaño del núcleo, permite que haya variabilidad en la cantidad de principio activo en las microesferas, lo que se traduce en una variación de la dosis.

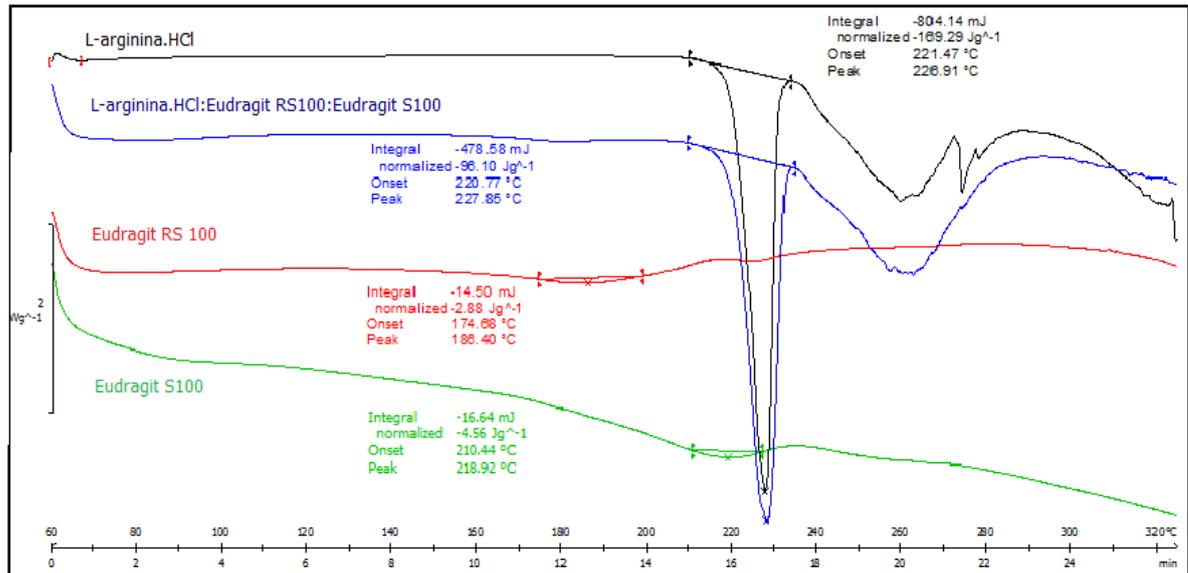
### 8.3 Estudio de compatibilidad

Se realizó un análisis por Calorimetría Diferencia de Barrido para evaluar posibles interacciones en estado sólido entre los componentes y en consecuencia evaluar la compatibilidad entre L-arginina·HCl y los polímeros. Los termogramas de los polímeros de trabajo, de L-arginina·HCl en estado puro y mezclados entre sí se muestran en la Figura 7 y 8.



**Figura 7.** Termograma del polímero Eudragit S100, L-arginina·HCl y la mezcla 1:1 de ambos.

L-arginina·HCl tiene un punto de fusión entre 226-230°C (CAS No: 1119-34-2;15595-35-4, Chemical Name: L-Arginine hydrochloride). En la Figura 7, L-arginina·HCl presenta un marcado evento endotérmico en 228°C que corresponde a su punto de fusión, mismo que se conserva cuando se encuentra en combinación con Eudragit S100. Esto indica que los cristales de L-arginina·HCl permanecen intactos cuando se mezclan con el polímero.



**Figura 8.** Termograma del polímero Eudragit RS100, Eudragit S100 y la mezcla de ambos polímeros con L-arginina·HCl.

En la Figura 8, se presentan los termogramas sobrepuestos de los dos polímeros y la combinación de éstos con L-arginina·HCl. El pico característico de L-arginina·HCl no se vió modificado por la mezcla de polímeros y tampoco se observó un cambio en la temperatura de fusión, mostrando que no existe incompatibilidad entre el aminoácido y Eudragit S100-Eudragit RS100.

Las curvas DSC de los polímeros corresponden con las reportadas en trabajos similares. Eudragit RS 100, presenta un pico ancho pero de muy baja intensidad entre 180 y 190°C, correspondiente a la entalpía de relajación del Eudragit RS (Trapani *et al.*, 2007).

## 8.4 Preparación de microesferas

### 8.4.1 Desarrollo del método por coacervación-adición de un no-solvente

Para la preparación de micropartículas por este método, se realizaron diferentes pruebas variando las relaciones solvente:no-solvente, polímero:principio activo, distintas concentraciones del polímero y diferentes velocidades de adición del no solvente. En la Figura 9, se muestran microfotografías de los cristales de L-arginina·HCl y del polímero Eudragit S 100. En este método, no se utilizaron cristales de tamaño homogéneo del aminoácido, y en la figura 9a se observa la variabilidad en el tamaño de partícula.

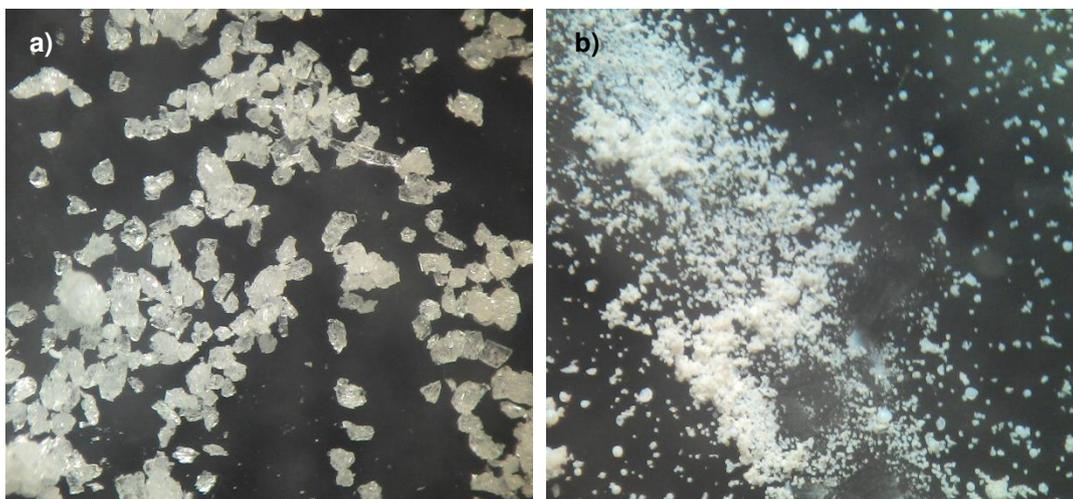
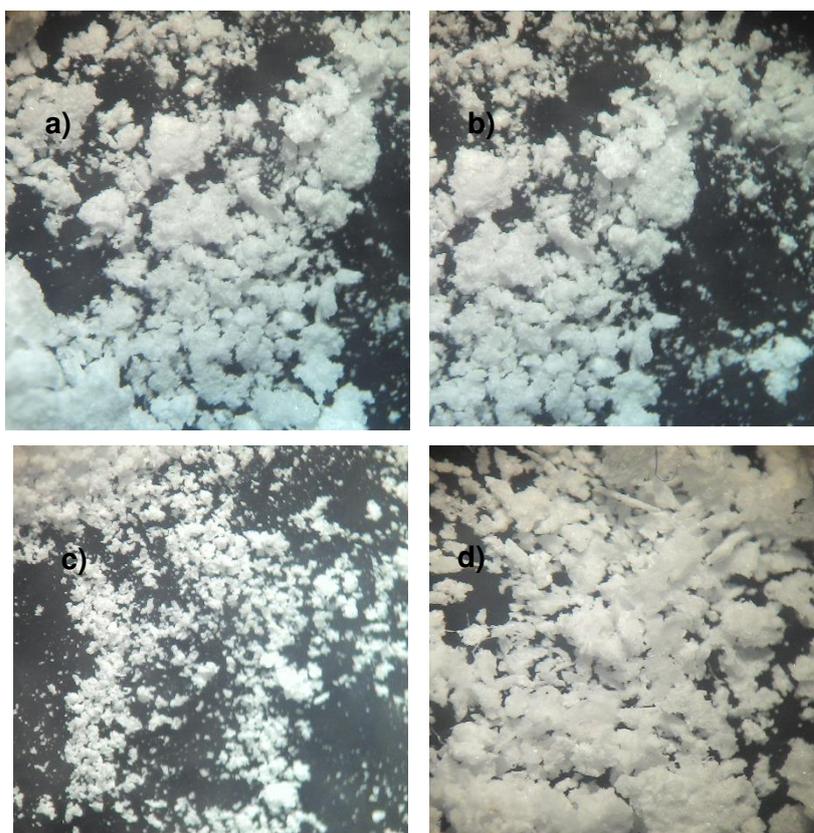


Figura 9. Microfotografía de la materia prima: a) cristales de L-arginina·HCl y b) Eudragit S 100.

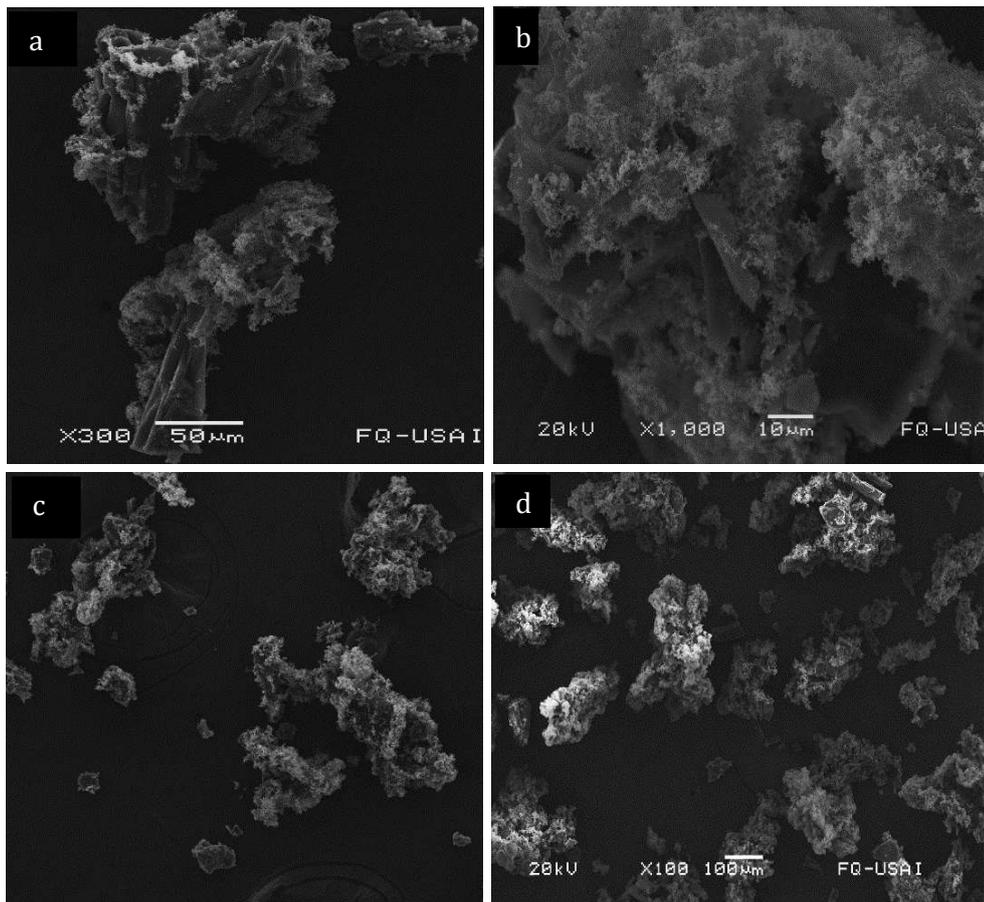
Durante el periodo de preparación de las micropartículas, se realizaron observaciones del producto con un estereomicroscopio para observar el transcurso de la formación de los coacervados. Las imágenes microscópicas de la Figura 10 muestran los productos finales de CP 1, CP 2, CP 3 y CP 4 (Figura 10a-10d, respectivamente). Se observó que los productos CP1 y CP 2 no eran más que un aglomerado de polímero

