



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de investigación:

Diseño y evaluación de formas  
farmacéuticas

**“Diseño y evaluación *in vitro* de Implantes de liberación sostenida a  
base de PLGA de formación *in situ*”**

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de maestro en ciencias  
farmacéuticas

**Presenta:**

Q.F.B. Nayelli Campos Morales

Matrícula: 2202802857

**Comité tutorial**

**Tutor:**

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón

**Asesoras:**

Dra. Viridiana G. Llera Rojas  
Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad

## RESUMEN

Los implantes parenterales de liberación sostenida pueden mantener las concentraciones del fármaco dentro de la ventana terapéutica, incluso por meses, y minimizar así las fluctuaciones indeseables en los niveles sistémicos del fármaco (Suh *et al.* 2021), contribuyendo al cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. En el presente trabajo se formuló doxiciclina (DOX) en implantes de formación *in situ* (IFIS). La DOX es una tetraciclina sintética, posee propiedades antibacterianas de amplio espectro, además se ha demostrado que cuenta con propiedades antiinflamatorias que la convierten en una buena opción terapéutica en múltiples enfermedades (Navarro-Treviño *et al.* 2020). Para la formación de los IFIS se utilizó el ácido poli (láctico-co-glicólico) PLGA por sus siglas en inglés, un polímero biodegradable y biocompatible. Para la formación de los IFIS se evaluaron diferentes relaciones molares de láctico:glicólico; 50:50, 75:25 y 85:15. El ácido esteárico se incluyó en las formulaciones ya que mejoró la estructura del implante. Los estudios de formulación incluyeron: el análisis de las condiciones de formación, porcentaje de PLGA en la fórmula, relación fármaco-polímero y diferentes proporciones de aditivo del 2 al 5%. Una vez definidas las variables, se analizaron estadísticamente con un diseño de experimentos. El modelo estadístico utilizado fue un diseño factorial completo  $2^3$  con 3 puntos centrales, teniendo como variable de respuesta la concentración de la liberación del fármaco en el tiempo cero (efecto burst), 48 h (tiempo 2) y 144 horas de formación (tiempo 6); una vez concluidos los experimentos, se procedió a evaluar los resultados con el software STATGRAPHICS Centurion XVIII. Los resultados demostraron que la formulación 4c cumplió las especificaciones establecidas, por lo que se caracterizó fisicoquímica y morfológicamente mediante calorimetría diferencial de barrido, microscopía electrónica de barrido y análisis de textura, Finalmente se evaluó la liberación *in vitro* por el método de difusión, utilizando membranas sintéticas, cumpliendo con una liberación prolongada por siete días. Por tanto, se logró el objetivo de diseñar y evaluar implantes de formación *in situ* a base de PLGA determinado por un diseño de experimentos para obtener una liberación sostenida de hclato de doxiciclina durante 7 días. **Palabras clave:** PLGA, IFIS, sostenida.

**Diseño y evaluación *in vitro* de Implantes de liberación sostenida a  
base de PLGA de formación *in situ*  
Visto Bueno (Vo. Bo.) de Comité Tutorial**

**Tutor:**

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón:



**Asesoras:**

Dra. Viridiana G. Llera Rojas:



Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad:



**Alumna:**

Q.F.B. Nayelli Campos Morales


Matrícula: 2202802857



**“Diseño y evaluación *in vitro* de Implantes de liberación sostenida a base de PLGA de formación *in situ*”**


**Jurado de Examen de Grado**

**Presidente:** Dr. Gerardo Leyva Gómez



---

**Vocal:** Dra. Lizbeth Martínez Acevedo



---

**Secretario:** Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón



---

Agradezco a la Maestría en Ciencias farmacéuticas de la Universidad Autónoma Metropolitana por la oportunidad de realizarme una vez más como profesionalista

Agradezco a mi comité tutorial por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, sus atenciones, consejos y conocimientos compartidos siempre con una buena atención para mi formación en este proyecto.

Agradezco a mi familia: Elizabeth, Héctor Luis y Darih por apoyarme siempre en todos los proyectos en los que decido participar, estando conmigo y ayudándome en todo lo que está en sus manos, son mi motor cada vez que siento que voy a desistir.

Agradezco también a César y Maggie por darme su apoyo no sólo con conocimientos también por estar conmigo en todo momento, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

## CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>MARCO TEORICO</b> .....	<b>19</b>
3.1	HICLATO DE DOXICICLINA .....	19
3.1.1	<i>Mecanismo de acción de hiclato de doxiciclina</i> .....	19
3.1.2	<i>Administración</i> .....	20
3.1.3	<i>Dosis</i> .....	20
3.1.4	<i>Características fisicoquímicas de hiclato de doxiciclina</i> .....	21
3.2	ÁCIDO POLI LÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA).....	22
3.2.1	<i>Degradación del PLGA</i> .....	24
3.2.2	<i>Propiedades del PLGA</i> .....	22
3.3	IMPLANTES DE FORMACIÓN IN SITU .....	25
3.3.1	<i>Métodos de evaluación de liberación in vitro de IFIS</i> .....	26
3.3.2	<i>Factores que impactan en la formación de implantes</i> .....	26
3.3.2.1	<b>Solvente</b> .....	26
3.3.2.2	<b>Aditivos</b> .....	28
3.3.2.3	<b>Polímero</b> .....	29
3.3.2.4	<b>Principio activo</b> .....	29
3.4	CARACTERIZACIÓN DEL IMPLANTE .....	31
3.4.1	<i>Textura</i> .....	31
3.4.2	<i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	32
3.4.3	<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	33
3.5	LIBERACIÓN DE FÁRMACO A TRAVÉS DE MEMBRANA DE DIÁLISIS .....	34
3.6	DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 2 <sup>3</sup> .....	35
<b>4</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
6.1	OBJETIVO GENERAL .....	38
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>7.</b>	<b>MATERIALES</b> .....	<b>39</b>
7.1	REACTIVOS .....	39
7.2	EQUIPOS.....	39
<b>8.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>40</b>
8.1	LINEAMIENTOS DE CALIDAD POR EL DISEÑO (QBD).....	40
8.3	CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA EN LA REGIÓN DEL UV .....	40
8.4	CURVA DE CALIBRACIÓN DE HICLATO DE DOXICICLINA.....	41

8.5 PRUEBAS DE FORMACIÓN DEL IMPLANTE <i>IN SITU</i> .....	41
8.6 PROPUESTAS DE FORMULACIÓN .....	42
8.7 DISEÑO FACTORIAL 2 <sup>3</sup> CON PUNTOS CENTRALES.....	43
8.8 LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> A TRAVÉS DE MEMBRANAS DE DIÁLISIS .....	43
8.9 CARACTERIZACIÓN DE LOS IFIS .....	44
8.9.1 <i>Análisis de textura</i> .....	44
8.9.2 <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	44
8.9.3 <i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	45
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
9.1 LINEAMIENTOS DE CALIDAD POR EL DISEÑO .....	46
9.2 EVALUACIÓN DEL SOLVENTE PARA LA FORMACIÓN DEL IMPLANTE .....	47
9.2.1 <i>Solubilidad del polímero en mezclas NMP:agua (90:10 y 80:20)</i> .....	47
9.2.2 <i>Solubilidad del polímero en mezclas NMP:Etanol (90:10 y 80:20)</i> .....	49
9.2.3 <i>Solvente NMP</i> .....	51
9.2.4 <i>Solubilidad del fármaco en NMP</i> .....	52
9.3 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA EN LA REGIÓN DEL UV .....	53
9.4 CURVA DE CALIBRACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE HICLATO DE DOXICICLINA ....	54
9.5 PRUEBAS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE LOS IMPLANTES <i>IN SITU</i> AL INYECTARSE .....	56
9.6 PROPUESTAS DE FORMULACIÓN .....	59
9.6.1 <i>Formulación 1</i> .....	59
9.6.2 <i>Formulación 2</i> .....	61
9.7 DISEÑO FACTORIAL 2 <sup>3</sup> CON PUNTOS CENTRALES.....	64
9.7.1 <i>Efecto burst</i> .....	66
9.7.2 <i>Análisis de porcentaje liberado a las 48 horas (tiempo 2)</i> .....	71
9.7.3 <i>Análisis de porcentaje liberado a las 144 horas (tiempo 6)</i> .....	72
9.8 LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DOX A TRAVÉS DE MEMBRANAS DE DIÁLISIS .....	75
9.8.1 <i>Modelo matemático que describe la liberación de DOX.</i> .....	77
9.9 CARACTERIZACIÓN DE LOS IMPLANTES DE FORMACIÓN <i>IN SITU</i> .....	81
9.9.1 <i>Texturómetro</i> .....	81
9.9.2 <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	83
9.9.3 <i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	86
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>11 REFERENCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>96</b>



## GLOSARIO DE TERMINOS

ANOVA	Análisis de varianza	ppm	Partes por millón
DOX	Doxiciclina	QbD	Por sus siglas en inglés: Calidad por el diseño
DMSO	Dimetilsulfóxido	RSD	Desviación estándar relativa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	ARN	Ácido ribonucleico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	SD	Desviación estándar
DW	Durbin-Watson	SED	Detector de estado sólido
EMA	Agencia Europea de Medicamentos	SEM	Microscopía electrónica de barrido
FDA	Food And Drug Administration	VIH	Virus de inmunodeficiencia Humana
HPMC	Hidroxipropil Metilcelulosa	LA	Ácido láctico
IC	Intervalo de confianza	GA	Ácido glicólico
ICH	Conferencia Internacional de Harmonización	PEG400	Polietilenglicol 400
IFIS	Implantes de formación <i>in situ</i>		
MIC	Concentración mínima inhibitoria		
MMP	Metaloproteinasas de la matriz		
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad		
NMP	N-metilpirrolidona		
PEG	Polietilenglicol		
PLGA	Poli ácido láctico-co-glicólico		
PLA	Poli ácido láctico		
PM	Peso molecular		
PVP	Polivinil pirrolidona		
PVA	Acetato de polivinilo		

## INDICE DE FIGURAS

<b>No.</b>		<b>Pág.</b>
1	Estructura química de hclato de doxiciclina.	19
2	Síntesis de PLGA por apertura de anillo copolimerización de láctico y glicólico	22
3	Estructura de 1-N-2-Metil pirrolidona (NMP)	28
4	Diseño factorial $2^3$ y su representación geométrica	35
5	Apariencia del polímero antes de agregar solvente	47
6	Apariencia del fármaco antes de agregar algún solvente	52
7	Espectro de hclato de doxiciclina.	53
8	Gráfico de linealidad: Hclato de doxiciclina	55
9	Cuantificación de liberación de fármaco. Prueba de formación F	57
10	Formulación 1	59
11	Grafica de liberación de formulación 1 en 7 días, realizada por duplicado.	60
12	Grafica de liberación de formulación 2 por 7 días, realizada por duplicado.	62
13	Diagrama de Pareto estandarizado para efecto burst	67
14	Contornos de la superficie de respuesta estimada de efecto burst	70
15	Superficie de respuesta estimada para efecto burst	71
16	Liberación a través de membranas de diálisis	75
17	Evaluación de la cinética de liberación en 12 horas de hclato de doxiciclina en membranas de diálisis por triplicado.	76
18	Predicción de liberación del fármaco	80
19	Termogramas de excipientes y de principio activo	83
20	Termogramas de formulaciones (polvos) Mezcla física	84
21	Termogramas de formulaciones (implantes formados)	85

## ÍNDICE DE TABLAS

No.		Pág.
1	Características principales de hiclato de doxiciclina	21
2	Características del PLGA	23
3	Descripción de métodos de formación de implantes de formación <i>in situ</i>	26
4	Características de NMP	27
5	Características de ácido esteárico	29
6	Definición de conceptos de textura	31
7	Equipos utilizados con sus características	39
8	Cantidades utilizadas en las pruebas de formación	41
9	Cantidades de excipientes utilizados en diferentes formulaciones	42
10	Factores y niveles utilizados en modelo estadístico	43
11	Tabla de atributos de calidad de implantes de formación <i>in situ</i>	46
12	Solubilidad del polímero NMP:Agua 90:10	47
13	Solubilidad del polímero NMP:Agua 80:20	48
14	Solubilidad del polímero NMP:Etanol 90:10	49
15	Solubilidad del polímero NMP:Etanol 80:20	50
16	Solubilidad del polímero NMP	51
17	Solubilidad del fármaco con NMP	52
18	Curva de calibración de hiclato de doxiciclina	54
19	Evaluación de la presencia de formación de implante en formulaciones	56
20	Respuesta a experimentos: fármaco acumulado	65
21	Análisis de varianza de efecto burst	66
22	Coefficiente de regresión	68
23	Análisis de varianza de tiempo 2	72
24	Análisis de varianza de tiempo 6	73
25	Parámetros obtenidos para la evaluación de la cinética de liberación de hiclato de doxiciclina	78
26	Resultados de textura de los implantes formados	81
27	Resultados cuantitativos de pico característico del fármaco	84
28	Micrografías de formulaciones 7b, 3a y 4 central	86

## 1 INTRODUCCIÓN

Los medicamentos de administración oral y parenteral son las formas farmacéuticas mayormente fabricadas a nivel mundial. La mayoría de estas formas farmacéuticas están diseñadas para liberar el fármaco de manera inmediata con la finalidad de lograr el efecto terapéutico en el menor tiempo posible, sin embargo, tienen una duración terapéutica corta, que resulta en múltiples administraciones. Las formas farmacéuticas de liberación modificada surgen como una alternativa a los sistemas de liberación inmediata. Una liberación modificada es aquella en la que el principio activo es cedido de forma controlada en el lugar de acción, resultando en una modificación en la velocidad de liberación, mientras que la liberación prolongada se refiere a que la velocidad de liberación del fármaco es menor que de la forma convencional mientras sean administradas por la misma vía (Lozano, et al. 2012)]. La liberación sostenida o liberación extendida se define como la liberación de fármaco en un periodo de tiempo prolongado, el fármaco es liberado de una manera más lenta, así que los niveles plasmáticos se mantienen por más tiempo (Hillery & Park, 2016).

Un sistema de liberación controlada de fármacos cumple principalmente dos funciones, la primera es el transporte del fármaco a un sitio particular del organismo, esto puede ser por vía parenteral o no parenteral. La segunda se refiere a que la liberación va a ocurrir de manera controlada dependiendo de la preparación de formas farmacéuticas, esto determina la velocidad a la que el fármaco se encontrará disponible en el organismo una vez liberado (Cox, 2008). Un sistema ideal de liberación modificada asegura que la actividad del principio activo estará disponible en el sitio de acción durante un tiempo apropiado, que no ocasione efectos secundarios, presentado en el sitio de acción valores sobre la concentración mínima inhibitoria y menores a la concentración plasmática máxima. Esto es controlado por muchos factores como: la concentración del fármaco, incluida la ruta y frecuencia de administración, el metabolismo del fármaco, así como su aclaramiento. Por lo tanto, en la práctica clínica es vital considerar: el tratamiento del farmacológico y las propiedades de liberación requeridas del medicamento (Hillery & Park, 2016).

El desarrollo de sistemas de administración de fármacos inyectables ha recibido una atención considerable en los últimos años, y se han desarrollado una gran cantidad de sistemas. Los implantes de formación *in situ* (IFIS) consisten en soluciones poliméricas, que cuando son administradas por vía parenteral forman un sistema tipo depósito de fármaco en el lugar de la inyección. La liberación a partir de los IFIS se divide típicamente en tres fases: explosión durante la formación del depósito, difusión del fármaco a través de la matriz polimérica y finalmente la liberación del fármaco por degradación del sistema (Parent *et al.* 2013). Estos sistemas presentan muchas ventajas, por ejemplo: fácil administración, una fabricación menos compleja, incremento de la duración del efecto farmacológico, conserva la eficacia de fármacos con una reducida vida media y reduce la necesidad de administrar inyecciones repetidas al día (Mashayekhi *et al.* 2013).

La formulación de los IFIS puede ser variada, pero uno de los componentes principales es el polímero que controla la liberación. Uno de los polímeros que con mayor frecuencia se utiliza en este tipo de formulaciones es el ácido poli-(láctico-co-glicólico). El PLGA es un polímero biocompatible y biodegradable, se degrada a ácido glicólico y ácido láctico (Lizambard *et al.* 2019). El PLGA tiene la capacidad de controlar la liberación del fármaco durante periodos extendidos, desde semanas hasta años. La duración del efecto, es decir, el tiempo que controla la liberación dependerá de la composición en el sistema y de las características fisicoquímicas del tipo de PLGA que se utilice. La formación de IFIS con PLGA puede controlar la liberación de fármacos hidrofóbicos o hidrofílicos, por ejemplo, la doxiciclina.

La doxiciclina (DOX) es un antibiótico de amplio espectro que pertenece al grupo de las tetraciclinas sintéticas, se ha descubierto que presenta propiedades antiinflamatorias convirtiéndolo en una muy buena opción terapéutica en múltiples enfermedades, además de poseer actividad antiapoptóticas y antioxidantes. Cuenta con un perfil de eficacia y seguridad óptima (Navarro-Treviño *et al.* 2020). La DOX y otros derivados de tetraciclina parecen ser efectivos en el tratamiento de enfermedades asociadas con la inflamación crónica, incluidos los aneurismas aórticos abdominales, múltiples esclerosis, gingivitis y arteritis reumatoide (Clemens

*et al.* 2018). El presentar diversas aplicaciones, desde infecciones agudas, así como en enfermedades crónicas (mencionadas anteriormente) y su alta solubilidad en agua, lo hace un fármaco candidato para formularse en un IFIS, además, al administrarse por vía oral, puede causar irritación gástrica y reducir su absorción al ser tomada con alimentos.

Los IFIS's ofrecen una gran ventaja sobre los sistemas convencionales ya que, al ser una sola administración, solventa el problema de la adherencia terapéutica, definida como "el comportamiento de una persona -tomar el medicamento, seguir un régimen alimentario y ejecutar cambios del modo de vida- respecto a las recomendaciones acordadas de un prestador de asistencia sanitaria" (Ortega et al. 2018). Por lo que el objetivo de este trabajo es diseñar y evaluar implantes *in situ* a base de PLGA, determinado por un diseño de experimentos para obtener una liberación sostenida de hiclato de doxiciclina durante 7 días.

## 2. ANTECEDENTES

La vía de administración oral, a pesar de ser considerada como la vía deseable por los pacientes, aún representa un gran desafío en muchas aplicaciones farmacéuticas (Parent *et al.* 2013). En el tratamiento de algún padecimiento se requiere de una administración frecuente y constante para mantener el fármaco en niveles dentro de la ventana terapéutica, sin embargo, no muchos pacientes logran mantener el régimen de dosificación (Hopkins *et al.* 2019). Las rutas de administración como pulmonar, nasal, transdérmica, ocular y rectal se presentan como una alternativa, aunque de la misma forma han presentado inconvenientes como la degradación enzimática, baja o variable absorción en algunos casos. Como resultado de lo anterior, existe un renovado interés en la administración parenteral, especialmente con las diferentes mejoras en la reducción del dolor (Parent *et al.* 2013). En el mercado se encuentran disponibles varios tipos de formas farmacéuticas parenterales, tales como soluciones, emulsiones, liposomas, micelas, implantes, micropartículas, nanopartículas y nanocápsulas. Sin embargo, en los últimos años sólo los implantes y micropartículas ganaron importancia como sistemas de liberación controlada (Kempe y Mäder, 2012).

Se han desarrollado sistemas de administración de fármacos, como los implantes inyectables que presentan numerosas ventajas sobre las plataformas orales convencionales, los implantes de formación *in situ* (IFIS's) primera vez desarrollados por Dunn *et al.* Los IFIS's son una solución líquida de polímero y fármaco que se puede inyectar a través de una aguja de pequeño calibre en el cuerpo. Una vez en el cuerpo, la solución solidifica en un implante que libera el fármaco durante un periodo de tiempo prolongado (Hopkins *et al.* 2019).

Estos sistemas presentan muchas ventajas como fácil administración, una fabricación menos compleja, incrementa la duración del efecto farmacológico, conserva la eficacia de fármacos con una reducida vida media y reduce la necesidad de administrar repetidas inyecciones al día (Mashayekhi *et al.* 2013). Las formulaciones líquidas generalmente pueden administrarse más fácilmente que los implantes preformados, ofrecen la posibilidad de controlar la liberación de fármacos durante periodos que van desde unos pocos días hasta varios meses,

pueden administrarse directamente en el sitio de acción y por lo tanto permitir la superación de barreras fisiológicas cruciales (Bode *et al.* 2019). Los implantes de formación *in situ* presentan una variedad de aplicaciones como en vacunas, plásmidos de DNA, liberación de péptidos e incluso en medicamentos veterinarios, ya que reduce el estrés en animales y siendo de fácil aplicación, además de que las liberaciones controladas por vía parenteral forman un 40% de las presentaciones existentes en el mercado (Kanwar & Sinha, 2019).

Los implantes parenterales de liberación sostenida han aportado enormes beneficios a la salud humana durante las últimas décadas. Estos medicamentos pueden mantener el fármaco dentro de la ventana terapéutica incluso por meses y minimizar así las fluctuaciones indeseables en los niveles sistémicos del fármaco. Actualmente existe una gran variedad de medicamentos parenterales de liberación sostenida aprobados por la FDA. Pueden estar preformados como Zoladex® y Ozurdex® o formación *in situ* como Eligard® y Antridox® (Suh *et al.* 2021).

La tecnología Atrigel es un sistema de administración parenteral específico del sitio de acción, desarrollado por Dunn y colaboradores en 1987. La tecnología fue desarrollada para el tratamiento de la enfermedad periodontal, incluye la disolución de un polímero biodegradable insoluble en agua en un disolvente no tóxico, N-metil-2-pirrolidona. Luego se agrega el medicamento a la solución. Este

la solución se inyecta por vía intramuscular/subcutánea donde forma el implante debido a la separación de fases. Eligard sigue esta tecnología y es utilizado para el tratamiento paliativo del cáncer de próstata, contiene como principio activo: Acetato de leuprolida. De la misma manera que Atrisorb utilizado para la regeneración tisular del tejido periodontal, mientras que Atridox este a su vez cuenta con el principio activo: Hiclato de doxiciclina, aplicándose directamente en la encía, es administrado subgingival mente y controla la liberación de hiclato de doxiciclina por 7 días, similar a Eligard al consistir en dos jeringas: una contiene la formulación polimérica, mientras que la segunda contiene el principio activo, al combinarse forman un líquido viscoso que al entrar en contacto con el fluido crevicular, solidifica y permite la liberación. Este producto se recomienda estar refrigerado, atemperarse 15 min antes de su administración y no es necesario



utilizar ningún anestésico para su administración (Kanwar & Sinha, 2019). Los sistemas de administración de fármacos son particularmente importantes en la terapia del cáncer donde el índice terapéutico del fármaco es pequeño y la estabilidad es limitada. Los IFIS's son utilizados para la administración local de fármacos directamente en el tejido de interés (por ejemplo, un tumor), son una ruta alternativa a la vía oral e intravenosa a través de un procedimiento mínimamente invasivo utilizando una aguja de pequeño calibre (Manaspon *et al.* 2017).

