



**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Farmacia**  
**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE TRANSPORTADORES  
LIPIDICOS NANOESTRUCTURADOS CARGADOS CON TERIFLUNOMIDA  
COMO UN POTENCIAL TRATAMIENTO PARA LA ARTRITIS  
REUMATOIDEA**

POR

**CRISTÓBAL DANIEL CAMPOS SÁEZ**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al grado de académico de Magister en Ciencias Farmacéuticas

Profesor guía: Dr. Pablo Torres Vergara  
Profesor co - guía: Dra. Carolina Gómez Gaete

Concepción, Chile  
Diciembre 2022



Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica de este documento. © 2022, Cristobal Daniel Campos Sáez.

## INDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	12
1.1	Tratamiento de la artritis reumatoidea .....	14
1.2	Leflunomida y Teriflunomida.....	15
1.3	Problemas clínicos asociados al uso de inhibidores de la deiodinasa .	19
1.4	Sistemas de administración de fármacos para AR .....	21
1.5	Nanopartículas basadas en lípidos (SLN y NLC).....	22
1.5.1	<i>Métodos de preparación de nanopartículas basadas en lípidos (NLC y SLN)</i> .....	26
1.5.2	<i>Nanopartículas basadas en lípidos en el desarrollo de formulaciones enfocadas en la artritis reumatoidea</i> .....	28
1.5.3	<i>Sulfato de condroitina como recubrimiento</i> .....	30
1.6	Diseño de experimentos para optimizar el desarrollo de formulaciones 30	
2	Hipótesis.....	32
3	Objetivos .....	32
4	materiales y equipamiento.....	33
4.1	Materiales y Reactivos.....	33
4.2	Equipamiento y software.....	34
5	Métodología.....	36
5.1	Validación método analítico de cuantificación .....	36
5.1.1	<i>Linealidad</i> .....	37

5.1.2	<i>Precisión</i> .....	38
5.1.3	<i>Exactitud</i> .....	39
5.1.4	<i>Límite de detección y cuantificación</i> .....	39
5.2	Elaboración de NLC-TFM .....	40
5.3	Diseño de experimentos y optimización.....	41
5.4	Recubrimiento de NLC-TFM con sulfato de condroitina (CHS-NLC-TFM) 43	
5.5	Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta .....	43
5.6	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	44
5.7	Difracción de rayos X en polvo (PXRD).....	44
5.8	Microscopia de fuerza atómica (AFM) .....	44
5.9	Determinación de eficiencia de encapsulación y carga de fármaco ....	45
5.10	Cinética de liberación <i>in vitro</i> de fármaco .....	46
6	Resultados .....	47
6.1	Validación método analítico de cuantificación .....	47
6.1.1	<i>Linealidad</i> .....	47
6.1.2	<i>Límite de detección y cuantificación</i> .....	48
6.1.3	<i>Precisión y exactitud</i> .....	49
6.2	Diseño experimental Box-Behnken.....	50
6.2.1	<i>Efectos sobre tamaño de partícula</i> .....	54
6.2.2	<i>Efecto sobre eficiencia de encapsulación</i> .....	55
6.2.3	<i>Efecto sobre carga de fármaco</i> .....	56

6.3	Optimización de la preparación de NLC-TFM.....	59
6.4	Preparación y caracterización fisicoquímica: NLC – NO RECUBIERTO Y NLC-RECUBIERTO.....	59
6.4.1	<i>Tamaño de partículas, potencial zeta e índice de polidispersión ..</i>	60
6.4.2	<i>Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco .....</i>	62
6.4.3	<i>Análisis de estabilidad térmica .....</i>	63
6.4.4	<i>Estudios PXRD.....</i>	65
6.4.5	<i>Análisis por AFM .....</i>	67
6.4.6	<i>Estudio de liberación in vitro .....</i>	68
7	Conclusión y perspectivas.....	72
8	GLOSARIO.....	73
9	Bibliografía .....	75
10	ANEXOS .....	86



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1.</b> Materiales usados en formulaciones de nanopartículas basadas en lípidos. (Mishra et al., 2018; Subramaniam et al., 2020) .....	26
<b>Tabla 5-1.</b> Condiciones cromatográficas para la determinación cuantitativa de TFM. ....	37
<b>Tabla 5-2.</b> Variables independientes y dependientes utilizadas en el diseño de Box-Behnken para la preparación de NLC-TFM. ....	42
<b>Tabla 6-1.</b> LD y LC del método analítico. ....	48
<b>Tabla 6-2.</b> Valores de Repetibilidad, precisión intermedia y exactitud del método .....	49
<b>Tabla 6-3.</b> Corridas experimentales y respuestas observadas para el diseño de Box-Behnken de NLC-TFM.....	51
<b>Tabla 6-4.</b> Resumen de los resultados del análisis de regresión para las respuestas $Y_1$ , $Y_2$ y $Y_3$ .....	53
<b>Tabla 6-5.</b> Tamaño de partícula (diámetro medio), índice de polidispersión (PDI), potencial zeta (PZ), eficiencia de encapsulación (%EE) y carga de fármaco (%DL) de NLC-TFM y CHS-NLC-TFM ( $n = 3$ ; los datos se expresan como la media $\pm$ SD).....	59
<b>Tabla 10-1.</b> Estadísticas de regresión. ....	86
<b>Tabla 10-2.</b> Análisis de varianza.....	86

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1-1.</b> Generación in vivo de teriflunomida a partir del profármaco leflunomida y sus estructuras moleculares.....	17
<b>Figura 1-2.</b> Mecanismo de acción de los inhibidores de DHODH. (Figura adaptada de.....)	18
<b>Figura 1-3.</b> Diferencias entre SLN y NLC.....	23
<b>Figura 5-1.</b> Esquema de método de emulsificación-ultrasonido para la preparación de NLC.....	41
<b>Figura 6-1.</b> Curva de calibrado del método analítico.....	48
<b>Figura 6-2.</b> Gráfica de superficie de respuesta 3D para la optimización de las formulaciones preparadas, que muestra el impacto de diferentes variables de formulación (factores independientes) en las características del NLC desarrollado; efecto de X1, X2 y X3 y sus términos de interacción sobre el tamaño de partícula (Y1); efecto de X1, X2 y X3 y sus términos de interacción en la eficiencia de encapsulación (Y2); y efecto de X1, X2 y X3 y sus términos de interacción sobre la carga de fármaco (Y3).....	58
<b>Figura 6-3.</b> DSC del fármaco puro Teriflunomida (TFM), lípido sólido Compritol ATO, polímero de recubrimiento condroitina sulfato (CHS), muestra liofilizada de NLC no recubierto ni teriflunomida (NLC-BLANCO) y muestra liofilizada de NLC recubierto con Condroitina sulfato y cargado con teriflunomida (CHS-NLC-TFM).....	64
<b>Figura 6-4.</b> PXRD del fármaco puro teriflunomida (TFM), lípido sólido compritol ATO, polímero de recubrimiento sulfato de condroitina (CHS), muestra liofilizada de NLC sin teriflunomida ni recubrimiento (NLC-BLANCO) y muestra liofilizada de NLC cargado con teriflunomida y recubierto con sulfato de condroitina (CHS-NLC-TFM).....	66

**Figura 6-5.** Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de (A) NLC-BLANCO y (B) CHS-NLC-TFM.....68

**Figura 6-6.** Liberación in vitro desde TFM en suspensión, NLC-TFM optimizada y CHS-NLC-TFM.....70



## INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Límite de detección .....	40
Ecuación 2. Límite de cuantificación.....	40
Ecuación 3. Porcentaje de eficiencia de encapsulación. ....	45
Ecuación 4. Porcentaje de carga de fármaco. ....	45
Ecuación 5. Ecuación polinomial del tamaño de partícula. ....	54
Ecuación 6. Ecuación polinomial de la eficiencia de encapsulación. ....	55
Ecuación 7. Ecuación polinomial de la carga de fármaco. ....	57



## RESUMEN

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica y sistémica que provoca la destrucción de las articulaciones y cartílagos. La leflunomida (LEF) es un fármaco ampliamente utilizado en el control de la AR, pero presenta varios efectos adversos de tipo gastrointestinal y sistémico que conducen al recurrentemente abandono del tratamiento. Actualmente, se utiliza teriflunomida (TEF), el metabolito activo de LEF y responsable de su efecto terapéutico, con resultados clínicos similares. La utilización de transportadores lipídicos nanoestructurados (nanostructured lipid carriers – NLC) que reduzcan efectos adversos locales o sistémicos cuando se administran oralmente, así como se dirijan selectivamente a la membrana sinovial inflamada y liberen de forma controlada cuando se administran por vía intraarticular, es un enfoque prometedor para solucionar estos problemas.

En este trabajo se desarrolló y optimizó mediante un diseño tipo Box-Benkhen (BBD) una formulación de NLC para teriflunomida (TFM). Los NLC cargados con TFM (NLC-TFM) se desarrollaron mediante el método de emulsificación-ultrasonido. El NLC-TFM optimizado también se recubrió con sulfato de condroitina (NLC-TFM-CHS) buscando mejorar su interacción con los tejidos objetivo y cambiar su enfoque de la administración oral a la intraarticular.

Los NLC-TFM y NLC-TFM-CHS desarrollados exhibieron una morfología esférica, potencial Zeta inferior a -30 mV, tamaño de partícula medio de 178.6-211 nm, eficiencia de encapsulación de 85.95-65.78 % y carga de fármaco de

3.97-2.97%, respectivamente. Los análisis de comportamiento térmico y cristalino sugirieron que TFM está molecularmente disperso en la matriz lipídica. La liberación de TFM mostró un patrón bifásico, con una liberación inicial en ráfaga seguida de una liberación sostenida hasta 72 h. Los resultados muestran que las formulaciones desarrolladas son prometedoras como sistemas de administración para la terapia dirigida de la AR por vía de administración oral o intraarticular.



## ABSTRACT

RA is a chronic and systemic inflammatory disease that causes the destruction of joints and cartilage. Leflunomide (LEF) is a widely used drug for treatment of RA, but its gastrointestinal and systemic adverse effects may often lead to withdrawal. Teriflunomide (TFM), the active metabolite of LEF and responsible of its therapeutic effect, is currently being used although its side effects profile is similar to the observed with LEF. The use of nanostructured lipid carriers (NLC) that reduce the gastrointestinal side effects and selectively targets the inflamed synovial membrane is a promising approach to address these issues.

In this work, a NLC formulation for TFM was developed and optimized using a Box-Benken experimental design (BBD). NLCs were developed by the emulsification-ultrasound method. The optimized NLC loaded with TFM (NLC-TFM) were also coated with chondroitin sulfate (NLC-TFM-CHS) seeking to improve its interaction with target tissues and shift its use from oral to intra-articular administration.

The developed NLC-TFM and NLC-TFM-CHS exhibited a spherical morphology, Zeta potential (PZ) less than -30 mV, mean particle size (PS) of 178.6-211 nm, encapsulation efficiency (%EE) of 85.95-65.78% and drug loading (%DL) of 3.97-2.97%, respectively. Thermal and crystalline behavior analyzes suggested that TFM is molecularly dispersed within the lipid matrix. TFM release from NLCs showed a biphasic pattern, with an initial burst release followed by a sustained

release up to 72 h. Our results show that the developed formulations hold promise as delivery systems for targeted therapy of RA via oral or intra-articular administration.



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1. Artritis reumatoidea

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, crónica y sistémica que afecta las articulaciones, los tejidos conectivos, los músculos, los tendones y el tejido fibroso (World Health Organization, 2016). Es una afección crónica e incapacitante que a menudo causa dolor y deformación de las articulaciones. Actualmente se conoce que múltiples sistemas de órganos también son afectados por la enfermedad, incluido el sistema pulmonar, cardiovascular, ocular y cutáneo. A pesar de esto, la inflamación articular sigue siendo una señal distintiva para el diagnóstico de la AR (Deane & Holers, 2019; World Health Organization, 2016).

La AR afecta aproximadamente a 5 de cada 1000 personas en el mundo y tiende a atacar durante los años más productivos de los adultos, entre las edades de 20 y 40 años, siendo acompañada además de una reducción de la esperanza de vida y un alto costo socioeconómico si no se accede a tratamiento temprano. (Koenders & Van Den Berg, 2015; World Health Organization, 2016).

Se han caracterizado ciertas etapas de la AR, incluyendo fases tempranas con diversos cambios inmunológicos, antes de la primera aparición de inflamación articular (Deane & Holers, 2019; Scherer et al., 2020). Se ha propuesto una variedad de mecanismos biomoleculares pero la etiología de esta enfermedad aún no está del todo dilucidada, se cree que es el resultado de una influencia tanto genética de los pacientes, como de factores ambientales.

Los factores genéticos representan un rol claro en el riesgo, severidad y progresión de la enfermedad. Los gemelos monocigóticos comparten entre un 12 a 15% de veces la AR en contraste con la población normal que llega al 1 % y gemelos fraternos o parientes de primer grado que alcanzan entre el 2 a 5%. (Firestein & McInnes, 2017). Si bien el componente genético de la AR es evidente, este solo explica una parte de los casos. En el caso de la heredabilidad de la AR, es probable que sean en parte consecuencia de las marcas epigenéticas que se han detectado en estudios a gemelos monocigóticos (Kaminsky et al., 2009).

Por otro lado, la interacción entre influencias externas (ambiente) y el sistema inmunológico puede representar un factor importante en el origen o la susceptibilidad de la enfermedad. Estas interacciones se manifiestan principalmente en el microbioma de la mucosa oral, los pulmones y el tracto gastrointestinal, con mecanismos que aún no se entienden del todo. El factor de riesgo ambiental más importante en el contexto de AR es el tabaquismo (interacción tabaco-mucosa pulmonar), estimándose un doble de riesgo de

padecer la enfermedad para fumadores habituales (Boissier et al., 2012; Derksen et al., 2017; X. Liu et al., 2016).

### **1.1 Tratamiento de la artritis reumatoidea**

La AR tiene una evolución intermitente con exacerbaciones episódicas, en ausencia de un tratamiento óptimo los síntomas empeoran gradualmente hasta que las articulaciones se dañan de forma irreversible que promueve un deterioro físico y cognitivo de los pacientes (Chaurasia et al., 2020).

El tratamiento recomendado para AR, en cualquier etapa de la enfermedad, busca su remisión o bien una disminución de la severidad de los síntomas. Los enfoques terapéuticos modernos permiten lograr un buen control de la AR, y el objetivo de este tratamiento es evitar el daño de las articulaciones, así como las manifestaciones sistémicas. Esto se logra de mejor forma con un seguimiento exhaustivo (Burmester & Pope, 2017).

Las terapias farmacológicas disponibles incluyen los fármacos anti reumatoideos modificadores de la enfermedad (FARME) en sus variantes convencionales y biológicas. Estos fármacos se consideran como el ancla del tratamiento porque promueven la remisión o ralentización de la enfermedad al aumentar la función física, y disminuir la destrucción y deformidad de las articulaciones (Van Den Hoven et al., 2011). Por otra parte, están los antiinflamatorios no esteroideos

(AINEs) y los corticoesteroides (CE), que se enfocan al alivio del dolor y la disminución de la inflamación. Los AINEs son menos potentes pero a su vez presentan menos efectos adversos que los CE (Aletaha & Smolen, 2018; Bullock et al., 2019; Van Den Hoven et al., 2011).

Los FARME que se utilizan actualmente para el tratamiento de AR son metotrexato (MTX), leflunomida (LEF), sulfasalazina (SFZ), ciclosporina A, e hidroxicloroquina (HCQ). Actualmente MTX es el tratamiento de referencia, pero si no se puede usar debido a sus efectos adversos clínicamente significativos o contraindicaciones. Es posible comenzar con LEF (20 mg/semana) o SFZ (2 g/día), que presentan eficacia similar a MTX (Köhler et al., 2019).

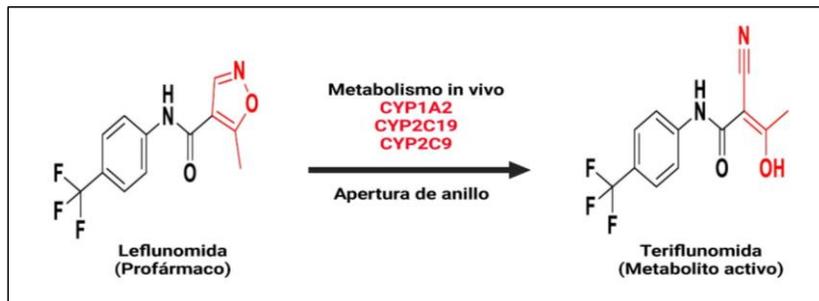
Una revisión sistemática evaluó el beneficio y seguridad de LEF comparado con placebo, MTX y SFZ. LEF logró retrasar la progresión radiológica de la enfermedad y mejorar significativamente los resultados clínicos en comparación con el placebo. Sin embargo, se incrementaron en un 10% los abandonos de la terapia en el mismo caso. La eficacia y presencia de efectos adversos resultaron ser similares a las presentadas por MTX y SFZ hasta los 2 años de tratamiento (Osiri et al., 2002).

