

Artículo recibido 15 de febrero de 2024.

Artículo aceptado 15 de julio de 2024.

Artículo publicado 31 de octubre de 2024.

Estudios de liberación en formulaciones farmacéuticas: perspectivas actuales y desafíos

Pérez Zamora, Cristina M.¹, Chiappetta, Diego A.^{3,4}, Nuñez, María B.^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones en Procesos Tecnológicos Avanzados (CONICET-UNCAUS), Comandante Fernández 755, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco 3700, Argentina

²Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional del Chaco Austral, Comandante Fernández 755, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco 3700, Argentina
cristinaperez@uncaus.edu.ar mbnunez@uncaus.edu.ar

³Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Tecnología Farmacéutica I, Buenos Aires, Argentina.

⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, Buenos Aires C1425FQB, Argentina dchiappetta@ffyb.uba.ar COLOCARLE SUBÍNDICE SIN PUNTO

ORCID Cristina M. Pérez Zamora 0000-0002-5913-8130

ORCID Diego Chiappetta 0000-0001-6700-9331

ORCID María Beatriz Nuñez 0000-0001-9099-9724

Resumen

Los ensayos de liberación de fármacos son fundamentales en el desarrollo y control de calidad de las formulaciones farmacéuticas. Estos estudios buscan entender cómo los principios activos se liberan de sus formulaciones para poder estar disponibles y ser absorbidos en el organismo. Para las formas farmacéuticas convencionales las condiciones del estudio se encuentran estandarizadas en diversas farmacopeas, mientras que para las formas farmacéuticas más novedosas, no sucede lo mismo y los investigadores adaptan las condiciones de ensayo de acuerdo al producto a evaluar y las condiciones del área de aplicación de la formulación. Por eso, en este artículo se realiza una descripción de los métodos experimentales de liberación más empleados para

evaluar las formulaciones más novedosas y los aspectos fundamentales a tener en cuenta al momento de diseñar los ensayos de liberación. Además, se hace una breve revisión sobre estudios de liberación en formulaciones con extractos vegetales, debido a que estos representan un desafío por su compleja composición química.

Palabras claves: muestreo y separación, método de diálisis, formulaciones no convencionales, protocolos estandarizados

Abstract

Release studies in pharmaceutical formulations: current perspectives and challenges

Drug release tests are essential in developing and quality control of pharmaceutical formulations. These studies seek to understand how active ingredients are released from their formulations to be available for absorption in the body. For conventional pharmaceutical forms, the study conditions are standardized in various Pharmacopoeias; while for newer pharmaceutical forms, the same does not happen. For this reason, researchers adapt the test conditions according to the product to be evaluated and the conditions of the application area of the formulation. Therefore, in this article, a description of the experimental release methods most used to evaluate the most innovative formulations is made. In addition, the fundamental aspects are reviewed, so the reader can consider it when designing release test. Moreover, a brief review is made of release studies in formulations with herbal extracts, because these represent a challenge due to their complex chemical composition.

Keywords: sampling and separation, dialysis method, unconventional formulations, standardized protocols

INTRODUCCIÓN

Los ensayos de liberación de fármacos son estudios realizados para evaluar y caracterizar la forma en que los principios activos o fármacos se liberan de sus formulaciones farmacéuticas. Es un proceso por el cual un fármaco (por ejemplo: paracetamol), incorporado en un vehículo farmacéutico (por ejemplo: comprimido de paracetamol), pasa a la condición de fármaco libre, imprescindible para su absorción (Telavi y Bellera, 2016). Cuando un medicamento se administra, el principio activo debe liberarse del vehículo para que pueda ser absorbido y distribuido en el organismo, donde ejerce su efecto terapéutico. Este proceso se tiene que dar en todas las formas farmacéuticas, excepto en aquellas donde el fármaco ya se encuentra disuelto. Debido a la importancia de este paso, se da especial atención a los estudios de liberación que se emplean en formas farmacéuticas sólidas de liberación modificada.