Hasta la fecha, los implantes sólidos biodegradables son usados en aplicaciones oculares y están hechos con poli (ácido láctico- co-glicólico) (PLGA), poli (ácido láctico) (PLA) o hidroxipropil metilcelulosa (HPMC). Se están desarrollando implantes sólidos biodegradables de liberación controlada para la prevención o el tratamiento del VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) (Maturavongsadit *et al.* 2021). Los implantes inyectables que utilizan PLGA se han desarrollado hace más de 25 años y presentan relevancia clínica en aquellas aplicaciones en donde la actividad farmacológica sistémica a largo plazo es deseable (Manaspon *et al.* 2017).

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos de amplio espectro, iniciando con la clortetraciclina, obtenida de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens*, dividido en tres categorías. El primer grupo incluye a oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina, presentan una absorción menor a comparación de la segunda generación. El segundo grupo se compone de minociclina y doxiciclina, tienen una mejor distribución por el tejido, pueden ser administradas vía oral y parenteral. Mientras que la tercera categoría con excepción de tigeciclina, aún debe evaluarse en estudios controlados para su aplicación (Ghiasian *et al.*, 2019).

La doxiciclina (DOX) tuvo lugar debido a la modificación estructural en 1967, demostrando mantener propiedades antimicrobianas presentando ahora propiedades antiinflamatorias, aumentando así su uso en diferentes ámbitos (Navarro-Treviño *et al.* 2020).

Una característica de DOX es que presenta una baja nefrotoxicidad y un efecto protector en las funciones renales. Es ampliamente usado en enfermedades

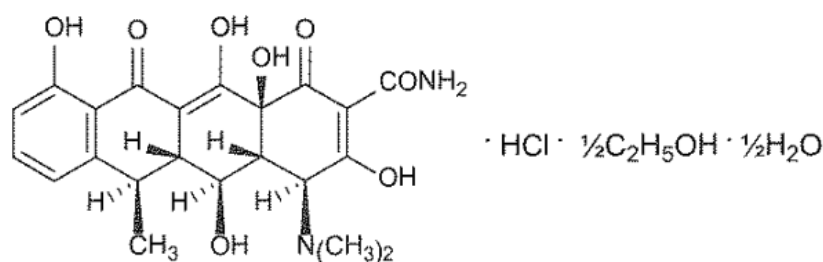
respiratorias, infecciones urinarias, enfermedad de Lyme, malaria, entre otras (Huang et al., 2019).

DOX es usada en tratamiento para humanos y en especies domésticas para enfermedades causadas por diferentes agentes biológicos, de la misma forma es usado como tratamiento profiláctico. Sin embargo, su uso se limita debido a sus efectos secundarios. La administración de DOX puede ocasionar irritación del estómago y esófago, causando el riesgo de generar úlceras y vómito. Al ser administrado por vía parenteral puede causar irritación en el tejido, limitando su uso a aquellos tratamientos donde es estrictamente necesario. Las formulaciones de liberación controlada de DOX pueden reducir los efectos secundarios manteniendo la eficacia durante el tratamiento (Ruiz, et., al. 2015).

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 Hiclato de doxiciclina

El hiclato de doxiciclina es un antibiótico de amplio espectro de la clasificación de las tetraciclinas (Figura 1). Comparado con otras tetraciclinas, destaca la baja nefrotoxicidad y un efecto protector renal. Aunque los principales sitios de absorción son el estómago y el duodeno, el hiclato de doxiciclina induce una importante lesión gástrica y esofágica. No se recomienda la administración con comida, ya que puede inhibir la absorción (Huang *et al.* 2019).



**Figura 1.** Estructura química de hiclato de doxiciclina.

La DOX es una tetraciclina semisintética producida naturalmente por el género *Streptomyces genus* que pertenece al tipo dominante de bacteria, Actinobacteria. La DOX es un antibiótico sintetizado por un microorganismo que inhibe el crecimiento de otro microorganismo, teniendo un efecto bacteriostático de amplio espectro (Ali *et al.* 2017).

##### 3.1.1 Mecanismo de acción de hiclato de doxiciclina

El posible modo de acción es mediado por su fuerte efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas. Precisamente la DOX inhibe la síntesis de proteínas mediante la prevención de aminoacil-tARN unido al ribosoma en la célula bacteriana (Ali *et al.* 2017).

El hiclato de doxiciclina presenta una acción bacteriostática de amplio espectro, inhibe síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad ribosómica 30S de bacterias gram positivas como gram negativas. Este fármaco también actúa en la subunidad ribosómica 40S específica de las células de los mamíferos (Piacentini *et al.* 2019).

### 3.1.2 Administración

La doxiciclina se ha utilizado desde 1967 en humanos y en especies domésticas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades causadas por varios agentes biológicos (Ruiz, et, al. 2015). Se usa comúnmente para el tratamiento de diversas infecciones de la piel por *Staphylococcus aureus* resistente a la metaciclina, la enfermedad de Lyme, varias enfermedades de transmisión sexual, la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y profilaxis para malaria (Turner *et al.* 2014). Además, la DOX tiene un efecto inhibitor sobre la actividad de las proteínas metaloproteinasas de la matriz (MMP), de acuerdo con esto, puede utilizarse como antineoplásico y también como agente antiinflamatorio. Es un fármaco bien tolerado, prácticamente se absorbe después de la administración oral y tiene una buena penetración tisular. La doxiciclina es barata y ampliamente disponible, se administra por la vía oral. Estas cualidades hacen que sea conveniente su uso en la población (Ali *et al.* 2017).

### 3.1.3 Dosis

La DOX tiene eficacia clínica en concentraciones bajas de 2 a 4 veces la concentración mínima inhibitoria (MIC) para microorganismos susceptibles. Por lo tanto, la inhibición de microorganismos ocurre independiente del tiempo, sin embargo, el uso de doxiciclina se ha limitado en cierta medida debido a reacciones adversas, como irritación del esófago y estómago, con riesgo de ulceraciones y vómito. También, puede producirse irritación tisular después de una inyección subcutánea o intramuscular, como ocurre con otros fármacos del grupo de tetraciclinas (Ruiz *et al.* 2015).

En 1983 Golub y colaboradores, demostraron que la tetraciclina posee una potente actividad antiinflamatoria independiente de su acción antimicrobiana, inhibiendo la actividad de la enzima colagenasa en tejido gingival de rata. Desde entonces se han llevado a cabo estudios sobre estos mecanismos demostrando que la doxiciclina en dosis sub-antimicrobianas de 20 a 40 mg por día muestra actividades antiinflamatorias (Piacentini *et al.* 2019). En un estudio cruzado por Ruiz y

colaboradores para determinar la farmacocinética de DOX en perros, se les administró una dosis única de 20 mg/Kg de hiclato de doxiciclina.

### 3.1.4 Características fisicoquímicas de hiclato de doxiciclina

La Tabla 1 presenta las principales características del fármaco.

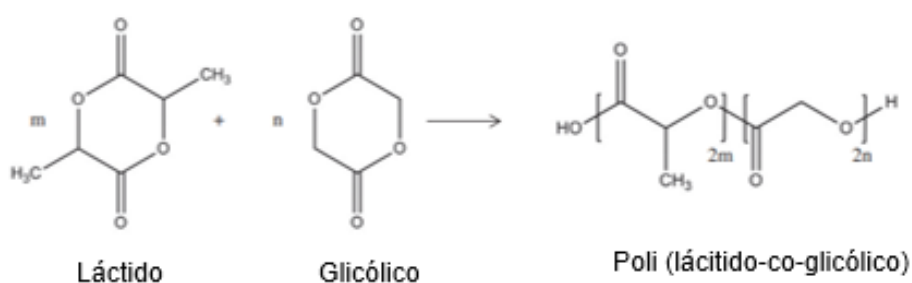
**Tabla 1.** Características principales de hiclato de doxiciclina. Obtenida de FEUM, 2009

<b>Fórmula molecular</b>	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot \frac{1}{2} C_2H_6O \cdot \frac{1}{2} H_2O$
<b>Peso molecular</b>	512.94 g/mol
<b>Descripción</b>	Polvo cristalino amarillo, higroscópico.
<b>Solubilidad</b>	Fácilmente soluble en agua y metanol; casi insoluble en cloroformo y éter dietílico.
<b>pH</b>	Entre 2 y 3
<b>Punto de fusión</b>	201 °C
<b>Log P</b>	0.63
<b>pKa</b>	3.09

### 3.2 Ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA)

Los polímeros derivados de ácido láctico y glicólico han sido extensamente usados en la formulación de sistemas de liberación de fármacos, por su habilidad de controlar la liberación de fármacos por largos periodos de tiempo y proporcionar una concentración plasmática constante, puede reducir la dosis total y algunas reacciones adversas. Un gran número de polímeros han sido estudiados para la formulación de sistemas acarreadores, pero poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) PGA y sus copolímeros poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) han sido extensamente usados por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y su versatilidad en cinéticas de degradación. Sus propiedades físicas y la aprobación de los productos por la FDA que contienen estos polímeros los hace muy estudiados y comercialmente disponibles (Mittal *et al.* 2007).

El PLGA es un polímero biocompatible y biodegradable. Los productos de degradación son ácido láctico y ácido glicólico, ninguno de ellos es tóxico (Bode *et al.* 2019). La figura 2 ilustra la síntesis del PLGA. Es ampliamente conocido como formador de una matriz biocompatible en formulaciones parenterales de liberación controlada (Bode *et al.* 2018).



**Figura 2.** Síntesis de PLGA por apertura de anillo copolimerización de láctico y glicólico. Obtenida y modificada de Parent y colaboradores, 2013.

#### 3.2.1 Propiedades del PLGA

Es un polímero alifático con un poliéster en su estructura que se forma por la polimerización de monómeros de ácido láctico y glicólico. Se muestran sus características en la tabla 2. El PLGA al ser un copolímero puede polimerizar en

diferentes relaciones molares de sus monómeros. Su composición copolimérica puede ser utilizada para manipular la cristalinidad, hidrofobicidad y la temperatura de transición vítrea del copolímero. La temperatura de transición puede variar de 40° a 60°C dependiendo de la composición del polímero y su peso molecular, sin embargo, todas las composiciones de PLGA resultarán en una matriz de polímero amorfo termoplástico por debajo de la temperatura de transición vítrea. Si el ácido láctico se usa en una proporción más alta que el ácido glicólico se forma un copolímero más hidrófobo, este cambio se puede utilizar para reducir la velocidad de penetración de agua dentro del dispositivo. El incremento en el ácido glicólico en la composición copolimérica puede producir una matriz polimérica más cristalina (Hines & Kaplan, 2013).

**Tabla 2.** Características del PLGA. Obtenida de Sheskey *et al.* 2009

<b>PLGA</b>	
<b>Función</b>	Material biodegradable; agente de recubrimiento; agente de liberación controlada.
<b>Descripción</b>	Material vítreo, que se presenta como blanco o amarillo.
<b>PM</b>	Depende de la elongación de la cadena. 75:25 0.40-0.60 dl/g 85:15 0.20-0.40 dl/g 50:50 0.20-0.40 dl/g
<b>Densidad</b>	1.2-7.0 g/cm <sup>3</sup> (depende de la elongación de la cadena).
<b>Viscosidad</b>	Depende de la elongación de la cadena.
<b>Solubilidad</b>	Soluble en diclorometano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, cloroformo, hexafluoroisopropanol y acetona. Insolubles en agua.

### 3.2.2 Degradación del PLGA

El ácido láctico y/o glicólico son bien conocidos como materiales higroscópicos, los polímeros derivados de estas sustancias también lo son. Los polímeros se degradan en un medio acuoso mediante hidrólisis, tanto en humanos como en animales. La biodegradación de PLGA ocurre a través de cuatro pasos consecutivos: hidratación, degradación inicial, degradación adicional y solubilización. Los PLGA son conocidos por sufrir una degradación masiva en un medio acuoso, lo que significa que la velocidad de penetración del medio o hidratación es más rápida que la solubilización del polímero. Muchos factores influyen en la biodegradación del PLGA. Estos factores pueden incluir la composición del polímero (o la proporción de ácido láctico a ácido glicólico), peso molecular, naturaleza de los medios de incubación/ hidrólisis, pH y la fuerza iónica del medio. Aunque estos factores han sido reportados, todavía se necesita un estudio minucioso para dar una comprensión completa sobre la biodegradación de PLGA (Wu y Wang, 2001).



### 3.3 Implantes de formación *in situ*

El concepto de implantes de formación *in situ* fue introducido por Dunn y colaboradores en los 90's. Un polímero biodegradable insoluble en agua se disuelve con ayuda de un solvente orgánicos farmacéuticamente aceptable miscible o parcialmente miscible en agua. El fármaco es agregado a esta solución polimérica para formar una solución, seguido de la inyección en un medio acuoso ocurre la separación de fases, resultando en la precipitación del polímero y formación del depósito que atrapa el fármaco en el sitio de inyección (Parent *et al.* 2013).

Los implantes de formación *in situ* son típicamente compuestos por dos partes: una solución polimérica biodegradable farmacéuticamente aceptable, en solventes miscibles (como N-Metil pirrolidona) y un fármaco liofilizado. Estas dos partes son mezcladas antes de administrarse para asegurar la dispersión homogénea o una completa disolución del fármaco en la solución polimérica. La inyección de implantes por formación *in situ* forma matrices poliméricas en el sitio de acción por la separación de cambios de solventes. La separación ocurre cuando los solventes se difunden en el medio acuoso, resultando en un fenómeno de antisolvencia que resulta en la precipitación del polímero y la formación del depósito sólido que encapsula el fármaco en el sitio de acción.

La cinética de la liberación del fármaco puede ser modulada al alterar las propiedades del polímero (peso del polímero, el grupo final, composición de monómeros). La liberación del fármaco en los IFIS es generalmente caracterizada por efecto burst inicial durante la formación del implante, seguido de una liberación lenta debido al paso del fármaco por la matriz polimérica (difusión), cerca del final existe una fase de liberación rápida generada por la degradación de la matriz y su erosión, la separación dinámica de fases es la fuerza principal que controla la cinética de liberación del fármaco es de los implantes de formación *in situ* (Suh *et al.* 2021).

Existen diferentes sistemas de liberación controlada de fármacos intramuscular o subcutáneo en la forma de implantes o micropartículas, estos han basado su desarrollo en polímeros biodegradables. Este sistema de liberación biodegradable de fármacos utiliza poliésteres como PLA o PLGA como materiales de liberación

controlada (Kranz y Bodmeier, 2007). Para estos sistemas PLA o PLGA son disueltos en solventes miscibles en agua como NMP (N-metilpirrolidona) o DMSO (dimetilsulfóxido).

### 3.3.1 Métodos de evaluación de liberación *in vitro* de IFIS

Existen cinco métodos de formación de implantes usados para investigar la formación *in vitro* de la cinética de liberación, mencionados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Descripción de métodos de formación de implantes de formación *in situ*. Obtenida y modificada de Suh y colaboradores, 2021

Método	Definición
<b>Inyección directa en el medio</b>	La inyección directa de la formulación de los implantes de formación <i>in situ</i> en el medio de liberación.
<b>Congelación rápida</b>	La congelación rápida de la formulación de implantes de formación <i>in situ</i> en nitrógeno líquido.
<b>Cápsula de gelatina</b>	La encapsulación de la formulación de implantes de formación <i>in situ</i> en una cápsula de gelatina.
<b>Diálisis</b>	La formulación de implantes de formación <i>in situ</i> en diálisis de membrana.
<b>Películas de PVA</b>	La formulación de implantes de formación <i>in situ</i> En sacos de películas de PVA (solubles en agua).

### 3.3.2 Factores que impactan en la formación de implantes

La velocidad de liberación de los implantes de formación *in situ* depende de un gran número de parámetros, aunque se ha investigado que la concentración del polímero, la naturaleza del solvente, el principio activo y la presencia de aditivos afectan la liberación del fármaco, además existen estudios que destacan el efecto de entorno en el que sucede la liberación (Wang & Burgess, 2021).

#### 3.3.2.1 Solvente

Los solventes usados en los implantes de formación *in situ* deben cumplir con una seguridad biológica, afinidad por el agua, la habilidad de disolver el polímero, la viscosidad apropiada que permita la Inyectabilidad. Los solventes utilizados son: DMSO, NMP, benzoato de bencilo, benzoato de etilo, triacetina, citrato de trietilo, alcohol bencílico o una mezcla de alguno de los anteriores. Un número limitado de

estudios utilizó disolventes como glucofurool, tetraglicol y PEG 400. En adición, los solventes pueden influir en la estabilidad del polímero, ya que pueden cambiar la disolución del fármaco y la erosión de la matriz, alterando así la liberación del fármaco (Wang & Burgees, 2021).

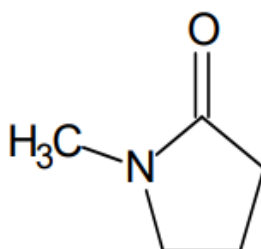
La NMP es uno de los principales cosolventes farmacéuticos y actúa fuertemente como un agente solubilizante, es un excipiente usado en soluciones parenterales y orales. Se muestran sus características en la tabla 4. La NMP es un solvente biodegradable, por lo que es usado en diferentes campos y como un solvente seguro (Jouyban *et al.* 2010). Se observa su estructura en la figura 3.

**Tabla 4.** Características de NMP. Obtenida de Jouyban, et. Al. 2010.

<b>1-N-2-Metil pirrolidona</b>	
<b>Función</b>	Es un solvente con alta potencia para solubilizar productos químicos y agentes farmacéuticos.
<b>Descripción</b>	Es un líquido transparente ligeramente amarillo.
<b>PM</b>	99.13 g/mol
<b>Densidad</b>	1.03 g/cm <sup>3</sup>
<b>Viscosidad</b>	1.80 cP
<b>Solubilidad</b>	Miscible en el agua, alcoholes de bajo peso molecular, cetonas, polietilenglicoles y disolventes como acetato de etilo, cloroformo y benceno.

La NMP pertenece al grupo de solventes apróticos, es un líquido amarillo claro y es miscible con el agua, presenta una baja volatilidad y flamabilidad, con la necesaria solubilización de polvos para hacerlo un buen solvente en diferentes aplicaciones. El mecanismo de solubilización de fármacos por NMP es ambiguo y existen diferentes teorías para el mismo, incluyendo la acción como un cosolvente, un

agente complejante y surfactante, recientemente se define como cosolvente y agente complejante simultáneamente (Jouyban *et al.* 2010).



**Figura 3.** Estructura de 1-N-2-Metil pirrolidona (NMP). Obtenida de Jouyban y colaboradores, 2010.

### 3.3.2.2 Aditivos

El impacto de utilizar aditivos en las formulaciones de implantes de formación *in situ* ha sido ampliamente estudiado y como afecta la liberación de fármacos (Bode *et al.* 2019). El uso de aditivos hidrofílicos se espera que acelere la separación de líquido – líquido y aumente el efecto burst, como la adición de PVP o manitol. La adición de un aditivo anfifílico o hidrófobo reduce el efecto burst, modificando la morfología del sistema con una transición a una estructura de esponja. Algunos ejemplos son el glicerol, heptanoato de etilo, ácido esteárico, heptanoato de metilo y son agregados del 1 al 10% p/p. Sin importar cual sea el principio activo, las formulaciones con estos aditivos retienen el solvente, controlando la liberación, ya que la estructura que forman se torna menos porosa y más como una estructura de esponja, disminuyendo el efecto burst y extendiendo la liberación (Parent *et al.* 2013).

El ácido esteárico es un ácido fuerte ligeramente amarillo o blanco, sólido cristalino brillante o puede presentarse como un polvo blanco amarillento, tiene un olor ligero y sabor sugerido a sebo, sus características se pueden observar en la tabla 5. El ácido esteárico es usado en formulaciones tópicas y orales, se utiliza también como acarreador de fármacos en liberación sostenida (Sheskey *et al.* 2009). El ácido esteárico no es soluble en agua. La adición del 1, 3 o 5% de este compuesto lipofílico en las formulaciones de implantes de formación *in situ* tienen un impacto relativo en la estructura microscópica (Bode *et al.* 2019).

**Tabla 5.** Características de ácido esteárico. Obtenida de Sheskey *et al.* 2009 y FEUM, 2009.

<b>ÁCIDO ESTEÁRICO</b>	
<b>Función</b>	Agente emulsionante; agente solubilizante; lubricante para tabletas y cápsulas.
<b>Descripción</b>	Polvo blanco o blanco amarillento. Tiene un ligero olor (con un umbral de olor de 20 ppm) y sabor sugiriendo sebo, untuoso al tacto.
<b>Fórmula</b>	$C_{18}H_{36}O_2$
<b>PM</b>	284.5 g/mol
<b>Densidad</b>	0.537 g/cm <sup>3</sup>
<b>Viscosidad</b>	No reportada.
<b>Solubilidad</b>	Fácilmente soluble en benceno, tetracloruro de carbono, forma de cloro y éter; soluble en etanol (95%), hexano y propilenglicol; prácticamente insoluble en agua.

### 3.3.2.3 Polímero

Las características del polímero biodegradable afectan fuertemente en la degradación y no solo la erosión de la matriz, sino también la dinámica de inversión de fases (Parent *et al.* 2013). La liberación del fármaco está relacionada con las propiedades del polímero como es el peso molecular, estructura, cristalinidad y concentración de polímero. El peso molecular es un factor crítico que es integral en determinar un gran número de características fisicoquímicas y mecánicas de los polímeros, como son la solubilidad, viscosidad, difusividad y temperatura de transición vítrea. (Wang & Burgess, 2021). El peso molecular es otro factor que afecta al poliéster en la erosión de la matriz y el efecto burst. Un bajo peso molecular muestra una baja liberación inicial que aquellos con mayor peso molecular pero una vez erosiona, aumenta la velocidad de liberación (Parent *et al.* 2013).