## **1.2 Leflunomida y Teriflunomida**

Cabe destacar que LEF es un profármaco que se metaboliza rápida y casi completamente (en un 85%) en teriflunomida (TFM) en la mucosa intestinal o el

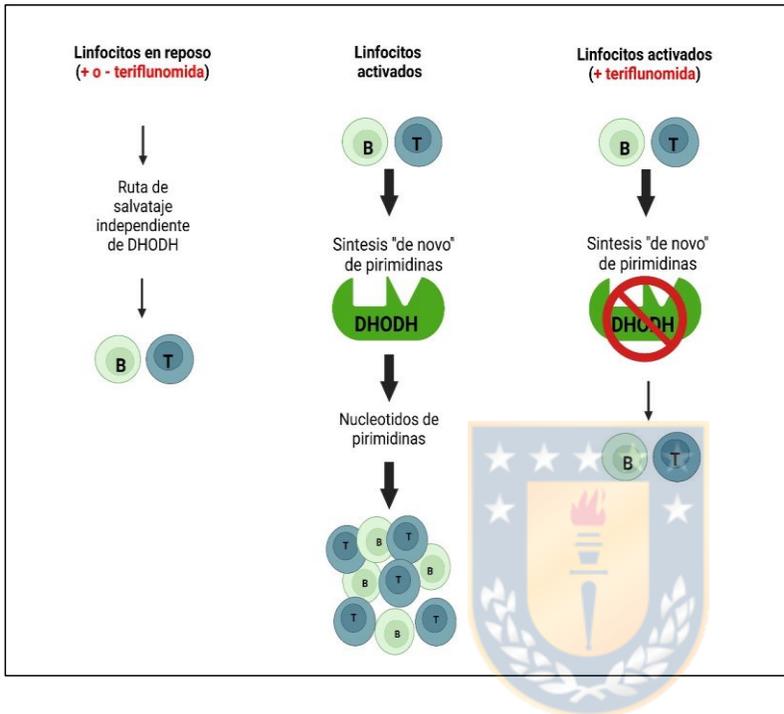
plasma, por lo que su farmacocinética es muy similar (Oh & O'Connor, 2013). TFM es el único metabolito activo y responsable de la acción clínica de LEF (Duquette et al., 2016). Como LEF presenta una gran variabilidad interindividual en su farmacocinética por variaciones en la edad, función hepática, tamaño corporal, etc. (Bohanec Grabar et al., 2009), el uso TFM evita el paso metabólico inicial (Burger, 2003). Por lo tanto, su uso resulta atractivo en el ámbito clínico para evitar este problema, y mantener la eficacia inmunomoduladora y perfil de seguridad. La amplia experiencia clínica de LEF en el tratamiento de la AR (aprobada desde 1998) ha servido como base para construir el perfil de seguridad de TFM en su aprobación por distintas agencias de medicamentos (Miller, 2015). Químicamente, a TFM es un análogo estructural de LEF y pertenecen a una clase de compuestos orgánicos llamados trifluorometilbencenos. Estos son compuestos organofluorados que contienen un anillo de benceno sustituido con uno o más grupos trifluorometilo. Ambos poseen los grupos 4-(trifluorometil)fenilo y amida, y sólo difieren en la parte de la estructura que está sujeta a la apertura del anillo isoxazol (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013). La estructura química de ambas moléculas se muestra en la figura 1-1.

El nombre IUPAC de la estructura molecular de TFM es 2-ciano-3-hidroxi-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]-2-butenamida (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013; Muehler et al., 2019; Rabie, 2023).



**Figura 1-1.** Generación *in vivo* de teriflunomida a partir del profármaco leflunomida y sus estructuras moleculares. (Figura adaptada de (Rabie, 2023))

El mecanismo de acción de TFM (y por lo tanto de LEF) se centra en la disminución de biosíntesis *de novo* de pirimidina, que forma parte de los ácidos nucleicos, mediante la inhibición reversible y no competitiva de la enzima mitocondrial dihidrofolato deshidrogenasa (DHODH), que es clave en este proceso (Warnke et al., 2013). En ausencia de reservas adecuadas de pirimidina para la producción de ácidos nucleicos, los linfocitos no pueden proliferar. En este caso, la proliferación se detiene en la fase G1, lo que hace que estos fármacos sean principalmente citostáticos, pero no citotóxicos (Fragoso & Brooks, 2015) (figura 1-2).



**Figura 1-2.** Mecanismo de acción de los inhibidores de DHODH. (Figura adaptada de (Bar-Or et al., 2014))

La Food and Drug Administration (FDA) aprobó TFM para su uso en esclerosis múltiple en el año 2012 (English & Aloï, 2015) y se comercializa bajo el nombre de AUBAGIO®, el cual se administra por vía oral en dosis de 7 hasta 14 mg por día. Tiene aprobaciones regulatorias en la mayoría de los países (incluidos Estados Unidos y la Unión Europea) para el tratamiento eficaz de la esclerosis

múltiple de moderada a grave y algunas otras afecciones reumáticas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013).

En cuanto a su farmacocinética, TFM se absorbe casi por completo entre 1 a 4 horas. Los alimentos no tienen ningún efecto sobre su farmacocinética. Se une a proteínas (albúmina) en más del 99 % y se distribuye principalmente en el plasma. Sufre un metabolismo parcial y es el principal componente detectado en el plasma. La hidrólisis y la oxidación son las principales rutas de biotransformación, mientras que la N-acetilación y la conjugación con sulfato son las rutas secundarias (Guarnera et al., 2017). Se excreta principalmente a través de la bilis como fármaco no modificado. Aproximadamente el 60% de la dosis administrada se excreta por heces (37,5%) y orina (22,6%). La vida media es entre 14 y 18 días, siendo su eliminación acelerada mediante la administración de colestiramina (Bohanec Grabar et al., 2009).

### **1.3 Problemas clínicos asociados al uso de inhibidores de la deiodinasa**

Los perfiles de seguridad LEF y TFM son muy similares siendo los síntomas gastrointestinales (especialmente diarrea), elevación de ALT (generalmente leve), hipertensión, alopecia, neutropenia, vasculitis, neuropatía, erupción cutánea y reacciones alérgicas leves los eventos adversos más comunes (Papadopoulou et al., 2015).

Los inhibidores de DHODH han sido objeto de varias alertas de seguridad por parte de la FDA debido principalmente a la hepatotoxicidad y teratogenicidad presente en ambos fármacos (Keen et al., 2013; Papadopoulou et al., 2015). Existe evidencia de que TFM tiene una hepatotoxicidad menor que LEF, probablemente debido a la metabolización por parte de las enzimas del CYP450, en específico CYP2C19 parece estar relacionada con la toxicidad de LEF en metabolizadores lentos (Wiese et al., 2013). Por lo anterior, es importante contar con una estrecha monitorización para este tipo de fármacos, incluyendo hemograma, perfil hepático y función arterial (Fragoso & Brooks, 2015).

En el caso de LEF, un estudio prospectivo en 136 pacientes con AR arrojó que un 65% presentó al menos un evento adverso relacionado con la terapia, el 29% declaró abandonar el tratamiento debido a sus efectos adversos y el 13% por falta de eficacia (Van Roon et al., 2004).

En adición a los efectos adversos de mayor gravedad, las reacciones adversas más comunes como diarrea, alopecia y neutropenia han llevado a altas tasas de interrupción del tratamiento. En estudios clínicos de TFM, la alopecia fue la causa más común de discontinuación debido a efectos adversos, y los estudios de adherencia en muestras reales de pacientes con esclerosis múltiple demostraron que los pacientes con TFM tenían un riesgo más del doble de discontinuación en comparación con pacientes con fingolimod (Muehler et al., 2019).

#### 1.4 Sistemas de administración de fármacos para AR

A pesar de los notables avances en la terapia de AR, una proporción significativa de pacientes presenta los inconvenientes anteriormente mencionados con las dosis terapéuticas tradicionales. Los fármacos destinados a la terapia clínica de AR pueden presentar vida media deficiente, biodisponibilidad escasa o una solubilidad inadecuada. Se ha buscado resolver estos problemas mediante el uso de sistemas de administración de fármacos (SAF). Las modificaciones del fármaco y de su microentorno pueden ajustar y optimizar su actividad. Los SAF pueden combinar estas dos estrategias mediante la construcción de una interfaz entre el fármaco y su microambiente (Vargason et al., 2021).

Las micropartículas, nanopartículas, nano dispersiones, nano cápsulas, nano emulsiones, nano suspensiones, entre otros, son enfoques novedosos para las terapias de la AR porque aumentan la eficacia y tolerabilidad de los fármacos (Nasra et al., 2022) Los SAF nano-particulados son especialmente adecuados para AR, como se ha demostrado en una variedad de estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos. Primero, por la protección contra una rápida biodegradación de la molécula, resultando en una liberación sostenida y una cinética de circulación prolongada de la misma (Yang et al., 2017).

Segundo, la entrega dirigida de fármacos en sitios inflamados mediante la focalización pasiva o activa de estos, lo que aumenta la eficacia y disminuye el

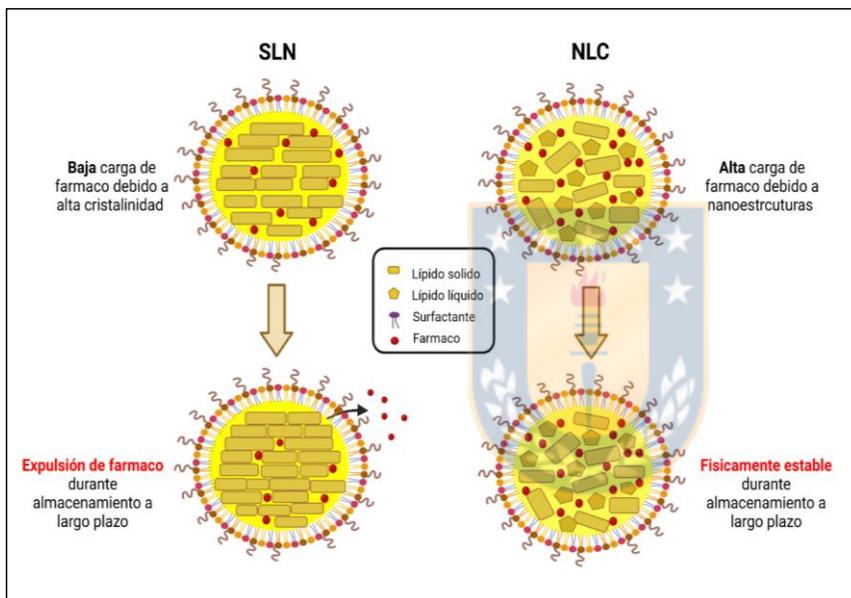
riesgo de toxicidad en otros órganos por la distribución fuera del objetivo terapéutico (Gorantla et al., 2020; Janakiraman et al., 2018; Yang et al., 2017). Por ende, los SAF nano-particulados de fármacos pueden aumentar la biodisponibilidad y solubilidad, evitando el aumento de la dosis y no administrar de forma repetitiva, invadiendo sitios afectados por la enfermedad como sucede por ejemplo al utilizar la vía intraarticular (Yang et al., 2017).

### **1.5 Nanopartículas basadas en lípidos (SLN y NLC)**

A principios de la década de los 90 comenzó el desarrollo de las nanopartículas lipídicas sólidas (solid lipid nanoparticles – SLN), que se han posicionado como un sistema de transporte de fármacos alternativo a los convencionales como las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas (H. Muller et al., 2011). Físicoquímicamente, son SAF coloidales que varían en tamaño de 1 a 1000 nm y están formulados a partir de lípidos que son sólidos a temperatura corporal, siendo estabilizados por emulsionantes (Attama & Umeyor, 2015; Üner & Yener, 2007).

Las SLN presentaron en un comienzo ciertos problemas como el crecimiento de partícula, la deficiente carga de fármaco, la gelificación y posterior fuga de fármaco de la matriz durante el almacenamiento. Una década después, el desarrollo de los transportadores lipídicos nanoestructurados (nanostructured lipid carriers - NLC) como segunda generación de nanopartículas basadas en

lípidos sólidos, surgió como una respuesta a estas desventajas (Müller et al., 2002). Las características y diferencias estructurales entre NLC y SLN se ilustran en la figura 1-3.



**Figura 1-3.** Diferencias entre SLN y NLC. (Figura adaptada de ((H. Muller et al., 2011))

Los NLC se componen de una matriz lipídica que consiste en lípidos sólidos, lípidos líquidos biocompatibles, y surfactantes mezclados en proporciones específicas dentro de una solución acuosa (Haider et al., 2020).

La adición de aceite en la fase lipídica de los NLC da como resultado imperfecciones en la matriz sólida, no permitiendo la formación de una red cristalina perfecta como tiende a ocurrir con las SLN. En su lugar, forma nanoestructuras que pueden capturar fármaco de mejor manera, aumentando la capacidad de carga y minimizando la expulsión del ingrediente activo durante el almacenamiento (H. Muller et al., 2011). En adición a lo anterior, los NLC combinan una serie de ventajas que se describen a continuación (Gowda et al., 2016; Sharma & Baldi, 2018).

- Son fáciles de validar y obtienen fácilmente la aprobación de los organismos de regularidad.
- Poseen una excelente biocompatibilidad.
- Se pueden evitar los solventes orgánicos según su método de preparación.
- Son fáciles preparar, escalar y esterilizar, y económicos en comparación con los soportes poliméricos/basados en surfactantes.
- Pueden proporcionar una liberación controlada del fármaco permitiendo modular la velocidad de liberación.
- Cuentan con una carga de fármaco excelente y más alta en comparación con otros transportadores disponibles en el mercado.
- Tienen posibilidad de transportar fármacos lipofílicos e hidrofílicos al mismo tiempo.
- La mayoría de los lípidos son biodegradables y son considerados como seguros.

- Es uno de los vehículos de elección para medicamentos de aplicación tópica porque sus componentes lipídicos tienen un estado aprobado o son excipientes utilizados en preparaciones cosméticas o farmacéuticas tópicamente comercialmente disponibles.

Estas ventajas hacen de los NLC un portador biocompatible para varios tipos de ingredientes activos destinados a aplicaciones farmacéuticas y cosméticas (de Souza Guedes et al., 2021). Como los lípidos son el principal material estructural de los NLC, determinan en gran medida las propiedades de estos sistemas coloidales. En el caso de los lípidos sólidos, principalmente se usan los triglicéridos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de glicerol y ceras. También incluyen fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos que tienen una actividad surfactante que favorece la formación de las partículas (Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2018). Los aceites o lípidos líquidos incluyen la mezcla de mono-, di- y triglicéridos de insaturación de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena (Nguyen et al., 2022).

Los surfactantes son compuestos que se adsorben en las interfases y reducen la tensión interfacial entre la fase acuosa y fase de aceite, aumentando la estabilidad de las formulaciones. La mayoría de las formulaciones de nanopartículas basadas en lípidos utilizan surfactantes hidrofílicos (poloxameros, polisorbatos, colatos, etc.) (Sharma & Baldi, 2018). Los surfactantes anfifílicos o lipofílicos (polisorbatos o lecitinas) pueden ser necesarios. Se ha visto que la combinación de surfactantes previene la agregación de partículas. La tabla 1-1

resume los principales materiales utilizados en la elaboración de nanopartículas basadas en lípidos.

**Tabla 1-1.** Materiales usados en formulaciones de nanopartículas basadas en lípidos. (Mishra et al., 2018; Subramaniam et al., 2020)

Ingredientes	Ejemplos
Lípidos sólidos	Cera de abejas, ácido esteárico, colesterol, triglicérido caprílico/cáprico, cetilpalmitato, estearato de glicerilo (-mono y -tri), trilaurato de glicerilo, trimiristato de glicerilo, behenato de glicerilo (Compritol), tripalmitato de glicerilo, grasa endurecida (Witepsol E85, H5 y W35), monocitrato de monoestearato, parafina sólida, ácido behénico.
Lípidos líquidos	Aceite de soja, ácido oleico, trioleato de glicerol triglicéridos de cadena media/triglicéridos caprílicos y cápricos, aceite de castor, Cremophor ELP, miristato de isopropilo, $\alpha$ -tocoferol.
Surfactantes/Emulsificantes	Fosfatidilcolina, lecitina de soja y huevo, poloxámeros, poloxamina, polisorbato 80.
Co-surfactantes	Dodecilsulfato de sodio, oleato de sodio, sal sódica de taurocolato, glicocolato de sodio, taurodeoxycolato de sodio

### 1.5.1 Métodos de preparación de nanopartículas basadas en lípidos (NLC y SLN)

Los métodos de preparación de nanopartículas basadas en lípidos se pueden clasificar en tres tipos: a base de solventes orgánicos, de alta energía y de baja

energía (Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2018). Los métodos de alta energía incluyen el uso de homogeneizador, ultrasonido o microondas, los cuales emplean esta alta energía para reducir el tamaño de las partículas en las formulaciones. Los métodos de baja energía como la microemulsión y la doble emulsión son simples y no requieren el uso de equipamiento complejo. Por último, los métodos de preparación basados en solventes orgánicos se usan para mezclar el fármaco y los lípidos en un estado homogéneo, ejemplos de esto son la emulsión de disolvente y difusión/evaporación e inyección de disolvente (Subramaniam et al., 2020).

El método preferencial para la producción de nanopartículas basadas en lípidos (tanto SLN como NLC) es la homogeneización a alta presión. Este método se subdivide en técnicas de calor y frío, siendo la última una forma adecuada para incluir compuestos altamente sensibles a la temperatura en estas formulaciones (Montenegro et al., 2016).