y L-arginina·HCl. El CP 3 presentó características diferentes, las partículas fueron más homogéneas; a esta escala microscópica no se observaron fibras ni plastas de polímero. Por lo tanto, una muestra de este producto fue analizada por microscopía electrónica de barrido para obtener más detalle de lo que ocurrió durante el proceso (Figura 11).



**Figura 10.** Micrografías de a) CP 1, b) CP 2, c) CP 3 y d) CP 4. Tomas con estereomicroscopio.

En la Figura 11, con más detalle se observa que el polímero se depositó formando fibras o precipitados finos sobre los cristales de L-arginina·HCl, y esto no implica una verdadera deposición, incluso pueden observarse partículas “desnudas”. Esto se debe a que los polímeros empleados no se depositaron como una cubierta continua sobre los cristales de arginina.



**Figura 11** Micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido de micropartículas obtenidas por coacervación (CP 3); a) y b) Cristales de L-arginina con fibras de polímero en su superficie. En c) y d) obsérvese algunos cristales de L-arginina sin polímero en la superficie

Se aumentó la concentración del polímero para evaluar si lo observado era por falta de polímero (CP 4), y también se incrementó la velocidad de agitación para tener el sistema con mayor homogeneidad, pero los experimentos no fueron adecuados porque el polímero precipitó sobre el fondo del matraz, sin cubrir a los cristales del núcleo (Figura 11d). Además, en este experimento no se utilizaron cristales de L-arginina·HCl de tamaño uniforme, por ello los de mayor tamaño se concentraron casi desprotegidos de polímero.

Los resultados no fueron satisfactorios porque las micropartículas obtenidas no estaban siendo protegidas en su totalidad. Después de analizar estos resultados, se probó un segundo método de microencapsulación mediante el método de evaporación del solvente.

## **8.4.2 Desarrollo del método emulsión- evaporación del solvente**

### *8.4.2.1 Determinación de las condiciones experimentales del proceso.*

Se trabajó con la sal Clorhidrato de L-arginina (L-arginina·HCl) para mejorar la solubilidad de la molécula en los fluidos intestinales. Además, L-arginina es un aminoácido alcalino en soluciones fisiológicas por lo que se utiliza en forma de sal HCl para evitar un desequilibrio ácido-base en sistemas de administraciones intravenosas en animales y humanos (Ruíz de Chávez, 2014).

Se eligió el método de la emulsión/evaporación del solvente porque es un método sencillo, económico y que recientemente se ha utilizado para encapsular fármacos hidrosolubles (Li *et al.*, 2008). Se estableció el sistema parafina/acetona en una emulsión simple o/o ya que L-arginina·HCl no es soluble en los solventes orgánicos que se utilizan frecuentemente en este método, permitiéndose alcanzar altas eficiencias de encapsulación. Parafina líquida fue seleccionada como fase externa porque los polímeros y L-arginina·HCl son insolubles en ella, mientras que la mezcla de acetona:etanol (3:1) fue elegida como solventes de los polímeros y por lo tanto como fase interna. Acetona tiene una constante dieléctrica de 20.7 y etanol de 24.5. Se sabe que aquellos solventes con constante dieléctrica entre 10 y 40 muestran pobre miscibilidad con la parafina líquida. Además de que acetona:etanol son considerados como solventes de baja o nula toxicidad y presentan un bajo punto de ebullición, lo cual facilita la evaporación a temperatura ambiente (Das *et al.*, 2015).

De acuerdo con El-Bari, *et al.*, la relación de volúmenes entre fase interna y fase externa impacta en el tamaño de partícula del producto final. Cuando ésta decremente, disminuye el tamaño de las microesferas. Por ello, en este estudio se seleccionó un

volumen de fase continua 10 veces mayor a la fase dispersa. En algunos trabajos se han reportado incluso volúmenes de fase externa hasta 20 veces mayor, pero la morfología del producto se ve afectada por la rápida evaporación del solvente y la formación de poros. Durante el diseño del método se realizó un experimento con agitación mecánica utilizando una propela de hélice de 2 aspas. Este tipo de agitación no fue utilizado en la elaboración de los lotes porque el rendimiento del proceso se vio disminuido, ya que una cantidad considerable de polímero y aminoácido se adhería a la propela provocando pérdidas considerables. Por lo tanto, la evaporación del solvente se consiguió con agitación magnética, sometiendo el sistema a velocidades entre 400 y 1000 rpm. La velocidad de agitación óptima fue la que permitió la formación de una emulsión fina y estable (900 rpm). El tiempo de agitación fue entre 3 y 4 horas, dependiendo de la velocidad de agitación, hasta que el solvente se hubiese evaporado por completo.

Hexano fue utilizado para limpiar la superficie de las microesferas porque éste remueve la parafina líquida sin alterar la integridad de las microesferas. Además, como no-solvente de Eudragit, permite endurecer las microesferas formadas.

#### *8.4.2.2 Determinación de las variables de la formulación*

Se diseñó una serie de formulaciones utilizando la mezcla de dos tipos de Eudragit®. En este sentido, se propuso la combinación de una variedad aniónica pH-dependiente con una catiónica de baja permeabilidad. Los polímeros seleccionados fueron Eudragit S100 y Eudragit RS 100 respectivamente, para modular la velocidad de liberación en medios que simulan el contenido ruminal.

El primer lote contuvo mayor cantidad del polímero pH-dependiente, en una proporción 4:1 con respecto al de baja permeabilidad. A partir de éste, los siguientes lotes se formularon aumentando un 10% la cantidad de Eudragit RS hasta que se invirtieron las proporciones.

Emulsificantes como el span 80 y Estearato de Mg fueron evaluados, sin embargo, este último fue agregado a las formulaciones como estabilizador de las gotas para sobreponer el problema de coalescencia durante la evaporación del solvente (Haznedar y Dortunc, 2004). El uso de estearato de Magnesio como agente de dispersión disminuyó la tensión interfacial entre las fases de la emulsión, permitiendo mantener la forma esférica de las gotas hasta que ocurrió la evaporación total del solvente y fueron endurecidas lo suficiente para ser recolectadas.

Partiendo de la información proporcionada en los trabajos reportados por Kendall *et al.*, 2009 y Lamprecht *et al.*, 2003, se estableció trabajar con la relación L-arginina·HCl:polímero 1:10, ya que cantidades inferiores a éstas, no ofrecieron la protección deseada para fines similares a los que fueron planteados en este trabajo, incluso en otras investigaciones se demostró que con relaciones fármaco:polímero 1:1 y 1:2 no se consiguió la formación de microesferas o en algunos casos, éstas eran amorfas con poco contenido de fármaco (Khamanga, *et al.*, 2009; Raffin *et al.*, 2008). Por este motivo no se probaron éstas cantidades en la preparación de Microesferas.

### **8.5 Rendimiento del proceso y eficiencia de la encapsulación**

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 8, el proceso fue eficiente y sencillo a esta escala de fabricación, obteniéndose rendimientos por encima del 90% sin importar la proporción de polímeros. Las pérdidas del proceso se atribuyeron a los componentes de la formulación que se quedaron pegados en la superficie del vaso en la interfase L/G (ver Figura 2) cuando ocurrió la evaporación del solvente.

La eficiencia de encapsulación se encontró por arriba del 59%. La carga del principio activo dentro de las microesferas depende de las características fisicoquímicas del material del núcleo como el coeficiente de partición, el grado de ionización y su solubilidad en el solvente y en la fase continua (Phutane *et al.*, 2010). L-arginina·HCL es prácticamente insoluble en parafina líquida y en el sistema de solvente etanol-acetona, por esta razón la carga de L-arginina·HCl en las microesferas puede

considerarse satisfactoria para la mayoría de los lotes, sin embargo ésta fue variable. La eficiencia de encapsulación no fue afectada por la combinación de polímeros cuando la relación 1:10 aminoácido:polímero fue constante. Resultados similares fueron presentados por Akbuga (1991) cuando en la preparación de microesferas utilizó proporciones 1:4, 1:8 y 1:12 de Eudragit S:RS, y la eficiencia de encapsulación no estuvo relacionada con la mezcla de polímeros.