Estos estudios se diseñan para determinar, mediante técnicas *in vitro*, la cantidad de fármaco que se disuelve en función del tiempo, y evaluar de esta manera su velocidad de liberación, y poder predecir su comportamiento una vez administrado en el organismo. Estos ensayos permiten también sostener declaraciones de etiquetas y realizar correlaciones *in vitro/in vivo* para estimar cómo se producirá la liberación en el cuerpo (D’Souza, 2019). Además, estos estudios son críticos para el desarrollo y la formulación de nuevos medicamentos porque permiten evaluar diferentes factores relacionados a la formulación y a los métodos de fabricación sobre el producto farmacéutico final. Por último, y no menos importante, son realizados constantemente como una evaluación rutinaria de control de calidad (Amatya et al. 2013; D’Souza, 2014).

Las primeras regulaciones para ensayos de liberación aparecen en la década del ‘70 en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés: *United States Pharmacopeia*) y Formulario Nacional (NF, por sus siglas en inglés: *National Formulary*), para luego ser incorporadas en otras farmacopeas. Los estudios de liberación son de tal importancia que permanentemente llevan a constantes revisiones y actualizaciones del tema (D’Souza, 2019; Amatya et al., 2013; D’Souza, 2014; Natarajan et al. 2014; Bernkop-Schnurch y Jalil, 2018; Gray et al. 2018; Fotak y Klein, 2019; Shah et al., 2022; Bayer, 2021; Chakraborty y Banzala, 2022; Abbasnezhad et al. 2022).

En la actualidad, un gran número de publicaciones informan sobre resultados de estudios de liberación de diferentes principios activos desde formas farmacéuticas no convencionales. Cada uno establece condiciones de ensayo que considera apropiadas para el tipo de formulación estudiada considerando las características de la vía de administración. En este artículo, nos propusimos como objetivo describir los métodos experimentales de liberación más empleados y los aspectos fundamentales a tener en cuenta al momento de diseñar este tipo de ensayos para evitar o minimizar errores al evaluar la formulación. No se exponen aquí aspectos relacionados al modelado matemático de los datos obtenidos.

MÉTODOS EXPERIMENTALES USADOS EN ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Según la forma farmacéutica (FF) a evaluar, el ensayo de liberación puede tener diferentes condiciones de realización. Para productos farmacéuticos sólidos de liberación inmediata administrados por vía oral, este ensayo se conoce como prueba de disolución porque el medicamento es destinado a disolverse rápidamente en el medio de prueba y se considera que si está disuelto, se encuentra disponible para ser absorbido por el organismo. Para formas de dosificación no orales, como administración tópica y transdérmica, suppositorios y otros, la prueba se denomina preferiblemente como ensayo de liberación *in vitro* (D'Souza, 2019) debido a que las formulaciones no se disolverán en el sitio de absorción, pero el fármaco que contienen debe ser liberado para su absorción.

La USP indica el uso de aparatos de disolución: Aparato I (cestas) y II (paletas) (Figura 1) para evaluar fármacos de uso oral (comprimidos y cápsulas, de liberación inmediata, extendida, retardada o controlada). Estos equipos son mencionados tanto en la Farmacopea Argentina (FA VIII) como Brasileña (ANVISA, 2010). Además, el Aparato II puede usarse en la evaluación de suspensiones orales (Fotak y Klein, 2019). Los Aparatos III (cilindro alternativo) y IV (celda de flujo continuo) (Figura 2) se diseñaron para formas de dosificación oral de liberación prolongada, y son mencionados en la Farmacopea Europea (2013), pero no en las Farmacopeas Argentina y Brasileña. El Aparato IV de celdas de flujo es recomendado para evaluar la liberación desde

implantes subcutáneos o intramusculares, debido a que el flujo del medio en cierto modo imita al flujo de la sangre (Gray et al., 2018; Abbasnezhad et al. 2022). Los Aparatos V (paletas sobre disco), VI (cilindro giratorio) y VII (soporte alternativo) se usan para las formas de administración vía transdérmica como parches, y no están mencionados en las Farmacopeas Argentina, Brasileña y Europea, pero sí en la USP (2018).