Otra técnica bastante utilizada en la investigación científica es la emulsificación-ultrasonido (Guilherme et al., 2019; Kiss et al., 2019). En esta técnica, los lípidos líquidos y sólidos se mezclan y se derriten a una temperatura de 5 a 10 °C por encima del punto de fusión del lípido sólido. El surfactante se disuelve en agua destilada y se calienta a la misma temperatura que el lípido fundido. La fase acuosa se agrega a la fase lipídica y esta pre-emulsión se homogeneiza a alta velocidad aplicando las revoluciones por minuto (rpm) requeridas durante un

tiempo específico. Luego, esta emulsión se somete a ultrasonidos durante un tiempo adecuado (Salvi & Pawar, 2019). A pesar de ser métodos de dispersión válidos, presentan algunos inconvenientes como una cierta polidispersidad que podría comprometer la calidad de las dispersiones de nanopartículas (Montenegro et al., 2016).

#### *1.5.2 Nanopartículas basadas en lípidos en el desarrollo de formulaciones enfocadas en la artritis reumatoidea*

Desde la última década hasta la actualidad se ha estudiado una considerable cantidad de nanopartículas basadas en lípidos enfocadas en el tratamiento de la AR y patologías similares (Ferreira et al., 2015; Garg et al., 2016; Ye et al., 2008). Características como su fácil preparación, liberación controlada, estabilidad física, protección del fármaco contra la degradación, biocompatibilidad y biodegradabilidad, los posicionan como buenos candidatos para la administración de fármacos antirreumáticos (Chuang et al., 2018a; Syed & Devi, 2019) mediante variadas vías de administración como la transdérmica, oral, intraarticular o parenteral (Garg et al., 2021; M. Sharma & Chaudhary, 2021; Shinde et al., 2016; Ye et al., 2008).

Junto con su versatilidad para ser administrados por diferentes vías, la hidrofobicidad de los NLC y SLN facilita la incorporación en su núcleo de fármacos insolubles como TFM. Por último, estos SAF tienen la capacidad de ser incorporados en diversas plataformas como hidrogeles para la administración

intraarticular, micropartículas híbridas o ser recubiertos con polímeros naturales mediante interacciones electrostáticas (Bishnoi et al., 2014; Jain et al., 2014; Rabelo et al., 2018; Zewail et al., 2021; Zhou et al., 2018).

Recientemente, se han desarrollado liposomas que encapsulan TFM, destinadas al tratamiento de AR y otras enfermedades, con resultados prometedores a nivel de estudios pre-clínicos (D. Gadhawe et al., 2021; Mahtab et al., 2019). Estos resultados se han logrado aprovechando la focalización pasiva propia de las nanopartículas debido al proceso de extravasación a través de la vasculatura permeable y posterior secuestro mediado por células inflamatorias (ELVIS - Extravasation through Leaky Vasculature and the subsequent Inflammatory cell-mediated Sequestration). Esta característica es similar a la estudiada en tejidos tumorales y denominada efecto de retención y permeabilidad mejorada (Enhanced permeability and retention effect - EPR) (Emami & Ansarypour, 2019).

Otro factor que pareciera optimizar los resultados es la focalización activa mediante el recubrimiento o funcionalización de superficie de los NLC (Mahtab et al., 2020; Zewail et al., 2022). Las células presentes en la patogenia de la AR tienden a sobre-expresar receptores de superficie como receptor de folato (FR)- $\beta$ , CD44 y la integrina  $\alpha V\beta$ . Esto permite una orientación activa a las articulaciones afectadas mediante la funcionalización de la superficie de los nano portadores con ligandos que se unen a tales receptores (Emami et al., 2017; Mahtab et al., 2020; Pirmardvand Chegini et al., 2018; Zewail et al., 2019).

### 1.5.3 Sulfato de condroitina como recubrimiento

El polisacárido sulfato de condroitina (CHS) pertenece a la clase de polisacáridos complejos naturales denominados glicosaminoglicanos y es uno de los componentes más abundantes en el cartílago humano. CHS ha recibido gran atención para su uso en conjunto con los sistemas de administración de fármacos, gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, no inmunogenicidad y baja toxicidad (Amhare et al., 2020). En combinación con nanopartículas lipídicas, CHS ha sido utilizado a nivel pre-clínico con éxito en sistemas de administración dirigidos de fármacos (Bishnoi et al., 2014; K. S. Kim et al., 2019). Además, se ha demostrado su unión preferente a los receptores CD44, que se encuentran sobre expresados en linfocitos sinoviales, macrófagos y fibroblastos precisamente para captar más CHS en la AR (Pirmardvand Chegini et al., 2018; Shilpi et al., 2019). Finalmente, sus efectos regeneradores de tejido y antiinflamatorios a través de la inhibición de la producción de interleuquina-1 $\alpha$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , se han considerado para aumentar la efectividad de formulaciones para el tratamiento de AR y osteoartritis (Bishnoi et al., 2014; Mahtab et al., 2020; Oliveira et al., 2021).

## 1.6 Diseño de experimentos para optimizar el desarrollo de formulaciones

Aunque SLN y NLC tienen décadas de estudios, las características de las formulaciones son poco predecibles. Para solucionar este inconveniente, es

posible optimizar una formulación empleando metodologías de superficie de respuesta, que a su vez, pueden obtenerse desde diseños que estudian factores en más de dos niveles, como el diseño central compuesto o diseño Box-Behnken (Box-Behnken design - BBD) (Scioli Montoto et al., 2020).

El BBD permite encontrar relaciones funcionales entre las respuestas estudiadas (atributos de calidad, como el tamaño de partícula o  $\zeta$ ) y factores, como la cantidad de lípidos, el tiempo de síntesis o la temperatura, entre otros. BBD tiene un diseño experimental de tres factores en el que los tres niveles de los factores están ubicados en los puntos medios y los bordes del espacio del proceso. Como este diseño no utiliza los valores extremos de los factores requiere menos ejecuciones que cualquier otro modelo de diseño de superficie-respuesta de tres niveles (Subramaniam et al., 2020). Este diseño ayuda a eliminar los factores que no tienen efecto en la variable de respuesta y es adecuado para generar una formulación optimizada (Tavares Luiz et al., 2021). Así, el diseño ayuda a reducir el costo y tiempo, reduciendo los parámetros experimentales complejos y, por lo tanto, simplificando los experimentos (Jazuli et al., 2019).

El presente proyecto buscó desarrollar y caracterizar transportadores lipídicos nanoestructurados cargados con TFM (NLC-TFM), usando la metodología de emulsificación - ultrasonido. La optimización de los parámetros de formulación se desarrolló mediante un diseño de experimentos Box-Behnken, y la formulación optimizada de NLC-TFM se recubrió con CHS para una potencial administración dirigida del fármaco a las articulaciones afectadas por AR.

## 2 HIPÓTESIS

Es posible desarrollar y optimizar una formulación de NLC cargada con TFM aplicando un diseño Box-Behnken y recubrirla con sulfato de condroitina para el potencial tratamiento de AR.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

- Desarrollar, caracterizar y optimizar sistemas de transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados con teriflunomida.

### 3.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un diseño de experimentos para optimizar la elaboración de NLC cargados con teriflunomida.
- Elaborar NLC cargados con teriflunomida y recubiertos con sulfato de condroitina.
- Caracterizar fisicoquímicamente los NLC desarrollados.
- Evaluar la cinética de liberación *in vitro* de teriflunomida desde los sistemas desarrollados.

## 4 MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

### 4.1 Materiales y Reactivos

- Compritol 888 ATO (Compritol), Gattefossé (Saint Priest, Francia),
- Soy PC 95% (Lecitina), Sigma Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos)
- Trioleato de Glicerilo (Trioleina), Sigma Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos)
- Pluronic F68 (Poloxamero 188), Sigma Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos)
- Taurodesoxicolato de sodio, Sigma Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos)
- Teriflunomida, Toronto Research Chemical. (Canadá)
- Sulfato de condroitina sódica, Sigma Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos)
- Agua Bidestilada.
- Acetonitrilo grado HPLC Merck® (Darmstadt, Alemania).
- Ácido fosfórico grado p.a. Merck® (Darmstadt, Alemania).
- Estándares de pH 4.0-7.0-10.0 Hanna Instruments INC® (Estados Unidos).
- Metanol, Etanol grado HPLC Merck® (Darmstadt, Alemania).
- Fosfato di-hidrógeno de potasio. (Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido de sodio, Merck® (Darmstadt, Alemania).
- Jeringa HPLC de 50 µL Microliter®, (Estados Unidos).

- Jeringas desechables NIPRO de 1 mL.

Material de vidrio clase A.

#### 4.2 Equipamiento y software

- Agitador magnético MULTISTIRRER 6, Velp Científica, (España).
- Balanza analítica AA-200, Denver Instrument Company, (Estados Unidos).
- Balanza Precisa XB120A, Precisa Instruments, (Suiza).
- Baño de ultrasonido Branson 1200, (Alemania).
- Bomba Elite LaChrom L-2130, Merck Hitachi. (Tokio, Japón).
- Bomba peristáltica, TP-320, ChromTech, (Taiwán).
- Centrífuga Eppendorf 5403, (Alemania).
- Columna LiChroCart 250-4 mm, LiChrospher RP-18, Tamaño de partícula 5µm, Merck Co, (Alemania).
- Detector UV-L2400 de longitud de onda programable Merck Hitachi Lachrom, (Alemania).
- DSC Mettler Toledo modelo 822e, (Suiza)
- Equipo de filtración por vacío Supelco® Supelco Inc. Bellefonte, (Estados Unidos)
- Bomba de vacío Gast®, Benton Harbor, (Estados Unidos).
- Homogeneizador de alta velocidad DiAx 600, Heipdolph, (Alemania).
- Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK).

- Microscopio Confocal Espectral LSM760 NLO, Zeiss, (Alemania).
- Microscopio óptico, Carl Zeiss, modelo 4271123, (Alemania).
- Programa EOS utility, versión 2.10.2.0, 2011, Canon INC.
- Design-ExpertVR Software Version 10, State-Ease Inc., Minneapolis, MN
- Software Biorender
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc, (Estados Unidos)
- Procesador Ultrasonico VCX-130, Vibra-cell, (Estados Unidos)



## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Validación método analítico de cuantificación

La cuantificación de TFM se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (high-performance liquid chromatography, HPLC) utilizando las condiciones cromatográficas presentadas en la tabla 5-1. Estas condiciones fueron adaptadas desde un método previamente validado y publicado (Van Roon *et al.*, 2004). La fase móvil se preparó añadiendo metanol y buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , en una proporción del 65 y 35% respectivamente. Después se mezcló adecuadamente y se desgasificó en un baño de ultrasonido. El buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fue preparado disolviendo 3.06 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1000 mL de agua bidestilada y se corrigió el pH a 3 con ácido fosfórico 85%.

La validación del método analítico se usa para mostrar la confiabilidad del método analítico elegido para el análisis del principio activo. Para este propósito se preparó una solución stock de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TFM en etanol absoluto. Los parámetros de validación estudiados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

**Tabla 5-1.** Condiciones cromatográficas para la determinación cuantitativa de TFM.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Fase móvil (MeOH:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (45 mmol/L, pH=3))</b>	65:35 % v/v
<b>Columna</b>	LiChroCart 250-4 RP-18 (5 μM)
<b>Longitud de onda</b>	295 nm
<b>Flujo</b>	1.0 mL/min
<b>Tiempo de retención</b>	4-5 min

#### 5.1.1 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra, ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. Por lo tanto, se necesitan mínimo 5 puntos de datos los que deben presentar un valor  $R^2$  mínimo:  $\geq 0.99$ , y así definir un intervalo de trabajo (The United States Pharmacopeial convention, 2007). Se hizo una curva de calibrado de 7 puntos, las muestras se prepararon en un rango de concentraciones de TFM de 5 a 100 μg/mL.

### 5.1.2 Precisión

Se define como la cercanía de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas (ICH Expert Working Group, 2003). Dentro del concepto de precisión, pueden distinguirse la precisión intra ensayos y precisión intermedia (Sankar et al., 2015).

- *Precisión intra-ensayo (Repetibilidad)*

Es la proximidad de la concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos por el mismo método, material de prueba idéntico, mismo laboratorio, mismo operador y utilizando el mismo equipo dentro de intervalos de tiempo cortos (Fanali et al., 2017; ICH Expert Working Group, 2003).

- *Precisión intermedia*

Es una medida de la capacidad de un método para proporcionar mediciones consistentes dentro de un laboratorio dado cuando diferentes analistas realizan las pruebas utilizando diferentes equipos o diferentes días de medición (3-5 días) (Fanali et al., 2017).

Para obtener la repetibilidad se analizó 10 veces un nivel de concentración de 40 µg/mL, calculando la media, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual (%CV) (Sankar et al., 2015). Para la determinación de la precisión intermedia se prepararon 9 análisis en total, evaluando por triplicado 3 niveles de

concentración equivalentes al 30-40-50  $\mu\text{g/mL}$  durante 3 días diferentes. Posteriormente, se cuantificaron las muestras y se compararon con la concentración real de la solución. De esta manera se obtuvo el porcentaje de recuperación con lo que se calculó el % CV para cada nivel de cuantificación (Peris-Vicente et al., 2015).

#### 5.1.3 *Exactitud*

Para evaluar la exactitud del método se utilizó el mismo ensayo descrito para la precisión intermedia, pero en este caso se calculó el porcentaje de recuperación de TFM en el 75-100-125% de la concentración objetivo (40  $\mu\text{g/mL}$ ) (Peris-Vicente et al., 2015).

#### 5.1.4 *Límite de detección y cuantificación*

El límite de detección (LD) de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto. El límite de cuantificación (LC) de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas (Sankar et al., 2015).

Haciendo uso de la pendiente de la recta obtenida de la curva de linealidad y la estadística de los parámetros del modelo de regresión de la curva obtenida se calcularon los límites con las ecuaciones 1 y 2.

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Ecuación 1. Límite de detección.

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

Ecuación 2. Límite de cuantificación.

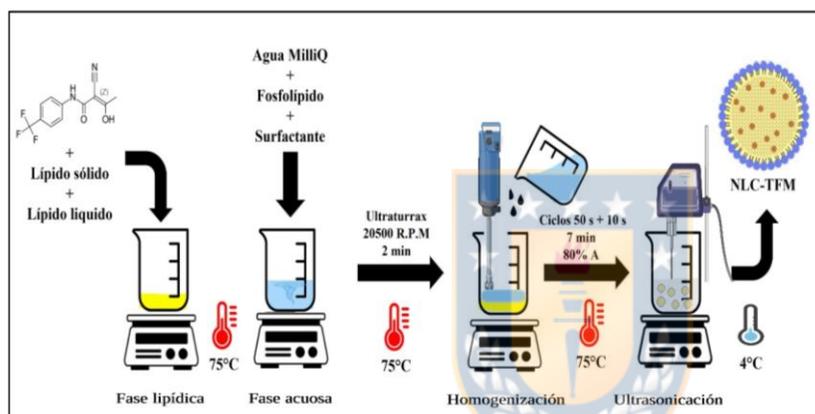
Donde,  $\sigma$  es la desviación estándar del punto de linealidad de nivel más bajo de la curva de calibración (regresión) y  $S$  es la pendiente de la curva de calibración para linealidad (Sankar et al., 2015).



## 5.2 Elaboración de NLC-TFM

Se elaboraron transportadores lipídicos nanoestructurados cargados con TFM (NLC-TFM) mediante el método de emulsificación-ultrasonido (Nnamani et al., 2014) ilustrado en la figura 5-1. Se preparó una fase lipídica compuesta por Compritol (lípido sólido), trioleína (lípido líquido) y TFM, enfriándola a 10°C por encima de la temperatura de fusión del lípido sólido. En paralelo, se preparó una fase acuosa compuesta por 15 mL de agua bidestilada, lecitina de soya, Pluronic F68 y taurodeoxicolato de sodio (TDC). La fase acuosa se llevó a la misma temperatura de la fase lipídica y se dispersó, gota a gota, en la fase lipídica. La dispersión se homogenizó con ultraturrax (DiAx 600, Heidolph) a 20500 rpm por

2 minutos. La emulsión obtenida se sometió a pulsos de ultrasonido de 50 s por 7 minutos con una amplitud del 80% mediante una sonda de ultrasonido (Vibracell, VCX-130, EE. UU). Por último, la nano-dispersión se enfrió en un baño de hielo por 10 minutos y se almacenó a 4°C.



**Figura 5-1.** Esquema de método de emulsificación-ultrasonido para la preparación de NLC

### 5.3 Diseño de experimentos y optimización

Se utilizó un diseño de experimentos tipo Box-Behnken de 3 niveles y 3 factores para la optimización de la formulación de NLC. Se estudió el efecto de variables independientes: relación lípido líquido/lípido total ( $X_1$ ), cantidad de lípido total ( $X_2$ ) y cantidad de surfactante ( $X_3$ ), sobre las variables dependientes tamaño de partícula ( $Y_1$ ), eficiencia de encapsulación ( $Y_2$ ) y carga de fármaco ( $Y_3$ ). Se utilizó

la función de deseabilidad para obtener una formulación optimizada de la dispersión NLC-TFM. El resumen de las variables incluidas en el estudio se presenta en la **tabla 5-2**.

**Tabla 5-2.** Variables independientes y dependientes utilizadas en el diseño de Box-Behnken para la preparación de NLC-TFM.