### 3.3.2.4 Principio activo

El principio activo tiene un impacto en la dinámica de separación de fases, humectabilidad, degradación y las propiedades de liberación de los implantes de formación *in situ*, estos factores son el peso molecular y la liofilia, la afinidad del fármaco con el solvente y polímero, así como la solidificación del principio activo en

el sistema de formación de implantes *in situ* (ya sea cristalino o amorfo). Un bajo peso molecular es esperado que pueda salir más fácilmente de la matriz polimérica del implante y así presentar una liberación mayor del fármaco. La hidrofobicidad y lipofilidad muestran una influencia significativa en la absorción del fármaco *in vivo* por administración subcutánea. Sin embargo, la influencia de estas características estudiadas *in vivo* o *in vitro* en implantes de formación *in situ* es compleja (Wang & Burgess, 2021). Las características del fármaco, tales como, el peso molecular, solubilidad, lipofilia, acidez y tamaño de partícula puede alterar el comportamiento de la liberación del IFIS. Moléculas con bajo peso molecular pasan fácilmente a través de estructuras porosas de los implantes debido a su pequeño tamaño y presión osmótica. Los fármacos hidrófobos con alto coeficiente de partición son fácilmente liberados y resultan en una liberación de efecto burst rápido (Zhang *et al.* 2019).

### 3.4 Caracterización del implante

La forma final del implante una vez inyectado en el medio tiene un impacto en la cinética de liberación, ya sea por la geometría, dureza, plasticidad o la estructura microscópica, por lo que es importante conocer la estructura macro y microscópica de los implantes de formación *in situ*.

#### 3.4.1 Textura

La textura es definida como la combinación de diferentes atributos como mecánicos, la de superficie de un producto y geométricos. El análisis de textura emplea varias técnicas para analizar mediciones cuantitativas de las propiedades de un material. Las técnicas mecánicas y los análisis de imagen se emplean para la caracterización óptica (visual) de la muestra analizada. Un análisis mecánico de textura es utilizado frecuentemente para la caracterización de productos alimenticios, cosméticos y en la industria farmacéutica. La deformación y la multideformación son protocolos empleados para el aseguramiento de las propiedades críticas de un objeto. Una deformación puede ser utilizada para definir parámetros, por ejemplo, la dureza (la fuerza máxima de la primera compresión de un objeto), adhesividad o cohesividad (la máxima fuerza negativa de la primera deformación), resiliencia y el modo inicial (definido como el radio de tensión inicial a la deformación inicial). Una prueba de deformación provee información acerca de la fracturabilidad y elasticidad, la cual es definidas como la distancia que el producto se extiende durante la decompresión antes de ser separado del punzón (Tai *et al.* 2014). Las definiciones se encuentran descritas en la tabla 6.

**Tabla 6.** Definición de conceptos de textura (Información obtenida de: texture profile analysis, texture technologies).

Concepto	Definición
<b>Dureza</b>	La dureza es el valor de fuerza máxima, la dureza no ocurre en el punto de máxima penetración, aunque normalmente lo hace para la mayoría de los productos.
<b>Cohesividad</b>	Es que tanto se mantiene el producto a una deformación.

<b>Elasticidad</b>	La elasticidad es que tanto se recupera un producto después de que se haya deformado durante la compresión.
--------------------	---

### 3.4.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido SEM (por sus iniciales en inglés Scanning Electron Microscopy) se define como una técnica de análisis topográfico, composicional y estructural. En términos generales, es capaz de tomar una “imagen” del analito, ya que lo que detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones, en vez de registrar fotones propiamente dichos, como lo que sucede en la microscopía óptica.

El funcionamiento de un equipo de SEM sucede cuando se genera un haz de electrones de alta energía y se focaliza el haz con un sistema de lentes para posteriormente hacerlo incidir sobre el analito, generando a su vez, electrones debido al impacto electrónico, siendo detectados así mediante dispositivos Everhart-Thornley y SED (Solid State Detector) que se encargan de registrar cada uno la cantidad de electrones detectados, convirtiéndolo en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, para construir una “imagen” aunque no se usen fotones. (Clavijo, 2013).

La naturaleza propia de las muestras analizadas puede afectar la profundidad y forma del volumen de interacción en estos estudios, el presentar muestras compuestas por elementos pesados o más densas, reducen la penetración del haz, reduciendo así la distancia que pueden atravesar las señales generadas sin ser reabsorbidas por la muestra.

Se puede recurrir a tratamientos como lo son el recubrimiento metálico o incluso un proceso de deshidratación, pero la observación de muestras de este tipo es un problema complejo (muestras biológicas o volátiles). Cualquier alteración de la muestra que pueda produzca vapores contaminantes al momento de realizar el análisis, puede liberar depósitos sobre los detectores o generar aperturas del sistema, degradando así la calidad de las imágenes (Ipohorski, M. & Bozzano, 2013). Otra opción más práctica es el secado al aire, aunque no es tan sencillo ya



que si no se realiza con cuidado, entonces puede introducir productos, debido a los constituyentes celulares. Se recomienda la menor duración del tiempo de secado para muestras biológicas para evitar productos celulares. (Ali *et al.* 2021).

### **3.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Un método analítico para analizar propiedades térmicas de polímeros es la calorimetría diferencial de barrido, por sus siglas en inglés DSC. La técnica de DSC es usada para investigar la relación fármaco – excipiente, polímero – excipiente o evaluar la efectividad de agentes plastificantes en capas poliméricas. El proceso es el siguiente: Una muestra y su referencia son calentadas a una velocidad programada y la mayor cantidad de energía se absorbe (o emite) durante el cambio de fase, el calor o el flujo de energía son graficados contra el tiempo transcurrido o la temperatura y con ayuda del software del programa se determina la propiedad deseada. (McGinity & Felton, 2008).

### 3.5 Liberación de fármaco a través de membrana de diálisis

El método de diálisis es considerado un método ampliamente utilizado en el estudio de la liberación de implantes de formación *in situ*. En el desarrollo de un método conveniente de diálisis para lograr la liberación extendida de fármacos en sistemas de formación *in situ*, se deben considerar una serie de parámetros como lo son el volumen receptor y aceptor, condiciones de agitación, peso molecular del corte de la membrana de diálisis. En adición el medio de liberación debe ser de 6-10 veces mayor que el volumen dentro del saco de membrana para obtener una fuerza de salida del fármaco por la membrana de diálisis. Sin embargo, la alteración del perfil de liberación puede ser causada por la falta de agitación o cambios en las condiciones *sink* que presentan una limitante en el método (Ibrahim *et al.* 2021). Existe una gran variedad de modelos matemáticos que se utilizan en la evaluación de sistemas de fármacos basados en PLGA. Los modelos matemáticos pueden estar divididos en dos categorías: Empíricos o semi-empíricos y modelos mecánico matemático. Los primeros se refieren a descripciones matemáticas y no están basados en fenómenos químicos, físicos o biológicos, no proveen información sobre qué factores controlan la liberación y su poder predictivo es bajo. Sin embargo, son de utilidad para describir fases del fenómeno de liberación que ayudan en el desarrollo del producto. El modelo mecánico matemático, está basado en fenómenos reales como la difusión, erosión y el uso de herramientas mecánicas para obtener la liberación del proceso. Los valores de algunos parámetros mecánicos se ajustan simultáneamente, la validación del modelo incrementa si las predicciones están de acuerdo con los datos experimentales independientes. La predictibilidad se ha demostrado en algunos modelos (Fredenberg *et al.* 2011).

La ecuación más conocida del modelo matemático empírico/semi-empírico es la ecuación de Peppas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

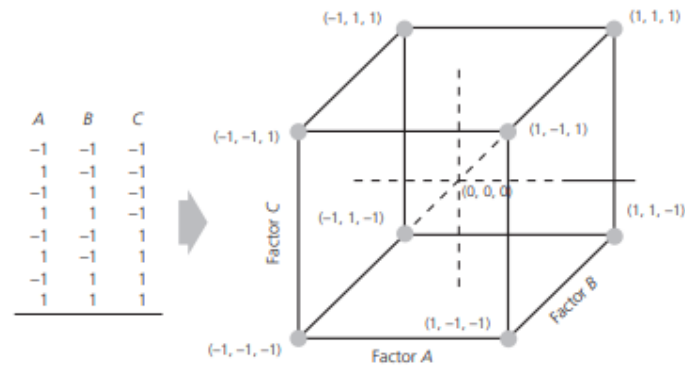
Donde  $M_t$  es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo  $t$ ,  $M_\infty$  es la cantidad total de fármaco encapsulado,  $k$  es la constante de incorporación de características del sistema y  $n$  es el exponente de liberación (Fredenberg *et al.* 2011).

### 3.6 Diseño factorial completo $2^3$

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor las situaciones complejas de relación causa-efecto. El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras.

En cualquier diseño y desarrollo de un producto y de su proceso de manufactura, o en la explicación de algún fenómeno, es muy común que intervengan varios factores en la respuesta observada. Por ejemplo, en el caso de la disolución de una tableta, algunos de los factores involucrados pueden ser las materias primas y el método de producción. La modificación o manipulación de tales factores posiblemente cambiará la manera en que se lleva a cabo la disolución. Si lo que deseamos es tener un pleno conocimiento de cómo influyen determinados factores en una variable de respuesta, entonces es necesario estudiar experimentalmente los efectos que tales factores tienen sobre la variable de respuesta, por ende, es necesario aplicar estrategias eficientes para el estudio de dos o más factores, lo cual se puede lograr mediante los llamados diseños factoriales completos. El Diseño factorial es un método experimental que sirve para estudiar el efecto individual y de interacción de varios factores sobre una o varias respuestas.

El diseño factorial  $2^3$  estudia el efecto de tres factores en dos niveles cada uno. Consta de 8 tratamientos diferentes. La representación geométrica y los tratamientos del diseño  $2^3$  se muestran en la figura 4. La región experimental está definida como un cubo centrado en el origen (0, 0, 0), los vértices del cubo son cada tratamiento. El diseño resulta acomodado en el orden estándar o de Yates (Gutiérrez & Salazar, 2012).



**Figura 4.** Diseño factorial  $2^3$  y su representación geométrica. Obtenida de Gutiérrez y Salazar, 2012.

Los efectos de valores de  $-p$  que son menores a  $\alpha = 0.05$  se consideran significativos y son aquellos que se deben interpretar para conocer cómo está operando el proceso y para determinar el mejor tratamiento. También, mientras menor sea el valor  $-p$  para un efecto, significa que éste tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta. Se recomienda correr este diseño con al menos dos réplicas para contar con suficientes grados de libertad para cálculo del error. (Gutiérrez & Salazar, 2008).

#### 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incumplimiento del tratamiento por parte del paciente ha presentado un gran problema a lo largo del tiempo, la OMS menciona que las intervenciones para eliminar las barreras a la adherencia terapéutica deben convertirse en un componente central de los esfuerzos para mejorar la salud de la población y para lo cual se precisa un método eficaz.

Los implantes de formación *in situ* representan una solución a este problema, ya que son fáciles de aplicar y no requieren de cirugía, adicionalmente al tener una liberación sostenida del fármaco mejora el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. Además, al ser inyectado vía intramuscular mediante formulaciones líquidas, el implante puede adaptarse a la geometría y tamaño de la lesión objetivo, esto puede ser útil para llegar a las áreas que son de difícil acceso y para prolongar el tiempo de residencia del sistema en el sitio de administración.

El hiclato de doxicilina presenta una variedad de aplicaciones a diferentes enfermedades, sin embargo, su uso es limitado ya que al ser administrado por vía oral presenta efectos adversos como irritación en el estómago y esófago, generando ulceraciones y vómito. Al administrarse por vía parenteral puede producir irritación tisular, características que lo convierten en un buen candidato para una forma farmacéutica de implantes de formación *in situ* en sistemas de liberación controlada, en este caso prolongada, mejorando su liberación en el organismo.

## 5 HIPÓTESIS

El desarrollo de implantes *in-situ* de liberación sostenida de hiclato de doxiciclina, empleando polímeros de PLGA, permitirá obtener la gelificación del sistema en fluidos corporales simulados por solventes, se extenderá el tiempo de administración y la liberación del fármaco por siete días.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Diseñar y evaluar implantes *in situ* a base de PLGA, determinado por un diseño de experimentos para obtener una liberación sostenida de hiclato de doxiciclina durante siete días.

### 6.2 Objetivos específicos

- 6.2.1 Diseñar un implante de formación *in situ* de liberación sostenida a base de PLGA, siguiendo lineamientos de QbD.
- 6.2.2 Elaborar una formulación inyectable de liberación prolongada de hiclato de doxiciclina a base de PLGA que cumplan con los requisitos de calidad.
- 6.2.3 Determinar el espacio de conocimiento mediante la aplicación del diseño estadístico de experimentos ( $2^3$ ), en el proceso de elaboración de un implante formado *in situ* de liberación prolongada de hiclato de doxiciclina.
- 6.2.4 Determinar las características fisicoquímicas y morfológicas de una formulación inyectable de liberación prolongada de hiclato de doxiciclina a base de PLGA por medio de análisis morfológico y térmico.
- 6.2.5 Caracterizar la cinética de liberación *in vitro* de un implante formado *in situ* de liberación prolongada de hiclato de doxiciclina a base de PLGA, por el método de difusión.

## 7. MATERIALES

### 7.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en el presente proyecto se muestran a continuación:

Hiclato de doxiciclina, lote: 509809, Básicos Feed Garde. PLGA 50:50, lote: 2L-PQ1, Reactivos Ashland. PLGA 75:25 lote: 2496523, Reactivos Ashland. PLGA 85:15, lote: 2485958, Reactivos Ashland. Ácido esteárico, lote: 129199, Droguería Cosmopolita. NMP, lote: 2471042, Reactivos Ashland. Hidróxido de sodio, lote: L01116030, Reactivos Meyer. Fosfato de potasio monobásico, lote: V40C19, Reactivo J. T. Baker. Agua desionizada, lote: 110522, CEPAX. Membrana de diálisis, lote: 9201630, Spectra/por.

### 7.2 Equipos

Los equipos empleados en el desarrollo del proyecto se muestran en la tabla 7

**Tabla 7.** Equipos utilizados con sus características.

<b>EQUIPO</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>
<b>Espectrofotómetro UV-VIS</b>	Modelo UV-1201 Marca SHIMADZU
<b>Disolutor</b>	Modelo 10-1200 Marca VanKel
<b>Báscula electrónica</b>	Modelo AP110S Marca OHUS
<b>Baño de agitación</b>	Modelo SW22 Marca Julabo
<b>Texturómetro</b>	Modelo Belle versión 2019 Marca Agrosta
<b>Calorimetría diferencial de barrido</b>	Modelo 214 POLYMA Marca NETZSCH
<b>Microscopía electrónica de barrido</b>	Modelo JSM 5900 LUV Marca JEOL
<b>Liofilizadora</b>	Modelo: 74000 Series Marca LABCONCO-TRIAD
<b>Parrilla de agitación</b>	Modelo RO5S1 Marca IKA
<b>Vórtex</b>	Modelo: Vórtex mixer Marca: ICB
<b>Ultracongelador</b>	Modelo: Revco series Marca: Revco Thermo Scientific

## 8. METODOLOGIA

### 8.1 Lineamientos de calidad por el diseño (QbD)

Siguiendo algunos aspectos de los lineamientos de las guías ICH Q8 y Q9 se realizó la búsqueda bibliográfica de los componentes principales de la formulación y sus características: solubilidad, peso molecular, reactividad, posibles interacciones entre ellos; medio de liberación, esto con ayuda de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, el manual de excipientes y diferentes artículos científicos para conocer el espacio diseño. Conociendo esto se realizaron pruebas de solubilidad del fármaco, PLGA y ácido esteárico. Una vez reunida esta información, se realizó el llenado de una tabla de atributos críticos de la calidad.

### 8.2 Evaluación del solvente

Se realizaron pruebas de solubilidad para el fármaco y para el polímero en diferentes proporciones de solventes a 90:10 y 80:20 de N-Metil pirrolidona (NMP) (solvente) en combinación con agua (cosolvente), respectivamente. Se cambió el cosolvente agua por etanol y se realizaron las pruebas de la misma manera, así como la prueba en NMP pura.

Se pesaron 50 mg de PLGA (50:50) y 50 mg de fármaco se agregó cada uno en un tubo de ensayo con 0.5 mL de NMP, se agitaron con un vórtex a temperatura ambiente. Se fue agregando 0.5 mL del solvente hasta llegar a un volumen de 2.5 mL o la disolución fuera completa.

Se repitió la misma metodología para el solvente NMP en proporciones con etanol y agua de 90:10 y 80:20 respectivamente y se observó la solubilidad.

### 8.3 Caracterización espectrofotométrica en la región del UV

En un espectrofotómetro se midió la absorbencia del hclato de doxiciclina en función de la longitud de onda, partiendo desde 200 hasta 400 nm. Mediante el gráfico obtenido se identificó la longitud de onda máxima, la cual sirvió para llevar a cabo la cuantificación en los experimentos subsecuentes.

Se prepararon concentraciones de 0.0180 mg/mL, 0.0256 mg/mL y 0.0350 mg /mL de hclato de doxiciclina usando como blanco una mezcla de una solución



amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 y NMP (proporción 5:1). Estas muestras se leyeron en el espectrofotómetro UV-vis en modo barrido y se obtuvo la curva donde se muestra el pico máximo (la longitud de máxima absorbencia) para el hclato de doxiciclina.

#### 8.4 Curva de calibración de hclato de doxiciclina

Para preparar la curva de calibración del hclato de doxiciclina se pesaron 50 mg de hclato de doxiciclina y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, se llevó al aforo con una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 y NMP (proporción 5:1) para obtener una concentración de 2 mg/mL. A partir de la solución anterior se tomó una alícuota de 1mL y se llevó a un matraz volumétrico de 50 mL con la misma mezcla de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 y NMP (proporción 5:1) y se llevó al aforo para obtener una concentración de 0.04 mg/mL de hclato de doxiciclina. Posteriormente se tomaron siete diferentes alícuotas para construir la curva de calibración de concentraciones desde 0.0032 hasta 0.0350 mg/mL de hclato de doxiciclina. Cada punto se realizó por triplicado y las diferentes concentraciones se leyeron en un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 276 nm, posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la  $r^2$  y el intervalo de confianza.

#### 8.5 Pruebas de formación del implante *in situ*

Para determinar las condiciones de formación de los implantes se realizaron diferentes pruebas para analizar la cantidad de PLGA, tipo de PLGA (50:50, 75:25 y 85:15), diferentes proporciones de ácido esteárico del 2 al 5%. De la misma forma se cambiaron las cantidades de fármaco empleadas en la formulación, mostradas en la tabla 8.

**Tabla 8.** Cantidades utilizadas en las pruebas de formación

<i>Propuesta</i>	<i>PLGA</i>	<i>Hclato de doxiciclina</i>	<i>Ácido esteárico</i>	<i>NMP</i>
A	20 mg (50:50)	100 mg	-	2 mL

<i>B</i>	50 mg (50:50)	200 mg	-	2 mL
<i>C</i>	100 mg (50:50)	500 mg	-	2 mL
<i>D</i>	200 mg (50:50)	500 mg	50 mg	2 mL
<i>E</i>	450 mg (50:50)	500 mg	62.5 mg	2.5 mL
<i>F</i>	500 mg (85:15)	500 mg	75 mg	2.5 mL

Después de la formación, los implantes se evaluaron por 7 días realizando una reposición total del medio de liberación cada 24 h, se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 276 nm y se cuantificaron los resultados con la ecuación de la recta de la curva de calibración para conocer la concentración de fármaco liberado.

### 8.6 Propuestas de formulación de IFIS

De las pruebas de formación del apartado 8.5, se obtuvo información necesaria como la cantidad de polímero necesario para la formación de la matriz, la necesidad de utilizar aditivo, así como el manejo de la técnica de preparación de los implantes, esto para poder proponer dos formulaciones mostradas en la tabla 9.

**Tabla 9.** Cantidad de excipientes utilizados en diferentes formulaciones.

<b>Excipiente/ PA</b>	<b>Formulación 1</b>	<b>Formulación 2</b>
<b>PLGA 50:50</b>	1000 mg	900 mg
<b>Ácido esteárico</b>	250 mg	150 mg
<b>Hiclato de doxiciclina</b>	1000 mg	1500 mg
<b>NMP</b>	5 mL	5 mL

Las formulaciones se prepararon de la siguiente manera. El polímero se pesó y se disolvió en NMP con ayuda de agitación en una parrilla a 50 rpm con una barra de agitación magnética, hasta una disolución completa. Una vez disuelto, se agregó el ácido esteárico y el fármaco. Posteriormente se tomó 1 mL de la formulación con una jeringa de 3 mL y se adicionó a un frasco ámbar con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4. Las formulaciones se mantuvieron protegidas

de la luz por 7 días a temperatura ambiente. Cada 24 horas se realizó reposición de medio, las muestras se analizaron en el espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 276 nm. Con la curva de calibración se calcularon los porcentajes liberados para determinar la cinética de liberación para cada uno. Esta evaluación se realizó por duplicado.

### 8.7 Diseño factorial 2<sup>3</sup> con puntos centrales

La evaluación de los factores que afectan la liberación se realizó mediante un diseño de experimentos que consistió en un diseño factorial completo 2<sup>3</sup> con puntos centrales. La tabla 10 muestra los factores y los niveles estudiados, los tratamientos (con notación de Yates) y el orden aleatorizado en que se llevaron a cabo los experimentos. Las variables de respuesta fueron la cantidad de fármaco liberado al tiempo cero (efecto burst), cantidad de fármaco liberado a las 48 horas y cantidad de fármaco liberado a las 144 horas.

**Tabla 10.** Factores y niveles utilizados en modelo estadístico.

Factor	Niveles		Punto central
Tipo de polímero	PLGA 85:15	PLGA 50:50	PLGA 75:25
Cantidad de aditivo	3%	5%	4%
Cantidad de fármaco	100%	150%	125%

Los experimentos se monitorizaron durante 7 días en un baño de agitación a 37±5°C a 20 rpm protegidos de la luz para evitar la degradación de la DOX. El análisis se llevó a cabo tal como se mencionó en el punto anterior. Una vez concluidos los experimentos se procedió a analizar los resultados del diseño de experimentos en Statgraphics Centurion XVII.