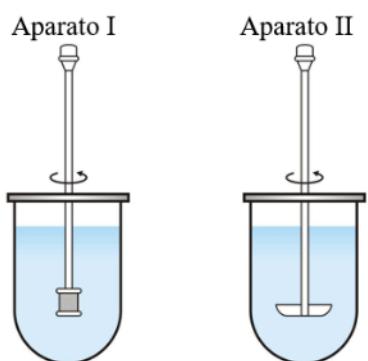


Figura 1. Esquema representativo del Aparato I (con accesorio canasto) y Aparato II (con accesorio paleta).

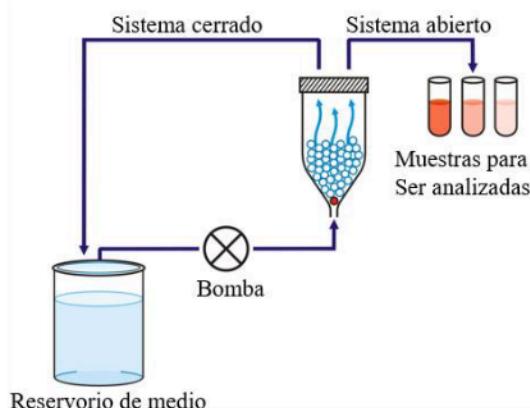


Figura 2. Esquema del sistema empleado con el Aparato IV, de celdas de flujo.

Para formas farmacéuticas novedosas como los sistemas particulados (nano/micro), emulsiones (nano/micro), liposomas, láminas e hidrogeles, inyectables e implantes de liberación controlada, no hay condiciones estandarizadas acerca de cómo realizar los ensayos de liberación (D’Souza, 2019; Gray et al., 2018; Fotak y Klein, 2019; Shah et al., 2022). Advirtiendo esta situación, a partir del 2017, la USP y la FDA (*Food and Drug Administration*) dan una serie de sugerencias para estudios de liberación de este tipo de formulaciones, donde involucran el uso del Aparato II, IV y el VII (Gray et al., 2018; FDA, 2022). Debido a esta ausencia de estándares, los investigadores adaptan el ensayo considerando las condiciones más apropiadas para el producto en estudio. Los métodos más empleados, se pueden clasificar en 2 grandes grupos: i) método de muestra y separación, y ii) método de difusión por membrana.

Método de muestra y separación

Con este método, la formulación se introduce directamente en el medio de liberación, el cual se mantiene a temperatura constante y con agitación durante todo el ensayo. Luego se extraen muestras del medio de liberación a intervalos de tiempos predeterminados, para cuantificar la concentración de fármaco liberado. Por lo general, la muestra extraída se filtra, en algunos casos se centrifuga, luego se filtra y recién entonces se analiza el sobrenadante. Si quedan partículas del estudio, tal como se muestra en el esquema de la Figura 3, pueden reponerse al medio de liberación, previa reconstitución con un volumen determinado de medio de liberación equivalente al volumen extraído.



Figura 3. Esquema de las etapas del método de muestreo y separación en el cual se pueden apreciar micropartículas (verdes), cargadas con fármaco (rojo), que se liberan al medio acuoso.

Este método proporciona un enfoque simple y directo, siendo satisfactorio si la formulación dispersa y el medio de liberación pueden separarse fácilmente, resultando útil para la evaluación de formulaciones como micropartículas y diferentes formas de apóritos laminares, entre otros (Yousefi et al., 2019, 2020; Keskir et al., 2019; Ramalingam et al., 2019; Shokrollahi et al., 2020; Ahmadi et al., 2021; Almasian et al. 2020; Pérez Zamora et al., 2022). Existe una variedad de adaptaciones de este método que incluyen el Aparato I (Gupta et al., 2021), el Aparato II (Edikresnha et al., 2019), el uso de vasos de precipitados o frascos viales (Yousefi et al., 2019, 2020; Keskir et al., 2019; Ramalingam et al., 2019; Shokrollahi et al., 2020; Ahmadi et al., 2021; Almasian et al. 2020; Pérez Zamora et al., 2022; Flamminii et al. 2020). La cuantificación del principio activo se realiza generalmente por cromatografía líquida de alta performance

(HPLC) o espectrofotometría UV-visible. Este método no es adecuado para sistemas como emulsiones, liposomas, geles o nanopartículas.