FACTORES	NIVELES		
	BAJO (-1)	MEDIO (0)	ALTO (+1)
<b>VARIABLES INDEPENDIENTES</b>			
X <sub>1</sub> : Lípido líquido/lípidos totales	0.1	0.2	0.3
X <sub>2</sub> : Cantidad de lípidos (mg)	400	500	600
X <sub>3</sub> : PLURONIC F68 (mg)	150	225	300
<b>VARIABLES INDEPENDIENTES</b>	<b>LÍMITES</b>		
Y <sub>1</sub> : Tamaño de partícula (nm)	180		
Y <sub>2</sub> : Eficiencia de encapsulación (%)	Maximizar		
Y <sub>3</sub> : Carga de fármaco (%)	En rango		

Comentado [VHCR1]: El encabezado de tabla va en la parte superior de la tabla, no inferior

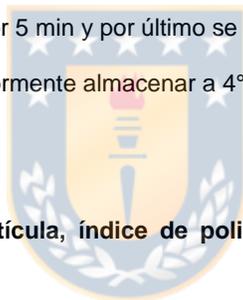
Comentado [CDCS2R1]: corregido

Comentado [VHCR3]: A que se refiere con "en rango". Cual rango?

Con las variables elegidas se planificó el diseño con una serie de 16 experimentos (ver tabla 6-3) a realizar con los parámetros de formulación y los resultados esperados para las variables dependientes. El diseño y todos los cálculos fueron realizados usando el software Design-Expert (Design-ExpertVR Software Version 10, State-Ease Inc., Minneapolis, MN).

#### **5.4 Recubrimiento de NLC-TFM con sulfato de condroitina (CHS-NLC-TFM)**

Una vez seleccionada la formulación optimizada de NLC-TFM se realizó un recubrimiento con condroitina sulfato mediante interacción electrostática y/o hidrofóbicas. Los NLC recubiertos se prepararon como se describió en 5.2, pero con una modificación: después de la ultra sonicación de la nano-dispersión se añadió lentamente y bajo agitación una solución externa de CHS 1.5% p/v. Esta mezcla fue homogeneizada a 8000 rpm por 5 min y por último se introdujo en un baño de hielo por 10 minutos para posteriormente almacenar a 4°C.



#### **5.5 Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta**

La medición del tamaño de partícula (PS), índice de polidispersidad (PDI) y potencial Zeta son una herramienta importante para evaluar la estabilidad de sistemas coloidales dispersos como los NLC. La determinación de PS, PDI y potencial Zeta se realizó con un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) a 25°C con ángulo de medición de 90°. Las formulaciones testeadas fueron diluidas 100 veces en agua ultrapura (Rudhrabatla et al., 2019).

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

La caracterización térmica se realizó con la ayuda de un calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo modelo 822e (Mettler Toledo, USA), equipado con cápsulas de alta presión. La velocidad de calentamiento utilizada fue de 10°C/min en un rango de 25-350°C y se analizó el fármaco libre (TFM), Compritol, CHS, liofilizado de NLC-BLANCO y NLC-CHS-TFM.

## **5.7 Difracción de rayos X en polvo (PXRD)**

Se emplearon estudios de difracción de rayos X en polvo para las muestras de TFM, Compritol, CHS y liofilizado de NLC-BLANCO Y CHS-NLC-TFM. El estudio se llevó a cabo utilizando un difractómetro de rayos X (Bruker, modelo D4 Endeavor), exponiendo las muestras a radiación de cobre y se escanearon en el rango de 2° a 90° 2θ con una pasabanda de 0.02° a 25°C.

## **5.8 Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La morfología de NLC-TFM y CHS-NLC-TFM se estudió mediante un microscopio de fuerza atómica modelo Naio (Nanosurf AG, Liestal, Switzerland). El equipo cuenta con una punta PPP-FMAuD recubierta de oro (Nanosensors®) con frecuencia de resonancia de 75 KHz, constante elástica de 2.8 N/m y radio de 7

nm. Una porción de cada muestra se dispersó 1:1 en agua destilada, luego algunas gotas se depositaron sobre un sustrato de mica, donde la muestra se secó suavemente con nitrógeno justo antes de la observación.

### 5.9 Determinación de eficiencia de encapsulación y carga de fármaco

El porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) y porcentaje de carga de fármaco (%DL) fueron determinados usando el método de Pandian y colaboradores con leves modificaciones (Pandian et al., 2020). Brevemente, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de la dispersión NLC-TFM y fueron dispersados en 800  $\mu\text{L}$  de metanol (MeOH), esta mezcla fue centrifugada a 13500 rpm por 25 minutos. La TFM disuelta en el sobrenadante resultante fue cuantificada a través del método HPLC descrito en 5.1. El %EE y %DL fueron calculados utilizando las siguientes ecuaciones.

$$\%EE = \left[ \frac{W_T - W_F}{W_T} \right] \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de eficiencia de encapsulación.

$$\%DL = \left[ \frac{W_T - W_F}{W_L} \right] \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de carga de fármaco.

Donde  $W_T$  es el peso inicial de TFM,  $W_F$  es el peso de TFM libre y  $W_L$  es el peso de los lípidos totales (lípidos sólidos + lípidos líquidos).

### 5.10 Cinética de liberación *in vitro* de farmaco

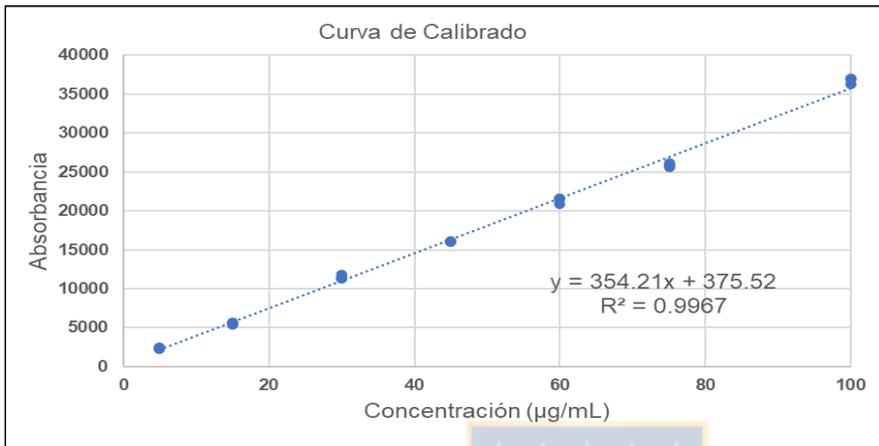
El estudio de liberación de las muestras TFM, NLC-TFM, y CHS-NLC-TFM fue realizado por diálisis (Mahtab et al., 2020) empleando condiciones *sink*. Una cantidad de NLC, equivalente a 5 mg de TFM para cada muestra (NLC-TFM = 3 mL y CHS-NLC-TFM = 4 mL), fue cargada en una bolsa de diálisis (cut-off: 10 KDa). La bolsa de diálisis fue sumergida en 150 mL de un medio de disolución (0.5% v/v tween 80 en PBS, pH 7.4) y llevada a una estufa a 37°C con agitación constante a 100 rpm (Elmowafy et al., 2018). Se retiró una alícuota de 500 µL del medio y se reemplazó con el mismo volumen de la sustancia a los 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 h. La cantidad de TFM liberada de los NLC se determinó mediante el método HPLC mencionado anteriormente.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Validación método analítico de cuantificación

#### 6.1.1 Linealidad

Se evaluó la linealidad del método, preparando una curva de calibración entre los rangos de concentración de 5 - 100 µg/mL. Al realizar el análisis de regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la recta y un coeficiente de correlación obtenido  $R^2 = 0,997$  (ver figura 6-1). El resultado obtenido es muy cercano a 1 lo cual muestra que existe un alto grado de correlación entre la variable de concentración (X) y la variable de respuesta (Y). Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (tabla 10-2) lo que confirma ( $p < 0.001$ ) la relación lineal entre las variables estudiadas dentro del rango 5 – 100 (µg/mL).



**Figura 6-1.** Curva de calibrado del método analítico.

### 6.1.2 Límite de detección y cuantificación

Los resultados del análisis LD y LC de TFM para el método analítico descrito anteriormente se muestran en la tabla 6-1.

**Tabla 6-1.** LD y LC del método analítico.

LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
1.09	3.32

### 6.1.3 Precisión y exactitud

La tabla 6-2 presenta los valores de repetibilidad, precisión intermedia (entre días) y exactitud para el método analítico validado. En cuanto a la repetibilidad y precisión intermedia, en todos los casos se observó un CV%  $\leq$  2.0, lo que indica que el método analítico tiene una precisión adecuada.

La determinación de la exactitud del método analítico entregó resultados satisfactorios, puesto se encuentran dentro de un rango de 98 - 102% de recuperación de TFM (ICH Expert Working Group, 2003).

**Tabla 6-2.** Valores de Repetibilidad, precisión intermedia y exactitud del método

Concentración (µg/mL)	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)	Exactitud (%R)
30	-	1.92	98.10 ± 0.58
40	1.72	1.63	97.57 ± 0.60
50	-	1.49	99.02 ± 0.53

## 6.2 Diseño experimental Box-Behnken

Se utilizó un diseño estadístico Box-Behnken de tres niveles y tres factores para la preparación y optimización de NLC-TFM. Los valores experimentales observados de PS, %EE y %DL para las 16 corridas experimentales de NLC-TFM se presentan en la tabla 6-3.



**Tabla 6-3.** Corridas experimentales y respuestas observadas para el diseño de Box-Behnken de NLC-TFM.

Experimento	X <sub>1</sub> Lípido liquido/Lípidos totales	X <sub>2</sub> : Cantidad de lípidos (mg)	X <sub>3</sub> : Cantidad de surfactante (mg)	Y <sub>1</sub> : PS (nm)	Y <sub>2</sub> : EE (%)	Y <sub>3</sub> : DL (%)
1	0.300	500	150	180	90.2	4.58
2	0.200	600	150	227	66.1	2.75
3	0.200	400	300	148	88.4	5.45
4	0.300	600	225	201	91.2	3.79
5	0.100	400	225	151	86.0	5.37
6	0.200	500	225	158	85.7	4.36
7	0.300	500	300	166	88.9	4.47
8	0.100	500	300	167	89.8	4.48
9	0.200	500	225	162	90.6	4.48
10	0.100	500	150	195	77.5	3.90
11	0.200	500	225	187	90.0	4.53
12	0.200	600	300	190	89.7	3.78
13	0.300	400	225	157	91.3	5.76
14	0.200	400	150	168	92.2	5.76
15	0.100	600	225	215	93.4	3.88
16	0.200	500	225	189	88.4	4.19

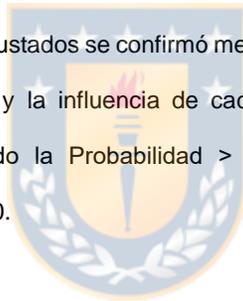
Los resultados del ANOVA para evaluar el efecto de las condiciones definidas por el BBD, en los 16 experimentos realizados, se presentan en la tabla 6-4.

Las respuestas obtenidas para las formulaciones fueron procesadas mediante un análisis de regresión lineal múltiple que seleccionó los modelos matemáticos

adecuados para cada variable independiente. En consecuencia, se estableció un modelo lineal para PS, un modelo cuadrático para %EE y un modelo 2FI para %DL.

Los modelos matemáticos generaron ecuaciones polinomiales que reflejan de manera cuantitativa los efectos principales individuales y los efectos de interacción de las variables independientes en cada respuesta (Y) donde el signo más o menos que antecede al coeficiente de cada término significa su impacto de refuerzo o disminución en dicha variable.

La relevancia estadística de los modelos ajustados se confirmó mediante ANOVA para validar las ecuaciones polinómicas y la influencia de cada variable del modelo se consideró significativa cuando la Probabilidad  $> F < 0.05$  y no significativo cuando Probabilidad  $> F > 0.10$ .



**Tabla 6-4.** Resumen de los resultados del análisis de regresión para las respuestas  $Y_1$ ,  $Y_2$  y  $Y_3$

Parámetros del modelo ajustado	Tamaño de partícula $Y_1$		%EE $Y_2$		%DL $Y_3$	
	Valor $p$	Interpretación	Valor $p$	Interpretación	Valor $p$	Interpretación
<b>Modelo</b>	< 0.0001	Significativo	0.0372	Significativo	< 0.0001	Significativo
$R^2$	0.844	-	0.715	-	0.941	-
$R^2$ ajustado	0.805	-	0.525	-	0.902	-
$R^2$ Predictivo	0.775	-	-0.305	-	0.730	-
<b>Falta de ajuste</b>	0.971	No significativo	0.0798	No Significativo	0.149	No Significativo
$X_1$	0.425		0.283	No Significativo	0.208	No Significativo
$X_2$	< 0.0001	Significativo	0.217	No Significativo	< 0.0001	Significativo
$X_3$	0.00482	Significativo	0.0445	Significativo	0.127	No Significativo
$X_1, X_2$	-	-	-	-	0.365	No Significativo
$X_2, X_3$	-	-	0.0166	Significativo	0.207	No Significativo
$X_1, X_3$	-	-	0.178	No significativo	0.0276	Significativo
$X_1^2$	-	-	-	-	-	-
$X_2^2$	-	-	-	-	-	-
$X_3^2$	-	-	0.102	No significativo	-	-

### 6.2.1 Efectos sobre tamaño de partícula

Para PS se seleccionó un modelo lineal con un  $R^2$  de 0.844, valor que está cerca del  $R^2$  pronosticado, indicando que solo un 16.6 % de la variación de la respuesta no puede ser explicada por este modelo. Como la falta de ajuste no es significativa, el modelo es adecuado para su utilización en el rango de variables experimentales, teniendo como términos significativos  $X_2$  y  $X_3$ , cantidad de lípidos y cantidad de surfactante, respectivamente. La ecuación generada se presenta a continuación.

$$PS: y_1 = 179 - 2.98 x_1 + 26.1 x_2 - 12.4 x_3$$

**Ecuación 5.** Ecuación polinomial del tamaño de partícula.

Los resultados mostraron que las formulaciones preparadas tuvieron un PS que varió en un rango de 148 a 227 nm. La ecuación polinomial muestra mayor influencia de los factores  $X_2$  y  $X_3$  de manera directa e indirectamente proporcional, respectivamente, lo que se condice con la evidencia (Martins et al., 2012). En el caso de la variable independiente  $X_1$ , su influencia no es significativa en concordancia por lo propuesto por otros autores (Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2018), confirmando el supuesto de que solo el lípido sólido influencia el tamaño de partícula. Una mayor cantidad de lípidos produce un mayor tamaño de partícula promedio, debido a la mayor cantidad de material sólido que hay disponible para la formación de las nanopartículas. El efecto negativo del

surfactante se puede explicar por el aumento de la cantidad de Pluronic F68 disponible en la formulación, el cual facilita la estabilización de las minúsculas gotas generadas en el proceso de producción, mediante una reducción de la tensión interfacial (Aslam et al., 2016; Kim et al., 2019).

### 6.2.2 Efecto sobre eficiencia de encapsulación

Para %EE se eligió un modelo cuadrático (ecuación 6) que fue ajustado eliminando variables para aumentar su significancia y reducir su falta de ajuste. Si bien el modelo se presentó con un  $R^2$  de 0.715 y un  $R^2$  ajustado de 0.525, a pesar de estos parámetros relativamente favorables. El  $R^2$  pronosticado dio un resultado negativo, lo cual sugiere que la media general pueda predecir de mejor manera la respuesta en este caso.

$$\%EE \ y_2 = 89.6 + 1.88x_1 - 2.18x_2 + 3.84x_3 - 3.40x_1x_3 + 6.83x_2x_3 - 4.23x_3^2$$

**Ecuación 6.** Ecuación polinomial de la eficiencia de encapsulación.

El %EE de las formulaciones varió entre 66.1 y 93.4%. Solo el término  $X_3$  (cantidad de surfactante) y la interacción entre  $X_2X_3$  (cantidad total de lípidos y cantidad de surfactantes) presentaron una modificación significativa del %EE de manera directamente proporcional.

Como ha sido descrito en la literatura consultada, el aumento en la proporción de lípido líquido sobre el lípido sólido ( $X_1$ ) aumenta el %EE en este caso de manera poco significativa. Esto se puede generar por la capacidad de los lípidos líquidos de causar alteraciones del ordenamiento cristalino de los lípidos sólidos, creando un núcleo amorfo que facilita el alojamiento y retención de más moléculas de TFM (Salvi & Pawar, 2019). De la misma forma, el aumento de Pluronic F68 ( $X_3$ ) tiene una influencia positiva sobre el %EE como indica la ecuación 6. Este fenómeno es producido por el aumento de la solubilización del fármaco que el surfactante propicia dentro de la matriz lipídica (Raina et al., 2017).

El gráfico superficie respuesta presentado en la figura 6-2 muestra el efecto de la interacción entre Pluronic F68 ( $X_3$ ) y la cantidad de lípidos sobre el %EE (ecuación 2). Sí se disminuye la cantidad de Pluronic F68 ( $X_3$ ) al mínimo se observa una disminución drástica del %EE, debido a que la cantidad de moléculas de surfactante no son suficientes para estabilizar tal cantidad de lípidos. En cambio, si se aumenta al máximo la cantidad de surfactante y se disminuye al mínimo la cantidad de lípidos la %EE tiende a disminuir, seguramente debido a la solubilización de mayor cantidad de fármaco en el exceso de Pluronic F68 ( $X_3$ ) y no en la matriz lipídica (Kiss et al., 2019).