### 8.8 Liberación *in vitro* a través de membranas de diálisis

La liberación *in vitro* se realizó mediante el método de diálisis con membranas sintéticas. Para ello se inyectó 1 mL de la formulación en una bolsa de membrana de diálisis (12 KDa) que contenía 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Las bolsas de diálisis se colocaron dentro de vasos con 400 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 a temperatura controlada de 37°C manteniendo

una agitación de 50 rpm. Las muestras de 3 mL se tomaron cada hora en las primeras 6 horas y posteriormente cada dos horas hasta completar 12 horas. La solución amortiguadora se reemplazó con PBS fresco a la misma temperatura. Cada experimento se realizó por triplicado. La cuantificación de DOX se determinó mediante la interpolación en la curva de calibración de DOX. El cálculo y la determinación de la cinética de liberación se realizó con el complemento de Excel DDSolver.

## **8.9 Caracterización de los IFIS**

Los IFIS que cumplieron con las especificaciones establecidas (4c, 3 a y 7b), se caracterizaron mediante análisis de textura, calorimetría de barrido diferencial y microscopia electrónica de barrido.

### **8.9.1 Análisis de textura**

Para el análisis de textura se formaron los implantes de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 8.6. Se evaluaron a 2 horas de formación, mientras que para 4c se agregó una medición a 24 horas de formado el implante, se evaluó en el texturómetro con un punzón hemisférico de 25 mm, a una velocidad de contacto de 0.1 mm/s: 270, velocidad de medición en 0.1 mm/s: 270, distancia de medición en 0.1 mm/s: 50, a temperatura ambiente.

### **8.9.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Los análisis de DSC se llevaron a cabo en un instrumento NETZSCHE Polyma 214. Fueron analizados individualmente PLGA (50:50, 85:15 y 85:25), hiclato de doxiciclina, ácido esteárico, así como las mezclas físicas. Los implantes se formaron como se describe en la sección 8.6. Los implantes formados fueron asilados y se dejaron a temperatura ambiente por 24 h, posteriormente se realizó una pre-congelación a 2°C por 24 h y posteriormente se congelaron a -71°C por 48 h con ayuda de un ultra congelador. Una vez tenidos los implantes se fraccionaron hasta pesar 8 mg y se analizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °/ min desde 20°C hasta 250°C.

### **8.9.3 Microscopía electrónica de barrido**

Después de formar los implantes se describe en la sección 8.6, se asilaron y se dejaron a temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente se pre-congelaron por 24 horas a 2°C. Posteriormente las muestras congeladas fueron liofilizadas con una presión de 0.140 mbar a -2 °C por 30 horas. Las muestras se recubrieron con oro con la técnica de sputtering, para finalmente analizar en microscopio.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Lineamientos de calidad por el diseño

El objetivo principal del desarrollo farmacéutico es diseñar un producto de calidad y su proceso de manufactura consiste en conseguir el rendimiento deseado del producto. La guía ICH Q8 provee la oportunidad de presentar el conocimiento ganado a través de la aplicación del enfoque científico y el control de riesgos (EMA, 2017). La primera etapa en el desarrollo de productos bajo un enfoque de calidad por diseño es el establecimiento del perfil deseado del producto. Algunos de los elementos que constituyen dicho perfil se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11.** Tabla de atributos de calidad de implantes de formación *in situ*

Atributo de calidad	Objetivo	Justificación
<b>Dosis</b>	20 mg/kg de peso	Dosis utilizada para efecto antimicrobiano.
<b>Diseño</b>	Implantes de formación <i>in situ</i>	Sistemas de liberación prolongada para lograr el efecto deseado durante siete días
<b>Ruta de administración</b>	Subcutáneo	Sitio de administración que favorece la formación de los IFIS
<b>Características de la formulación líquida</b>	Solución transparente, color amarillo y viscosidad característica	Los componentes deberán estar disueltos para formar adecuadamente el implante después de la administración. La viscosidad debe cumplir con la inyectabilidad
<b>Características del implante</b>	Sólido con tonalidades amarillas, presencia de poros	Formación de un sistema tipo matricial que libere el fármaco de manera controlada.
<b>Propiedades físicas del implante</b>	Dureza, cohesividad, elasticidad	Los parámetros mecánicos son la clave para explicar su liberación, dependen del tipo de polímero.
<b>Tiempo de liberación</b>	7 días	Duración del tratamiento del antibiótico.

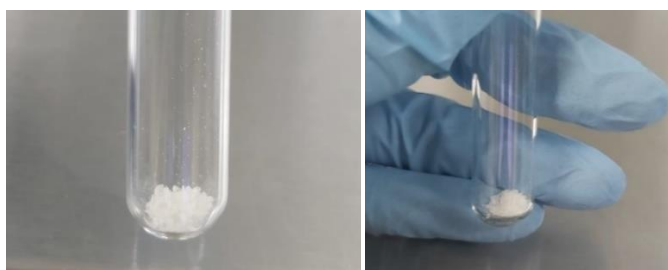
Los elementos descritos en la tabla 11 direccionaron el diseño y desarrollo del IFIS tal como se discute en los resultados siguientes.

## 9.2 Evaluación del solvente para la formación del implante

Con la finalidad de favorecer la formación del implante, se analizó el efecto de un cosolvente en la solubilización del PLGA en NMP. El agua y el etanol disminuyen la solubilidad respecto a la NMP por lo que la difusión *in vivo* se vería favorecida y en consecuencia la formación del implante. Los resultados se describen a continuación.

### 9.2.1 Solubilidad del polímero en mezclas NMP:agua (90:10 y 80:20)

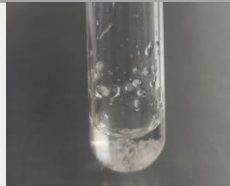
La figura 5 demuestra la apariencia del polímero en estado sólido antes de la realización de las pruebas.



**Figura 5.** Apariencia del polímero antes de agregar solvente.




En las tabla 12 y 13, se observa que de los experimentos realizados en ninguno se llega a solubilizar totalmente el polímero en un volumen de 2.5 mL de la solución de NMP:Agua en las diferentes proporciones, ya que después de agitar se observa una pequeña formación del polímero sedimentado.

**Tabla 12.** Solubilidad del polímero NMP:Agua 90:10

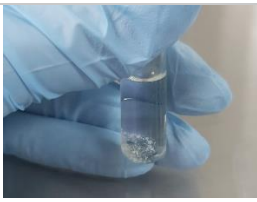

Cantidades	Resultado	Imagen
50 mg PLGA + 0.5 mL	No solubiliza, se agrega más disolvente.	

<b>50 mg PLGA + 1 mL</b>	No solubiliza, se agrega más disolvente.	
<b>50 mg PLGA + 1.5 mL</b>	No solubiliza, se agrega más disolvente.	
<b>50 mg PLGA + 2 mL</b>	No solubiliza, se agrega más disolvente.	
<b>50 mg PLGA + 2.5 mL</b>	No solubiliza Con agitación se observa un botón en el fondo tubo.	

**Tabla 13.** Solubilidad del polímero NMP:Agua 80:20

Cantidades	Resultado	Imagen
<b>50 mg PLGA + 0.5 mL</b>	No solubiliza, se agrega más disolvente.	
<b>50 mg PLGA + 1 mL</b>	No solubiliza, se agrega más disolvente.	
<b>50 mg PLGA + 1.5 mL</b>	No solubiliza, se agrega más disolvente.	



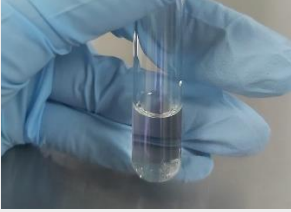




<p><b>50 mg PLGA + 2 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 2.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se observa una gran parte de polímero sin disolver.</p>	

### 9.2.2 Solubilidad del polímero en mezclas NMP:Etanol (90:10 y 80:20)


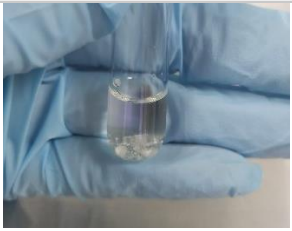
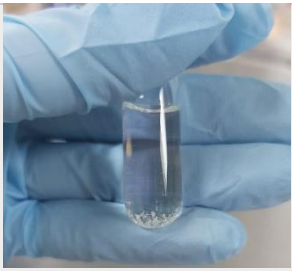

El etanol es un solvente que cumple con los requisitos para la preparación de implantes de formación *in situ*, al ser miscible con el agua, ser biocompatible y no tóxico (Kanwar & Sinha, 2019) y el ser utilizado ampliamente como disolvente de muchas sustancias. En las tablas 14 y 15 se observan los resultados. En las proporciones utilizada no es posible encontrar una solución transparente esperada. De hecho, al aumentar la proporción de etanol, la solubilidad se ve disminuida por lo que se descarta el uso del cosolvente.


**Tabla 14.** Solubilidad del polímero NMP:Etanol 90:10

Cantidades	Resultado	Imagen
<p><b>50 mg PLGA + 0.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 1 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 1.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	

<p><b>50 mg PLGA + 2 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 2.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se observa un botón de polímero al fondo del tubo.</p>	

**Tabla 15.** Solubilidad del polímero NMP:Etanol 80:20


Cantidades	Resultado	Imagen
<p><b>50 mg PLGA + 0.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 1 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 1.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	
<p><b>50 mg PLGA + 2 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se agrega más disolvente.</p>	

<p><b>50 mg PLGA + 2.5 mL</b></p>	<p>No solubiliza, se observa polímero al fondo del tubo.</p>	
-----------------------------------	--	---

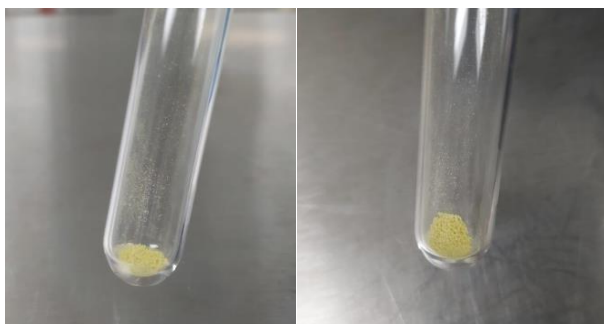
### 9.2.3 Solvente NMP

El uso de la NMP resulta en la solubilidad del polímero con 0.5 mL de NMP con facilidad, ya que está clasificada por Kanwar & Sinha en 2019 como un solvente altamente soluble en agua, refiriéndose que es capaz de mezclarse con los fluidos corporales, también conocidos como solventes hidrofílicos. Además de que NMP es un solvente farmacéuticamente aceptable y biocompatible (Astaneh *et al.* 2009). La tabla 16 ilustra la solubilización del PLGA en NMP como solvente sin la utilización de algún cosolvente, por tanto, se decidió utilizar solo NMP como solubilizante del PLGA para la formación de los IFIS.

**Tabla 16.** Solubilidad del polímero NMP

Cantidades	Resultado	Imagen
<p><b>50 mg + 0.5 mL</b></p>	<p>Se disuelve fácilmente, no es necesario agregar más disolvente.</p>	

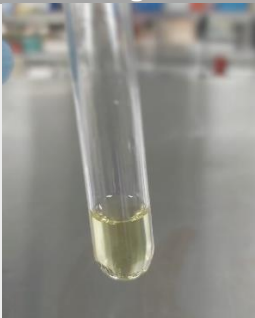
### 9.2.4 Solubilidad del fármaco en NMP



**Figura 6.** Apariencia del fármaco antes de agregar algún solvente.

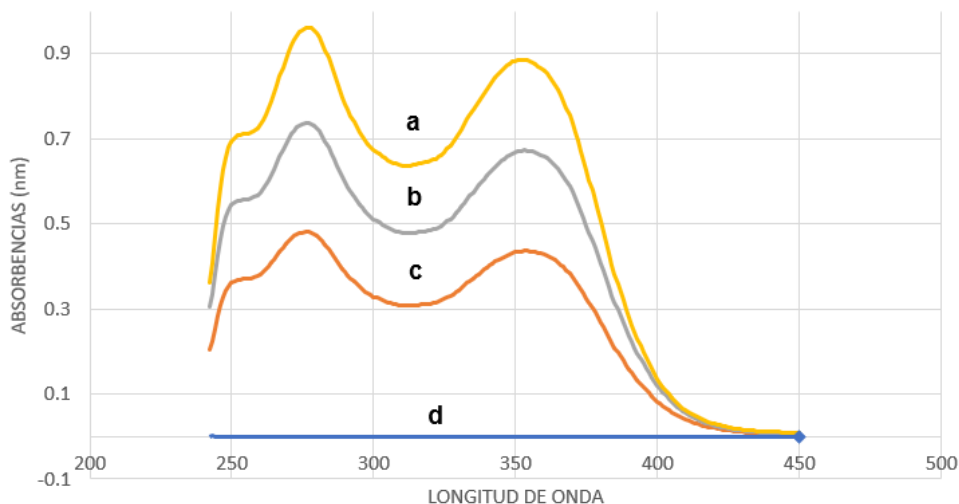
Al ser NMP el solvente el que disolvió el polímero en su totalidad, se decide utilizarlo en las pruebas para evaluar la solubilidad de la DOX, llegando a disolver hasta una concentración de 100 mg/mL con gran facilidad, y hasta 200 mg/mL con agitación constante (Tabla 17). Por lo tanto, el solvente para realizar las formulaciones fue NMP, pues solubiliza al polímero y el fármaco sin utilizar algún cosolvente, esto se corrobora con la información publicada por Zhang y colaboradores en 2019 donde utilizan NMP como solvente en este tipo de sistemas, además de que se ha utilizado en productos inyectables en medicina veterinaria (Kanwar & Sinha, 2019).

**Tabla 17.** Solubilidad del fármaco con NMP

Cantidades	Resultado	Imagen
<p><b>50 mg + 0.5 mL</b></p>	<p>Se disuelve completamente, no es necesario agregar más disolvente.</p>	

### 9.3 Caracterización espectrofotométrica en la región del UV

Se realizó un barrido de la DOX en la región UV agregando el fármaco a diferentes concentraciones en una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 y NMP (proporción 5:1).



**Figura 7.** Espectro de hclato de doxiciclina. A diferentes concentraciones **a)** 0.0350 mg/mL, **b)** 0.0256 mg/mL, **c)** 0.0180 mg/mL y **d)** blanco.

En la figura 7 se observan los barridos en la región UV de las soluciones de DOX a diferentes concentraciones. La absorbencia incrementa proporcionalmente con respecto a la concentración, mientras que se observa que el blanco no está absorbiendo (línea azul), por lo que se demuestra que no interfiere con las lecturas de las muestras. El pico de máxima absorbencia para las soluciones de DOX en las tres diferentes concentraciones se encuentra a una longitud de onda de 276 nm tal como se reporta en la literatura (Eunice *et al.* 2016), por lo que la elaboración de la curva de calibración y las lecturas experimentales se realizará midiendo la absorbencia a esta longitud de onda.

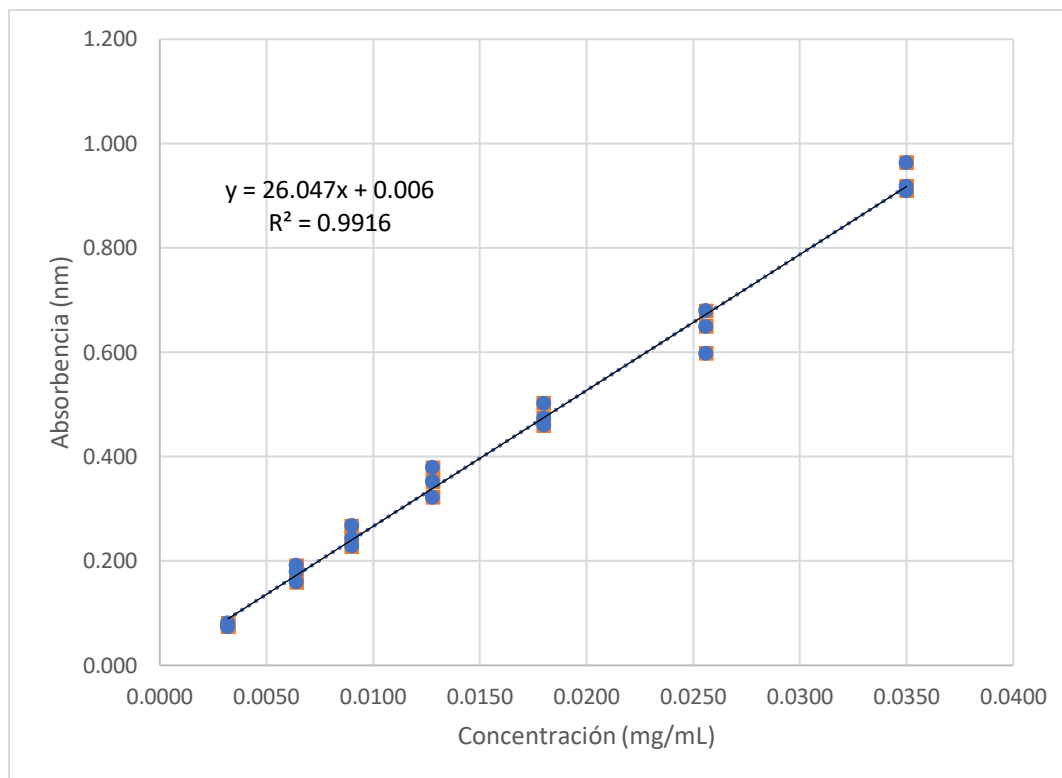
#### 9.4 Curva de calibración espectrofotométrica de hclato de doxiciclina

Las soluciones de DOX en diferentes concentraciones se leyeron en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 276 nm y se obtuvieron las absorbencias mostradas en la tabla 18.

**Tabla 18.** Curva de calibración de hclato de doxiciclina

Muestra	Conc. [mg/mL]	Absorbencias		
		1	2	3
1	0.0350	0.728	0.725	0.703
2	0.0256	0.579	0.533	0.529
3	0.0180	0.400	0.365	0.358
4	0.0128	0.312	0.266	0.251
5	0.0090	0.188	0.184	0.155
6	0.0064	0.12	0.111	0.097
7	0.0032	0.031	0.026	0.018

Una vez obtenidas las lecturas en el espectrofotómetro UV-vis, se realizaron los cálculos correspondientes para validar la curva de calibración, cuyos resultados se muestran en el Anexo 1, *Cálculos para obtener la gráfica de la curva de calibración*. Con los datos obtenidos se procedió calcular la linealidad de la curva de calibración, donde se obtuvo la ecuación de la recta, el coeficiente de regresión ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza de la pendiente.



**Figura 8.** Linealidad del sistema para las soluciones de hclato de doxiciclina.

De la gráfica mostrada en la figura 8 se obtiene la ecuación de la recta, la cual se utilizó para calcular el intervalo de confianza:

- ✓ IC ( $\beta_1$ ) =  $\pm 25.03, 27.05$  se acepta al no incluir el cero.
- ✓  $r^2$  0.99 Se acepta al ser  $\geq 0.98$

De acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos se cumple con el parámetro de linealidad y se puede utilizar para evaluar los resultados futuros. (García y colaboradores, 2002).

### 9.5 Pruebas para evaluar la formación de los implantes *in situ* al inyectarse

Los resultados obtenidos en las pruebas de formación de los implantes, descritas en la sección 8.5, sirvieron para generar conocimiento sobre el proceso de formación, así como de la cantidad de polímero necesario para obtener la formación del implante, siendo adecuada una concentración de 250 mg/mL del PLGA 50:50. La adición de un aditivo como coadyuvante para mantener la formación del implante también fue necesaria, siendo en este caso ácido esteárico. Este conocimiento fue de importancia para realizar las propuestas de formación pues la formación del implante está en función de la difusión de la fase acuosa en el sistema, lo que da lugar al fenómeno de anti solvencia que produce la formación de la fase sólida del PLGA. Uno de los puntos clave para la formación de los IFIS es la velocidad con se forma, si la formación es lenta es posible que la mayor cantidad de fármaco se libere y por tanto no se logre un efecto prolongado, por el contrario, al liberar una gran cantidad del fármaco exista la posibilidad de que se produzca un efecto no deseado. Los resultados se muestran en la tabla 19:

**Tabla 19.** Evaluación de la presencia de formación de implante en formulaciones

Propuesta	PLGA	Hiclato de doxiciclina	Ácido esteárico	NMP	Resultado
A	20 mg (50:50)	100 mg	0 mg	2 mL	No se tiene formación del implante.
B	50 mg (50:50)	200 mg	0 mg	2 mL	No se tiene formación del implante.
C	100 mg (50:50)	500 mg	0 mg	2 mL	No se tiene formación del implante.
D	200 mg (50:50)	500 mg	50 mg	2 mL	Formación y con agitación se disuelve.
E	450 mg (50:50)	500 mg	62.5 mg	2.5 mL	Formación de implante.
F	500 mg (85:15)	500 mg	75 mg	2.5 mL	Formación de implante.

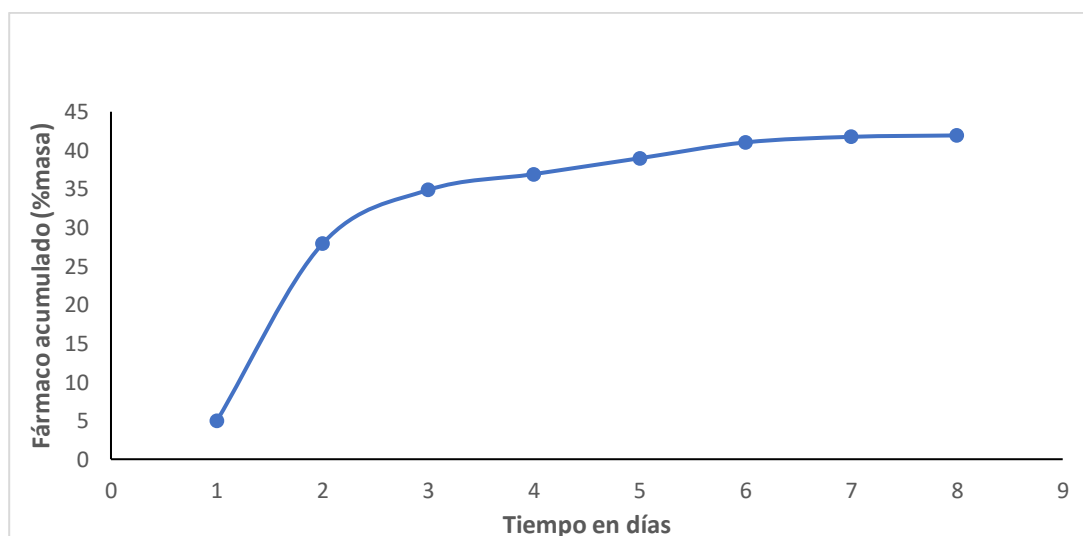
A partir de los resultados se puede destacar la importancia de utilizar un aditivo como coadyuvante en la formación del implante en este tipo de formulaciones, (Formulación D, E y F) ya que son los responsables de proporcionar una estructura



adecuada en la formación de la matriz, es decir permite mantener su formación. La adición de diferentes tipos de aditivos como carbopol, PEG 400, HPMC y ácido esteárico ha mostrado efectos parciales en la morfología y la cinética en los implantes de formación *in situ*; El ácido esteárico genera un impacto en la estructura macroscópica de los IFIS's esto debido a que la humectabilidad en los implantes aumenta proporcionalmente al aumentar la proporción del aditivo. Esto puede generar además una retención en la liberación del fármaco al impedir su paso por la matriz polimérica. (Bode *et al.*, 2019).