Método de difusión por membrana o método de diálisis

Este método es muy versátil, siendo uno de los más empleados para formulaciones nanométricas y también para estudiar la liberación desde depósitos a base de aceites, liposomas, partículas poco solubles en agua o sistemas autoemulsionados (Amatya et al., 2013; Bernkop-Schnurch y Jalil, 2018; Kim et al., 2021; Marques et al., 2011; Baran et al., 2018).

En este método, la formulación a evaluar se separa del medio de liberación mediante una membrana semipermeable de tamaño de poro conocido. Esta membrana dejará pasar sólo al fármaco disuelto al medio de liberación, para luego ser cuantificado. Existen varias adaptaciones de este método (Amatya et al., 2013; D’Souza, 2014; Kim et al., 2021), pero el más empleado es el uso de bolsas de diálisis elaboradas con polímeros no hidrosolubles. En esta técnica, la formulación a evaluar se coloca dentro de la bolsa junto a una pequeña cantidad de medio de liberación (por ejemplo, entre 1 y 10 ml). Los extremos de la bolsa deben estar bien sellados. Luego se la sumerge en un volumen mayor de medio, entre 50 y 500 ml, o más (Figura 4). Se produce una agitación continua en el medio de liberación, la cual dependerá del recipiente que se emplee, si se usan vasos de precipitados, se emplean pequeños volúmenes (50-100 ml) y agitación magnética. Otros estudios se realizan con el Aparato II (accesorio paletas) sumergiendo la bolsa de diálisis en el fondo del vaso, empleando un volumen de 500 ml. En este método, las condiciones de agitación, la relación entre el volumen de celda donante y el del receptor, y el peso molecular de la membrana, pueden afectar el proceso de liberación. Se recomienda que la membrana sea de 100 veces el tamaño molecular del fármaco (Gupta et al., 2021) para que deje pasar sólo a la molécula del fármaco, pero no a los otros excipientes de la formulación, y que si estos permean, no representen una interferencia para la cuantificación. Es importante que los extremos de la bolsa se encuentren bien sellados, de lo contrario puede haber pérdidas y se pueden producir alteraciones si no se cumplen las condiciones de sumidero (“sink”). Además, hay que considerar que algunos fármacos pueden unirse a la membrana y esto afecta a la cantidad cuantificada de fármaco.

Una variante del método es la diálisis inversa, donde el medicamento se coloca fuera de la membrana y el muestreo se realiza dentro de la membrana. La ventaja es que la agitación previene la agregación de partículas (Amatya et al., 2013). Existen otras configuraciones como, por ejemplo, el uso del Aparato I con una cesta de vidrio y una membrana de diálisis en la parte inferior (D’Souza, 2014), o el uso del Aparato II con una bolsa de diálisis en el fondo (Bao et al., 2022).

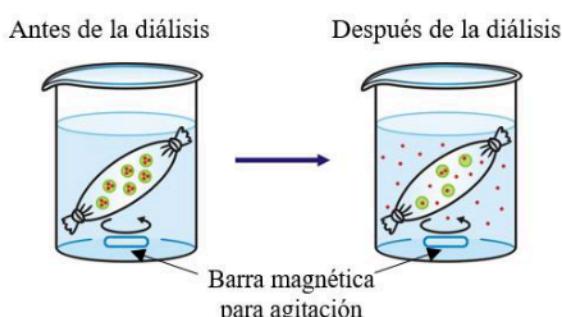


Figura 4. Representación esquemática del uso de membranas de diálisis para evaluar la liberación de un fármaco (puntos rojos) desde partículas (esferas verdes), empleando un vaso de precipitado con medio acuoso y agitación magnética.