### 6.2.3 Efecto sobre carga de fármaco

El modelo 2FI se presentó con un  $R^2$  de 0.941 indicando que solo un 5.9% de la variabilidad de la respuesta no puede ser explicada por el modelo. El término  $X_2$

ejerce influencia sobre la respuesta, indicando que la cantidad de lípidos en la formulación es lo que mayormente afecta a %DL, como demuestra la ecuación 7.

$$\%DL: y_3 = 4.47 + 0.121x_1 - 1.02x_2 + 0.151x_3 - 0.121x_1x_2 - 0.172x_1x_3 + 0.332x_2x_3$$

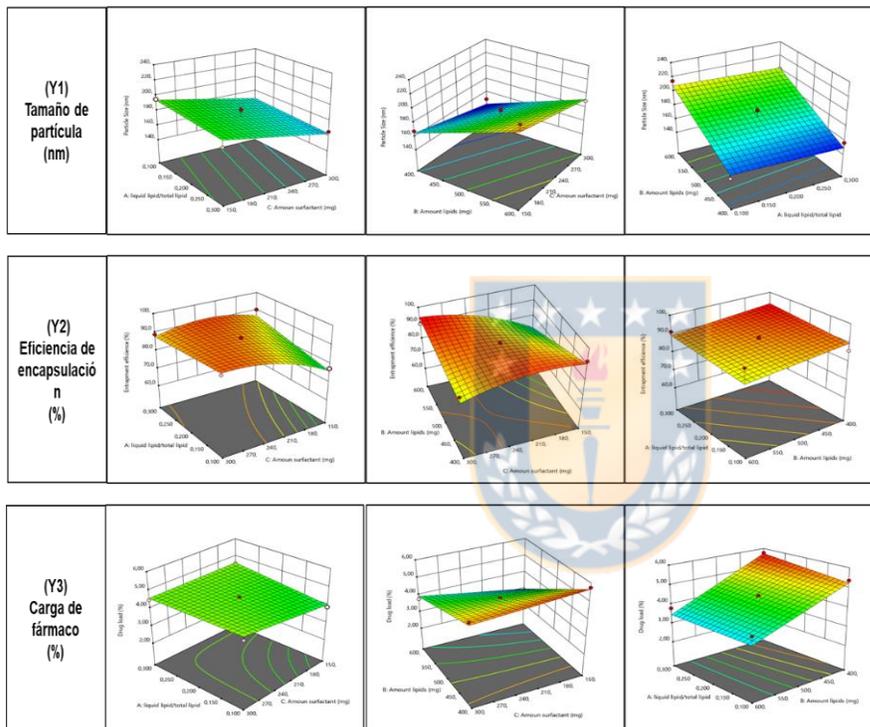
**Ecuación 7.** Ecuación polinomial de la carga de fármaco.

La cantidad de lípidos totales tiene una influencia negativa sobre %DL. A mayor cantidad de lípidos %DL disminuye, probablemente debido a que una proporción muy amplia entre la cantidad de fármaco y la cantidad de lípidos puede conllevar una saturación deficiente del fármaco en la matriz lipídica y por ende una menor disposición del primero dentro del núcleo de la nanopartícula (Kunal et al., 2015). Este resultado es coherente con influencia de la cantidad de lípidos ( $X_2$ ) sobre el %EE.

El gráfico superficie respuesta muestra una dimensión más detallada de este fenómeno, ya que a medida que aumenta la cantidad de lípidos, %EE y %DL disminuyen, excepto cuando la cantidad de surfactante aumenta lo suficiente para contrarrestar este efecto.

A diferencia de otras investigaciones (Soni et al., 2017; F. Wang et al., 2014), en este estudio la proporción lípido líquido/lípido sólido aumentó ligeramente %DL, quizás producto de la excelente solubilidad de TFM en Compritol y a la ventaja

intrínseca de este excipiente en cuanto a su ordenamiento cristalino de menor intensidad (Aburahma & Badr-Eldin, 2014).



**Figura 6-2.** Gráfica de superficie de respuesta 3D para la optimización de las formulaciones preparadas, que muestra el impacto de diferentes variables de formulación (factores independientes) en las características del NLC desarrollado; efecto de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  y sus términos de interacción sobre el tamaño de partícula ( $Y_1$ ); efecto de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  y sus términos de interacción en la eficiencia de encapsulación ( $Y_2$ ); y efecto de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  y sus términos de interacción sobre la carga de fármaco ( $Y_3$ ).

### 6.3 Optimización de la preparación de NLC-TFM

La optimización mediante la aplicación del método de predicción puntual de Design Expert software proporciona parámetros de formulación precisos para lograr los objetivos deseados de las respuestas seleccionadas. La formulación de NLC cargada con TFM optimizada se seleccionó en función del criterio de lograr el valor máximo de %EE y %DL, ajustando el tamaño de partícula a 180 nm. Como resultado, la composición de la formulación óptima contenía 539 mg de lípidos totales, una relación lípido líquido/total lípidos de (0.100) y una cantidad de surfactante de 297 mg.

### 6.4 Preparación y caracterización fisicoquímica: NLC – NO RECUBIERTO Y NLC-RECUBIERTO

**Tabla 6-5.** [Tamaño de partícula (diámetro medio), índice de polidispersión (PDI), potencial zeta (PZ), eficiencia de encapsulación (%EE) y carga de fármaco (%DL) de NLC-TFM y CHS-NLC-TFM ( $n = 3$ ; los datos se expresan como la media  $\pm$  SD).]

Formulación	PS (nm)	PDI	PZ	%EE	%DL
NLC-TFM	178.63 $\pm$ 2.49	0.297 $\pm$ 0.05	-34.95 $\pm$ 1.99	85.95 $\pm$ 2.47	3.97 $\pm$ 0.01
CHS-NLC-TFM	211.03 $\pm$ 0.42	0.248 $\pm$ 0.02	-56.35 $\pm$ 2.33	65.78 $\pm$ 2.54	2.97 $\pm$ 0.055

Comentado [VHCR4]: El título de esta tabla es poco claro. No indica que está describiendo. Es la predicción de los óptimos de acuerdo a los modelos? Realmente se optimizaron 5 respuestas, no 3

Comentado [CDCS5R4]: Es una caracterización posterior. Para comparar recubiertos y no recubiertos

Comentado [CDCS6R4]: Va en la sección 6, se cambió por error

#### 6.4.1 *Tamaño de partículas, potencial zeta e índice de polidispersión*

##### 6.4.1.1 *NLC-TFM optimizada*

La formulación optimizada de NLC-TFM presentó valores de PS  $178.6 \pm 2.5$  nm, PDI  $0.297 \pm 0.05$  y PZ de  $(-)34.95 \pm 0.99$  mV (tabla 6-5). El PS resulta una característica importante para la focalización pasiva y la mayor retención en articulaciones afectadas por AR. Los NLC pueden aprovechar los espacios generados en los tejidos sinoviales inflamados de AR ( $\sim 700$  nm) (Emami & Ansarypour, 2019; L. Liu et al., 2019; Q. Wang & Sun, 2017). El valor de PDI menor a 0,4 también indica una distribución estrecha de tamaño de partícula lo que favorece el desempeño de los NLC, mientras que valores de PZ cercanos a  $\pm 30$  mV indican una mayor estabilidad debido a la repulsión que se genera entre la superficie de cada nanopartícula. Como consecuencia, es menos probable que ocurra una agregación de estas (Bashiri et al., 2020; Trujillo & Wright, 2010).

##### 6.4.1.2 *NLC-TFM-CHS*

Se consideró el recubrimiento de NLC-TFM con CHS en busca de mejorar las condiciones coloidales de la formulación, otorgando la capacidad de una focalización activa y pasiva, mediante la unión de CHS en receptores CD-44 que son sobre expresados en AR (Pirmardvand Chegini et al., 2018).

Una simple mezcla de CHS con NLC-TFM en ausencia de solventes orgánicos y reacciones químicas durante el proceso de producción, generó NLC recubiertos. Los CHS-NLC-TFM desarrollados exhibieron un PS medianamente mayor al de

NLC-TFM ( $211.03 \pm 0.42$  nm). Este aumento puede estar asociado al recubrimiento de CHS en la superficie de NLC-TFM generando una capa externa que aumenta el PS, efecto que ha sido observado en varios sistemas de liberación de fármacos funcionalizados con CHS (Ebada et al., 2022; Jain et al., 2014; Mahtab et al., 2020). Cabe destacar que se produjo una pequeña reducción del PDI hasta 0,247, lo que sugiere un recubrimiento homogéneo por parte de CHS a NLC-TFM. Se observó que CHS tiene un gran efecto sobre PZ, aumentando su valor hasta -56.35 mV. Este resultado puede ser debido a las cargas negativas de sal sódica de CHS, que al estar en la superficie del NLC produce una disminución significativa de PZ. Una repulsión electrostática mayor que  $\pm 30$  mV tiende a disminuir la agregación y a tener un PS estable por mayor tiempo en dispersiones acuosas (Aslam et al., 2016).

La mayoría de sistemas de liberación funcionalizados con CHS apelan a interacciones electrostáticas entre cargas negativas de sus grupos funcionales activos COO<sup>-</sup> y SO<sub>3</sub><sup>-</sup> de CHS y nanopartículas con PZ positivo, o a la conjugación mediante reacciones químicas (Ebada et al., 2022). Por otra parte, se han documentado interacciones hidrofóbicas o puente hidrogeno (L. Wang et al., 2022). En este caso, NLC-TFM ya presenta un PZ negativo, por ende es probable que el recubrimiento de CHS este mediado por interacciones hidrofóbicas, específicamente entre fosfatidilcolina (fosfolípido principal de lecitina) y CHS como ya se ha documentado anteriormente (Da Silva et al., 2014). Un estudio de NLC cargados con LEF demostró interacciones entre NLC de PZ

negativo y CHS, aunque en este caso no había presencia de lecitina y probablemente se generaron por la formación de enlaces hidrógeno entre el grupo carbonilo de LEF y grupo OH de CHS (Zewail et al., 2019). TFM posee el mismo grupo carbonilo que LEF, por lo cual podría presuponerse una interacción similar. Esta información confirma que se necesitan mayor cantidad de estudios para conocer los tipos de interacciones que están involucrados entre los componentes de las nanopartículas lipídicas, TFM y CHS.

#### 6.4.2 *Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco*

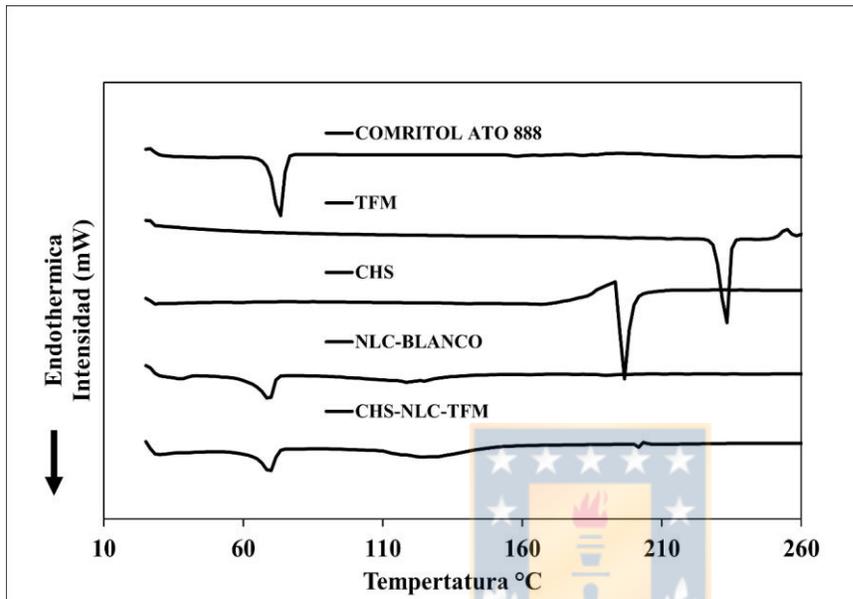
Los resultados de %EE y %DL para NLC-TFM y CHS-NLC-TFM se muestran en la Tabla 6-3. Como la %EE de NLC-TFM optimizada fue de  $85.95 \pm 2.47$  % con una %DL de  $3.97 \pm 0.01$  %, estos valores son indicativos de la buena afinidad de TFM por los componentes lipídicos de la formulación. En el caso de CHS-NLC-TFM, se redujo significativamente el %EE, un fenómeno que ha sido documentado en otros estudios cuando se funcionalizaron nanopartículas lipídicas con este material (Bishnoi et al., 2014; Ebada et al., 2022; Jain et al., 2014; Shilpi et al., 2019). Se han propuesto mecanismos para explicar este resultado, como por ejemplo, la posibilidad de lixiviación debido al aumento del tiempo en el proceso de producción del sistema de entrega de fármacos cuando se agrega la solución de CHS (Sharma & Baldi, 2018). También, se ha sugerido la competencia entre CHS y TFM por interacciones hidrofóbicas con lecitina u otros componentes lipídicos de NLC (Jain et al., 2014). Este último mecanismo

podría explicar el cómo un aumento excesivo de la proporción de CHS disminuye %EE, ya que se requiere una mayor cantidad de surfactante para estabilizar los lípidos y CHS.

#### *6.4.3 Análisis de estabilidad térmica*

DSC es una técnica termo analítica con resultados rápidos y precisos para determinar el efecto de los cambios térmicos en el estado físico y la estructura cristalina de nanopartículas basadas en lípidos (Mishra et al., 2018). La Figura 6-3 muestra un termograma DSC para TFM, Compritol ATO, CHS, NLC-no cargadas, CHS-NLC-TFM.





**Figura 6-3.** DSC del fármaco puro Teriflunomida (TFM), lípido sólido Compritol ATO, polímero de recubrimiento condroitina sulfato (CHS), muestra liofilizada de NLC no recubierto ni teriflunomida (NLC-BLANCO) y muestra liofilizada de NLC recubierto con Condroitina sulfato y cargado con teriflunomida (CHS-NLC-TFM).

El termograma mostró un pico endotérmico agudo de TFM a los 234.18°C correspondiente a su punto de fusión en el estado cristalino (rango 229 – 233°C) (Mahtab et al., 2019).

En el caso de Compritol ATO puro, exhibió un pico endotérmico en 73.34 °C correlacionado también a su punto de fusión documentado previamente (Kar et al., 2017). Este pico sigue estando presente en NLC-BLANCO y CHS-NLC-TFM a una menor intensidad, debido probablemente a la reducción de su estado

cristalino. Además de la reducción de entalpía, Compritol ATO presentó una reducción en el inicio (onset) del peak de 69 a 63 °C aprox. en ambos casos. Este cambio en el punto de fusión puede deberse a la reducción del tamaño de partículas, que al tener una mayor superficie específica su proceso de fusión se facilita en comparación al material a granel (efecto Kelvin) (Shah et al., 2016). Por otra parte, este cambio podría atribuirse a la interacción de los lípidos sólidos, el aceite y los surfactantes, lo que demuestra una correcta preparación de las NLC (Khan et al., 2016).

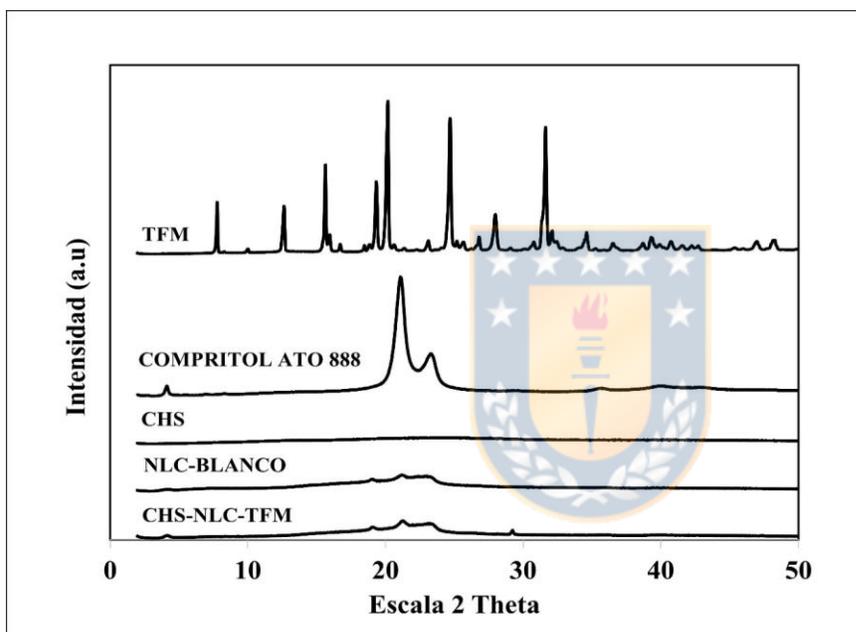
El DSC de CHS mostró un endotérmico agudo a los 197.17°C el que se puede correlacionar al punto de fusión del polímero. Para el caso de NLC-BLANCO y CHS-NLC-TFM, ambas formulaciones presentaron un termograma casi idéntico a excepción de un pequeño pico endotérmico a los 198°C aproximadamente, el cual coincide con el pico que representa a CHS.

CHS-NLC-TFM no evidenció ningún pico característico de TFM debido a que probablemente esta se dispersó molecularmente en la matriz lipídica durante el proceso de encapsulación (Zewail et al., 2022).

#### 6.4.4 Estudios PXRD

Se realizó un análisis PXRD para investigar los cambios en el proceso de cristalización de lípidos y estructura interna de la matriz lipídica y como esta es afectada por la encapsulación de TFM. Los patrones de TFM pura, Compritol,

CHS y muestras liofilizadas de NLC-BLANCO y CHS-NLC-TFM se muestran en la Figura 6-4.