**Tabla 8.** Rendimiento y eficiencia de encapsulación de los 9 lotes preparados.

<b>Lote</b>	<b>Rendimiento del proceso</b>	<b>Eficacia de encapsulación</b>
<b>1</b>	96%	93%
<b>2</b>	92%	68%
<b>3</b>	93%	73%
<b>4</b>	90%	84%
<b>5</b>	92%	67%
<b>6</b>	93%	74%
<b>7</b>	91%	69%
<b>8</b>	95%	80%
<b>9</b>	90%	59%

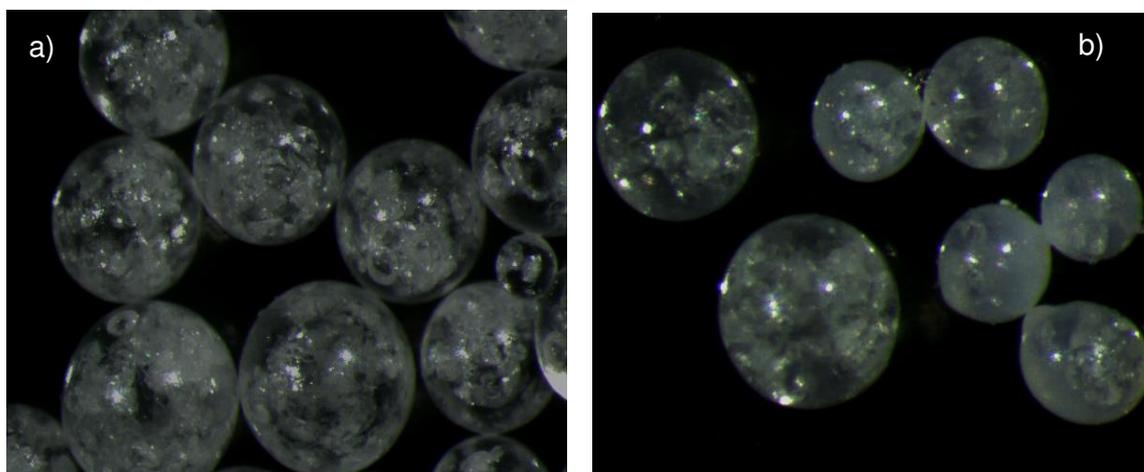
La menor eficiencia de encapsulación se observó en el lote 9, donde la cantidad de polímero es 20 veces mayor que la cantidad del aminoácido. En la literatura se ha descrito que si la viscosidad de la solución del polímero se ve aumentada por una

mayor concentración de éste, la eficiencia de encapsulación también aumenta (Li *et al.*, 2008); sin embargo esto no se vió reflejado en los resultados de ese trabajo. Trivedi *et al.*, prepararon microesferas de aceclofenaco y en los resultados de su estudio indicaron que la eficiencia de encapsulación se incrementó conforme la relación fármaco:polímero disminuyó y esto es consistente con lo obtenido en los resultados de este trabajo.

## 8.6 Análisis microscópico

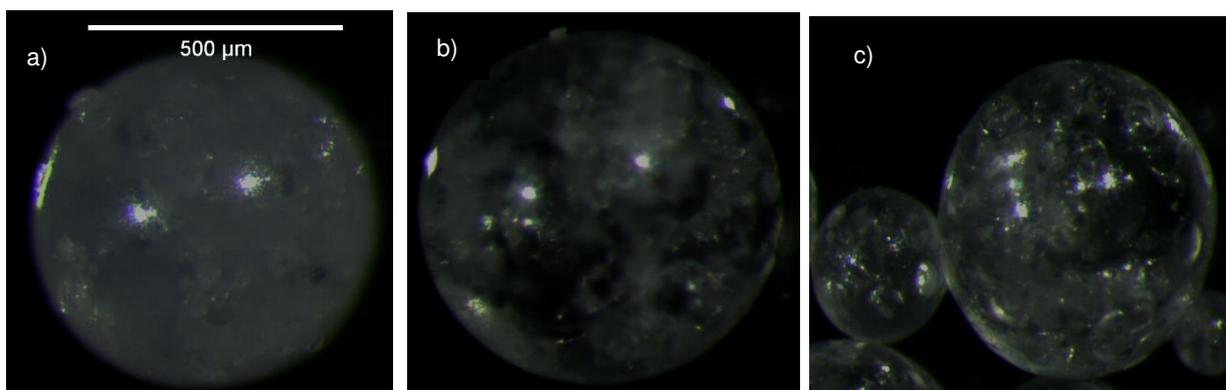
### *Morfología*

Las micrografías revelaron que las microesferas de todos los lotes tuvieron una forma esférica, sin distinción entre cubierta y núcleo, una superficie lisa y en algunos casos, casi transparente donde pueden observarse los cristales de L-arginina·HCl incrustados en la pared polimérica que forma la Microesfera (Figura 12). Cuando la remoción del solvente se realiza mediante evaporación por agitación, la superficie de las micropartículas es más lisa que cuando se elimina por extracción (Lamprecht A. *et al.*, 2003).



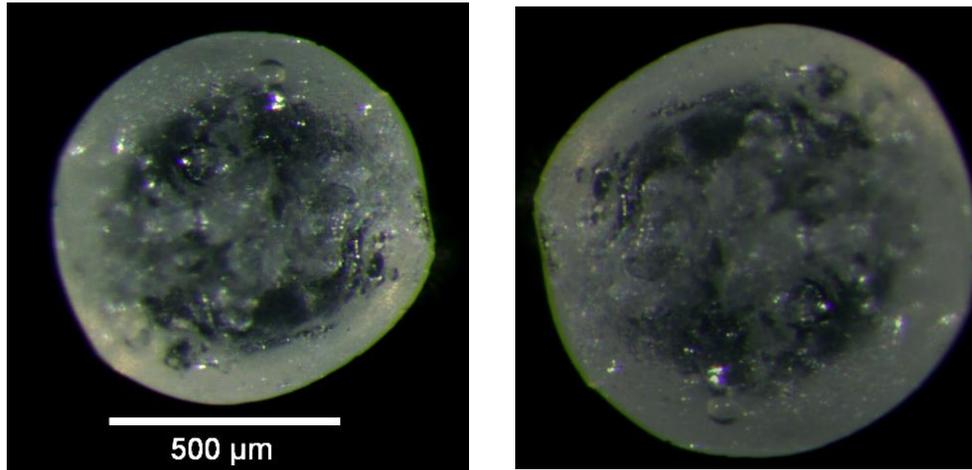
**Figura 12.** Microfotografía de a) lote 4 (Eudragit S100:Eudragit RS100 50:50) y b) lote 5 (Eudragit S100:Eudragit RS 100 40:60)

El aspecto en la superficie depende del polímero que se encuentra en mayor proporción en la formulación; en la Figura 13a la esfera es opaca (lote 1, 80:20 predomina el aspecto del Eudragit S100) y a medida que aumenta la cantidad de Eudragit RS100 la apariencia cambia hasta observarse microesferas transparentes (Fig 13c), tal como se presenta el polímero a granel.



**Figura 13.** Microfotografías con aumento de 5 veces para a) lote 1 (80:20), b) lote 4 (50:50) c) lote 6 (30:70)

A partir del estudio microscópico se determinó la morfología específica de la micropartícula (Figura 14), ya que por su estructura monolítica donde los cristales de L-arginina·HCl se encuentran altamente dispersos bajo la forma de diminutas partículas en una matriz del material de recubrimiento (Lopretti, M. *et al* 2007) se denominen particularmente **microesferas**.

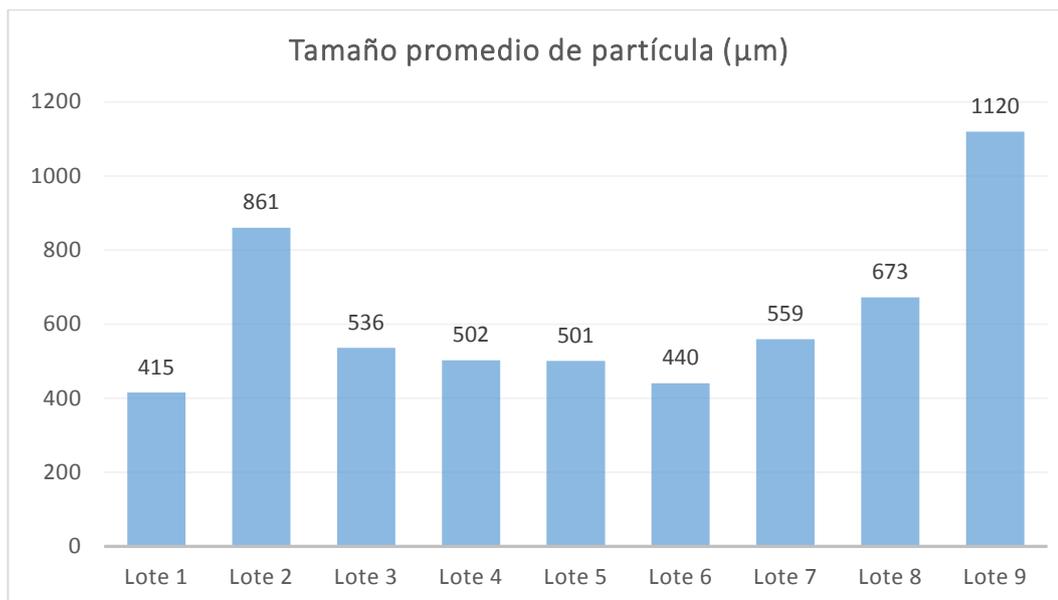


**Figura 14.** Microfotografía del corte transversal de las microesferas a un aumento de 50 veces.

### 8.7 Determinación del tamaño de partícula

Como parte de la caracterización de las microesferas se realizaron las mediciones de tamaño de partícula de todos los lotes. El tamaño promedio de las microesferas se encontró entre 400 y 800  $\mu\text{m}$ , con excepción del lote 9 (relación L-arginina·HCl:polímero 1:20) el cual fue significativamente mayor con una media de 1119.58  $\mu\text{m}$ . El tamaño de las microesferas del lote 2 también fue considerablemente mayor. Este aumento no está relacionado con la proporción de polímeros, ya que en las formulaciones siguientes no hay una variación significativa en el tamaño; pero sí se asocia con la velocidad de agitación utilizada en el proceso. Los valores presentados en la figura 14 permitieron confirmar que no existe diferencia entre el tamaño de partícula entre lotes con relación L-arginina·HCl:polímero 1:10.

El tamaño de partícula no fue afectado por la proporción de polímeros empleados en cada formulación, pero sí por la relación L-arginina·HCl:polímero. Un incremento en la concentración del polímero produce una fase dispersa más viscosa, la cual forma gotas más grandes y consecuentemente esferas de mayor tamaño (Haznedar y Dortunç, 2004).



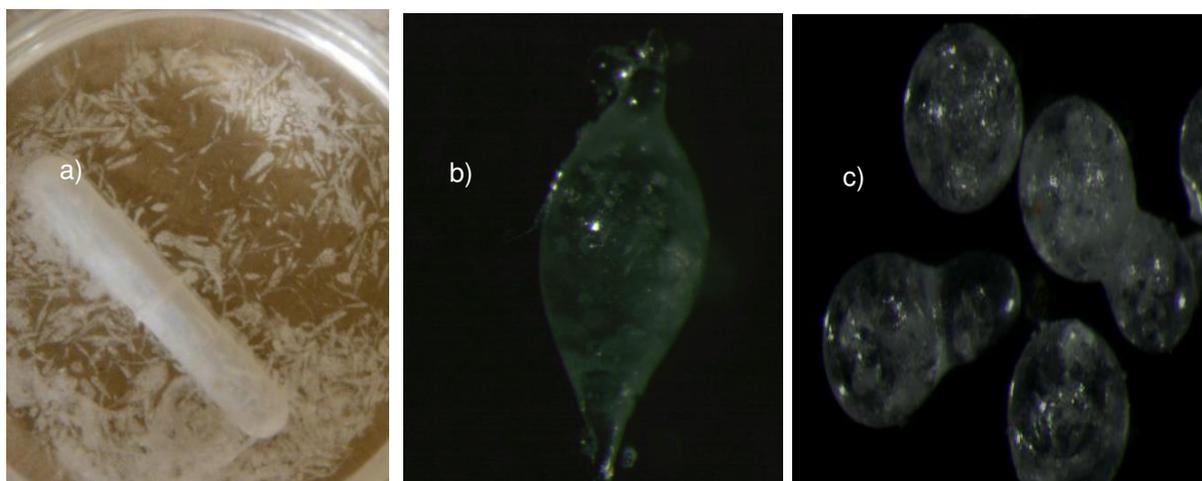
**Figura 15.** Tamaño promedio de las microesferas de los 9 lotes preparados.