También se debe mencionar que la cantidad de PLGA es quizá el factor más importante ya que es la principal estructura del IFIS. Para reducir el efecto burst de los implantes de formación *in situ* es necesario incrementar la concentración de polímero debido a la hidrofobicidad del PLGA en agua (Parent *et al.*, 2013). Por lo que, al aumentar la cantidad del PLGA se llega al resultado que es la formación del implante.

Después de realizar los experimentos y observar la formación del implante con el PLGA 50:50, se evaluó la formación del implante en otro grado de polímero, PLGA 85:15, (formulación F) cuya hidrofobicidad es mayor que el PLGA 50:50. Los resultados fueron favorables con esta formulación, al encontrar la formación del implante satisfactoriamente, por lo cual se evaluó la cantidad de fármaco liberado hasta los 7 días. Los resultados se muestran en la Figura 9.

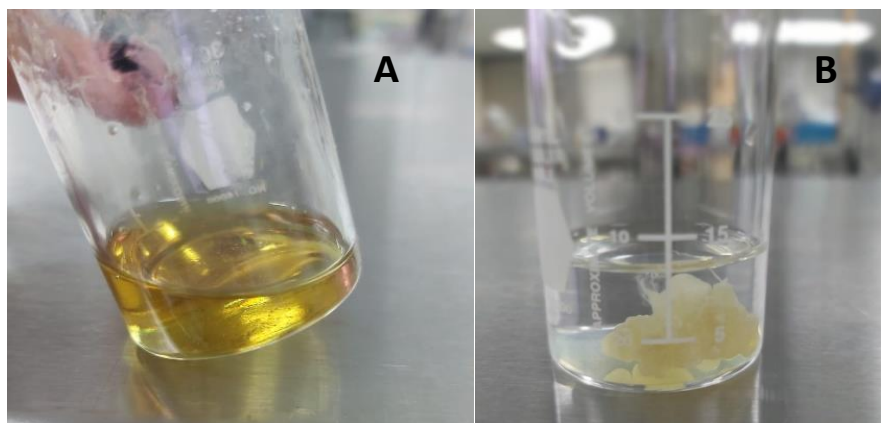


**Figura 9.** Cinética de liberación de fármaco de la formulación F en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4

La prueba de formación de implante del experimento F muestra una liberación muy reducida de fármaco, alcanzando aproximadamente el 40% de fármaco acumulado a los 7 días de formación. Las propiedades físicas los implantes formados con PLGA han demostrado depender de diferentes factores, incluyendo la relación molar de ácido láctico (LA) y de ácido glicólico (GA), la relación 85:15 es más hidrofóbica, lo que limita la liberación del fármaco. Por otro lado, cabe recordar que el polímero se degrada por hidrólisis, la velocidad de degradación es influenciada por parámetros como la relación LA:GA, polímeros con un alto contenido de LA son menos hidrofílicos, absorben menos agua y subsecuentemente se degradan más lento (Gentile *et al.*, 2014). Además de que este tipo de estructuras muestran una formación menos porosa, impidiendo el paso del fármaco por la matriz, reteniendo así la liberación en formulaciones que contienen este tipo de proporción, dando explicación de por qué el PLGA 85:15 muestra una baja liberación del fármaco. Por lo anterior, se decide que para las propuestas de formulación se evalúen en PLGA en las relaciones 50:50, 75:25 y 85:15, además de considerar diferentes cantidades de polímero, porcentaje de fármaco y de aditivo, a modo de controlar la liberación, como se muestra en el siguiente punto.

## 9.6 Propuestas de formulación

Se evaluó la liberación de las formulaciones 1 y 2, descritas en la tabla 9 de la sección de métodos. En la figura 10 se muestra la apariencia de la formulación 1, así como su apariencia una vez formada el implante.

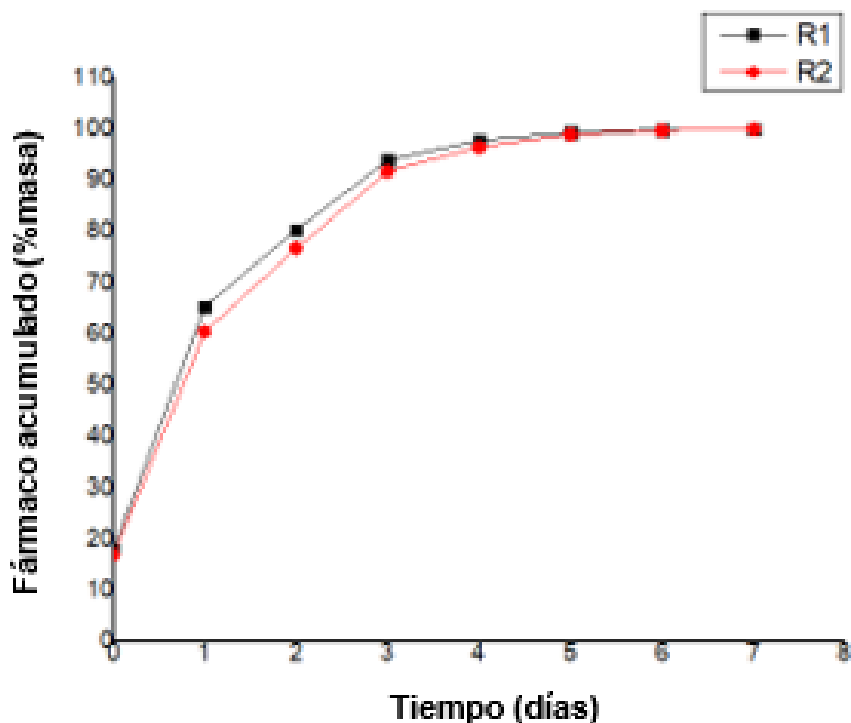


**Figura 10.** Formulación 1. A. Solución inyectable que contiene hclato de doxiciclina. B. Formación del implante que contiene hclato de doxiciclina en solución amortiguadora de fosfatos 7.4.

Se obtuvieron las absorbencias y se realizaron los cálculos para conocer la cantidad de porcentaje de masa de cada una de las formulaciones.

### 9.6.1 Formulación 1

El remanente del recambio de medio se evaluó en el espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 276 nm, en este caso por duplicado, los resultados se muestran en el anexo 2, *Evaluación de liberación de formulación 1 en 7 días*. Una vez tenido esto se procedió a graficar en Origin 9.0, como se observa a continuación:



**Figura 11.** Grafica de liberación de formulación 1 en 7 días, realizada por duplicado.

Existen 3 formas en que el fármaco es liberado, ya sea por difusión a través de poros llenos de agua o a través del polímero y debido a la disolución del polímero encapsulado (Fredenberg *et al.* 2011).

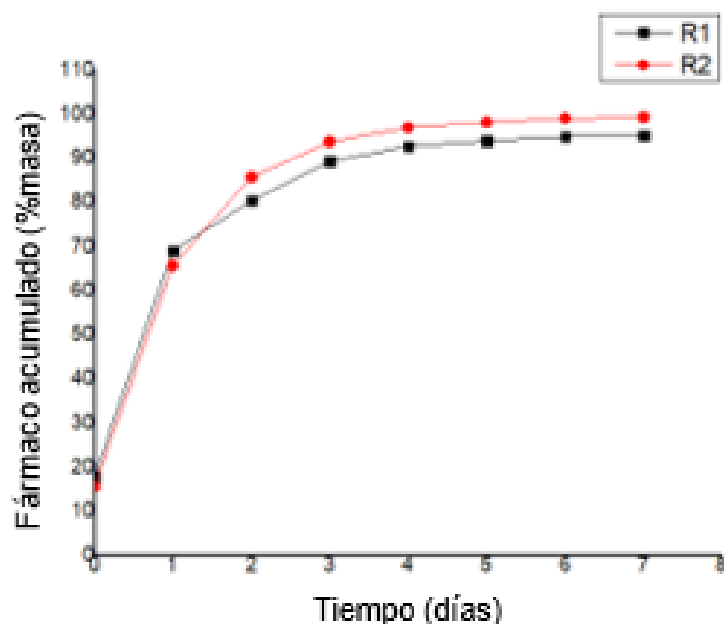
En la Figura 11 se tiene la liberación de la formulación 1 con sus dos repeticiones, mostrando ligeras modificaciones en los primeros 3 días de liberación de fármaco, esto es debido a que se tiene una falta de métodos estandarizados para la evaluación *in vitro* para implantes de formación *in situ* (Manaspon *et al.* 2017).

En esta formulación se tiene la misma proporción de polímero y fármaco, se cuenta con un porcentaje de ácido esteárico del 5%, presenta una ráfaga inicial (efecto burst) de aproximadamente del 20%, resultados que concuerdan con estudios de Manaspon y colaboradores (2017), donde ellos lo presentan como valores aceptables debido al intercambio de solventes en la formación del implante.

En los resultados obtenidos se muestra una curva bifásica con liberación rápida en la fase II. Las curvas de liberación normalmente muestran una curva trifásica donde en la primera fase se observa una liberación rápida de fármaco atribuido al efecto burst. La fase II es normalmente una difusión lenta del fármaco y la fase III es una liberación rápida atribuido a la erosión del sistema. Si la liberación en la fase II es rápida puede existir una liberación lenta en la fase III. Sin embargo, no todos los sistemas siguen el mismo comportamiento, existen diferentes explicaciones en cada una de las fases, como lo es la complejidad del proceso o eventos que inhiben o aumentan la liberación del fármaco, lo que dificulta el concluir a un solo efecto en cada fase, cambios en la liberación pueden deberse a la densidad del polímero (poco poroso) o a que se cierran los poros, interacciones polímero fármaco o interacciones fármaco (Fredenberg *et al.* 2011). Dos procesos importantes que influyen en la liberación son la formación de los poros y cuando los poros se cierran.

### **9.6.2 Formulación 2**

La evaluación de la formulación 2, sigue el mismo protocolo que la formulación 1 mostrada anteriormente, resultados en anexo 3, *Evaluación de liberación de fármaco en la formulación 2 por 7 días*. Después de realizar los cálculos de la misma manera que en la formulación 1, se procede a realizar la gráfica para visualizar el comportamiento del fármaco liberado en los 7 días evaluados con reposicionamiento de medio, con ayuda del programa Origin 9.0.



**Figura 12.** Grafica de liberación de formulación 2 por 7 días, realizada por duplicado.

La gráfica de la figura 12, muestra que, a pesar de tener las mismas condiciones en la realización del experimento, se observan diferencias en la liberación, esto es atribuido a la diferencia en la morfología superficial encontrada en cada implante, ya que debido al método de formación (inyección directa en el medio), no es posible controlar la forma que adopta el implante. A diferencia de películas de PVA (Suh *et al.* 2021) las diferencias encontradas en las repeticiones en la liberación del fármaco son despreciables y se procede a evaluar la liberación. A pesar de no tener un control en la forma de los implantes, el procedimiento se normalizó, además de que se controlaron variables como temperatura, pH del medio y velocidad de agitación.

En esta formulación se tiene una cantidad de fármaco mayor a la cantidad de PLGA, pero presenta una cantidad de ácido esteárico menor, siendo en este caso del 3%. La cantidad de aditivo en la formulación afecta directamente a la formación del implante como en su porosidad y estructura (Bode *et al.* 2019).

La liberación deseable en los sistemas es de orden cero, ya que la velocidad con la que el fármaco se libera es independiente del fármaco liberado en el medio y es liberado así a una velocidad constante, aunque este tipo de liberación no es comúnmente encontrada en este tipo de sistemas ya que la difusión es el

mecanismo más común y es dependiente de la concentración de fármaco disuelto en el medio, como lo describe la segunda ley de Fick (Hines & Kaplan, 2013).

La liberación de la formulación 2 es similar a la liberación 1. ambas presentan un efecto burst y una rápida liberación en la fase 2, Friess y Schlap encontraron que la rápida liberación puede ser la fase dos o fase tres dependiendo del tipo de PLGA, relacionada con la humectabilidad, erosión y la deformación de las micropartículas.

### **9.7 Diseño factorial 2<sup>3</sup> con puntos centrales.**

Los resultados del diseño se analizaron con el software Statgraphics Centurion XVIII. Los implantes se prepararon y se realizó el recambio de medio por 7 días y se realizó la lectura del medio remanente en el espectrofotómetro UV-vis como se describe en la sección de métodos. Con los datos se calculó el fármaco acumulado en el efecto burst, al segundo día y sexto día de formación. Los resultados se muestran en la tabla 20.

Los resultados de la tabla 20 fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), considerando un *valor-p* = 0.05. Adicionalmente se analizó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para graficar las curvas de contornos y de superficie. Los resultados de este análisis se muestran en las tablas 21, 22, 23 y 24.



**Tabla 20.** Respuesta a experimentos: fármaco acumulado

Experimentos			FACTORES			VARIABLES		
			PLGA	Ácido esteárico	Fármaco	Efecto burst (tiempo cero)	Tiempo 2 (48 h)	Tiempo 6 (144 h)
No	Orden de realización	Notación de Yates	Proporción	(%m/v)	(mg/mL)	(%masa)	(%masa)	(%masa)
7	1	bc	P50:50	5%	150	10.07	28.47	34.16
5	2	c	P50:50	3%	150	16.69	38.44	41.83
2	3	a	P85:15	3%	100	15.25	30.81	33.02
9	4	centro	P75:25	4%	125	16.8	62.1	96.83
11	5	centro	P75:25	4%	125	15.04	61.02	93.71
10	6	centro	P75:25	4%	125	13.01	57.55	94.52
3	7	b	P50:50	5%	100	21.57	55.85	68.82
1	8	(l)	P50:50	3%	100	31.84	62.25	64.55
4	9	ab	P85:15	5%	100	17.24	44.03	45.78
8	10	abc	P85:15	5%	150	11.46	43.03	50.7
6	11	ac	P85:15	3%	150	12.78	27.07	28.56

### 9.7.1 Efecto burst

La evaluación del efecto burst en la liberación, es decir, tiempo cero, mostró variables que son estadísticamente significativas en nuestra respuesta (porcentaje de fármaco acumulado a este tiempo), estos resultados se pueden observar en la tabla 21 a continuación.

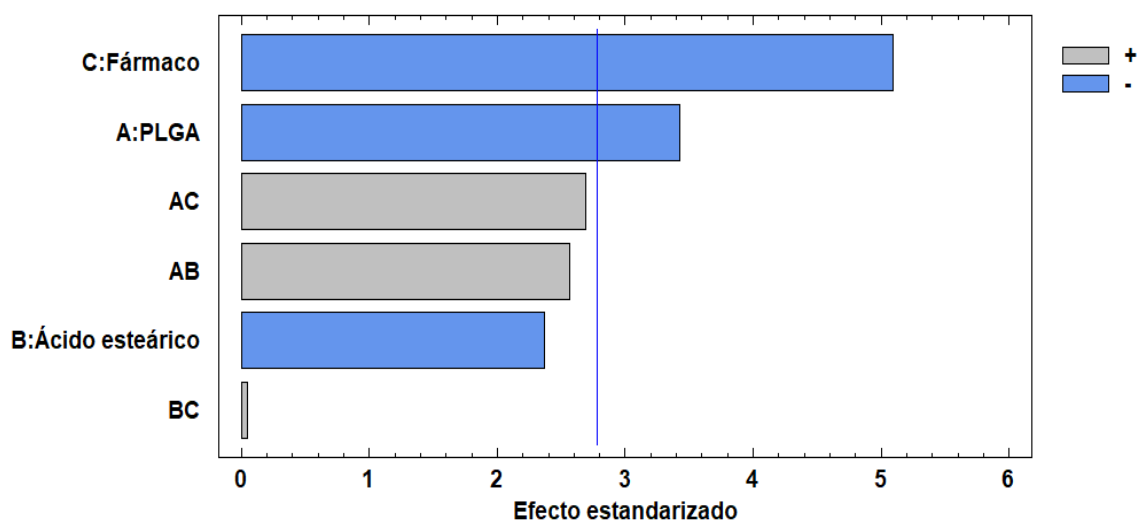
**Tabla 21.** Análisis de varianza de la de la respuesta: efecto burst

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A:PLGA	68.67	1	68.67	11.71	<b>0.0267</b>
B:Ácido esteárico	32.88	1	32.88	5.61	0.0770
C:Fármaco	152.25	1	152.25	25.97	<b>0.0070</b>
AB	38.54	1	38.54	6.57	0.0624
AC	42.32	1	42.32	7.22	0.0548
BC	0.014	1	0.014	0.00	0.9628
Error total	23.45	4	5.86		
Total (corr.)	358.14	10			

El análisis de varianza muestra dos efectos que presentan valores-P menores a 0.05, siendo valores significativos al ser diferentes de cero con un nivel de confianza de 95.0%, refiriéndome al PLGA con un valor de 0.0267 y el fármaco con un valor de 0.0070. El PLGA al aumentar la relación molar de los monómeros láctico: glicólico aumenta su hidrofobicidad y con ello encapsula mayor cantidad de DOX. De acuerdo con el ANOVA esta disminución se debe al PLGA y no al error aleatorio que se pudiese presentar durante la formación de los implantes. Por su parte, cuando la cantidad de DOX en la formulación incrementa, también se observa un efecto significativo. Este comportamiento puede ser debido a que hay una saturación de la cantidad disuelta, por ello, al incrementar la cantidad de DOX el efecto observado es una disminución, pero cabe señalar que es con respecto al total adicionado. El ANOVA de la evaluación del efecto burst en la liberación indica que el ácido esteárico no es un factor significativo. No obstante, en caso de que el valor

de significancia elegido hubiese sido un valor- $p = 0.1$ , entonces sí tendría un efecto significativo, al igual que las interacciones dobles. Aunque estadísticamente no hay datos suficientes para rechazar la hipótesis nula para el factor ácido esteárico, en la realidad los resultados demostraron que si tiene un impacto en la formación del implante. Una de las razones para que no haya resultados significativo es que en la formación del implante hay factores que tienen una variabilidad natural que pueden ocasionar mayores diferencias, por ejemplo, la velocidad de inyección el sitio de administración entre otros. También es importante mencionar que la interacción AC muestra un valor cercano al límite de significancia, siendo de 0.0548 pero al ser mayor el *valor-p* (0.05) se concluye que el error aleatorio es mayor que el efecto de la interacción sobre la evaluación del efecto burst en la liberación.

El diagrama de Pareto estandarizado (Figura 13) ilustra gráficamente el ANOVA. En la figura 13 se demuestra que el fármaco y el PLGA afectan la cantidad de DOX liberada durante el efecto burst, mostrando un efecto inhibitorio, esto quiere decir que el aumentar el grado de PLGA y la cantidad de fármaco, van a retener mayor cantidad de DOX durante efecto burst. Esto se puede explicar en la proporción de polímero, ya que el porcentaje elevado de PLGA, es decir 85:15 ha demostrado en estudios que retiene la liberación en comparación con proporciones más bajas (Kapoor *et al.* 2015).



**Figura 13.** Diagrama de Pareto estandarizado para efecto burst

En el caso del fármaco se atribuye que al presentar un peso molecular alto del fármaco interfiere su paso por la matriz, reteniendo la liberación al no permitir un libre paso hacia el medio (Wang y Burgess). El hiclato de doxiciclina tiene un valor de peso molecular de 512.94 g/mol por lo que al aumentar su concentración puede disminuir la liberación.

El análisis de regresión de los factores analizados, ajustados al modelo de factores fijos arroja una  $r^2$  de 93.45% y una  $r^2$  ajustada de 83.62% siendo aceptables para un análisis de correlación al ser mayor del 80%, explicando que se tendría una reproducibilidad elevada en los datos. Por definición, entre mayor sea nuestro valor de  $r^2$ , el modelo se ajusta mejor a los datos, se infiere que cumple con los supuestos del modelo. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 2.42, mientras que el error absoluto es de 1.11 es el valor de promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) es de 1.40 ( $P=0.22$ ) y la autocorrelación residual de LAG 1 es de -0.01, Es decir, DW determina si la correlación de los términos de adyacentes es igual o diferente de cero, esto ayuda a determinar si existe algún error en la regresión de los mínimos cuadrados, pudiendo subestimar el error estándar de los coeficientes, puesto que el valor-P es mayor que 5% (0.05) no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia de 5%. El software estadístico empleado para el análisis nos permite calcular los coeficientes del modelo que describe el comportamiento de la variable de respuesta, los valores son mostrados en la tabla 22.