**Figura 6-4.** PXRD del fármaco puro teriflunomida (TFM), lípido sólido compritol ATO, polímero de recubrimiento sulfato de condroitina (CHS), muestra liofilizada de NLC sin teriflunomida ni recubrimiento (NLC-BLANCO) y muestra liofilizada de NLC cargado con teriflunomida y recubierto con sulfato de condroitina (CHS-NLC-TFM).

TFM presentó picos prominentes y agudos en ángulo  $2^\theta$  (7.78, 12.60, 15.63, 15.96, 19.34, 20.17, 24.68, etc.) lo que demuestra su característica altamente

cristalina (D. Gadhave et al., 2021) En tanto, Compritol mostró dos picos de difracción característicos en ángulo  $2^{\theta}$  21.09 y 23.32 que corresponden al polimorfo alfa y beta' respectivamente (Jenning et al., 2000)

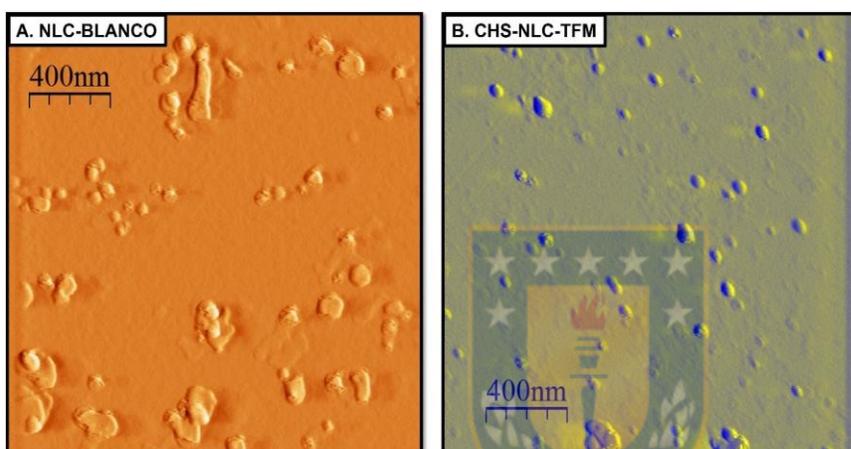
Respecto a las formulaciones, tanto NLC-BLANCO como CHS-NLC-TFM mostraron una reducción de la intensidad de reflexión los picos en 21.09 y 23.32 además de mayor amplitud en su forma, lo que indica una matriz lipídica influenciada por el fármaco (Almeida et al., 2022) También se observó un pequeño pico en  $2^{\theta}$  19.06 que es propio de la configuración polimórfica Bi de Compritol (Castro et al., 2008).

En CHS-NLC-TFM no se identifican los picos característicos de TFM a excepción de un pequeño pico en 29.1 lo que sugiere una distribución adecuada del fármaco dentro de la matriz lipídica (Almeida et al., 2022). Estos resultados coinciden con lo mostrado por el termograma de CHS-NLC-TFM donde no se identifica pico alguno de TFM por lo que se sugiere o un cambio de TFM a su estado amorfo o una buena solubilización de TFM en los componentes del NLC.

#### 6.4.5 *Análisis por AFM*

Las micrografías obtenidas por AFM de NLC-BLANCO y CHS-NLC-TFM (Figura 6-5) muestran nanopartículas de morfología predominantemente lisa y discoide. En el caso NLC-BLANCO, se observa mayor aglomeración de nanopartículas y una mayor dispersión de tamaño lo que coincide con los estudios de tamaño y

PDI (Tabla 6-3). Además, se puede explicar por el mayor PZ (en términos absolutos) que implica la carga negativa potenciada por CHS y que permite una mayor estabilidad de la nano-dispersión (Khosa et al., 2018).



**Figura 6-5.** Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de (A) NLC-BLANCO y (B) CHS-NLC-TFM.

#### 6.4.6 Estudio de liberación *in vitro*

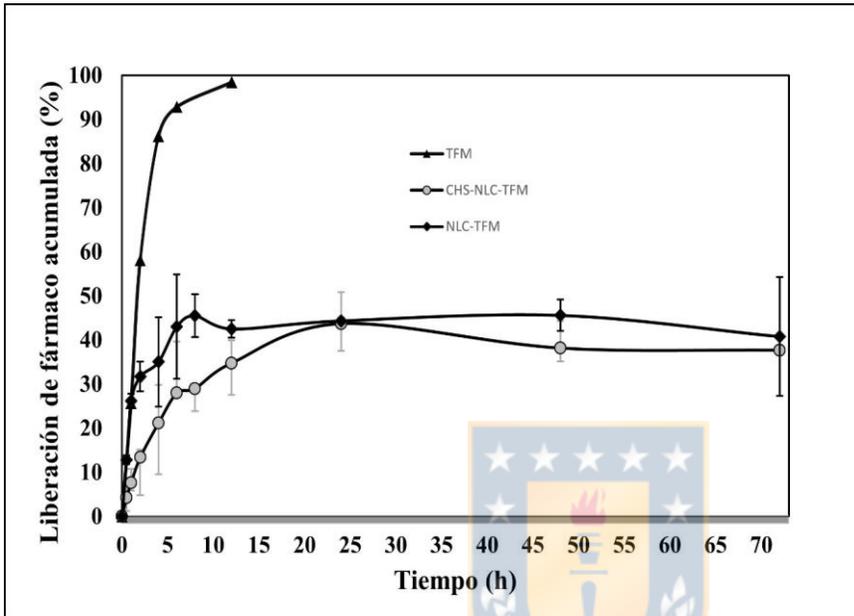
La Figura 6-6 muestra los perfiles de liberación de TFM a partir de las formulaciones NLC desarrolladas. La cantidad de TFM liberada *in vitro* desde NLC-TFM y CHS-NLC-TFM después de 72 horas fue de  $40.79 \pm 13.44\%$  y  $37.68 \pm 3.01\%$  respectivamente. Como se observa para NLC elaborados con excipientes similares. (Das et al., 2017; Pinheiro et al., 2016; Zewail et al., 2022)

Se muestra un perfil de liberación bifásico para NLC-TFM y CHS-NLC-TFM, con un efecto de explosión inicial que liberó aproximadamente un 30% de TFM en ambas formulaciones durante las primeras 4 horas. Seguido por una liberación sostenida hasta las 72 horas. Este estallido inicial suele indicar la presencia de TFM dispuesta en lugares externos del NLC y/o a un fenómeno de adsorción en la superficie de estos.(Gaspar et al., 2016).

En el caso de CHS-NLC-TFM, la liberación de fármaco es más lenta que la observada en NLC-TFM, lo que sugiere la capacidad de CHS para formar una capa externa capaz de retener el TFM ubicado en la superficie de NLC. Esta característica ha sido evidenciada en estudios previos (Shilpi et al., 2019).

En comparación con otros sistemas de liberación de nanopartículas, incluidos los NLC cargados con TFM, nuestras formulaciones muestran una liberación del fármaco ligeramente más sostenida a lo largo del tiempo (D. G. Gadhawe & Kokare, 2019; Mahtab et al., 2020; Pandey et al., 2018).

La suspensión de TFM como fármaco libre fue usada como referencia y mostró una liberación rápida, alcanzando un 98.45% en 12 horas. Por el contrario, la liberación sostenida que presentan los NLC posterior a las 12 horas podría atribuirse a la barrera lipídica proporcionada por la envoltura de fosfolípidos que en sinergia con compritol (Rudhrabatla et al., 2019), restringen la penetración del medio de liberación hacia núcleo de compritol-lecitina-trioleína, reduciendo la movilización de TFM, prolongando su liberación en el tiempo (Kar et al., 2017).



**Figura 6-6.** Liberación *in vitro* desde TFM en suspensión, NLC-TFM optimizada y CHS-NLC-TFM. Los resultados se presentan como media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes.

Se ha demostrado que las nanopartículas basadas en lípidos mejoran significativamente la eficacia de los FARMES en modelos experimentales de AR (Chuang et al., 2018). Además, los NLC tienen características biofarmacéuticas favorables, como una mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad, en comparación con los materiales poliméricos clásicos utilizados (H. Muller et al., 2011). En términos de una posible formulación destinada a la administración oral,

los NLC tienen varias ventajas, como una mayor solubilidad, permeabilidad y biodisponibilidad; la protección de la degradación química y enzimática del fármaco encapsulado (Khosa et al., 2018).

En el intestino, las NLC cargadas de fármaco se pueden absorber a través de varios mecanismos, incluida la captación directa (a través de la ruta linfática), la inducción de secreciones pancreáticas y biliares que promueven la formación de micelas y la reducción de la degradación metabólica por enzimas expresadas en enterocitos (CYP3A4) (Khan et al., 2015). Los escenarios anteriores podrían ayudar a reducir los efectos secundarios gastrointestinales de TFM. En el caso de CHS-NLC-TFN, la focalización activa y la retención se pueden mantener por vía oral, como se ha demostrado en trabajos anteriores (Zewail et al., 2019). Sin embargo, la formulación CHS-NLC-TFM puede funcionar como un sistema de administración de fármacos por vía intraarticular debido al aumento de la concentración y el tiempo de retención en la articulación afectada (Bishnoi et al., 2014; Ebada et al., 2022; Jain et al., 2014). Estos efectos se pueden mejorar combinando NLC con otros vehículos, incluidos hidrogeles o micropartículas híbridas (Shinde et al., 2016).

## 7 CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se desarrolló y optimizó un transportador lipídico nanoestructurado cargado con teriflunomida (NLC-TFM) empleando una metodología simple y en ausencia de solventes orgánicos.

La utilización de un diseño Box-Bhenken en la optimización de NLC-TFM permitió una reducción significativa en el tiempo necesario para evaluar el efecto de variables claves que inciden en el proceso de desarrollo y permitir un mejor entendimiento de este.

La formulación optimizada de NLC-TFM fue caracterizada en cuanto a su morfología y características fisicoquímica mostrando resultados adecuados.

Se logró un recubrimiento satisfactorio de la formulación optimizada con CHS, lo que representa una oportunidad para la focalización activa de la formulación en administración intraarticular u oral, pero se observó una merma sobre el %EE que deberá ser estudiada en investigaciones futuras. Teniendo en cuenta lo anterior, la hipótesis inicial se aprueba satisfactoriamente.

En conclusión, el desarrollo de NLC-TFM y la optimización de sus parámetros de formulación dan como resultado un producto con características óptimas para su prueba en modelos biológicos de inflamación antes de su uso potencial como sistema de administración oral o intraarticular para AR.

## 8 GLOSARIO

OMS: Organización Mundial de la Salud.

AR: Artritis reumatoidea.

FARME: Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.

CE: Corticoesteroides.

MTX: Metotrexato.

LEF: Leflunomida.

SFZ: Sulfasalazina.

HCQ: Hidroxicloroquina.

TFM: Teriflunomida.

DHODH: Dihidrofolato deshidrogenasa.

FDA: Food and Drug Administration.

SAF: Sistemas de administración de fármacos.

SLN: Nanopartículas lipídicas solidas

NLC: transportadores lipídicos nanoestructurados.



ELVIS: Extravasación a través de la vasculatura permeable y posterior secuestro mediado por células inflamatorias.

EPR: Efecto de retención y permeabilidad mejorada

CHS: Sulfato de condroitina.

BBD: Diseño Box-Bhenken.

NLC-TFM: Transportadores lipídicos nanoestructurados cargados con TFM.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

LD: Limite de detección

LC: Limite de cuantificación.

CHS-NLC-TFM: NLC-TFM recubierto por condroitina.

PS: Tamaño de partícula.

PDI: índice de polidispersidad.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

PXRD: Difracción de rayos X en polvo.

AFM: Microscopía de fuerza atómica.

%EE: Porcentaje de Eficiencia de encapsulación.

%DL: Porcentaje de carga del fármaco.



## 9 BIBLIOGRAFÍA

- ABURAHMA, M. H., & BADR-ELDIN, S. M. (2014). COMPRITOL 888 ATO: A MULTIFUNCTIONAL LIPID EXCIPIENT IN DRUG DELIVERY SYSTEMS AND NANOPHARMACEUTICALS. *EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY*, 11(12), 1865–1883. [HTTPS://DOI.ORG/10.1517/17425247.2014.935335](https://doi.org/10.1517/17425247.2014.935335)
- ALETAHA, D., & SMOLEN, J. S. (2018). DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS: A REVIEW. *JAMA - JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION*, 320(13), 1360–1372. [HTTPS://DOI.ORG/10.1001/JAMA.2018.13103](https://doi.org/10.1001/JAMA.2018.13103)
- ALMEIDA, O. P., DE FREITAS MARQUES, M. B., DE OLIVEIRA, J. P., DA COSTA, J. M. G., RODRIGUES, A. P., YOSHIDA, M. I., MUSSEL, W. DA N., & CARNEIRO, G. (2022). ENCAPSULATION OF SAFFLOWER OIL IN NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR FOOD APPLICATION. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 59(2), 805–814. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S13197-021-05078-5](https://doi.org/10.1007/S13197-021-05078-5)
- ASLAM, M., AQIL, M., AHAD, A., NAJMI, A. K., SULTANA, Y., & ALI, A. (2016). APPLICATION OF BOX-BEHNKEN DESIGN FOR PREPARATION OF GLIBENCLAMIDE LOADED LIPID BASED NANOPARTICLES: OPTIMIZATION, IN VITRO SKIN PERMEATION, DRUG RELEASE AND IN VIVO PHARMACOKINETIC STUDY. *JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS*, 219, 897–908. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.MOLLIQ.2016.03.069](https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2016.03.069)
- ATTAMA, A. A., & UMEYOR, C. E. (2015). THE USE OF SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR SUSTAINED DRUG RELEASE. *THERAPEUTIC DELIVERY*, 6(6), 669–684. [HTTPS://DOI.ORG/10.4155/TDE.15.23](https://doi.org/10.4155/TDE.15.23)
- BAR-OR, A., PACHNER, A., MENGUY-VACHERON, F., KAPLAN, J., & WIENDL, H. (2014). TERIFLUNOMIDE AND ITS MECHANISM OF ACTION IN MULTIPLE SCLEROSIS. *DRUGS*, 74(6), 659. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S40265-014-0212-X](https://doi.org/10.1007/S40265-014-0212-X)
- BASHIRI, S., GHANBARZADEH, B., AYASEH, A., DEGHANNYA, J., & EHSANI, A. (2020). PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-COATED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS (CH-NLC) CONTAINING CINNAMON ESSENTIAL OIL FOR ENRICHING MILK AND ANTI-OXIDANT ACTIVITY. *LWT*, 119, 108836. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.LWT.2019.108836](https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108836)
- BISHNOI, M., JAIN, A., HURKAT, P., & JAIN, S. K. (2014). ACECLOFENAC-LOADED CHONDROITIN SULFATE CONJUGATED SLNS FOR EFFECTIVE MANAGEMENT OF OSTEOARTHRITIS. *JOURNAL OF DRUG TARGETING*, 22(9), 805–812. [HTTPS://DOI.ORG/10.3109/1061186X.2014.928714](https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.928714)
- BOHANEČ GRABAR, P., GRABNAR, I., ROZMAN, B., LOGAR, D., TOMŠIČ, M., ŠUPUT, D., TRDAN, T., PETERLIN MAŠIČ, L., MRHAR, A., & DOLŽAN, V. (2009). INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF CYP1A2 AND CYP2C19 GENETIC POLYMORPHISM ON 2-CYANO-3-HYDROXY-N-[4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]-2-BUTENAMIDE (A77 1726) PHARMACOKINETICS IN LEFLUNOMIDE-TREATED PATIENTS WITH RHEUMATOID