Para los objetivos de este trabajo el tamaño de partícula fue un factor importante ya que la ruta de administración determinó el tamaño requerido para las microesferas. De acuerdo con la fisiología digestiva de los rumiantes, el retículo se conecta al omaso mediante el orificio retículo-omasal que tiene un diámetro cercano a los 2 mm (Syzov, 2008). Para la administración de sistemas particulados en rumiantes, es de suma importancia considerar que éstos no rebasen el diámetro del orificio, para que se permita el paso a través de él y el producto llegue a abomaso y posteriormente a intestino. Con los valores mostrados en la Figura 15, el tamaño de partícula de las microesferas es adecuado para permitir el paso a través del orificio retículo-omasal.

La velocidad de rotación del agitador generalmente controla el tamaño de las microesferas, sin embargo también puede cambiar significativamente la forma (Lee, 2000). En el presente estudio, la velocidad de agitación tuvo impacto no sólo en el tamaño, sino también en la forma de las microesferas preparadas. Partículas esféricas fueron formadas cuando la velocidad de agitación fue superior a 700 rpm. Velocidades de agitación en el rango de 700-900 rpm dieron como resultado microesferas de menor tamaño con morfología uniforme. La agitación proporciona energía para dispersar la fase orgánica del polímero en la parafina; si la agitación aumenta, se produce una

turbulencia generada por las altas fuerzas de cizallamiento que producen una emulsión fina que resulta en la formación de microesferas de menor tamaño (Islam *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2005).

Velocidades de agitación entre 500 y 600 rpm, producen estructuras filamentosas (Figura 16a). En los primeros instantes de la Emulsificación de las dos fases, el polímero (que se encuentra en la fase dispersa) permanece en forma líquida. A medida que transcurre el tiempo y comienza a evaporarse el disolvente, el polímero comienza a solidificar (debido a una pérdida de solubilidad) teniendo una consistencia semisólida y “pegajosa”. En esta etapa, las gotas de la fase dispersa se consideran microesferas “inmaduras”. Cuando no hay una adecuada agitación o cantidades suficientes de emulsificante, estas microesferas inmaduras comienzan a fusionarse formando agregados que originan partículas amorfas de mayor tamaño (Figura 16b y 16c).



**Figura 16.** Morfología de microesferas obtenidas cuando la velocidad de agitación oscila entre 500-600 rpm. a) estructuras filamentosas observadas macroscópicamente. b) y c) Microfotografías de una micropartículas “inmaduras”.

Cuando la velocidad de agitación fue inferior a 500 rpm no se formaron micropartículas; las dos fases no fueron emulsificadas correctamente y a medida que ocurría la evaporación del solvente se formaron partículas viscosas que se aglomeraron hasta formar masas de gran tamaño.

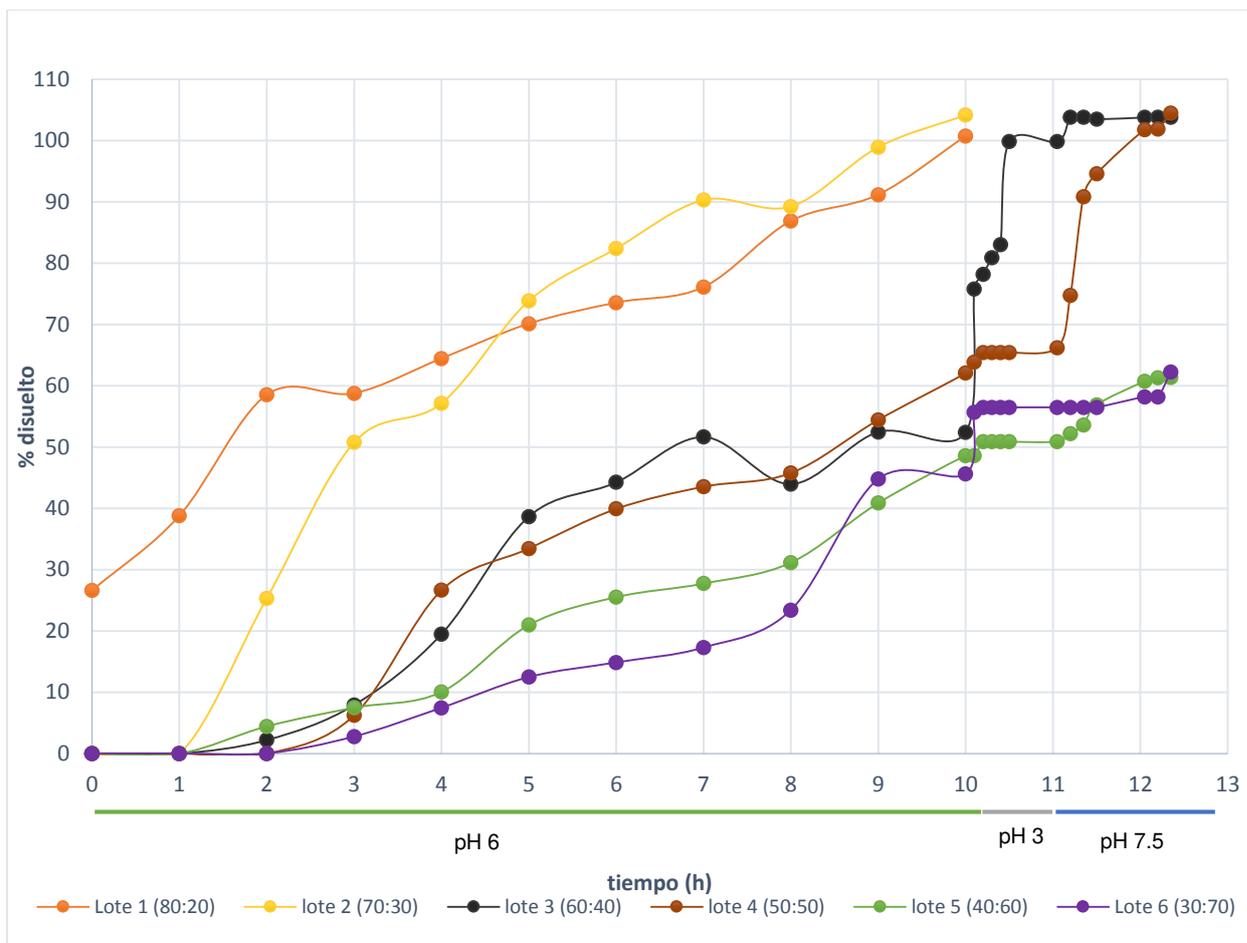
Por otro lado, la velocidad de liberación se vio influenciada por el tamaño de partícula, mientras menor es el tamaño de las microesferas obtenidas, mayor es el área superficial específica en contacto con el medio de disolución, facilitándose la liberación del fármaco.

## **8.8 Evaluación *in vitro* de las Microesferas**

### **8.8.1 Perfiles de liberación de los lotes 1 a 6**

Para modular el proceso de liberación, se combinaron dos variedades de los polímeros Eudragit; uno de baja permeabilidad cuyo hinchamiento es independiente del pH y otro cuya disolución ocurre de manera dependiente del pH. La Figura 17 muestra el comportamiento de la liberación de 6 lotes de microesferas de L-arginina·HCl preparadas con diferentes proporciones de Eudragit S y Eudragit RS.

La evaluación en tres diferentes medios se realizó con el objetivo de simular los compartimentos del tracto gastrointestinal de los rumiantes. En estos animales el alimento ingerido puede ser retenido, en promedio por 6 h (y hasta 18 h) en el rumen y por aproximadamente 30 min en el abomaso antes de ser transportado hacia el intestino. El pH del contenido ruminal oscila entre 5.5 y 6.5 y el pH del fluido abomasal varía de 2 a 3. El intestino, es el sitio de absorción de nutrientes y fármacos, y el medio alcanza un pH por encima de 7 (Syzov, 2008). Estas consideraciones se tomaron en cuenta cuando se realizó la prueba de disolución *in vitro* y los tres medio de prueba tuvieron un pH cercano al rumen, abomaso e intestino (pH 6, 3 y 7.5, respectivamente)



**Figura 17.** Perfil de liberación de L-arginina microencapsulada de los lote 1-6. Microesferas con relación aminoácido:polímero 1:10.

Como puede observarse, con el proceso de microencapsulación se logró un retardo apreciable de la liberación de L-arginina·HCl. La observación más importante del gráfico recae sobre la disminución significativa de la velocidad de liberación cuando la cantidad de Eudragit RS incrementa en las Microesferas.

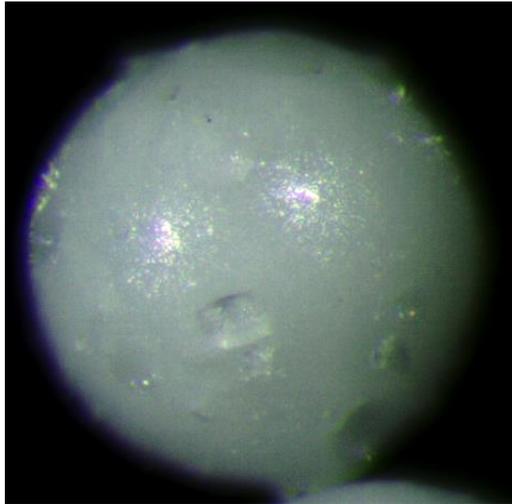
Eudragit RS es un polímero insoluble en agua pero es permeable a ella en todo el rango de pH, efecto debido a la presencia de grupos amonio cuaternario. Eudragit S es un polímero pH-dependiente el cual se disuelve a un pH por encima de 7. Tomando en cuenta la solubilidad de Eudragit S en los medios de prueba, se esperaba que en

los dos primeros, donde Eudragit S es insoluble, la liberación de L-arginina·HCl fuese insignificante, mientras que en pH 7.5 se esperaba fuese relativamente rápida. Sin embargo por el gran tiempo de residencia en el primer medio, se presume una parcial ionización y el consiguiente hinchamiento de las cadenas poliméricas que crean una cantidad suficiente de espacios entre las cadenas, las cuales permiten la difusión de L-arginina·HCl hacia el exterior (Trivedi *et al.*, 2008).