**Tabla 22.** Coeficiente de regresión del efecto burst

<b>Coefficiente</b>	<b>Estimado</b>
constante	136.82
A:PLGA	-1.32
B:Ácido esteárico	-10.70
C:Fármaco	-0.5361
AB	0.1254
AC	0.0052
BC	0.0017

Para un diseño factorial completo con  $k = 3$ , el modelo estadístico sería:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_s + \varepsilon_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$\mu$  es la media general

$\alpha_i$  es el efecto debido al  $i$ -ésimo nivel del factor A

$\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor B

$\gamma_k$  es el efecto del  $k$ -ésimo nivel del factor C

$\alpha\beta_{ij}$  representa al efecto de interacción en la combinación  $ij$

$\alpha\gamma_{ik}$  representa al efecto de interacción en la combinación  $ik$

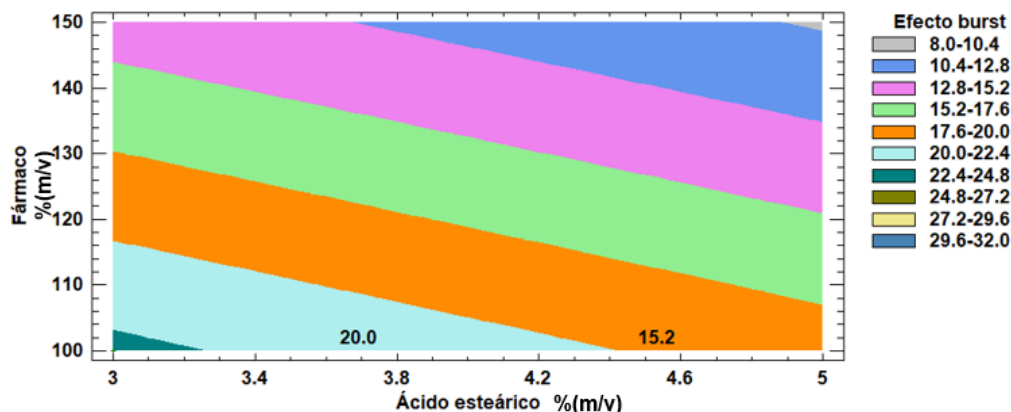
$\beta\gamma_{jk}$  representa al efecto de interacción en la combinación  $jk$

$\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante y son independientes entre sí.

El modelo estadístico queda de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \text{Efecto burst} = & 136.82 - 1.32629 * \text{PLGA} - 10.7064 * \text{Ácido esteárico} - 0.536157 * \\ & \text{Fármaco} + 0.125429 * \text{PLGA} * \text{Ácido esteárico} + 0.00525714 * \text{PLGA} * \text{Fármaco} \\ & + 0.0017 * \text{Ácido esteárico} * \text{Fármaco}. \end{aligned}$$

Una vez conocida la ecuación, se procede a evaluar la gráfica de contornos para establecer valores de respuesta (porcentaje de efecto burst) y así evaluar las condiciones en que debe trabajarse para llegar a estas, como lo es modular la cantidad de ácido esteárico, fármaco y tipo de PLGA.

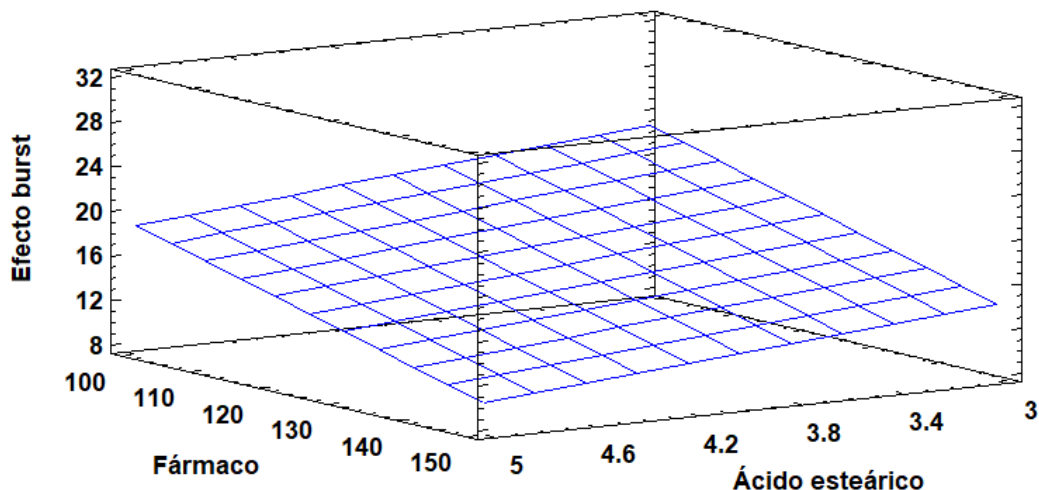


**Figura 14.** Contornos de la superficie de respuesta estimada para la cantidad de DOX liberada durante el efecto burst.

La gráfica de contornos nos muestra los valores en los que debemos trabajar dependiendo de la respuesta que estemos esperando, es decir si se busca un valor del efecto burst entre 15.2 y 17.6% (color verde) necesitaríamos valores de fármaco de entre 130 mg y 144 mg dependiendo de la cantidad de ácido esteárico que deba agregarse, en esta gráfica (figura 14) se deja fijo el valor de PLGA en su punto medio, haciendo referencia al punto central, PLGA 75:25, ya que es una variable categórica.

El valor de efecto burst que se decide trabajar (alrededor de 15 a 20%), está basado en de Manaspon y colaboradores, 2017, mencionado anteriormente, donde ellos presentan este porcentaje en sus resultados y reportan como aceptable en la formación sin causar daños en el tejido por la liberación de solvente y contar con una liberación de fármaco aceptable.

Del mismo se modo se procede a evaluar la gráfica de superficie de respuesta estimada para efecto burst para estudiar la relación entre la respuesta (cantidad de fármaco liberado) y su dependencia de diversos factores o variables, en este caso PLGA, ácido esteárico y cantidad de fármaco.



**Figura 15.** Superficie de respuesta estimada para el efecto burst en la liberación de hiclato de doxiciclina a partir de IFIS

El diagrama de superficie de respuesta complementa el diagrama de contornos ya que nos muestra la respuesta que vamos a tener en combinación de los diferentes factores, en esta gráfica por cuestiones de existencia de materiales se deja fijo el valor de PLGA 75:25. En el diagrama de la figura 15 se muestra que el aumentar el porcentaje de ácido esteárico y aumentar la concentración de fármaco se obtendría un valor de efecto burst menor de 8% esto se puede explicar que la utilización del ácido esteárico es para mejorar la formación de su estructura (Parent *et al.* 2013) por lo que retiene su liberación inicial como se muestra en la Figura 15. El efecto contrario al disminuir la cantidad de aditivo no le otorga la formación correcta y aunque disminuya la cantidad de fármaco se libera una ráfaga inicial mayor debido a la conjunción de los efectos.

### 9.7.2 Análisis de porcentaje liberado a las 48 horas (tiempo 2)

En la tabla 23 se muestra el resultado del análisis de varianza (ANOVA) para determinar la presencia de variables significativas en este tiempo de medición (tiempo 2, 48 horas).

**Tabla 23.** Análisis de varianza de tiempo 2

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: PLGA	200.70	1	200.70	1.00	0.3737
B: Ácido esteárico	20.51	1	20.51	0.10	0.7651
C:Fármaco	391.02	1	391.02	1.95	0.2351
AB	259.35	1	259.35	1.29	0.3190
AC	269.70	1	269.70	1.34	0.3107
BC	0.08611	1	0.08611	0	0.9845
Error total	802.22	4	200.55		
Total (corr.)	1943.59	10			

El análisis de varianza para el tiempo 2 no arroja ningún valor que se muestre con un *valor-p* menor o igual a 0.05, por lo que en este tiempo la cantidad de DOX liberada no es por el efecto de los factores en estudio ya que no existe una diferencia estadísticamente significativa, es decir, el error aleatorio debido a los factores no controlables es mayor. Entre los factores no controlables que pueden conducir a una variación en la cantidad de DOX liberada están la forma que adopta el implante al momento de la formación, así como la estructuración del sistema matricial. Mientras que la  $r^2$  presenta un valor de 58.72%, la  $r^2$  ajustada que es más adecuada para comparar modelos de con diferente número de variables independientes es de 0.0%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 14.16, mientras que el error absoluto es de 7.52 siendo el valor de promedio de los residuos. Al no tener variables significativas y un valor de  $r^2$  menor al 75 % para el modelo estadístico, la construcción de las gráficas de contorno y de superficie carecen de significancia por lo que no se presentan como parte de los resultados.

### 9.7.3 Análisis de porcentaje liberado a las 144 horas (tiempo 6)

El análisis de varianza para determinar el efecto de las variables de entrada sobre la cantidad de DOX liberada en a las 144 horas se muestra en la tabla 24.



**Tabla 24.** Análisis de varianza de tiempo 6

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A:PLGA	328.96	1	328.96	0.25	0.6451
B:Ácido esteárico	124.03	1	124.03	0.09	0.7753
C:Fármaco	404.98	1	404.98	0.30	0.6105
AB	183.36	1	183.36	0.14	0.7293
AC	418.18	1	418.18	0.31	0.6049
BC	0.8192	1	0.8192	0.00	0.9814
Error total	5320.40	4	1330.10		
Total (corr.)	6780.74	10			

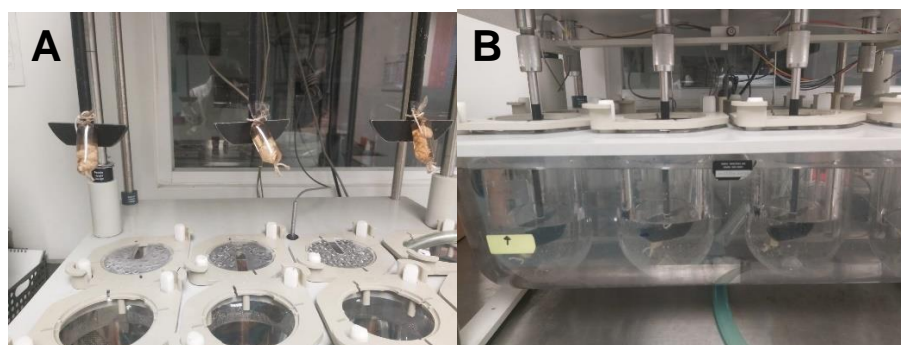
El análisis de varianza de la cantidad de DOX liberada al sexto día no muestra ningún resultado con un *valor-p* menor o igual a 0.05, por lo que en al sexto día de liberación tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre los factores estudiados. El modelo estadístico que describe el comportamiento de liberación para el día 6 presenta una  $r^2$  de 21.53% y una  $r^2$  ajustada de 0.0% al igual que el análisis para el tiempo 2 de liberación. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 36.47, mientras que el error absoluto es de 19.47 es decir el valor de promedio de los residuos. No se cuentan con variables significativas y con el valor de en  $r^2$ , no se prosigue con el análisis de gráficos y diagramas.

Se descartan los tiempos 2 y 6 (porcentaje liberado a las 48 y 144 horas, respectivamente) para la evaluación de las formulaciones de acuerdo con el diseño de experimentos y se destaca la importancia del efecto burst, ya que cuando se diseñan implantes inyectables es importante controlar la ráfaga inicial del efecto burst en las primeras 24 horas, esto para evitar toxicidad o efectos secundarios debido a su larga duración. Los fármacos hidrofílicos muestran una elevada liberación en el efecto burst en las primeras 24 horas (22.8-68.3%) debido a su alta

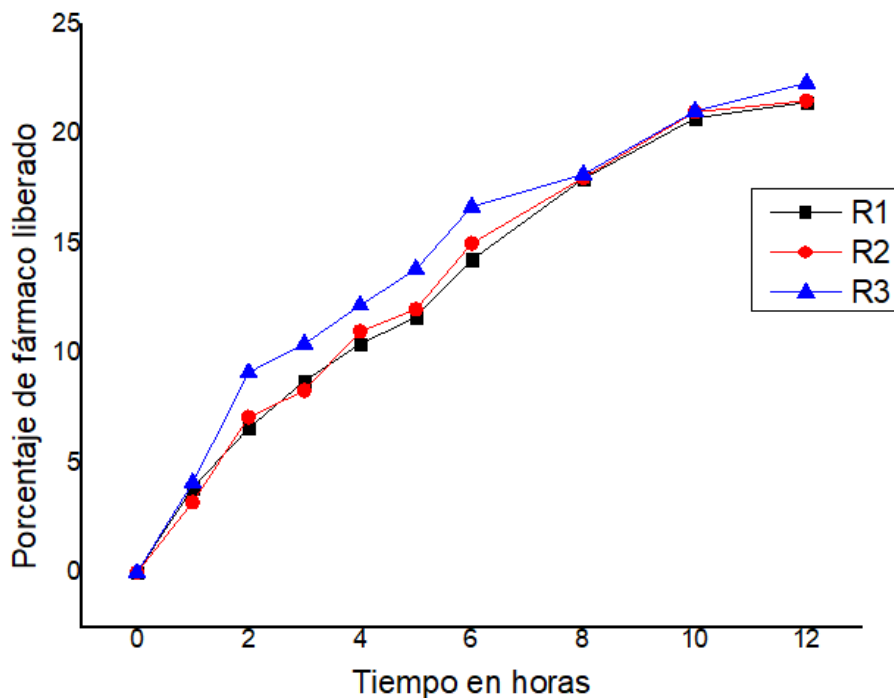
afinidad por el solvente: NMP y en medios de liberación acuosos lo que conllevan a una rápida difusión durante la inversión de fases después de su inyección (Joiner *et al.* 2022). Dependiendo de su uso, el efecto burst puede tener efectos positivos o negativos. Se considera perjudicial debido a grandes cantidades de fármaco liberado en un periodo corto de tiempo puede resultar en concentraciones fuera de los niveles terapéuticos, llevando a efectos adversos. Sin embargo, se ha utilizado para administrar medicamentos a altas tasas de liberación para lograr una dosis inicial de carga, como lo son los antibióticos. Incluso en ciertas situaciones, el efecto burst es deseado, a pesar de ser impredecible y difícil de controlar (Takur *et al.* 2014).

### 9.8 Liberación *in vitro* de DOX a través de membranas de diálisis

La liberación *in vitro* se utiliza para simular el posible comportamiento en una liberación *in vivo*, existen diferentes métodos para poder evaluarlo como las membranas de diálisis, que actúan como un compartimiento receptor y el medio funciona como el medio de liberación (Fredenberg *et al.* 2011). La utilización de bolsas de membranas de diálisis se ha usado por muchos investigadores para evaluar la liberación *in vitro* como: Sharma *et al* y Packhaeuser *et al.* En la figura 16 se ilustran las condiciones para realizar la liberación de DOX a través de membranas de diálisis.



**Figura 16.** Liberación de la DOX a través de membranas de diálisis. A. Sujeción de los implantes dentro de las membranas de diálisis en las paletas. B. Agitación dentro del disolutor.



**Figura 17.** Evaluación de la cinética de liberación en 12 horas de hiclato de doxiciclina en membranas de diálisis por triplicado. Formulación 4c.

De acuerdo con el análisis de diseño de experimentos y considerando las condiciones de formación de los IFIS se determinó que la combinación de niveles de los factores, que más convine para la formulación de este tipo de sistemas, son aquellos que corresponden a los puntos centrales. La liberación *in vitro* de DOX a través de membranas de diálisis se cuantificó en la formulación en puntos centrales (PLGA 75:25, 4% de ácido esteárico, 125 mg/mL de DOX). Los resultados de la cuantificación de DOX liberada se graficaron en el programa Origin 9.0, cuya grafica se muestra en la figura 17.

La liberación se evaluó por triplicado, mostrando ligeras variaciones en la liberación del fármaco, como se puede observar en la figura 17, donde R3 muestra una liberación levemente mayor en comparación con R1 y R2, esto se atribuye a la formación del implante ya que, Wang & Burgess mencionan que el utilizar inyección directa en el medio puede generar implantes de formas irregulares, ocasionando variaciones en la liberación *in vitro*. Fredenberg y colaboradores mencionan que la

presencia de partículas pequeñas y partículas recubiertas con PLGA muestran un perfil de liberación bifásico con una rápida fase de liberación secundaria. En la literatura se conoce que la combinación de partículas de diferentes tamaños en los implantes ha demostrado que pueden alterar la liberación del fármaco, llevar de una difusión Fickiana a un perfil sigmoideo de liberación o incluso a un perfil de orden cero. Existen diferentes factores que pueden modificar la liberación en estos sistemas de formación *in situ*, ya sean propios de las características del implante, así como del medio en el que se liberan como: la proporción láctico/glicólico, peso molecular, tamaño, porosidad, densidad del polímero, forma, cambios en el pH y temperatura (Fredenberg *et al.* 2011).

Es importante destacar que la liberación en 12 horas es del 20-22% de fármaco, estos valores son comparables con el experimento 4, una repetición de punto central en el diseño de experimentos, en este caso comparando con el fármaco acumulado, teniendo un efecto burst de 16.8 unidades de fármaco acumulado. Se destaca que estas diferencias son atribuidas al método de cuantificación del fármaco liberado, ya que en los experimentos del diseño factorial las lecturas se realizaron con un recambio de medio cada 24 horas y la formación fue inyección directa en el medio, tomando las alícuotas del medio remanente; mientras que la evaluación de la cinética, se evaluó con ayuda de membranas de diálisis, reflejando cómo el medio de formación afecta la liberación del fármaco, corroborado por Suh y colaboradores (2021), donde ellos concluyen que el método de formación afecta la liberación *in vitro* de implantes de formación *in situ*.

### **9.8.1 Modelo matemático que describe la liberación de DOX.**

Un modelo matemático se emplea para identificar el mecanismo de liberación del fármaco, caracterizar el proceso de transporte que se encuentra involucrado, conocer parámetros como el coeficiente de difusión, reducir la experimentación y proveer una predicción (Hines & Kaplan, 2013). Para esto, el análisis de los resultados de la liberación de la DOX a través de las membranas se realizó con el complemento de Excel, Ddsolver, donde se evalúan cada uno de los modelos y de acuerdo con los valores de  $r^2$  se decide que modelo se ajustan mejor los datos,

valores mostrados en el anexo 4, *Valores obtenidos de  $r^2$  obtenidos en programa Ddsolver.*

La liberación del fármaco es una propiedad importante de un sistema terapéutico, constituyendo un prerrequisito para la absorción del agente terapéutico y contribuye a la velocidad y biodisponibilidad. Los modelos matemáticos son una importante herramienta en el diseño de formulaciones farmacéuticas al evaluar el progreso de la liberación y ayudar a optimizar los sistemas (Bruschi, 2015). El anexo 5, *Liberación de hiclato de doxiciclina en 12 horas*, nos muestra los valores que se ingresaron en el complemento, además del cálculo de la desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD) de los cuales se obtienen los valores en donde se evalúa el valor de  $r^2$  en todos los modelos y se elige aquella que su valor sea más alto, en este caso el modelo que se ajusta es el de Korsmeyer-Peppas, ya que muestra valores de  $r^2$  de 0.9775, 0.9777 y 0.9798, los datos completos se muestran en el anexo 6, *Parámetros del ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas.*

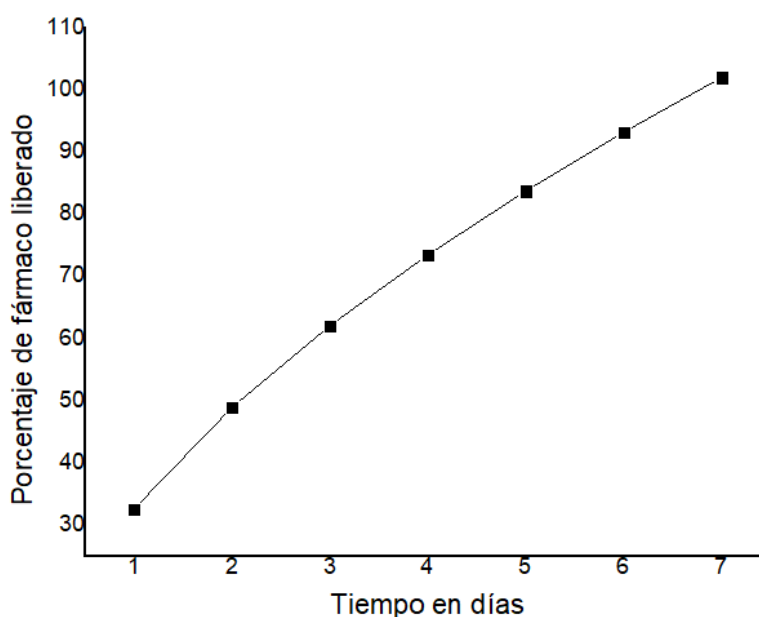
El perfil de liberación en estos sistemas de formación *in situ* es muy raro encontrar una cinética de orden cero, normalmente se muestran perfiles bifásicos o trifásicos, dependiendo de las características de los implantes, existen diferentes respuestas a esta condición como la complejidad del proceso, eventos que aumentan o disminuyen la liberación del fármaco (Fredenberg *et al.* 2011). El modelo Korsmeyer-Peppas (Power law) es una ecuación semi empírica que describe la liberación de sistemas poliméricos, este modelo fue desarrollado por Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, Peppas y Ritger, estableciendo una relación exponencial entre la liberación y el tiempo. Dependiendo del valor de  $n$  que mejor se ajuste a la liberación del fármaco, existe una clasificación de acuerdo con el comportamiento: Clase I Modelo Fickiano ( $n=0.5$ ) y clase II Modelo no Fickiano ( $n=1$ ) (Bruschi, 2015).

**Tabla 25.** Parámetros obtenidos para la evaluación de la cinética de liberación de hiclato de doxiciclina

Parámetros	Rept 1	Rept 2	Rept 3	Media	SD	RSD (%)
kKP	4.551	4.647	5.989	5.989	0.804	15.880
n	0.619	0.616	0.523	0.523	0.054	9.282

Un valor de  $n$  puede indicar el mecanismo de la liberación, por ejemplo, para una liberación controlada por difusión, no humectada y que el sistema no se degrada el valor de la constante  $n$  es igual a 0.5, para películas delgadas 0.45, para cilindros y para esferas 0.43, refiriéndose a su geometría (Fredenberg, *et al.* 2011). El valor de  $n$  que se obtuvo en este caso fue de 0.5, refiriéndose a un mecanismo de liberación controlado por difusión de la DOX desde el implante formado. En la difusión, la masa transferida es un proceso cinético que ocurre en sistemas que no se encuentran en equilibrio. La difusión molecular se lleva a cabo por el gradiente de concentración y esta ocurre en la dirección que la concentración disminuye. Es importante mencionar que el coeficiente de difusión dependerá de la composición de la matriz polimérica (Bruschi, 2015).

El uso de modelos matemáticos ayuda a reducir experimentos al realizar proyecciones utilizando los datos obtenidos con la fórmula del modelo que se ajusta a la liberación. Los valores de algunos parámetros pueden determinarse en experimentos complementarios o complementarse usando los datos experimentales existentes, la validez de un modelo incrementa si las predicciones concuerdan con datos experimentales independientes. La predictibilidad se utiliza en muchos modelos, sin embargo, no se han realizado en muchos estudios (Fredenberg *et al.* 2011). En el modelo de liberación de la DOX a partir de los IFIS con PLGA, descrito por la ecuación de Korsmeyer-Peppas, se puede predecir en cuanto tiempo se liberará el 100% del fármaco. La predicción se muestra en la figura 18.