- ARTHRITIS. *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, 37(10), 2061–2068.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.1124/DMD.109.027482](https://doi.org/10.1124/DMD.109.027482)
- BOISSIER, M. C., SEMERANO, L., CHALLAL, S., SAIDENBERG-KERMANAC'H, N., & FALGARONE, G. (2012). RHEUMATOID ARTHRITIS: FROM AUTOIMMUNITY TO SYNOVITIS AND JOINT DESTRUCTION. *JOURNAL OF AUTOIMMUNITY*, 39(3), 222–228.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JAUT.2012.05.021](https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2012.05.021)
- BULLOCK, J., RIZVI, S. A. A., SALEH, A. M., AHMED, S. S., DO, D. P., ANSARI, R. A., & AHMED, J. (2019). RHEUMATOID ARTHRITIS: A BRIEF OVERVIEW OF THE TREATMENT. IN *MEDICAL PRINCIPLES AND PRACTICE* (VOL. 27, ISSUE 6, PP. 501–507). S. KARGER AG. [HTTPS://DOI.ORG/10.1159/000493390](https://doi.org/10.1159/000493390)
- BURGER, D. (2003). THE ACTIVE METABOLITE OF LEFLUNOMIDE, A77 1726, INHIBITS THE PRODUCTION OF PROSTAGLANDIN E2, MATRIX METALLOPROTEINASE 1 AND INTERLEUKIN 6 IN HUMAN FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES. *RHEUMATOLOGY*, 42(1), 89–96. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEG038](https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEG038)
- BURMESTER, G. R., & POPE, J. E. (2017). NOVEL TREATMENT STRATEGIES IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *THE LANCET*, 389(10086), 2338–2348.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0140-6736\(17\)31491-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31491-5)
- CASTRO, G. A., FERREIRA, L. A. M., ORÉFICE, R. L., & BUONO, V. T. L. (2008). CHARACTERIZATION OF A NEW SOLID LIPID NANOPARTICLE FORMULATION CONTAINING RETINOIC ACID FOR TOPICAL TREATMENT OF ACNE. *POWDER DIFFRACTION*, 23(S1), S30–S35. [HTTPS://DOI.ORG/10.1154/1.2903515](https://doi.org/10.1154/1.2903515)
- CHAURASIA, N., SINGH, A., SINGH, I., SINGH, T., & TIWARI, T. (2020). COGNITIVE DYSFUNCTION IN PATIENTS OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *JOURNAL OF FAMILY MEDICINE AND PRIMARY CARE*, 9(5), 2219.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.4103/JFMPC.JFMPC\\_307\\_20](https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_307_20)
- CHUANG, S. Y., LIN, C. H., HUANG, T. H., & FANG, J. Y. (2018). LIPID-BASED NANOPARTICLES AS A POTENTIAL DELIVERY APPROACH IN THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *NANOMATERIALS*, 8(1), 42.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.3390/NANO8010042](https://doi.org/10.3390/NANO8010042)
- DA SILVA, I. M., BOELTER, J. F., DA SILVEIRA, N. P., & BRANDELLI, A. (2014). PHOSPHATIDYLCHOLINE NANOVESICLES COATED WITH CHITOSAN OR CHONDROITIN SULFATE AS NOVEL DEVICES FOR BACTERIOCIN DELIVERY. *JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH*, 16(7), 1–10.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S11051-014-2479-Y](https://doi.org/10.1007/S11051-014-2479-Y)
- DAS, S., GHOSH, S., DE, A. K., & BERA, T. (2017). ORAL DELIVERY OF URSOLIC ACID-LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER COATED WITH CHITOSAN OLIGOSACCHARIDES: DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION, IN VITRO AND IN VIVO ASSESSMENT FOR THE THERAPY OF LEISHMANIASIS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 102, 996–1008.  
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.098](https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.098)

- DE SOUZA GUEDES, L., MARTINEZ, R. M., BOU-CHACRA, N. A., VELASCO, M. V. R., ROSADO, C., & BABY, A. R. (2021). AN OVERVIEW ON TOPICAL ADMINISTRATION OF CAROTENOIDS AND COENZYME Q10 LOADED IN LIPID NANOPARTICLES. *ANTIOXIDANTS*, 10(7), 1034. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/ANTIOX10071034](https://doi.org/10.3390/antiox10071034)
- DEANE, K. D., & HOLERS, V. M. (2019). THE NATURAL HISTORY OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *CLINICAL THERAPEUTICS*, 41(7), 1256–1269. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CLINTHERA.2019.04.028](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.04.028)
- DERKSEN, V. F. A. M., HUIZINGA, T. W. J., & VAN DER WOUDE, D. (2017). THE ROLE OF AUTOANTIBODIES IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF RHEUMATOID ARTHRITIS. IN *SEMINARS IN IMMUNOPATHOLOGY* (VOL. 39, ISSUE 4, PP. 437–446). SPRINGER VERLAG. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00281-017-0627-Z](https://doi.org/10.1007/s00281-017-0627-z)
- DUQUETTE, A., FRENETTE, A. J., & DORÉ, M. (2016). CHRONIC DIARRHEA ASSOCIATED WITH HIGH TERIFLUNOMIDE BLOOD CONCENTRATION. *RHEUMATOLOGY AND THERAPY*, 3(1), 179–185. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S40744-016-0025-3](https://doi.org/10.1007/s40744-016-0025-3)
- EBADA, H. M. K., NASRA, M. M. A., NASSRA, R. A., & ABDALLAH, O. Y. (2022). CHONDROITIN SULFATE-FUNCTIONALIZED LIPID NANORESERVOIRS: A NOVEL CARTILAGE-TARGETING APPROACH FOR INTRA-ARTICULAR DELIVERY OF CASSIC ACID FOR OSTEOARTHRITIS TREATMENT. *DRUG DELIVERY*, 29(1), 652–663. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/10717544.2022.2041130](https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2041130)
- ELMOWAFY, M., SHALABY, K., BADRAN, M. M., ALI, H. M., ABDEL-BAKKY, M. S., & IBRAHIM, H. M. (2018). MULTIFUNCTIONAL CARBAMAZEPINE LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER (NLC) FORMULATION. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 550(1–2), 359–371. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJPHARM.2018.08.062](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.062)
- EMAMI, J., & ANSARYPOUR, Z. (2019). RECEPTOR TARGETING DRUG DELIVERY STRATEGIES AND PROSPECTS IN THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *RESEARCH IN PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 14(6), 471–487. [HTTPS://DOI.ORG/10.4103/1735-5362.272534](https://doi.org/10.4103/1735-5362.272534)
- ENGLISH, C., & ALOI, J. J. (2015). NEW FDA-APPROVED DISEASE-MODIFYING THERAPIES FOR MULTIPLE SCLEROSIS. IN *CLINICAL THERAPEUTICS* (VOL. 37, ISSUE 4, PP. 691–715). EXCERPTA MEDICA INC. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CLINTHERA.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.03.001)
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. (2013). *ASSESSMENT REPORT: "AUBAGIO; INN-TERIFLUNOMIDE"* (VOL. 44, ISSUE JUNE).
- FANALI, S., HADDAD, P., POOLE, C., & RIEKKOLA, M.-L. (2017). LIQUID CHROMATOGRAPHY FUNDAMENTALS AND INSTRUMENTATION. IN C. F. POOLE (ED.), *LIQUID CHROMATOGRAPHY* (SECOND EDI). [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/B978-0-12-805393-5.09993-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.09993-0)
- FIRESTEIN, G. S., & MCINNES, I. B. (2017). IMMUNOPATHOGENESIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *IMMUNITY*, 46(2), 183–196. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IMMUNI.2017.02.006](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006)

- FRAGOSO, Y. D., & BROOKS, J. B. B. (2015). LEFLUNOMIDE AND TERIFLUNOMIDE: ALTERING THE METABOLISM OF PYRIMIDINES FOR THE TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES. *EXPERT REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY*, 8(3), 315–320. [HTTPS://DOI.ORG/10.1586/17512433.2015.1019343](https://doi.org/10.1586/17512433.2015.1019343)
- GADHAVE, D. G., & KOKARE, C. R. (2019). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS ENGINEERED FOR INTRANASAL DELIVERY OF TERIFLUNOMIDE IN MULTIPLE SCLEROSIS: OPTIMIZATION AND *IN VIVO* STUDIES. *DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY*, 45(5), 839–851. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/03639045.2019.1576724](https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1576724)
- GADHAVE, D., RASAL, N., SONAWANE, R., SEKAR, M., & KOKARE, C. (2021). NOSE-TO-BRAIN DELIVERY OF TERIFLUNOMIDE-LOADED LIPID-BASED CARBOPOL-GELLAN GUM NANOGEL FOR GLIOMA: PHARMACOLOGICAL AND *IN VITRO* CYTOTOXICITY STUDIES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 167, 906–920. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.11.047](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.047)
- GASPAR, D. P., FARIA, V., GONÇALVES, L. M. D., TABOADA, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., & ALMEIDA, A. J. (2016). RIFABUTIN-LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR INHALED ANTITUBERCULAR THERAPY: PHYSICOCHEMICAL AND *IN VITRO* STUDIES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 497(1–2), 199–209. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJPHARM.2015.11.050](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.050)
- GORANTLA, S., SINGHVI, G., RAPALLI, V. K., WAGHULE, T., DUBEY, S. K., & SAHA, R. N. (2020). TARGETED DRUG-DELIVERY SYSTEMS IN THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS: RECENT ADVANCEMENT AND CLINICAL STATUS. *THERAPEUTIC DELIVERY*, 11(4), 269–284. [HTTPS://DOI.ORG/10.4155/TDE-2020-0029](https://doi.org/10.4155/TDE-2020-0029)
- GORDILLO-GALEANO, A., & MORA-HUERTAS, C. E. (2018). SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: A REVIEW EMPHASIZING ON PARTICLE STRUCTURE AND DRUG RELEASE. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS*, 133, 285–308. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.EJPB.2018.10.017](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017)
- GOWDA, D. V., SURYA TEJ, K. V. M., MOIN, A., ANJALI, KARUNAKAR, G., PATEL, N. P., & KAMAL, S. S. (2016). NANO STRUCTURED LIPID CARRIER BASED DRUG DELIVERY SYSTEM. *JOURNAL OF CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL RESEARCH*, 8(2), 627–643.
- GUARNERA, C., BRAMANTI, P., & MAZZON, E. (2017). COMPARISON OF EFFICACY AND SAFETY OF ORAL AGENTS FOR THE TREATMENT OF RELAPSING–REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS. *DRUG DESIGN, DEVELOPMENT AND THERAPY*, 11, 2193–2207. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/DDDT.S137572](https://doi.org/10.2147/DDDT.S137572)
- GUILHERME, V. A., RIBEIRO, L. N. M., ALCÂNTARA, A. C. S., CASTRO, S. R., RODRIGUES DA SILVA, G. H., DA SILVA, C. G., BREITKREITZ, M. C., CLEMENTE-NAPIMOGA, J., MACEDO, C. G., ABDALLA, H. B., BONFANTE, R., CEREDA, C. M. S., & DE PAULA, E. (2019). IMPROVED EFFICACY OF NAPROXEN-LOADED NLC FOR TEMPOROMANDIBULAR JOINT ADMINISTRATION. *SCIENTIFIC REPORTS*, 9(1). [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-019-47486-W](https://doi.org/10.1038/S41598-019-47486-W)

- H. MULLER, R., SHEGOKAR, R., & M. KECK, C. (2011). 20 YEARS OF LIPID NANOPARTICLES (SLN & NLC): PRESENT STATE OF DEVELOPMENT & INDUSTRIAL APPLICATIONS. *CURRENT DRUG DISCOVERY TECHNOLOGIES*, 8(3), 207–227. [HTTPS://DOI.ORG/10.2174/157016311796799062](https://doi.org/10.2174/157016311796799062)
- HAIDER, M., ABDIN, S. M., KAMAL, L., & ORIVE, G. (2020). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR DELIVERY OF CHEMOTHERAPEUTICS: A REVIEW. *PHARMACEUTICS*, 12(3), 288. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/PHARMACEUTICS12030288](https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12030288)
- ICH EXPERT WORKING GROUP. (2003). STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS Q1A(R2). *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES REVIEW AND RESEARCH*, 2, 18. [HTTPS://DOI.ORG/10.1136/BMJ.333.7574.873-A](https://doi.org/10.1136/BMJ.333.7574.873-A)
- JAIN, A., MISHRA, S. K., VUDDANDA, P. R., SINGH, S. K., SINGH, R., & SINGH, S. (2014). TARGETING OF DIACEREIN LOADED LIPID NANOPARTICLES TO INTRA-ARTICULAR CARTILAGE USING CHONDROITIN SULFATE AS HOMING CARRIER FOR TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS IN RATS. *NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY, AND MEDICINE*, 10(5), E1031–E1040. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NANO.2014.01.008](https://doi.org/10.1016/J.NANO.2014.01.008)
- JANAKIRAMAN, K., KRISHNASWAMI, V., RAJENDRAN, V., NATESAN, S., & KANDASAMY, R. (2018). NOVEL NANO THERAPEUTIC MATERIALS FOR THE EFFECTIVE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS-RECENT INSIGHTS. *MATERIALS TODAY COMMUNICATIONS*, 17, 200–213. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.MTCOMM.2018.09.011](https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2018.09.011)
- JENNING, V., THÜNEMANN, A. F., & GOHLA, S. H. (2000). CHARACTERISATION OF A NOVEL SOLID LIPID NANOPARTICLE CARRIER SYSTEM BASED ON BINARY MIXTURES OF LIQUID AND SOLID LIPIDS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 199(2), 167–177. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0378-5173\(00\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00378-1)
- KAMINSKY, Z. A., TANG, T., WANG, S.-C., PTAK, C., OH, G. H. T., WONG, A. H. C., FELDCAMP, L. A., VIRTANEN, C., HALFVARSON, J., TYSK, C., MCRAE, A. F., VISSCHER, P. M., MONTGOMERY, G. W., GOTTESMAN, I. I., MARTIN, N. G., & PETRONIS, A. (2009). *DNA METHYLATION PROFILES IN MONOZYGOTIC AND DIZYGOTIC TWINS*. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NG.286](https://doi.org/10.1038/NG.286)
- KAR, N., CHAKRABORTY, S., DE, A. K., GHOSH, S., & BERA, T. (2017). DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A CEDROL-LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER SYSTEM FOR IN VITRO AND IN VIVO SUSCEPTIBILITIES OF WILD AND DRUG RESISTANT LEISHMANIA DONOVANI AMASTIGOTES. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 104, 196–211. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.EJPS.2017.03.046](https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2017.03.046)
- KEEN, H. I., CONAGHAN, P. G., & TETT, S. E. (2013). SAFETY EVALUATION OF LEFLUNOMIDE IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *EXPERT OPINION ON DRUG SAFETY*, 12(4), 581–588. [HTTPS://DOI.ORG/10.1517/14740338.2013.798299](https://doi.org/10.1517/14740338.2013.798299)
- KHAN, S., BABOOTA, S., ALI, J., KHAN, S., NARANG, R. S., & NARANG, J. K. (2015). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: AN EMERGING PLATFORM FOR IMPROVING

- ORAL BIOAVAILABILITY OF LIPOPHILIC DRUGS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL INVESTIGATION*, 5(4), 182–191. [HTTPS://DOI.ORG/10.4103/2230-973X.167661](https://doi.org/10.4103/2230-973X.167661)
- KHAN, S., SHAHARYAR, M., FAZIL, M., BABOOTA, S., & ALI, J. (2016). TACROLIMUS-LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR ORAL DELIVERY – OPTIMIZATION OF PRODUCTION AND CHARACTERIZATION. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS*, 108, 277–288. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.EJPB.2016.07.017](https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2016.07.017)
- KHOSA, A., REDDI, S., & SAHA, R. N. (2018). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR SITE-SPECIFIC DRUG DELIVERY. *BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY*, 103, 598–613. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.BIOPHA.2018.04.055](https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.04.055)
- KIM, M.-H., KIM, K.-T., SOHN, S.-Y., LEE, J.-Y., LEE, C. H., YANG, H., LEE, B. K., LEE, K. W., & KIM, D.-D. (2019). FORMULATION AND EVALUATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLCS) OF 20(S)-PROTOPANAXADIOL (PPD) BY BOX-BEHNKEN DESIGN. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE*, 14, 8509. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/IJN.S215835](https://doi.org/10.2147/IJN.S215835)
- KISS, E. L., BERKÓ, S., GÁCSI, A., KOVÁCS, A., KATONA, G., SOÓS, J., CSÁNYI, E., GRÓF, I., HARAZIN, A., DELI, M. A., & BUDAI-SZÚCS, M. (2019). DESIGN AND OPTIMIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER CONTAINING DEXAMETHASONE FOR OPHTHALMIC USE. *PHARMACEUTICS*, 11(12). [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/PHARMACEUTICS11120679](https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11120679)
- KOENDERS, M. I., & VAN DEN BERG, W. B. (2015). NOVEL THERAPEUTIC TARGETS IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES*, 36(4), 189–195. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.TIPS.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2015.02.001)
- KÖHLER, B. M., GÜNTHER, J., KAUDEWITZ, D., & LORENZ, H. M. (2019). CURRENT THERAPEUTIC OPTIONS IN THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE* 2019, VOL. 8, PAGE 938, 8(7), 938. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/JCM8070938](https://doi.org/10.3390/JCM8070938)
- KUNAL, J., SUMEET, S., & KUPPUSAMY, G. (2015). OPTIMIZATION OF ARTEMETHER-LOADED NLC FOR INTRANASAL DELIVERY USING CENTRAL COMPOSITE DESIGN. *DRUG DELIVERY*, 22(7), 940–954. [HTTPS://DOI.ORG/10.3109/10717544.2014.885999](https://doi.org/10.3109/10717544.2014.885999)
- LIU, L., GUO, W., & LIANG, X.-J. (2019). MOVE TO NANO-ARTHROLOGY: TARGETED STIMULI-RESPONSIVE NANOMEDICINES COMBAT ADAPTIVE TREATMENT TOLERANCE (ATT) OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *BIOTECHNOLOGY JOURNAL*, 14(1), 1800024. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/BIOT.201800024](https://doi.org/10.1002/BIOT.201800024)
- LIU, X., ZENG, B., ZHANG, J., LI, W., MOU, F., WANG, H., ZOU, Q., ZHONG, B., WU, L., WEI, H., & FANG, Y. (2016). ROLE OF THE GUT MICROBIOME IN MODULATING ARTHRITIS PROGRESSION IN MICE OPEN. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/SREP30594](https://doi.org/10.1038/SREP30594)
- MAHTAB, A., RABBANI, S. A., NEUPANE, Y. R., PANDEY, S., AHMAD, A., KHAN, M. A., GUPTA, N., MADAAN, A., JAGGI, M., SANDAL, N., RAWAT, H., AQIL, M., &