Cuando la cantidad Eudragit S fue considerablemente mayor en las Microesferas, (**lote 1 y 2**) el 100% del contenido de L-arginina·HCl se liberó en el primer medio (pH 6). En el lote 1 (80:20) hay una liberación de L-argina·HCl desde el tiempo cero. Durante el proceso de fabricación, los cristales del aminoácido que se encuentran en la gota que forma la fase dispersa de la emulsión después de un periodo prolongado tienden a difundir hacia la interfase, y cuando ha ocurrido la solidificación del polímero los cristales quedan en la superficie externa (Lamprecht *et al.*, 2003) que al contacto con el medio son disueltos de inmediato.

El porcentaje de cristales superficiales es un factor importante, ya que influye directamente en el perfil de liberación del material encapsulado. La elevada presencia de cristales superficiales en una formulación puede derivar en un marcado “burst effect” o liberación instantánea de las partículas superficiales. (González *et al.*, 2005), En muchas de las formulaciones de liberación controlada, inmediatamente después de la colocación en el medio de disolución un gran bolo inicial de fármaco se libera antes de que la velocidad de liberación alcance un perfil estable. Este fenómeno es típicamente asociado con el “burst effect” (Huang y Brazel, 2001).

En la Figura 18 se muestra una esfera del lote 1 después de la prueba de disolución; se observa el espacio que ha dejado un cristal de L-arginina·HCl en la superficie exterior.



**Figura 18.** Microfotografía de una microesfera del lote 1 después de la prueba de disolución

Cuando se incrementó en un 10% la cantidad de Eudragit RS en la formulación (lote 2), el efecto en la matriz polimérica se volvió evidente ya que se logró incluso una fase lag de 1 h en el perfil de liberación, esta disminución en la velocidad de liberación se asocia también con el aumento en el tamaño de partícula. Cuando el tamaño de las Microesferas aumenta, disminuye el área superficial de contacto con el medio de disolución, permitiendo retardar la liberación, pero no lo suficiente porque se ha liberado todo el contenido de L-arginina·HCl en las primeras 10 h de prueba.

En el **lote 3 y 4** la adición de 20% y 30% más de Eudragit RS con respecto al lote inicial provocó una extensión de la fase lag de hasta dos horas y a partir de la tercera comenzó la liberación. En formulaciones conteniendo mayor cantidad de Eudragit RS, se observó una fase lag provocada por el tiempo que necesita el polímero para hidratarse y así penetrar el medio de disolución; tan pronto como el medio penetra la cubierta, la solubilidad del L-arginina·HCl en el medio provocará que ésta se disuelva y simultáneamente difunda hacia el exterior con un gradiente de concentración mayor. Con la formulación del lote 3 se logró proteger en el primer medio 48% de L-arginina·HCl, sin embargo, esta cantidad fue liberada rápidamente en el segundo medio (pH 3).

En el **lote 4**, donde las proporciones de los polímeros son equivalentes, la liberación fue más lenta y controlada en el primer medio. A pesar de que en el compartimento con pH 6 se liberó el 55% del principio activo, en el segundo medio no hay una liberación significativa y prácticamente el resto de L-arginina·HCl sí alcanza el tercer compartimento y se libera gradualmente durante los 105 min de prueba en este pH. Estos resultados probablemente se deben a la interacción entre los grupos amonio (catiónicos) del Eudragit RS con los grupos carboxílicos del Eudragit S, que protegen a los grupos aniónicos de la rápida ionización y como resultado de ello, retardan la disolución del polímero pH-dependiente después de las 10 h de la prueba en pH 6. Esta proporción equivalente de los polímeros permitió que en el segundo medio, sólo hubiera una ligera liberación del aminoácido del 3%.

La liberación de L-arginina·HCl en las microesferas de los lotes 5 y 6 (que contienen Eudragit S:RS en proporción 40:60 y 30:70 respectivamente), donde predomina la proporción de Eudragit RS fue muy lenta e incluso incompleta. Haznedar y Dortunç (2004) también reportaron en sus resultados que la liberación del principio activo sólo alcanzó el 20% y 30% en medios de disolución con pH 1.2 y 7.4 cuando utilizaron sólo Eudragit RS en formulaciones de microesferas conteniendo acetazolamida. Cuando utilizaron una combinación de Eudragit RS:RL, se logró la liberación del 100% del fármaco. Las microesferas de los lotes 5 y 6 después de ser liberadas, fueron trituradas y extraídas con un volumen de agua para verificar el contenido de L-arginina·HCl remanente en las microesferas. Aproximadamente un 32% del total del aminoácido estaba presente en las microesferas después de las 12.6 horas de la prueba de disolución. Armand *et al* (1987) reportaron en su estudio que una gran parte de salicilato de sodio permaneció en la matriz de las microesferas de Eudragit RS aún después de 20 h de exposición al medio de disolución.

En otro estudio Vachon y Nairn (1995) también prepararon Microesferas de Eudragit RS conteniendo ácido acetilsalicílico. En sus resultados no consiguieron liberar el 100% del fármaco, únicamente se liberó el 60% del contenido en 24 h de prueba. Los autores asumen que este fenómeno es debido a la capacidad de los polímeros

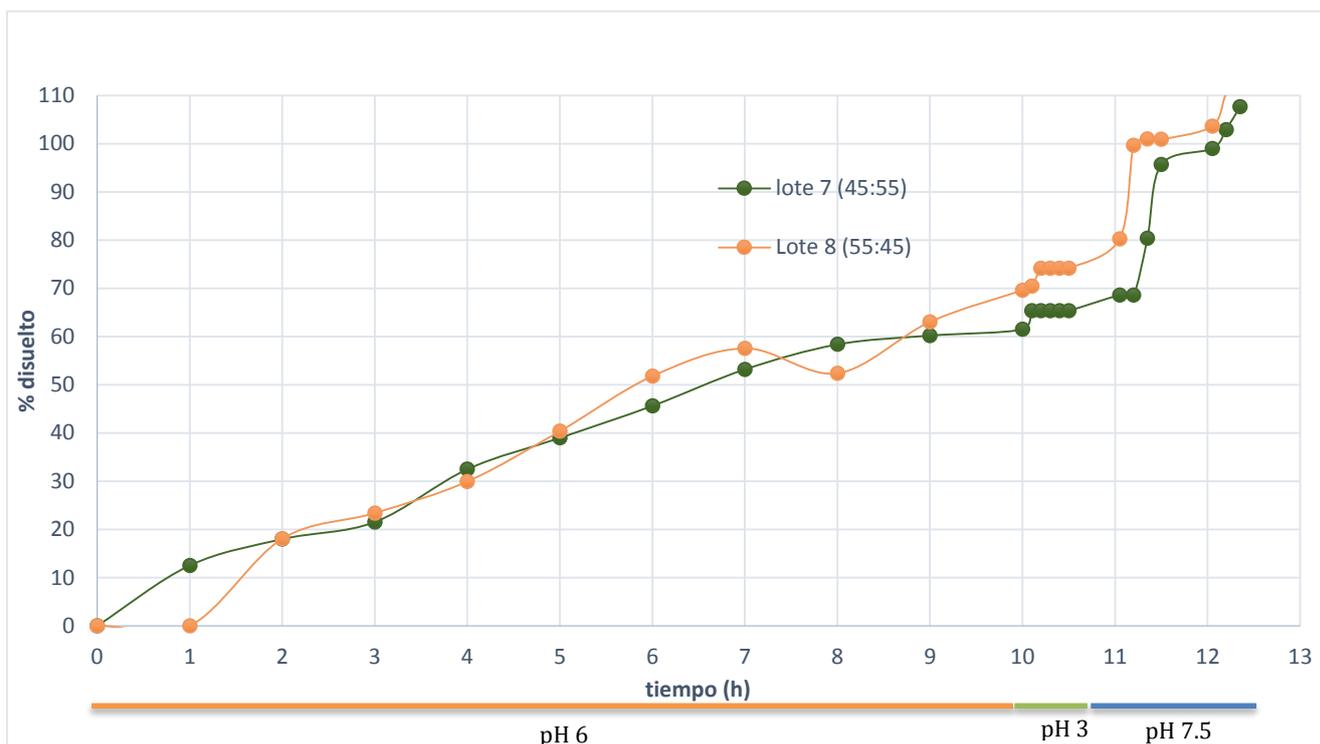
Eudragit RS para adsorber ácido salicílico del medio de disolución. Tienen la teoría de que cuando el ácido salicílico difunde al exterior de la matriz polimérica y pasa al medio de disolución, el fármaco puede ser ionizado. El ácido salicílico ionizado tiene una carga opuesta a la de los grupos amonio cuaternario del polímero Eudragit RS permitiendo que ocurra una unión electrostática y que el fármaco permanezca adherido a la matriz que forma el polímero. Jenquin et al (1990), investigaron la adsorción de ácido salicílico sobre Eudragit RS y RL, encontrando la isoterma de adsorción con el modelo de Freundlich, e indicaron que el grado de adsorción es proporcional a la concentración del fármaco. Es interesante notar que los fármacos citados anteriormente contienen un grupo funcional ácido carboxílico en su estructura capaz de ionizarse en el medio de disolución. Esta misma situación pudo presentarse en este trabajo ya que L-arginina al ser un aminoácido presenta en su estructura un grupo ácido carboxílico.

En los lotes 5 y 6 se observó una fase lag de una hora y al final de la prueba los dos lotes sólo liberaron el 62% del contenido de L-arginina·HCl. En la figura 12 se observa que Eudragit RS es el polímero que controla la liberación en el medio con pH 6 ya que tiene un comportamiento pH-independiente. En el medio con pH 3, Eudragit S como polímero pH-dependiente juega un papel protector ya que la liberación en este compartimento es nula para el lote 5 (que tiene mayor cantidad de este polímero) y de un 10% para el lote 6. Sin embargo, en el medio con pH 7.5 prevalece el efecto del Eudragit RS ya que no hay liberación significativa en los 105 min de prueba con este pH.