**Figura 18.** Predicción de liberación del fármaco.

En la Figura 18 se observa que para llegar al 100% de la liberación del fármaco se tendría que esperar 7 días para obtener la liberación completa, donde podemos observar que al día 4, ya se tiene una liberación del 70% aproximadamente, liberando un 10% por día hasta obtener la liberación completa en el día 7. Por otro lado, no se debe olvidar que el porcentaje liberado al momento de la formación del implante (efecto burst) no deberá ser mayor al 20 % de la DOX presente en la formulación.

Esto puede explicarse en que una liberación Fickiana es caracterizada por una alta velocidad de difusión del solvente en el interior de la matriz y una velocidad menor en la relajación del polímero, este comportamiento induce a la generación de un gradiente de penetración del solvente, la concentración del solvente disminuye exponencialmente de la región humectada al centro de la matriz (Bruschi, 2015).



## 9.9 Caracterización de los implantes de formación *in situ*

### 9.9.1 Texturómetro

Para estos estudios se realizan a dos horas de formación en cada una de las formulaciones a diferencia del punto central, donde se realiza otra medición, en este caso a las 24 h debido a que esta formulación mostró mejores resultados en el diseño de experimentos. Los resultados a la prueba de textura se reflejan en la tabla 26.

**Tabla 26.** Resultados de textura de los implantes formados

Formulación	Tiempo de formación	Resultados
<b>7 b (PLGA 50:50)</b>	2 horas	Dureza 5.0602 N
		Cohesividad: 1644.4 g/s
		Elasticidad: 3517.5 %
<b>3 a (PLGA 85:15)</b>	2 horas	Dureza: 9.6203 N
		Cohesividad: 2802.9 g/s
		Elasticidad: 1207.5 %
<b>4 central (PLGA 75:25)</b>	2 horas	Dureza: 9.6203 N
		Cohesividad: 3911.1 g/s
		Elasticidad: 859.1%
	24 horas	Dureza: 9.6203 N
		Cohesividad: 1717.9 g/s
		Elasticidad: 385.5%

La medición de las propiedades mecánicas como dureza, compresibilidad, adhesividad, cohesividad y elasticidad son la llave para los parámetros mecánicos a considerar durante la preparación de implantes de formación *in situ* (IFIS). En esta prueba, un analizador de textura con un punzón esférico de peso específico en modo de compresión puede ser de utilidad (Ibrahim *et al.* 2021). La tabla 26 muestra que la formulación 7b compuesta por la proporción de polímero 50:50 muestra una

dureza menor que comparada con las formulaciones 3a y 4central, siendo PLGA 85:15 y 75:25 respectivamente, además se presenta una elasticidad mayor en comparación con las anteriores. Esto corrobora con los resultados de liberación de fármaco de aquellas que contenían PLGA 50:50 en su formulación mostraban una liberación muy rápida de fármaco en los primeros días de formación, como se muestra en las propuestas de formulación siendo las figuras 10 y 11 en donde el fármaco se liberaba en mayor cantidad en los primeros días. Ibrahim y colaboradores mencionan que una baja dureza expresa la fácil administración y una buena extensibilidad de la formulación.

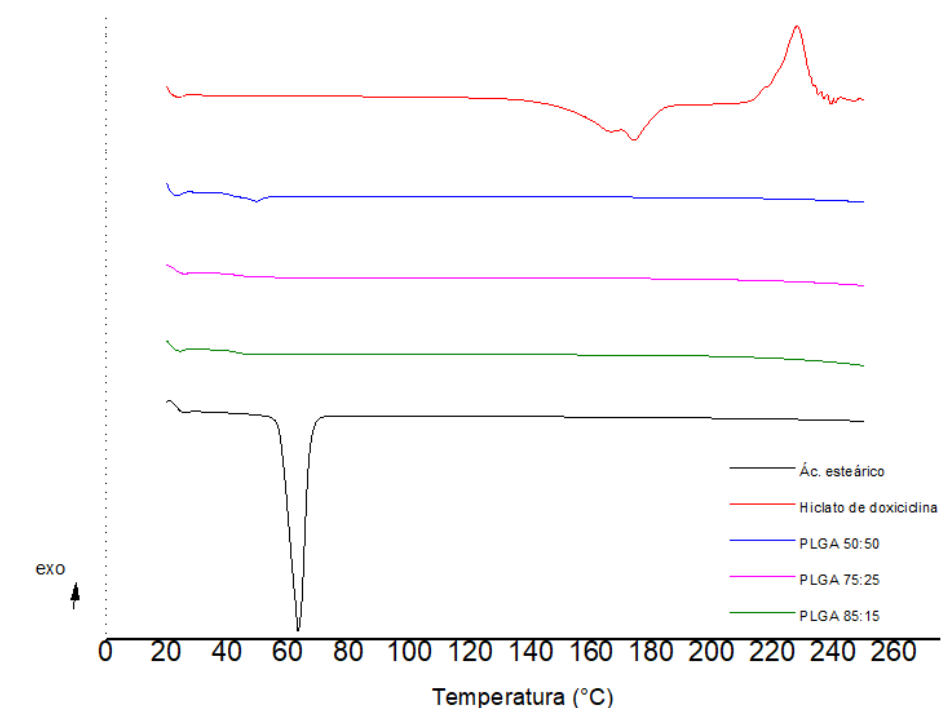
Para los resultados de elasticidad podemos observar cómo al aumentar el tiempo de formación en los puntos centrales pasando de 2 a 24 horas de formación, la elasticidad se ve disminuida. ya que la formación el implante se encuentra en estado más sólido una vez concluido la primera etapa de liberación llamada efecto burst, la elasticidad y la resiliencia nos muestran la relación plasticidad- elasticidad de los implantes sólidos, en la práctica debe existir una moderada resiliencia para permitir una adaptación en la formación del tejido (Agossa *et al.*, 2017).

Una deformación puede ser utilizada para determinar parámetros como adhesividad o cohesividad, es decir, la máxima fuerza negativa de la primera deformación (Tai, *et al.* 2014), que expresa el trabajo requerido para separar el punzón del implante, relativo de su tendencia adhesiva al tejido superficial, la cohesividad también se usa para observar la fuerza de la estructura inerte de los implantes, así como su resistencia a la ruptura (Ibrahim *et al.* 2021). En los resultados obtenidos podemos observar que el valor mayor de cohesividad (3911.1 g/s) se obtuvo en los implantes elaborados con PLGA 75:25 con dos horas de formación, mostrando una mayor adhesión en los primeros momentos de su formación. Do y colaboradores (2014) mencionan que se deben de estudiar estos parámetros con la debida importancia ya que, nos llevan a una mejor administración y una correcta liberación al permitir la estadía del sistema (IFIS) en el lugar de inyección y la liberación del fármaco.

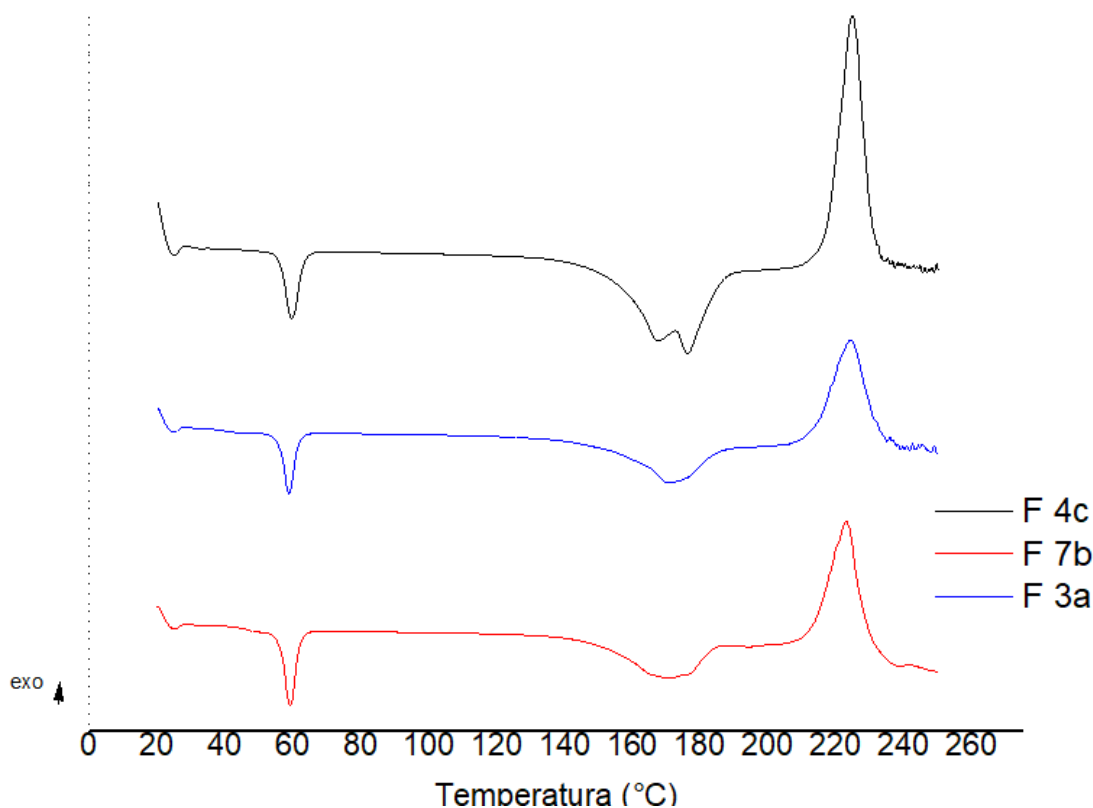
### 9.9.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido se utiliza para analizar las interacciones que se pueden presentar entre los componentes de una formulación farmacéutica. El análisis se realiza comparando los termogramas de los principios activos puros y en combinación con los componentes de la formulación (Kanwar & Sinha, 2019). A continuación, se muestran los termogramas de cada uno de los excipientes utilizados en las formulaciones (Figura 19).

El termograma de la DOX presenta la misma forma reportada en la literatura, la fusión alrededor de 168°C, mientras que el pico exotérmico de descomposición se presenta a 240°C, confirmado la estructura con Cicco y colaboradores en 2016. Los termogramas de PLGA son comparables con Benhabbour y colaboradores al presentar picos endotérmicos con valores que van de 40-50°C debido a una transición cristalina y presentar un carácter cristalino. Una vez conocido el termograma de cada uno de los excipientes se procede a evaluar las mezclas físicas de las formulaciones utilizadas en las pruebas, en este caso los polvos de los puntos centrales, 4c, 7b y 3a mostrados en la figura 20.



**Figura 19.** Termogramas de excipientes y de principio activo



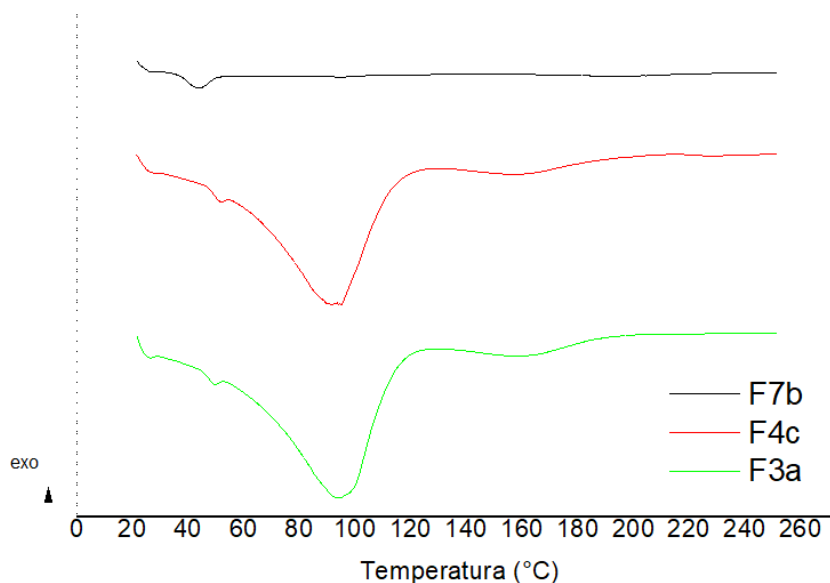
**Figura 20.** Termogramas de las mezclas físicas de las formulaciones 4c, 7b y 3a.

En las tres diferentes formulaciones se observa los picos característicos de hiclato de doxiciclina correspondientes a la fusión y a la oxidación-degradación, demostrando que en los excipientes utilizados como ácido esteárico y los diferentes tipos de PLGA, no presentan interacciones con la DOX. De los resultados obtenidos para mostrar una mejor comparación entre los picos característicos del fármaco se tiene la tabla 27.

**Tabla 27.** Resultados cuantitativos de pico característico del fármaco

Muestra	Área ( $\mu\text{Vs}/\text{mg}$ )	Temperatura inicio ( $^{\circ}\text{C}$ )	Temperatura final ( $^{\circ}\text{C}$ )	Ancho ( $^{\circ}\text{C}$ )	Altura ( $\mu\text{V}/\text{mg}$ )
Hiclato doxiciclina	-410.6	167.2	182.6	23.5	3.4304
Formulación 7b	-159.2	155.4	183.2	25.5	1.1577
Formulación 4 c	-157.3	159.9	184.8	24.2	1.4318
Formulación 3a	-166.8	161.1	184.3	23.4	1.3198

El uso de DSC al estudiar las reacciones permite la posibilidad de obtener información sobre el comportamiento de los materiales respecto la temperatura y su relación con el tiempo en el proceso de interés (Craig & Reading, 2006). Para tener un mejor conocimiento del comportamiento de lo que ocurre una vez que se forma el implante *in situ*, se realizan los estudios de calorimetría, los termogramas son mostrados en la figura 21.



**Figura 21.** Termogramas los implantes formados correspondientes a las formulaciones 7b, 4c y 3a.

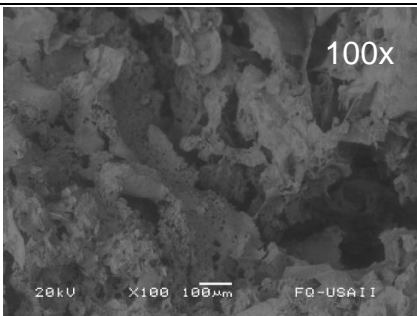
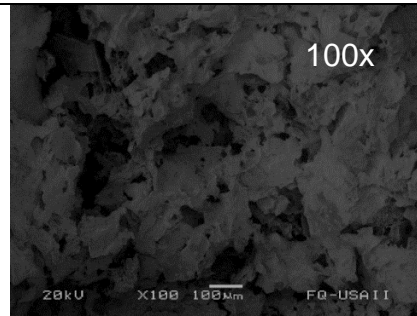
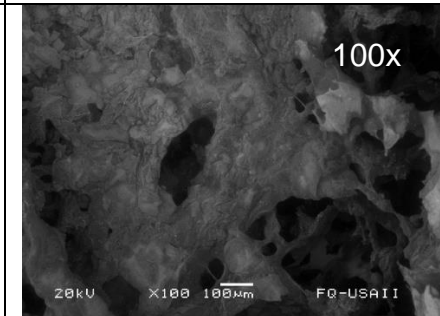
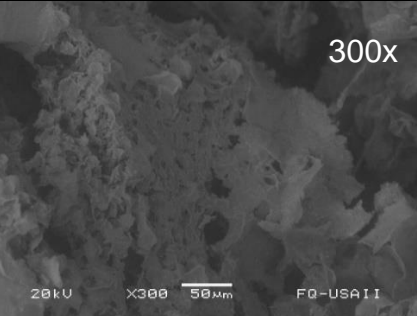
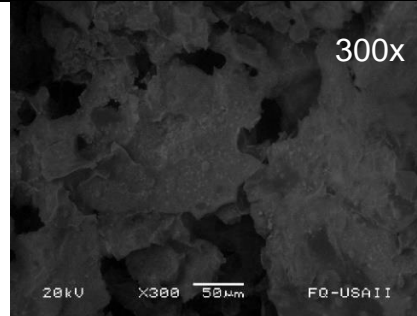
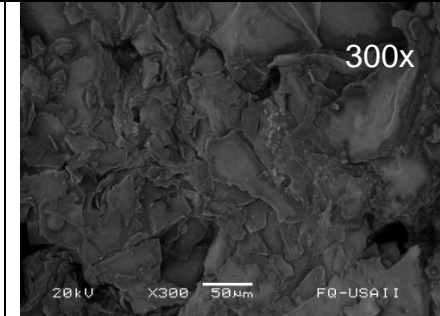
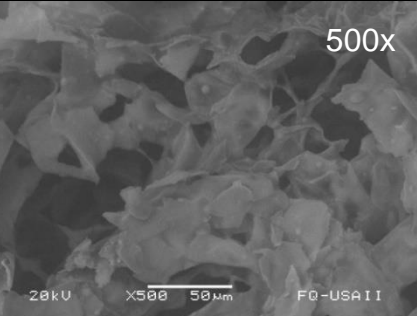
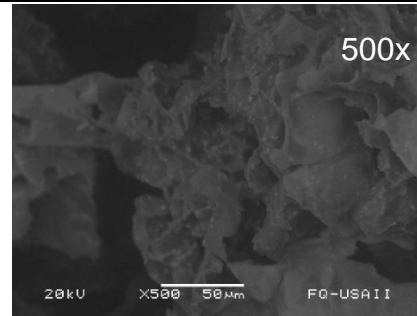
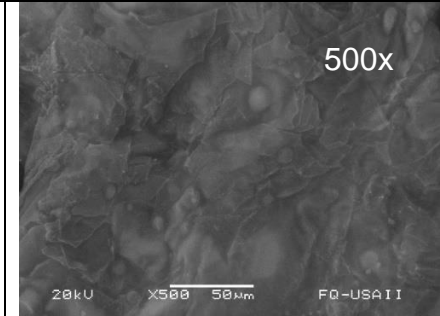
La figura 21 nos muestra los termogramas de los implantes formados. En ellos se observa un perfil térmico diferente en comparación con los termogramas de mezclas físicas, presentando picos endotérmicos entre 90-100°C. Esta variación es atribuida a la naturaleza de la formulación, al ser una matriz polimérica se refiere a que existe la unión de cada uno de los excipientes dentro del implante, como una misma identidad, por lo que no se logra distinguir cada uno de los excipientes como es el caso de los termogramas donde se tiene la combinación de los polvos de las formulaciones estudiadas en la figura 20.

Los termogramas de la formulación 4c (PLGA 75:25) y 3a (PLGA 85:15) muestran una mayor similitud entre ellos, en comparación con 7b (PLGA 50:50) debido a que la diferencia de la proporción láctico y glicólico entre ellos es muy pequeña.

### 9.9.3 Microscopía electrónica de barrido

Una vez realizado el tratamiento mencionado anteriormente en el apartado 8.9.3 se procesaron las muestras de las diferentes formulaciones, los resultados se muestran a continuación:

**Tabla 28.** Micrografías de formulaciones 7b, 3a y 4 central. Microscopía electrónica de barrido, utilizando recubrimiento con oro con la técnica de Sputtering. A diferentes distancias (100x, 300x y 500x).

Formulación 7b	Formulación 4 central	Formulación 3 a
		
		
		

En la tabla 28 podemos observar las micrografías de la formulación 7b, mostrando una estructura suave y porosa, comparándose con estudios de Astaneh y colaboradores, donde ellos usaban polímero PLGA 50:50 en sus formulaciones. La presencia de una gran cantidad de poros en este tipo de formulaciones que

contienen polímero 50:50, tiene como resultado una mayor liberación de fármaco, esto es atribuido a que el fármaco tiene un libre paso a través de la matriz polimérica, permitiendo fácilmente su liberación.

Se puede destacar que las formulaciones 7b y puntos centrales (4c) a una distancia de 100x parecen presentar una morfología similar, pero al aumentar a 300x se pueden notar las diferencias en su estructura, estas diferencias se corroboran a evaluarlas a 500x, donde la formulación 7b presenta una mayor cantidad de poros en su estructura a diferencia de 4c.

En las micrografías de la formulación 3a podemos destacar que presenta una estructura más compacta al observarla a una distancia de 300x, esto se muestra con más claridad en 500x demostrando la poca presencia de poros en las formulaciones que contienen PLGA 85:15. Esta información explica el por qué en este tipo de formulaciones el fármaco se libera en menor cantidad, ya que no permite un libre paso, reteniendo así, al fármaco dentro de su estructura. Además de corroborarse con estudios de Sun y colaboradores en 2018, donde ellos confirman que el aumento de concentración de polímero conduce a una transición similar de una esponja porosa a una menos porosa.

La importancia de realizar la visualización de la microestructura de los implantes es que nos ayuda a comprender la liberación del fármaco y cómo la matriz erosiona con el paso del tiempo. De esta forma podemos comprender la curva de liberación y mejorar aspectos en la formulación (Solorio & Exner, 2015).

## 10. CONCLUSIONES

La formulación de implantes de formación *in situ* a base de PLGA (Viatel™) se diseñaron y desarrollaron siguiendo los lineamientos de QbD, estableciendo en primer lugar los atributos que debe cumplir el producto, para posteriormente identificar los factores que afectan la formación del implante con la finalidad de establecer el espacio de conocimientos mediante un diseño de experimentos factorial completo  $2^3$  con tres puntos centrales.

Los IFIS cumplen con los requisitos de calidad al presentar una liberación de DOX en siete días, presentar una fácil inyectabilidad, una apariencia de solución amarilla, transparente e inodora.

El diseño de experimentos factorial completo  $2^3$  con tres puntos centrales permitió establecer que para cumplir con efecto burst menor al 20 % de DOX liberada, se debe formular en la región de PLGA 75:25, Ac. Esteárico de 3% a 5% y concentración de DOX de 200 mg/mL a 300 mg/mL

La caracterización de los IFIS demostró que los sistemas cumplen con una textura suave, con presencia de poros en su estructura y que no hay interacción entre los excipientes de la formulación.

La liberación de la DOX a partir de IFIS mediante el método de reposición de medio y mediante el método de diálisis demostraron que la dosis de la DOX se libera en siete días mediante un mecanismo que sigue una cinética de Korsmeyer-Peppas, el mecanismo por el cual se libera parcialmente el fármaco, siendo por difusión al presentar un valor de  $n = 0.5$

Por lo anterior, fue posible el diseño, desarrollo y evaluación de IFIS a base de PLGA cumpliendo con las pautas establecidas por la guía ICH Q8 para el diseño y desarrollo de productos farmacéuticos. El tiempo para la liberación del IFIS se analizó por medio de un diseño experimentos factorial completo  $2^3$  con tres puntos centrales el cual permitió establecer las condiciones de proceso para lograr cumplir con siete días de liberación, tiempo de la duración del tratamiento con este antibiótico.