- TALEGAONKAR, S. (2020). FACILE FUNCTIONALIZATION OF TERIFLUNOMIDE-LOADED NANOLIPOSOMES WITH CHONDROITIN SULPHATE FOR THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 250, 116926. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CARBPOL.2020.116926](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116926)
- MAHTAB, A., RIZWANULLAH, M., PANDEY, S., LEEKHA, A., RABBANI, S. A., VERMA, A. K., AQIL, M., & TALEGAONKAR, S. (2019). QUALITY BY DESIGN DRIVEN DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF TERIFLUNOMIDE LOADED NANOLIPOSOMES FOR TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS: AN IN VITRO AND IN VIVO ASSESSMENTS. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 51(OCTOBER 2018), 383–396. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JDDST.2019.03.008](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.008)
- MARTINS, S., THO, I., SOUTO, E., FERREIRA, D., & BRANDL, M. (2012). MULTIVARIATE DESIGN FOR THE EVALUATION OF LIPID AND SURFACTANT COMPOSITION EFFECT FOR OPTIMISATION OF LIPID NANOPARTICLES. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 45(5), 613–623. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.EJPS.2011.12.015](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.12.015)
- MILLER, A. E. (2015). TERIFLUNOMIDE: A ONCE-DAILY ORAL MEDICATION FOR THE TREATMENT OF RELAPSING FORMS OF MULTIPLE SCLEROSIS. *CLINICAL THERAPEUTICS*, 37(10), 2366–2380. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CLINTHERA.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.08.003)
- MISHRA, V., BANSAL, K. K., VERMA, A., YADAV, N., THAKUR, S., SUDHAKAR, K., & ROSENHOLM, J. M. (2018). SOLID LIPID NANOPARTICLES: EMERGING COLLOIDAL NANO DRUG DELIVERY SYSTEMS. *PHARMACEUTICS*, 10(4), 1–21. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/PHARMACEUTICS10040191](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040191)
- MONTENEGRO, L., LAI, F., OFFERTA, A., SARPIETRO, M. G., MICICCHÈ, L., MACCIONI, A. M., VALENTI, D., & FADDA, A. M. (2016). FROM NANOEMULSIONS TO NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: A RELEVANT DEVELOPMENT IN DERMAL DELIVERY OF DRUGS AND COSMETICS. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 32, 100–112. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JDDST.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.10.003)
- MUEHLER, A., KOHLHOF, H., GROEPEL, M., & VITT, D. (2019). THE SELECTIVE ORAL IMMUNOMODULATOR VIDOFUDIMUS IN PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS: SAFETY RESULTS FROM THE COMPONENT STUDY. *DRUGS IN R AND D*, 19(4), 351–366. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S40268-019-00286-Z](https://doi.org/10.1007/s40268-019-00286-z)
- MÜLLER, R. H., RADTKE, M., & WISSING, S. A. (2002). SOLID LIPID NANOPARTICLES (SLN) AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLC) IN COSMETIC AND DERMATOLOGICAL PREPARATIONS. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 54(SUPPL.), S131–S155. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0169-409X\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00118-7)
- NASRA, S., BHATIA, D., & KUMAR, A. (2022). RECENT ADVANCES IN NANOPARTICLE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR RHEUMATOID ARTHRITIS TREATMENT. IN *NANOSCALE ADVANCES* (VOL. 4, ISSUE 17, PP. 3479–3494). ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. [HTTPS://DOI.ORG/10.1039/D2NA00229A](https://doi.org/10.1039/D2NA00229A)

- NGUYEN, V. H., THUY, V. N., VAN, T. V., DAO, A. H., & LEE, B. J. (2022). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS FOR VERSATILE DRUG DELIVERY VIA ORAL ADMINISTRATION. *OPENNANO*, 8, 100064. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.ONANO.2022.100064](https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100064)
- NNAMANI, P. O., HANSEN, S., WINDBERGS, M., & LEHR, C. M. (2014). DEVELOPMENT OF ARTEMETHER-LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER (NLC) FORMULATION FOR TOPICAL APPLICATION. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 477(1–2), 208–217. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJPHARM.2014.10.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.004)
- OH, J., & O'CONNOR, P. W. (2013). TERIFLUNOMIDE. *NEUROLOGY: CLINICAL PRACTICE*, 3(3), 254–260. [HTTPS://DOI.ORG/10.1212/CPJ.0B013E318296F299](https://doi.org/10.1212/CPJ.0B013E318296F299)
- OSIRI, M., SHEA, B., WELCH, V., SUAREZ-ALMAZOR, M. E., STRAND, V., TUGWELL, P., & WELLS, G. A. (2002). LEFLUNOMIDE FOR THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS*, 2010(7). [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/14651858.CD002047](https://doi.org/10.1002/14651858.CD002047)
- PANDEY, S., KUMAR, V., LEEKHA, A., RAI, N., AHMAD, F. J., VERMA, A. K., & TALEGAONKAR, S. (2018). CO-DELIVERY OF TERIFLUNOMIDE AND METHOTREXATE FROM HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS: IN VITRO CHARACTERIZATION, PHARMACODYNAMIC AND BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS. *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, 35(11), 1–17. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S11095-018-2478-2](https://doi.org/10.1007/S11095-018-2478-2)
- PANDIAN, S. R. K., PAVADAI, P., VELLAISAMY, S., RAVISHANKAR, V., PALANISAMY, P., SUNDAR, L. M., CHANDRAMOHAN, V., SANKARANARAYANAN, M., PANNEERSELVAM, T., & KUNJIAPPAN, S. (2020). FORMULATION AND EVALUATION OF RUTIN-LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF BRAIN TUMOR. *NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY*. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00210-020-02015-9](https://doi.org/10.1007/S00210-020-02015-9)
- PAPADOPOULOU, A., KAPPOS, L., & SPRENGER, T. (2015). SAFETY OF TERIFLUNOMIDE FOR THE MANAGEMENT OF RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS. *EXPERT OPINION ON DRUG SAFETY*, 14(5), 749–759. [HTTPS://DOI.ORG/10.1517/14740338.2015.1014795](https://doi.org/10.1517/14740338.2015.1014795)
- PERIS-VICENTE, J., ESTEVE-ROMERO, J., & CARDA-BROCH, S. (2015). VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BASED ON CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES: AN OVERVIEW. IN *ANALYTICAL SEPARATION SCIENCE* (PP. 1757–1808). WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/9783527678129.ASSEP064](https://doi.org/10.1002/9783527678129.ASSEP064)
- PINHEIRO, M., RIBEIRO, R., VIEIRA, A., ANDRADE, F., & REIS, S. (2016). DESIGN OF A NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER INTENDED TO IMPROVE THE TREATMENT OF TUBERCULOSIS. *DRUG DESIGN, DEVELOPMENT AND THERAPY*, 10, 2467–2475. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/DDDT.S104395](https://doi.org/10.2147/DDDT.S104395)
- PIRMARDVAND CHEGINI, S., VARSHOSAZ, J., & TAYMOURI, S. (2018). RECENT APPROACHES FOR TARGETED DRUG DELIVERY IN RHEUMATOID ARTHRITIS

- DIAGNOSIS AND TREATMENT. *ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY*, 46(SUP2), 502–514. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/21691401.2018.1460373](https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1460373)
- RABIE, A. M. (2023). *TERIFLUNOMIDE AND COVID-19: A FRIEND OR FOE?!* 12(1), 24. [HTTPS://DOI.ORG/10.33263/LIANBS121.024](https://doi.org/10.33263/LIANBS121.024)
- RAINA, H., KAUR, S., & JINDAL, A. B. (2017). DEVELOPMENT OF EFAVIRENZ LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES: RISK ASSESSMENT, QUALITY-BY-DESIGN (QBD) BASED OPTIMISATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISATION. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 39, 180–191. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JDDST.2017.02.013](https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2017.02.013)
- RUDHRABATLA, V. S. A. P., SUDHAKAR, B., & REDDY, K. V. N. S. (2019). IN VITRO AND IN VIVO ASSESSMENT OF DESIGNED MELPHALAN LOADED STEALTH SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR PARENTERAL DELIVERY. *BIONANOSCIENCE 2019 10:1*, 10(1), 168–190. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S12668-019-00680-6](https://doi.org/10.1007/S12668-019-00680-6)
- SALVI, V. R., & PAWAR, P. (2019). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLC) SYSTEM: A NOVEL DRUG TARGETING CARRIER. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 51, 255–267. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JDDST.2019.02.017](https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.02.017)
- SANKAR, R., RAVISANKAR, P., NAGA NAVYA, C., PRAVALLIKA, D., & NAVYA, D. (2015). A REVIEW ON STEP-BY-STEP ANALYTICAL METHOD VALIDATION CONTROLLING HYPERTENSION: A BRIEF REVIEW VIEW PROJECT A REVIEW ON STEP-BY-STEP ANALYTICAL METHOD VALIDATION VIEW PROJECT A REVIEW ON STEP-BY-STEP ANALYTICAL METHOD VALIDATION. IN *IOSR JOURNAL OF PHARMACY* (VOL. 5, ISSUE 10). [WWW.IOSRPHR.ORG](http://WWW.IOSRPHR.ORG)
- SCHERER, H. U., HÄUPL, T., & BURMESTER, G. R. (2020). THE ETIOLOGY OF RHEUMATOID ARTHRITIS. IN *JOURNAL OF AUTOIMMUNITY* (VOL. 110, P. 102400). ACADEMIC PRESS. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JAUT.2019.102400](https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2019.102400)
- SHAH, B., KHUNT, D., BHATT, H., MISRA, M., & PADH, H. (2016). INTRANASAL DELIVERY OF VENLAFAXINE LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER: RISK ASSESSMENT AND QBD BASED OPTIMIZATION. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 33, 37–50. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JDDST.2016.03.008](https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2016.03.008)
- SHARMA, A., & BALDI, A. (2018). NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: A REVIEW COMPREHENSIVE REGULATORY GUIDELINES FOR RADIOPHARMACEUTICALS VIEW PROJECT ARTIFICIAL INTELLIGENCE FOR HERBAL DRUGS VIEW PROJECT NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: A REVIEW. *JOURNAL OF DEVELOPING DRUGS*. [HTTPS://DOI.ORG/10.4172/2329-6631.1000191](https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000191)
- SHILPI, S., UPADHAYE, S., SHIVVEDI, R., GURNANY, E., CHIMANIYA, P., SINGH, A., CHOUHAN, M., & KHATRI, K. (2019). CHONDROITIN SULPHATE MEDIATED TARGETED DELIVERY OF METHOTREXATE AND ACECLOFENAC TO THE JOINTS FOR EFFECTIVE MANAGEMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *ASIAN JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY*, 5(3), 495–502.

[HTTPS://DOI.ORG/10.31024/AJPP.2019.5.3.10](https://doi.org/10.31024/AJPP.2019.5.3.10)

- SHINDE, C. G., PRAMOD KUMAR, T. M., VENKATESH, M. P., RAJESH, K. S., SRIVASTAVA, A., OSMANI, R. A. M., & SONAWANE, Y. H. (2016). INTRA-ARTICULAR DELIVERY OF A METHOTREXATE LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER BASED SMART GEL FOR EFFECTIVE TREATMENT OF RHEUMATIC DISEASES. *RSC ADVANCES*, 6(16), 12913–12923. [HTTPS://DOI.ORG/10.1039/C5RA22672D](https://doi.org/10.1039/C5RA22672D)
- SONI, K., RIZWANULLAH, M., & KOHLI, K. (2017). DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF SULFORAPHANE-LOADED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS BY THE BOX-BEHNKEN DESIGN FOR IMPROVED ORAL EFFICACY AGAINST CANCER: IN VITRO, EX VIVO AND IN VIVO ASSESSMENTS. *HTTPS://DOI.ORG/10.1080/21691401.2017.1408124*, 46(SUP1), 15–31. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/21691401.2017.1408124](https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1408124)
- SUBRAMANIAM, B., SIDDIK, Z. H., & NAGOOR, N. H. (2020). OPTIMIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS: UNDERSTANDING THE TYPES, DESIGNS, AND PARAMETERS IN THE PROCESS OF FORMULATIONS. *JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH*, 22(6). [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S11051-020-04848-0](https://doi.org/10.1007/S11051-020-04848-0)
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. (2007). *FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA: FORMULARIO NACIONAL* (VOL. 2). [WWW.USP.ORG](http://www.usp.org).]
- TRUJILLO, C. C., & WRIGHT, A. J. (2010). SOLID LIPID NANOPARTICLES: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS. *JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY*, 87(7), 165–196. [HTTPS://DOI.ORG/10.1039/9781847550842-00103](https://doi.org/10.1039/9781847550842-00103)
- ÜNER, M., & YENER, G. (2007). IMPORTANCE OF SOLID LIPID NANOPARTICLES (SLN) IN VARIOUS ADMINISTRATION ROUTES AND FUTURE PERSPECTIVES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE*, 2(3), 289–300.
- VAN DEN HOVEN, J. M., VAN TOMME, S. R., METSELAAR, J. M., NUIJEN, B., BEIJNEN, J. H., & STORM, G. (2011). LIPOSOMAL DRUG FORMULATIONS IN THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, 8(4), 1002–1015. [HTTPS://DOI.ORG/10.1021/MP2000742](https://doi.org/10.1021/MP2000742)
- VAN ROON, E. N., JANSEN, T. L. T. A., MOURAD, L., HOUTMAN, P. M., BRUYN, G. A. W., GRIEP, E. N., WILFFERT, B., TOBI, H., & BROUWERE, J. R. B. J. (2004). LEFLUNOMIDE IN ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS: A PROSPECTIVE STUDY IN DAILY PRACTICE. *BRITISH JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY*, 57(6), 790–797. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1365-2125.2004.02075.X](https://doi.org/10.1111/J.1365-2125.2004.02075.X)
- VARGASON, A. M., ANSELMO, A. C., & MITRAGOTRI, S. (2021). THE EVOLUTION OF COMMERCIAL DRUG DELIVERY TECHNOLOGIES. IN *NATURE BIOMEDICAL ENGINEERING* (VOL. 5, ISSUE 9, PP. 951–967). NATURE RESEARCH. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41551-021-00698-W](https://doi.org/10.1038/S41551-021-00698-W)
- WANG, F., CHEN, L., JIANG, S., HE, J., ZHANG, X., PENG, J., XU, Q., & LI, R. (2014).

- OPTIMIZATION OF METHAZOLAMIDE-LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR OPHTHALMIC DELIVERY USING BOX-BEHNKEN DESIGN. *JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH*, 24(3), 171–181. [HTTPS://DOI.ORG/10.3109/08982104.2014.891231](https://doi.org/10.3109/08982104.2014.891231)
- WANG, L., WEI, Z., XUE, C., TANG, Q., ZHANG, T., CHANG, Y., & WANG, Y. (2022). FUCOXANTHIN-LOADED NANOPARTICLES COMPOSED OF GLIADIN AND CHONDROITIN SULFATE: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND STABILITY. *FOOD CHEMISTRY*, 379, 132163. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132163](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132163)
- WANG, Q., & SUN, X. (2017). RECENT ADVANCES IN NANOMEDICINES FOR THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *BIOMATERIALS SCIENCE*, 5(8), 1407–1420. [HTTPS://DOI.ORG/10.1039/C7BM00254H](https://doi.org/10.1039/C7BM00254H)
- WARNKE, C., STÜVE, O., & KIESEIER, B. C. (2013). TERIFLUNOMIDE FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS. *CLINICAL NEUROLOGY AND NEUROSURGERY*, 115(SUPPL.1), S90–S94. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CLINEURO.2013.09.030](https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.09.030)
- WIESE, M. D., ROWLAND, A., POLASEK, T. M., SORICH, M. J., & O'DOHERTY, C. (2013). PHARMACOKINETIC EVALUATION OF TERIFLUNOMIDE FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS. *EXPERT OPINION ON DRUG METABOLISM AND TOXICOLOGY*, 1025–1035. [HTTPS://DOI.ORG/10.1517/17425255.2014.894019](https://doi.org/10.1517/17425255.2014.894019)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2016). *CHRONIC RHEUMATIC CONDITIONS*. [HTTPS://WWW.WHO.INT/CHP/TOPICS/RHEUMATIC/EN/](https://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/)
- YANG, M., FENG, X., DING, J., CHANG, F., & CHEN, X. (2017). NANOTHERAPEUTICS RELIEVE RHEUMATOID ARTHRITIS. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 252, 108–124. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JCONREL.2017.02.032](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.032)
- ZEWAIL, M., EL-DEEB, N. M., MOUSA, M. R., & ABBAS, H. (2022). HYALURONIC ACID COATED TERIFLUNOMIDE (A771726) LOADED LIPID CARRIERS FOR THE ORAL MANAGEMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 623. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJPHARM.2022.121939](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121939)
- ZEWAIL, M., NAFEE, N., HELMY, M. W., & BORAIE, N. (2019). COATED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS TARGETING THE JOINTS – AN EFFECTIVE AND SAFE APPROACH FOR THE ORAL MANAGEMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 567, 118447. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IJPHARM.2019.118447](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118447)

## 10 ANEXOS

**Tabla 10-1.** Estadísticas de regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0.99837
Coefficiente de determinación $R^2$	0.99674
$R^2$ ajustado	0.99657
Error típico	665.1624
Observaciones	21

**Tabla 10-2.** Análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
<b>Regresión</b>	1	2575627541	2575627541	5821.4	0.000			
<b>Residuos</b>	19	8406380.4	442441.1					
<b>Total</b>	20	2584033921						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
<b>Intercepción</b>	375.52	262.62	1.43	0.17	-174.14	925.19	-174.14	925.19
<b>Concentración</b>	354.21	4.64	76.30	0,00	344.49	363.93	344.49	363.93