### **8.8.2 Perfiles de liberación de los lotes 7 y 8**

Partiendo de los resultados obtenidos en los perfiles de los lotes 3 y 4, donde una diferencia de 10% entre ellos en el contenido de Eudragit RS tuvo una influencia significativa en la modulación de la liberación en el medio con pH 3, se diseñaron los lotes 7 y 8, variando sólo un 5% la cantidad de los polímeros con respecto al lote 4 para observar si un cambio pequeño en el sistema tiene un efecto brusco sobre el

comportamiento de la liberación; con el objetivo de encontrar la proporción más adecuada de los Eudragit's para obtener el perfil de liberación deseado. Los lotes 7 y 8 con las proporciones 55:45 y 45:55 (Eudragit S:Eudragit RS) respectivamente, mostraron que, modificando 5% la proporción de polímero se controló liberación en el medio con pH 3 (Figura 19).

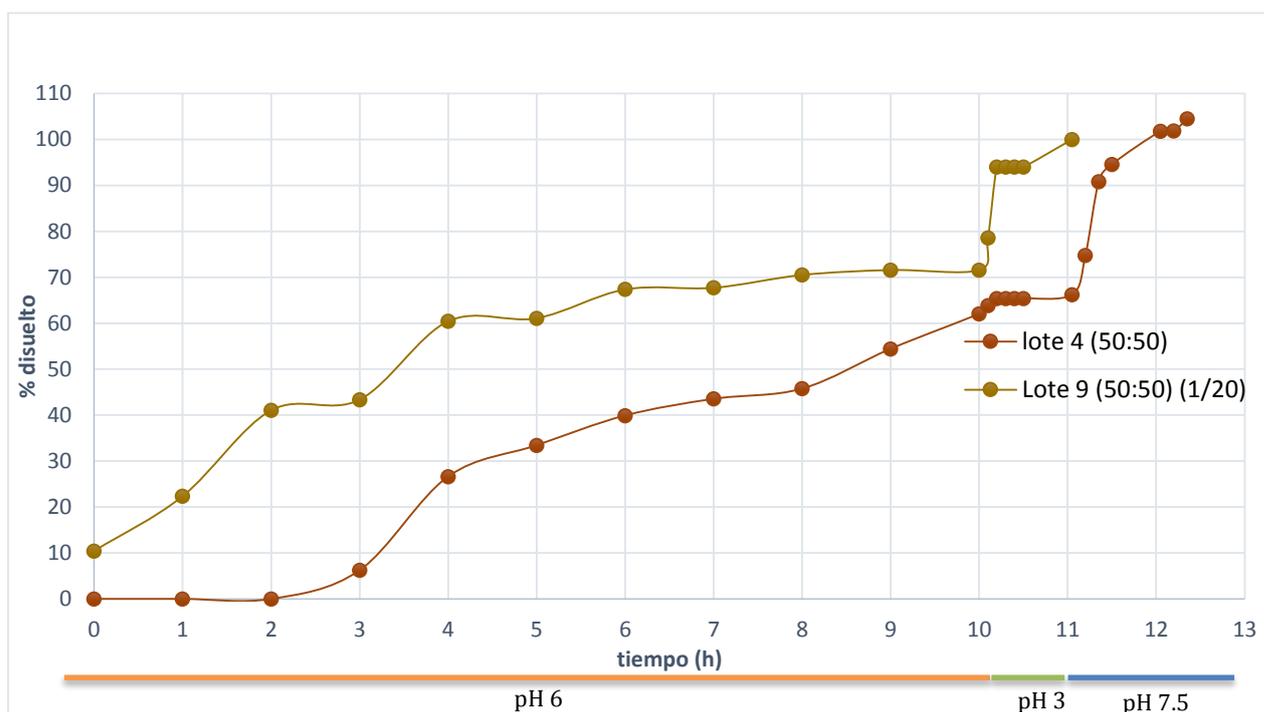


**Figura 19.** Perfil de liberación de L-arginina·HCl microencapsulada de los lotes 7 y 8.

Como fue de esperarse, el lote 8 que contenía mayor cantidad de Eudragit S presentó una velocidad de liberación ligeramente más rápida. Se confirmó el papel modulador de la liberación que juega Eudragit RS, ya que un pequeño incremento en la formulación permitió que la velocidad de liberación disminuyera en cualquier medio.

### 8.8.3 Perfil de liberación lote 9: Efecto de la proporción fármaco:polímero (lote 9)

Se preparó un lote de microesferas utilizando una mezcla 1:1 de los dos polímeros variando la proporción L-arginina·HCl:Eudragit a 1:20 para evaluar el efecto protector del polímero cuando aumenta su concentración (Figura 20).



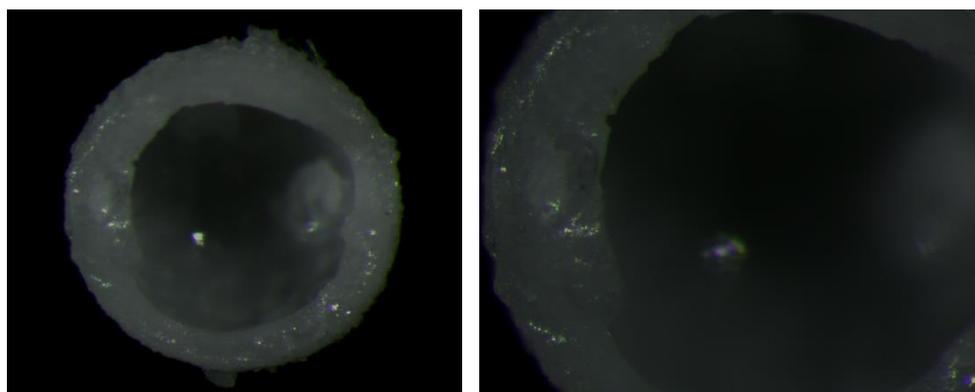
**Figura 20.** Perfil de liberación de L-arginina·HCl microencapsulada del lote 9, relación aminoácido:polímero 1:20, y Perfil de liberación del lote 4 (1:10)

El perfil de disolución del lote 9 muestra resultados contrarios a lo esperado, ya que únicamente se está protegiendo el 30% del principio activo en el primer compartimento, incluso al  $t_0$  se presenta una liberación del 10%. En la Figura 20 también se muestra el perfil de liberación de L-arginina·HCl del lote 4 (proporciones equivalentes de los dos

polímeros con relación aminoácido polímero 1:10) para comparar el efecto de las proporciones aminoácido:polímero.

Las microesferas del lote 9 estaban huecas y contenían una gran cantidad de cristales en la superficie, que al contacto con el medio fueron disueltos. Esa cavidad en el interior condujo a la formación de una cubierta tipo corteza que disminuyó el grosor de la matriz polimérica que contiene L-arginina·HCl y el trayecto de difusión del aminoácido fue más corto, permitiendo que la liberación fuese más rápida. La Figura 21 muestra un corte transversal de una esfera 50:50 (1:20).

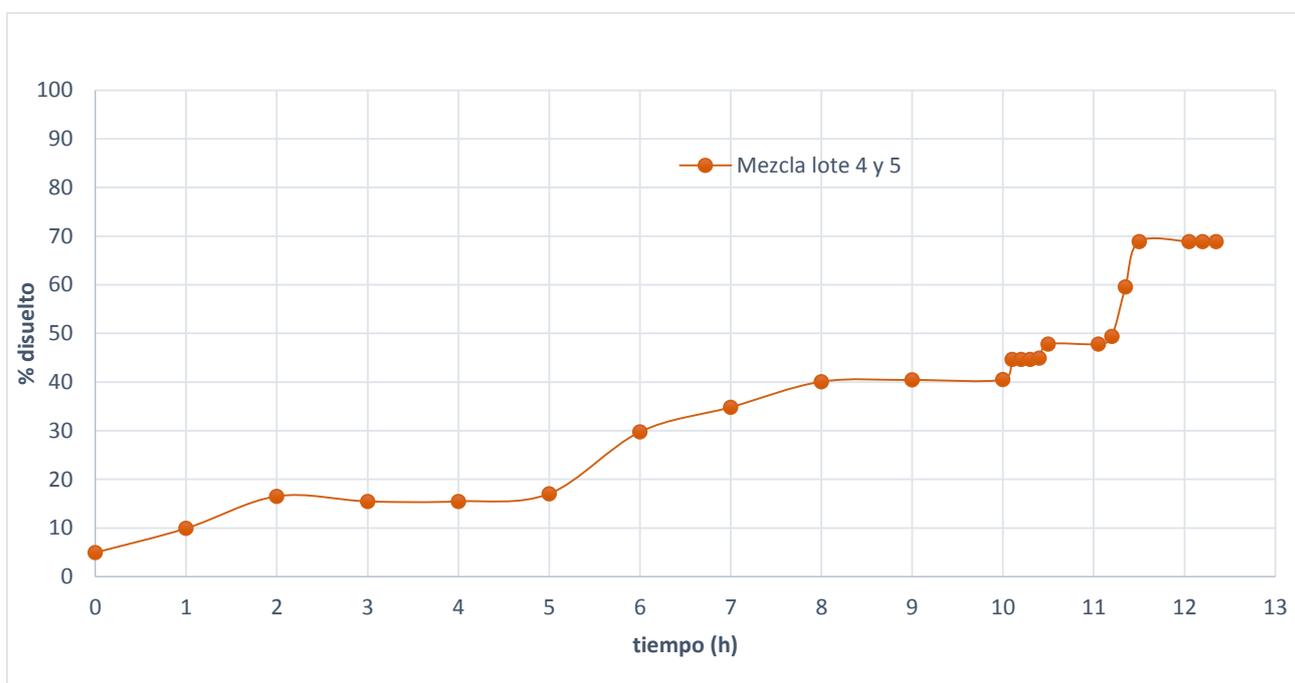
Altas concentraciones de polímero pueden permitir una rápida precipitación del polímero sobre la superficie de la gota provocando una rápida solidificación de la micropartícula, dando como resultado la obstaculización de la difusión de L-arginina quedando atrapada en la superficie de la partícula. Kendall *et al.* (2009) utilizaron diferentes relaciones de principio activo:polímero (1:5, 1:10 y 1:30) en la preparación de microesferas cargadas con prednisolona. En sus resultados estas proporciones no tuvieron un cambio significativo en lo velocidad de liberación del principio activo, lo que concuerda con los resultados de este lote, ya que un aumento en la cantidad del polímero no ofreció mayor protección.



**Figura 21.** Microfotografía de un corte transversal de microesferas del lote 9.

#### 8.8.4 Perfil de liberación Número 10: Mezcla de dos lotes

Con los resultados ya existentes, el perfil de liberación No. 10 (Figura 22) fue elaborado mezclando cantidades iguales de los lotes 4 y 5, con el objetivo de observar el efecto combinado de un lote de liberación completa y uno de liberación incompleta. El “Burst effect” se presentó nuevamente en este experimento; el porcentaje liberado en el primer medio fue el más bajo de todos los ensayos (40%). En el segundo medio, se liberó un 7% de L-arginina·HCl y en el tercero, un 23%.