## 11 REFERENCIAS

- Agossa, K., Lizambard, M., Rongthong, T., Delcourt-Debruyne, E., Siepmann, J., & Siepmann, F. (2017). Physical key properties of antibiotic-free, PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for local periodontitis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, *521*(1–2), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.039>
- Ali, I., Alfarouk, K. O., Reshkin, S. J., & Ibrahim, M. E. (2017). Doxycycline as Potential Anti-cancer Agent. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *17*(12). <https://doi.org/10.2174/1871520617666170213111951>
- Ali, R., El-Boubbou, K., & Boudjelal, M. (2021). An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*, *8*. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101521>
- Astaneh, R., Erfan, M., Moghimi, H., & Mobedi, H. (2009). Pharmaceutics, preformulation and drug delivery changes in morphology of in situ forming PLGA implant prepared by different polymer molecular weight and its effect on release behavior. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *98*(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/jps.21415>
- Benhabbour, S. R., Kovarova, M., Jones, C., Copeland, D. J., Shrivastava, R., Swanson, M. D., Sykes, C., Ho, P. T., Cottrell, M. L., Sridharan, A., Fix, S. M., Thayer, O., Long, J. M., Hazuda, D. J., Dayton, P. A., Mumper, R. J., Kashuba, A. D. M., & Victor Garcia, J. (2019). Ultra-long-acting tunable biodegradable and removable controlled release implants for drug delivery. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12141-5>
- Bode, C., Kranz, H., Kruszka, A., Siepmann, F., & Siepmann, J. (2019). In-situ forming PLGA implants: How additives affect swelling and drug release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *53*. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101180>
- Bode, C., Kranz, H., Siepmann, F., & Siepmann, J. (2018). In-situ forming PLGA implants for intraocular dexamethasone delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *548*(1), 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.013>
- Bruschi, M. L. (2015). Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. In *Interfacing PIC Microcontrollers* (pp. i–iii). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099363-8.00011-x>

- Clavijo, J. (n.d.). *Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM)*.
- Clemens, D. L., Duryee, M. J., Sarmiento, C., Chiou, A., McGowan, J. D., Hunter, C. D., Schlichte, S. L., Tian, J., Klassen, L. W., O'dell, J. R., Thiele, G. M., Mikuls, T. R., Zimmerman, M. C., & Anderson, D. R. (2018). Novel antioxidant properties of doxycycline. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19124078>
- Cox Gad, S. (2008). *PHARMACEUTICAL MANUFACTURING HANDBOOK Production and Processes*.
- Craig, D. Q. m. (2006). *THERMAL ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS*.
- de Cicco, F., Russo, P., García-González, C. A., Reverchon, E., García-González, C. A., Aquino, R. P., & Gaudio, P. del. (2016). Prilling and supercritical drying: A successful duo to produce core-shell polysaccharide aerogel beads for wound healing In situ forming polysaccharides based hydrogel for wound healing View project Prilling and supercritical drying: A successful duo to produce core-shell polysaccharide aerogel beads for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 147, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.011>
- Do, M. P., Neut, C., Delcourt, E., Seixas Certo, T., Siepmann, J., & Siepmann, F. (2014). In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(2), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.006>
- Dunn R. L, English J. P, Cowsar D. R, & Vanderbilt D. D. (1988). *Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same - Patent US-5278202-A*.
- EMA. (2017). *ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development*. [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
- EMA. (2021). *ICH guideline Q9 (R1) on quality risk management Step 2b*. [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
- Eunice, G., Niño, A., Bourdon, A., & Guitierrez, D. I. (n.d.). *Determinación de la longitud de onda máxima por barrido espectral dentro del rango ultravioleta visible (UV-VIS) Length Determination of Maximum Waves by Spectrum Sweep within an Ultraviolet-visible Spectral Region (UV-VIS)*.
- FEUM. (2009). *Farmacopea De Los Estados Unidos México* (11th ed., Vol. 2). Secretaria de Salud.

- 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. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 415, Issues 1–2, pp. 34–52). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>
- Friess, W., & Schlapp, M. (n.d.). *Release Mechanisms from Gentamicin Loaded Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Microparticles*.
- García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., & Alcántara, A. (2022). *Guía de validación de métodos analíticos*.
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. v. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 3, pp. 3640–3659). Molecular Diversity Preservation International. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Ghiasian, L., Habibi, A., Navahi, R. A., Hadavandkhani, A., Akbarian, S., Alemzadeh, S. A., & Khorasani, M. A. (2019). Safety of the subconjunctival injection of doxycycline in rabbits. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 38(4), 390-394. <https://doi.org/10.1080/15569527.2019.1641112>
- Golub, L. M., Lee, H. M., Lehrer, G., Nemiroff, A., Mcnamara, T. F., Kaplan, R., & Ramamurthy, N. S. (1983). Minocycline reduces gingival coilia-geoiytic activity during diabetes Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. In *Joitrnai of Periodontal Researh* (Vol. 18).
- Gutierrez, H., & Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*.
- Gutierrez, H., & Salazar, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*.
- Hillery, A., & Park, K. (2017). *Drug Delivery: Fundamentals & applications*. In 2017 (2nd ed.).
- Hines, D. J., & Kaplan, D. L. (2013). *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* (Vol. 30, Issue 3). [www.begellhouse.com](http://www.begellhouse.com)
- Hopkins, K. A., Vike, N., Li, X., Kennedy, J., Simmons, E., Rispoli, J., & Solorio, L. (2019). Noninvasive characterization of in situ forming implant diffusivity using diffusion-weighted MRI. *Journal of Controlled Release*, 309, 289–301. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.019>
- Huang, Y., Huang, Z., Wu, M., Liu, Y., Ma, C., Zhang, X., Zhao, Z., Bai, X., Liu, H., Wang, L., Pan, X., & Wu, C. (2019). Modified-release oral pellets for duodenum delivery of doxycycline hyclate. *Drug Development Research*, 80(7), 958–969. <https://doi.org/10.1002/ddr.21575>

- Ibrahim, T. M., El-Megrab, N. A., & El-Nahas, H. M. (2021). An overview of PLGA in-situ forming implants based on solvent exchange technique: effect of formulation components and characterization. In *Pharmaceutical Development and Technology* (Vol. 26, Issue 7, pp. 709–728). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1944207>
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. B. (n.d.). *Microscopía Electrónica de Barrido*.
- Joiner, J. B., Prasher, A., Young, I. C., Kim, J., Shrivastava, R., Maturavongsadit, P., & Benhabbour, S. R. (2022). Effects of Drug Physicochemical Properties on In-Situ Forming Implant Polymer Degradation and Drug Release Kinetics. *Pharmaceutics*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061188>
- Jouyban, A., Fakhree, M. A. A., & Shayanfar, A. (2010). Review of Pharmaceutical Applications of N-Methyl-2-Pyrrolidone. In *J Pharm Pharmaceut Sci* ([www.cspcsCanada.org](http://www.cspcsCanada.org)) (Vol. 13, Issue 4). [www.cspcsCanada.org](http://www.cspcsCanada.org)
- Kanwar, N., & Sinha, V. R. (2019). In Situ Forming Depot as Sustained-Release Drug Delivery Systems. In *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* (Vol. 36, Issue 2). [www.begellhouse.com](http://www.begellhouse.com)
- Kapoor, D. N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., & Dhawan, S. (2015). PLGA: A unique polymer for drug delivery. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 6, Issue 1, pp. 41–58). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/tde.14.91>
- Kempe, S., & Mäder, K. (2012). In situ forming implants - An attractive formulation principle for parenteral depot formulations. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 161, Issue 2, pp. 668–679). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.016>
- Kranz, H., & Bodmeier, R. (2007). A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1–2), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.033>
- Kranz, H., & Bodmeier, R. (2008). Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(2–3), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.03.004>
- Lizambard, M., Menu, T., Fossart, M., Bassand, C., Agossa, K., Huck, O., Neut, C., & Siepmann, F. (2019). In-situ forming implants for the treatment of periodontal diseases: Simultaneous controlled release of an antiseptic and

- an anti-inflammatory drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 572. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118833>
- Lozano M., Córdoba D., & Córdoba M. (2012). *Manual de tecnología farmacéutica*.
- Manaspon, C., Hernandez, C., Nittayacharn, P., Jeganathan, S., Nasongkla, N., & Exner, A. A. (2017). Increasing Distribution of Drugs Released from In Situ Forming PLGA Implants Using Therapeutic Ultrasound. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(12), 2879–2887. <https://doi.org/10.1007/s10439-017-1926-1>
- Mashayekhi, R., Mobedi, H., Najafi, J., & Enayati, M. (2013). In-vitro/In-vivo comparison of leuprolide acetate release from an in-situ forming plga system. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/2008-2231-21-57>
- Maturavongsadit, P., Paravyan, G., Kovarova, M., Garcia, J. V., & Benhabbour, S. R. (2021). A new engineering process of biodegradable polymeric solid implants for ultra-long-acting drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics: X*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2020.100068>
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. Informa Healthcare.
- Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., & Ravi Kumar, M. N. V. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.016>
- Navarro-Triviño, F. J., Pérez-López, I., & Ruiz-Villaverde, R. (2020). Doxycycline, an Antibiotic or an Anti-Inflammatory Agent? The Most Common Uses in Dermatology. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 111(7), 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2019.12.006>
- Ortega, J., Sánchez, H., Rodriguez, M., & Ortega, L. (2018). *Adherencia terapéutica: un problema de atención médica*. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)Aceptado:05-02-2018.Esteartículopuedeserconsultadoenversióncompletaen<http://www.medigraphic.com/actamedica>
- Packhaeuser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G., & Kissel, T. (2004). In situ forming parenteral drug delivery systems: An overview. In *European*

*Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 58, Issue 2, pp. 445–455). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.003>

- Parent, M., Nouvel, C., Koerber, M., Sapin, A., Maincent, P., & Boudier, A. (2013). PLGA in situ implants formed by phase inversion: Critical physicochemical parameters to modulate drug release. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 172, Issue 1, pp. 292–304). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.024>
- Piacentini, M., Borghetti, R. L., Zancanaro de Figueiredo, M. A., Cherubini, K., & Gonçalves Salum, F. (2019). Doxycycline: An option in the treatment of ulcerated oral lesions? In *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (Vol. 44, Issue 6, pp. 838–843). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13022>
- Ruiz, S., Olvera, G., Caballero, S., & Vargas, E. (2015). *Pharmacokinetics of an oral extended-release formulation of doxycycline hyclate containing acrylic acid and polymethacrylate in dogs*. 76.
- Sharma, G., Italia, J. L., Sonaje, K., Tikoo, K., & Ravi Kumar, M. N. V. (2007). Biodegradable in situ gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: Evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Controlled Release*, 118(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.026>
- Sheskey, P., Rowe, C., & Quinn, M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*.
- Solorio, L., & Exner, A. A. (2015). Effect of the Subcutaneous Environment on Phase-Sensitive in Situ-Forming Implant Drug Release, Degradation, and Microstructure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(12), 4322–4328. <https://doi.org/10.1002/jps.24673>
- Suh, M. S., Kastellorizios, M., Tipnis, N., Zou, Y., Wang, Y., Choi, S., & Burgess, D. J. (2021). Effect of implant formation on drug release kinetics of in situ forming implants. *International Journal of Pharmaceutics*, 592. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120105>
- Sun, Y., Jensen, H., Petersen, N. J., Larsen, S. W., & Østergaard, J. (2018). Concomitant monitoring of implant formation and drug release of in situ forming poly (lactide-co-glycolide acid) implants in a hydrogel matrix mimicking the subcutis using UV–vis imaging. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.065>

- Tai, A., Bianchini, R., & Jachowicz, J. (2014). Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(4), 291–304. <https://doi.org/10.1111/ics.12125>
- Thakur, R. R. S., McMillan, H. L., & Jones, D. S. (2014). Solvent induced phase inversion-based in situ forming controlled release drug delivery implants. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 176, Issue 1, pp. 8–23). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.020>
- Turner, R. B., Smith, C. B., Martello, J. L., & Slain, D. (2014). Role of Doxycycline in Clostridium difficile Infection Acquisition. *Annals of Pharmacotherapy*, 48(6), 772–776. <https://doi.org/10.1177/1060028014528792>
- Texture Profile Analysis. (s. f.). Texture Technologies. Recuperado 14 de marzo de 2022, de <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#tpa-measurements>
- Wang, X., & Burgess, D. J. (2021). Drug release from in situ forming implants and advances in release testing. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 178). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113912>
- Wu, X. S., & Wang, N. (2001). Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12(1), 21–34. <https://doi.org/10.1163/156856201744425>
- Zhang, X., Yang, L., Zhang, C., Liu, D., Meng, S., Zhang, W., & Meng, S. (2019). Effect of polymer permeability and solvent removal rate on in situ forming implants: Drug burst release and microstructure. *Pharmaceutics*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100520>

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1. Cálculos para obtener la gráfica de la curva de calibración

Muestra	Conc	Abs	(Conc) <sup>2</sup>	Abs <sup>2</sup>	Con * Abs
	[mg/mL]	(nm)	[mg/mL]	(nm)	(X*Y)
1	0.0350	0.728	0.00122	0.52998	0.02548
1	0.0350	0.725	0.00122	0.52562	0.02537
1	0.0350	0.703	0.00122	0.49420	0.02460
2	0.0256	0.579	0.00065	0.33524	0.01482
2	0.0256	0.533	0.00065	0.28408	0.01364
2	0.0256	0.529	0.00065	0.27984	0.01354
3	0.0180	0.400	0.00032	0.16000	0.00720
3	0.0180	0.365	0.00032	0.13322	0.00657
3	0.0180	0.358	0.00032	0.12816	0.00644
4	0.0128	0.312	0.00016	0.09734	0.00399
4	0.0128	0.266	0.00016	0.07075	0.00340
4	0.0128	0.251	0.00016	0.06300	0.00321
5	0.0090	0.188	0.00008	0.03534	0.00169
5	0.0090	0.184	0.00008	0.03385	0.00165
5	0.0090	0.155	0.00008	0.02402	0.00139
6	0.0064	0.12	0.00004	0.01440	0.00076
6	0.0064	0.11	0.00004	0.0121	0.00070
6	0.0064	0.097	0.00004	0.009409	0.00062
7	0.0032	0.031	0.00001	0.000961	0.00009
7	0.0032	0.026	0.00001	0.000676	0.00008
7	0.0032	0.018	0.00001	0.000324	0.00005
	X	Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	X*Y
Sumatoria	0.3300	6.678	0.00750	3.23225	0.15537



**ANEXO 2.** *Evaluación de liberación de formulación 1 en 7 días.*

Tiempo (días)	Absorbencia (nm)	Concentración (mg/mL)	Masa	%Masa	Acumulado
Inicial	0.100	6.009	36.057	18.028	18.028
Inicial	0.094	5.649	33.894	16.947	16.947
1	0.315	18.930	94.651	47.325	65.354
1	0.290	17.427	87.139	43.569	60.516
2	0.100	6.009	30.048	15.024	80.378
2	0.108	6.490	32.451	16.225	76.742
3	0.090	5.408	27.043	13.521	93.900
3	0.100	6.009	30.048	15.024	91.766
4	0.650	1.562	7.812	3.906	97.806
4	0.790	1.899	9.495	4.747	96.514
5	0.250	0.601	3.004	1.502	99.308
5	0.404	0.971	4.855	2.427	98.942
6	0.090	0.216	1.081	0.540	99.849
6	0.120	0.288	1.442	0.721	99.663
7	0.040	0.048	0.240	0.120	99.969
7	0.096	0.115	0.576	0.288	99.951

**ANEXO 3. Evaluación de liberación de fármaco en la formulación 2 por 7 días.**

Tiempo (días)	Abs (nm)	Conc (mg/mL)	Masa	%Masa	Acumulado
Inicial	0.150	9.014	54.087	18.029	18.028
Inicial	0.130	7.813	46.875	15.625	15.625
1	0.510	30.649	153.245	51.082	69.110
1	0.500	30.048	150.240	50.080	65.705
2	0.112	6.731	33.654	11.218	80.328
2	0.200	12.019	60.096	20.032	85.737
3	0.090	5.409	27.043	9.014	89.342
3	0.080	4.808	24.038	8.013	93.750
4	0.850	2.043	10.216	3.405	92.748
4	0.800	1.923	9.615	3.205	96.955
5	0.304	0.731	3.654	1.218	93.966
5	0.310	0.745	3.726	1.242	98.197
6	0.233	0.560	2.800	0.933	94.898
6	0.223	0.536	2.680	0.893	99.090
7	0.124	0.149	0.745	0.248	95.148
7	0.106	0.127	0.637	0.212	99.302

**ANEXO 4. Valores de r obtenidos en programa DDSolver.**

Modelo	Valor de $r^2$ 1	Valor de $r^2$ 2	Valor de $r^2$ 3
Orden cero	0.4426	0.4054	0.2836
Primer orden	0.5907	0.5239	0.4707
Higuchi	0.9351	0.9653	0.9396
K-Peppas	0.9775	0.9777	0.9798
Hixson-C	0.5444	0.4861	0.4120

**ANEXO 5.** *Liberación de hiclato de doxiciclina en 12 horas, DDsolver.*

Tiempo (horas)	R1	R2	R3	Media	SD	RSD
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	3.88	3.22	4.10	3.73	0.46	12.27
2	6.58	7.08	9.13	7.60	1.35	17.76
3	8.73	8.30	10.42	9.15	1.12	12.27
4	10.42	11.00	12.18	11.20	0.90	8.01
5	11.64	12.00	13.83	12.49	1.17	9.38
6	14.26	15.00	16.68	15.31	1.24	8.11
8	17.95	18.00	18.15	18.03	0.11	0.59
10	20.71	21.00	21.03	20.91	0.18	0.85
12	21.44	21.50	22.32	21.75	0.49	2.26

**ANEXO 6.** *Parámetros del ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas*

Parámetros	Rept 1	Rept 2	Rept 3
N obs	10	10	10
DF	8	8	8
R obs pre	0.9888	0.9861	0.9900
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9775</b>	<b>0.9719</b>	<b>0.9798</b>
R <sup>2</sup> adj	0.9747	0.9684	0.9772
MSE	1.2847	1.6690	1.1691
MSE_root	1.1333	1.2919	1.0813
Weighting	1	1	1
SS	10.2742	13.3520	9.3530
WSS	10.2742	13.5220	9.3530
<b>AIC</b>	<b>27.2964</b>	<b>29.9166</b>	<b>26.3569</b>
MSC	3.0461	2.8321	3.0632

**ANEXO 7.** Divulgación de los resultados de la investigación en diferentes eventos especializados.

Conferencia Iberoamericana de facultades de farmacia



**LA CONFERENCIA IBEROAMERICANA DE FACULTADES DE FARMACIA, A.C.**

Otorga el presente:  
**DIPLOMA DE AGRADECIMIENTO A:**

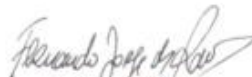
**Campos Morales N., Bernad Bernad M. J. , Llera Rojas V.G., Quirino  
Barrera C. T., Miranda Calderón J. E.**

**Por su destacada participación en la EXPO COIFFA EN LÍNEA – 2022  
Con el trabajo:**

**DISEÑO Y EVALUACIÓN IN VITRO DE IMPLANTES DE LIBERACIÓN SOSTENIDA  
A BASE DE PLGA DE FORMACIÓN IN SITU"**

**SIMPOSIO IBEROAMERICANO EN LÍNEA - COIFFA - 2022- SALUD GLOBAL Y SOSTENIBILIDAD**

Guatemala, 18 y 19 de noviembre de 2022.



**Dr. Fernando Ramos**  
Presidente  
-COIFFA-



**Dr. Eliego Rolando López García**  
Secretario General  
-COIFFA-

IX Congreso del Departamento de sistemas biológicos, UAM-X.



# DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

## Jefaturas de Áreas de Investigación



Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

Nayelli Campos Morales, María Josefa Bernad Bernad, Viridiana Gisela Llera Rojas, Carlos Tomás Quirino Barrera, Jorge Esteban Miranda Calderón.

Por presentar el cartel titulado

*“Diseño y evaluación in vitro de implantes de formación in situ a base de PLGA (VIATEL™)”*

En el IX Congreso del Departamento de Sistemas Biológicos  
Realizado en la Ciudad de México, los días 13 y 14 de octubre de 2022



**Dr. Esteban Barranco Florido**  
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos



**Dr. Jorge E. Miranda Calderón**  
Jefatura del Área de Tecnología Farmacéutica

Congreso nacional de ciencias farmacéuticas.



**LV** Congreso  
Nacional de Ciencias  
Farmacéuticas  
14 al 16  
de noviembre **2022**

La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

otorga la presente  
**CONSTANCIA** a:

**Campos Morales Nayelli, Bernad Bernad María Josefa, Llera Rojas  
Viridiana Gisela, Quirino Barrera Carlos Tomás**

por su trabajo de investigación:

*Liberación prolongada de Doxiciclina a partir de implantes de formación in situ a  
base de Viatel™*

presentado en el **LV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas** y Tercer Congreso Virtual,  
del 14 al 16 de noviembre, 2022  
*"Por la superación técnica y científica"*

**Dra. Angélica Meneses Acosta**  
Presidente de AFM A.C.

**Dr. Cairo David Toledano Jaimes**  
Director de Ciencia y Tecnología, AFM





**LV** Congreso  
Nacional de Ciencias  
Farmacéuticas  
14 al 16  
de noviembre **2022**

La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

otorga la presente  
**CONSTANCIA** a:

**Campos Morales Nayelli, Bernad Bernad María Josefa, Llera Rojas  
Viridiana Gisela, Quirino Barrera Carlos Tomás**

por su trabajo de investigación:

*Desarrollo de Implantes de formación in situ a base de Viate<sup>TM</sup>*



presentado en el **LV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas** y Tercer Congreso Virtual,  
del 14 al 16 de noviembre, 2022  
"Por la superación técnica y científica"



**Dra. Angélica Meneses Acosta**  
Presidente de AFM A.C.



**Dr. Cairo David Toledano Jaimes**  
Director de Ciencia y Tecnología, AFM