**Figura 22.** Perfil de liberación de L-arginina·HCl de la mezcla de los lotes 4 (50:50) y 5 (60:40).

El objetivo de este proyecto fue proteger L-arginina·HCl de la degradación ruminal. Con esta propuesta de mezcla, se consigue la mejor modulación *in vitro* de la liberación en el primer medio, sin embargo, no basta con protegerla, es necesario asegurar que el aminoácido llegue hasta intestino y sea liberado ahí para su posterior absorción y

sea aprovechado por el animal rumiante. Buscando cumplir este objetivo, no es el mejor de los casos liberar sólo el 23% en intestino, ya que nuevamente se tiene una liberación incompleta al final de la prueba.

### 8.9 Aplicación de modelos de cinética de liberación

Los coeficientes de correlación de los modelos matemáticos que se muestran en la tabla 9 fueron obtenidos con la herramienta DDS solver con el objetivo de describir la cinética de liberación. Los datos fueron procesados por cada compartimento, en donde hubo liberación significativa.

**Tabla 9.** Coeficientes de correlación de los diferentes modelos matemáticos.

Lote	Orden Cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Pepas	
	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	n
1 (pH 6)	0.9771	0.9775	0.9256	0.9790	0.86
2 (pH 6)	0.9132	0.9628	0.9832	0.9868	0.40
3 (pH 6)	0.9187	0.9171	0.9707	0.9795	0.40
3 (pH3 )	0.7432	0.7965	0.9001	0.9017	0.46
4 (pH 6)	0.9761	0.9293	0.9910	0.9907	0.46
4 (pH 7.5 )	0.9205	0.9507	0.8758	0.9299	0.80
5 (pH 6)	0.9639	0.9330	0.9429	0.9820	1.25
5 (pH 7.5 )	0.9564	0.9577	0.8400	0.9494	0.98
6 (pH 6)	0.8457	0.7940	0.8597	0.9509	2.70
6 (pH 7.5 )	0.2221	0.2795	0.7671	0.8986	0.20
7 (pH 6)	0.9561	0.9889	0.9282	0.9847	0.77
7 (pH 7.5 )	0.9536	0.9442	0.8190	0.9462	1.03
8 (pH 6)	0.9552	0.9685	0.9748	0.9779	0.66
8 (pH 7.5 )	0.6986	0.8122	0.9319	0.9220	0.47
9 (pH 6)	0.8224	0.9585	0.9429	0.9362	0.48
9 (pH 3 )	0.6236	0.6931	0.8526	0.8217	0.43
10 (pH 6)	0.9086	0.9189	0.8605	0.9161	0.81
10 (pH 7.5)	0.8414	0.8854	0.8814	0.8902	0.67

En los dos primeros lotes, la liberación se completó en el primer medio, y los datos se ajustaron mejor al modelo de Korsmeyer-Peppas. Para el lote 1, el valor de  $n$  describe una difusión no fickiana, mientras que para el lote 2 ( $n=0.401$ ),  $n$  indica que se combinaron los mecanismos de difusión parcial a través de una matriz hinchada y a través de los poros llenos de agua.

Cuando los datos de los lotes 3, 6, 8, 9 y 10, fueron ajustados a los modelos, no hubo una linealidad adecuada ya que los valores de  $R^2$  son inferiores a 0.98. Sin embargo, con esta información se determinó que el ajuste más idóneo corresponde con el mismo modelo de Kosmeyer-Peppas, lo que indica que el mecanismo de liberación del aminoácido fue una combinación de difusión y erosión. Cabe mencionar que al finalizar el tiempo de disolución, la matriz polimérica no se disolvió, mantuvo su forma esférica.

El lote 4 tuvo un mejor ajuste con el modelo de Higuchi, lo que sugiere que el mecanismo de liberación del fármaco fue la difusión.

### **8.10 Selección de la Mejor formulación**

Con base en los perfiles ya mostrados y discutidos, el lote 4 representó la mejor propuesta de este trabajo para liberar L-arginina·HCl en intestino de rumiantes. Si bien se ha observado que puede protegerse hasta un 60% el contenido de L-argina·HCL cuando se incrementa lo suficiente la cantidad de Eudragit RS en la formulación, esto provoca que la liberación no sea completa en intestino. Cuando las cantidades de los polímeros fueron equivalentes, se liberó el 50% en el medio que simuló el rumen, pero el 50% si alcanzó a liberarse en el tercer compartimento. Por lo tanto, la liberación en los previos compartimentos es resultado de los mecanismos que permiten la difusión en el sitio de acción, y para que esto ocurra esa liberación en rumen es inevitable. A pesar de esto, esa cantidad de L-arginina·HCl liberada en rumen, no se consideraría una pérdida, ya que el aminoácido puede aprovecharse por la microbiota que se aloja en

ese compartimento para la formación de péptidos y proteínas y es utilizada con el fines nutricionales y no de mejora en la reproducción.

Esto es significativo porque si el objetivo de la mayoría de los sistemas de liberación es alcanzar el sitio de acción a un bajo costo, reducción en el tiempo de proceso, y con metodologías sencillas que puedan desarrollarse a nivel laboratorio y que puedan escalarse a grandes cantidades, el método de la preparación de microesferas de Eudagrit® conteniendo L-arginina·HCl mediante un proceso de microencapsulación por evaporación del solvente representa un método satisfactorio para la producción de microesferas con aplicaciones veterinarias en administración de aminoácidos para rumiantes.

## **9. CONCLUSIONES**

Con el proceso de microencapsulación se logró un retardo apreciable de la liberación de L-arginina·HCl en medios que simulan el contenido ruminal. Este trabajo representa una forma viable, sencilla y reproducible de protección de un aminoácido hidrosoluble, pero el método puede utilizarse para la protección de una amplia variedad de sustancias con características fisicoquímicas similares. Con una metodología simple y de pocas etapas, se logró proteger una cantidad importante del aminoácido del pH que simula el ambiente ruminal, y con la mejor formulación se consiguió que una cantidad considerable del aminoácido alcanzara el intestino, liberándose para su posterior absorción. Del presente estudio, se concluye:

- No existe incompatibilidad entre los polímeros empleados y L-arginina·HCl, permitiendo su uso para la fabricación de microesferas.
- El método de la emulsión/evaporación del disolvente fue adecuado para la preparación de microesferas de Eudragit conteniendo L-arginina·HCl.
- La combinación de polímeros pH-dependiente y tiempo-dependiente fue efectiva para controlar la liberación de L-arginina·HCl, y así, alcanzar el sitio de liberación intestinal requerido para el principio activo. La adición de Eudragit RS

a las formulaciones pudo modificar la liberación de L-arginina·HCl retardándola al grado de proporcionar una fase lag en los perfiles de liberación.

- Los rendimientos de preparación y encapsulación fueron relativamente altos, e indican que el método es eficiente y económico a esta escala de preparación.
- El lote 4 que contiene proporciones equivalentes de Eudragit S y Eudragit RS resultó ser el más adecuado para controlar la liberación de L-arginina·HCl en los medios de prueba y permitió la liberación del aminoácido en el intestino.

## 10. REFERENCIAS

- Ahmed, I., Kasraian, K. 2002. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54(6), 871-82.
- Akbuga, J. 1991. Effect of microsphere size and formulation factors on drug release from controlled-release furosemida microspheres. *Drug development and industrial pharmacy* . 17(4), 593-607.
- Akhgari, A., Sadeghi, F., Garekani, H.A. 2006. Combination of time-dependent and pH-dependent polymethacrylates as a single coating formulation for colonic delivery of indomethacin pellets. *International Journal of Pharmaceutics*. 320, 137–142.
- Andretta H.A. 2003. Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 22 (4), 355-364.
- Armand, J.Y., Magnard, F., Bouzon, J., Rollet, J., Taverdet, J.L., Vergnaut, J.M., 1987. Modelling of drug release in gastric liquid from spheric galenic forms with Eudragit matrix. *International Journal of Pharmaceutics*. 40, 33–41
- Asplund, J. M. 1994. Structure and function of the ruminant digestive tract. In *Principles of Protein Nutrition of Ruminants*. CRC Press Boca Raton. pp. 5-28.
- Benita S. 2006. Microencapsulation: methods and industrial applications. 2nd ed. *Drugs and the pharmaceutical sciences*; v. 158., Florida, 741p
- Bernad, M. J., Ganem, A., Melgoza, L. M., & Quintanar, D. 2003. Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos. *Tópicos Selectos de Tecnología Farmacéutica*, 14.
- Borgquist, P., Nevsten, P., Nilsson, B. 2004. Simulation of the release from a multiparticulate system validated by single pellet and dose release experiments. *Journal of Controlled Release* 97, 453-465.
- Bulbarela, G., Martínez, A., Becerril M., Díaz P., Rosendo A. and Gallegos J. 2009. Effect of L-arginine and fish oil on the reproductive performance of hair sheep synchronization with a progestagen. *Agrociencia*. 43: 371-377.

Chache, B., Liu, H., Wang, D., Liu, J. 2013. Potential role of N-carbamoyl glutamate in biosynthesis of arginine and its significance in production of ruminant animals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 4 (16), 1-16.

Costa P., & Sousa J.M. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13, 123–133.

Das, S. K., Yuvaraja, K., Khanam, J., & Nanda, A. 2015. Formulation development and statistical optimization of ibuprofen-loaded polymethacrylate microspheres using response surface methodology. *Chemical Engineering Research and Design*. 96, 1-14.

De Souza, M. C., & Marchetti, J. M. 2011. Development of albendazole sulfoxide-loaded Eudragit microparticles: A potential strategy to improve the drug bioavailability. *Advanced Powder Technology*. 23(6), 801-807.

Dey, N. S., Majumdar, S., Rao, M. E. B. 2008. Multiparticulate drug delivery systems for controlled release. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7(3), 1067-1075.

Ding, X., Alani, A.W., Robinson, J.R. 2005. Extended-release and targeted drug delivery systems. In: Troy, D., editor. Remington: The science and practice of pharmacy. 21<sup>st</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins. USA.

Dubey, R., Shami, T. C., Rao, K. U. 2009. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal*. 59(1), 82-95

Ellis, K. J. 2013. Anatomy and Physiology of the Farmed Animal. In *Long Acting Animal Health Drug Products*. Springer US. p. 47-58.

Evonik Industries AG. Pharma Polymers. Germany. 2011. Eudragit® Polímeros acrílicos para Formas Farmacéuticas Sólidas Orales.

Faletti, A., Martínez, S. P., Perotti, C., & de Gimeno, M. A. 1999. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. *Nitric oxide*, 3(4), 340-347.

Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., Axelsson, A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 415, 34– 52.

Freitas, S., Merkle, H., Gander, B. 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*. 102:313-332.

Gao, Y., Guan, Y., Yang, L., Wang, Y. S., & Zhang, L. N. 2006. Preparation of roxithromycin-polymeric microspheres by the emulsion solvent diffusion method for taste masking. *International Journal of Pharmaceutics*. 318(1), 62-69.

Garmendia, J. 2005. Suplementación estratégica de vacas doble propósito alrededor del parto. *IX Seminario de Pastos y Forrajes. Universidad Nacional Experimental del Táchira. Venezuela*, 112-129.

Ghosh, S. K. (Ed.) 2006. Functional coatings: by polymer microencapsulation. John Wiley & Sons.

González, N., Fernández, D., Gómez, M, Núñez I., Lafita, O. 2005. Efecto del Eudragit y la Etilcelulosa como Agentes Retardantes de la Liberación sobre las Características Físico-Químicas y la Liberación In Vitro de Microesferas Cargadas con Zidovudín. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 24 (3), 350-355.

Gupta, A. K., & Dey, B. K. 2012. Microencapsulation for controlled drug delivery: a comprehensive review. *Sunsari Technical College Journal* 1(1), 48-54.

Harfoot, C.G. 1978. Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract. Print. *Lipid Res*. Vol. 17. pp. 1-19. Pergamon Press. Printed in Great Britain.

Haznedar, S. & Dortunç, B. 2004. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*. 269, 131-140.

Hwisa, N.T., Prakash, K., Rao, C., Shanta K. 2013. Solvent Evaporation Techniques as Promising Advancement in Microencapsulation. *VRI Biological Medicinal Chemistry*. 1 (1), 8-22.

Islam, M. S., Alam, S. M. R., Sadat, S. M. A., Chowdhury, J. A., & Jalil, R. U. 2009. Preparation and characterization of polyvinyl acetate (Kollidon® SR) microspheres containing diclofenac sodium I: effect of stirring rate and total solid content. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8(2), 111-116.

Jelvehgari, M., Montazam, S.H. 2012. Comparison of Microencapsulation by Emulsion-Solvent Extraction/Evaporation technique using derivatives cellulose and acrylate-methacrylate copolymer as carriers. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical products*. 7(4), 144-152.

Jenquin, M. R., Liebowitz, S. M., Sarabia, R. E., & McGinity, J. W. 1990. Physical and chemical factors influencing the release of drugs from acrylic resin films. *Journal of pharmaceutical sciences*. 79 (9), 811-816.

Jyothi, N.V.N, Prasanna, P., Sakarkar, S., Prabha, K., Ramaiah, P., Srawan, G. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*. 27(3), 187–197.

Kendall, R.A., Alhnan, M.A., Nilkumhang, S., Murdan, S., Basit, A.W. 2009. Fabrication and in vivo evaluation of highly pH-responsive acrylic microparticles for targeted gastrointestinal delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37, 284-290.

Khamanga, S. M., Parfitt, N., Nyamuzhiwa, T., Haidula, H., & Walker, R. B. 2009. The evaluation of eudragit microcapsules manufactured by solvent evaporation using USP apparatus 1. *Dissolution Technol*, 16(2), 15-22.

Kim, J.Y., Burghardt, R., Wu, G., Johnson, G., Spencer, T., Bazer, F. 2011. Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. VIII. Arginine Stimulates Proliferation of Ovine Trophectoderm Cells Through MTOR-RPS6K-RPS6 Signaling Cascade and Synthesis of Nitric Oxide and Polyamines. *Biology Of Reproduction*. 84, 70- 78

Kingston-Smith, A. H., Davies, T. E., Stevens, P. R., Mur, L. A. 2013. Comparative Metabolite Fingerprinting of the Rumen System during Colonisation of Three Forage Grass (*Lolium perenne* L.) Varieties. *PLoS ONE*. 8(11), 1-12.

Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y. 2003. Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil. *Journal of Controlled Release* 90, 313–322.

Lee J., Park, T., Choi H. 2000. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*. 196, 75-83.

Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D. 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*. 363, 26-39.

Lopretti, M., Barreiro, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C., Olivera, A. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *Publicacion anual del laboratorio tecnologico del uruguay no. 2*. 19-23

Machín R. 2013. Síntesis y caracterización de polímeros de ciclodextrina. Aplicación a la liberación de fármacos. Tesis para obtener el grado de Doctor por Universidad de Navarra.

Martín, L., Vargas, A., Barbosa, H., & Martínez, F. 2008. Estudio de las variables más relevantes de un proceso de microencapsulación por coacervación utilizando un polímero derivado del ácido metacrílico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 31(1).

Medlicott N., Waldron N., Foster T. 2004. Sustained release veterinary parenteral products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56, 1345–1365

Melgoza, L. M., Rocha, A., Plata, F., Mendoza, G., & Sandoval, H. 2007. Recubrimiento pelicular de comprimidos matriciales de alta densidad y pellets para

la liberación modificada de urea en rumiantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (4), 15-23.

Mhlanga, N., & Ray, S. S. 2015. Kinetic models for the release of the anticancer drug doxorubicin from biodegradable polylactide/metal oxide-based hybrids. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72, 1301–1307.

Miller, J. Oehler, D., Pound, J. 1998. Delivery of ivermectin by injectable microspheres. *Journal of Economic Entomology*. 91: 655-659.

Moore, S. 1968. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 243(23), 6281-6283.

Moore, S., & Stein, W. H. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of biological chemistry*. 176(1), 367-388.

Morris, J. 2009. Recent advance in arginine metabolism: roles and regulation of arginases. *British Journal of Pharmacology*. 157 (6), 922–930.

Nilkumhang, S., Alhnan, M., McConnell, E., Basit, A. Drug distribution in enteric microparticles. 2009. *International Journal of Pharmaceutics*. 379:1-8.

Nilkumhang, S., Basit, A.W. 2009. The robustness and flexibility of an emulsion solvent evaporation method to prepare pH-responsive microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 377, 135-141.

Paredero, J.M. 2008. Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia. Área de Farmacia del SESCAM.

Paul, S., Akhter, S., Hasan, I., Haider, S.S., Reza, S. 2012 Encapsulation of Naproxen in Eudragit RSPO Microsphere system: In vitro Characterization and Compatibility Studies. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 11(2), 147-155.

Pedrosa, M. M. 2008. Pellets sensibles a estímulos para liberación controlada de medicamentos: reticulación de matrices y formación de cubiertas in situ. *Universidad Santiago de Compostela*. 209 p.

Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G. Brizuela-Herrada, M.A., Tortoló-Cabañas, K., Gastón-Peña, C. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 47 (1), 14-25.

Phutane, P., Lotlikar, V., Ghule, A., Sutar, S., Kadam, V., & Shidhaye, S. 2010. In vitro evaluation of novel sustained release microspheres of glipizide prepared by the emulsion solvent diffusion-evaporation method. *Journal of Young Pharmacists*. 2(1), 35-41.

Poncelet, D. 2006. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. In *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*. Springer Netherlands. pp. 23-34.

Qiu, Y., Zhou, D. 2011. Understanding design and development of modified release solid oral dosage forms. *Journal of Validation Technology*. 17(2), 23-32.

Raffin, R. P., Colomé, L. M., Schapoval, E. E. S., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. 2008. Increasing sodium pantoprazole photostability by microencapsulation: Effect of the polymer and the preparation technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 69(3), 1014-1018.

Rathbone, J. M. 2012. Delivering drugs to farmed animals using controlled release science and technology. *International e-Journal of Science, Medicine & Education*: 6 (1), S118-S128.

Rathbone, M. J., & Martinez, M. N. 2002. Modified release drug delivery in veterinary medicine. *Drug discovery today*. 7(15), 823-829.

Rawat, M., Saraf, S., & Saraf, S. 2007. Influence of selected formulation variables on the preparation of enzyme-entrapped Eudragit S100 microspheres. *AAPS pharmscitech*. 8 (4), 289-297.

Relling, A., & Mattioli, G. 2002. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Universidad Nacional de La Plata. Editorial EDULPg

Rivas, C. 2010. Microencapsulación y estabilización enzimática del jugo de chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Tesis para obtener el título de M. en C. en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. UPIBI. México. Disponible en: [http://www.biotecnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/tesis/mc\\_crivas.pdf](http://www.biotecnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/tesis/mc_crivas.pdf).

Roy P. & Shahiwala A. 2009. Multiparticulate formulation approach to pulsatile drug delivery: Current perspectives. *Journal of Controlled Release*. 134, 74-80.

Ruíz de Chávez, J. 2014. Efecto de la suplementación con L-arginina sobre la tasa ovulatoria, la prolificidad y las concentraciones de VEGF y óxido nítrico en suero de ovejas. Tesis para obtener el título de M. en C. Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Siepmann, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R., Bodmeier, R. 2008. Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of Controlled Release*. 125, 1–15.

Trapani, A., Laquintana, V., Denora, N., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Franco, M., & Liso, G. 2007. Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 30(1), 64-74.

Trivedi, P., Verma, A., & Garud, N. 2008. Preparation and characterization of aceclofenac microspheres. *Asian Journal of pharmaceuticals*. 2 (2), 110-115.

Vachon, M. G., & Nairn, J. G. 1995. Physico-chemical evaluation of acetylsalicylic acid-Eudragit® RS100 microspheres prepared using a solvent-partition method. *Journal of microencapsulation*, 12(3), 287-305.

Van Soest, P.J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O&B BOOKS, Inc. Oregon, USA. Pág. 1-345

Vandamme, T. F., & Ellis, K. J. 2004. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 56 (10), 1415-1436.

Villamizar, L. F., & Martínez, F. 2008. Determination of the basic conditions for microencapsulation of an entomopathogenic Baculovirus by means of coacervation using Eudragit S100®. *Vitae*. 15(1), 123-131

Wagner, B., & Marmolejos, L. 1995. *Cria de ganado ovino y caprin*. Centro de Información FDA. Fundación de Desarrollo agropecuario, Inc. República Dominicana.

Wang, X., Frank, J. W., Xu, J., Dunlap, K. A., Satterfield, M. C., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. 2014. Functional role of arginine during the peri-implantation period of pregnancy. II. Consequences of loss of function of nitric oxide synthase NOS3 mRNA in ovine conceptus trophoctoderm. *Biology of reproduction*. 91(3):59, 1–10

Weiser, J.R., Saltzman, W., 2014. Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models . *Journal of Controlled Release*. 190, 664–673

Winzenburg, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T. 2004. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56, 1453-1466

Xia, Y., & Pack, D. W. 2015. Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release. *Chemical Engineering Science*. 125, 129-143.