Liberación con celdas de Franz

Este método es menos popular, pero lo desarrollamos aquí porque es de gran utilidad para evaluar formulaciones semisólidas de uso tópico como emulsiones, geles o ungüentos. Tal como se representa en la Figura 5, la celda de Franz cuenta con un compartimento dador donde se carga la muestra, y un compartimento receptor, donde se encuentra el medio de liberación. Ambos son separados por una membrana, la cual puede ser una membrana de diálisis o una membrana sintética inerte que sólo actúa de sostén para la formulación pero que no interfiere en la difusión. La cantidad de muestra cargada debe representar una dosis típica. El medio de liberación se mantiene a temperatura constante mediante un sistema de camisa de agua, y en constante agitación magnética. Las formulaciones tópicas generalmente se evalúan a 32 °C. Se puede realizar el ensayo a 37 °C cuando el producto está destinado a una aplicación tópica como puede ser la mucosa vaginal (por ejemplo, cremas vaginales).

Las formulaciones semisólidas no presentan condiciones de liberación estandarizadas en las farmacopeas, pero la FDA presenta recomendaciones al respecto en las guías para la industria SUPAC-SS (1997) donde indica el uso de celdas de difusión vertical (celdas de Franz) y las condiciones del ensayo.

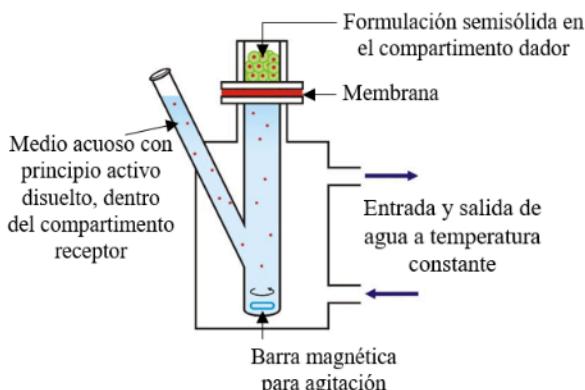


Figura 5. Ilustración de una celda de Franz cargada con una formulación en gel (verde) que contiene un principio activo (puntos rojos) que es liberado, y tiene la capacidad de solubilizarse y pasar a través de una membrana hacia el medio acuoso en el compartimento receptor.

FACTORES CLAVES PARA EL DISEÑO DE UN ESTUDIO DE LIBERACIÓN

Los factores claves que influyen en el proceso de liberación, y por lo tanto condicionan el diseño del estudio, son: el recipiente, la velocidad de agitación, la composición del medio de liberación (pH, presión osmótica, tensión superficial), la cantidad de muestra y la estabilidad del principio activo (Chakraborty y Banzala, 2022; Kim et al., 2021). El recipiente define el volumen de medio a utilizar y el modo de agitación (D'Souza, 2019). Es importante que la agitación se pueda realizar de forma controlada y reproducible, independientemente del mecanismo de agitación.

Respecto a los medios de liberación, se eligen considerando la solubilidad y estabilidad del principio activo (Fotak y Klein, 2019). Se prefieren medios de disolución simples como soluciones tampón acuoso debido a su costo, facilidad de preparación y reproducibilidad; aunque en situaciones particulares puede requerirse condiciones diferentes, que se evaluarán y justificarán debidamente (Marques et al., 2011). Es importante garantizar que el medio de disolución no se sature durante el ensayo, por lo tanto también es clave la relación entre cantidad de medio y cantidad de formulación. Como regla general, se recomienda que la concentración del fármaco en el medio de disolución/liberación se mantenga por debajo del 10% (D'Souza, 2019). Esto garantiza una condición *sink* o “de sumidero” durante el estudio, es decir, que el medio tenga una concentración baja constantemente, de manera tal que se favorezca el proceso de

difusión del principio activo desde la formulación hacia la disolución y no se alcance el equilibrio en el proceso, ya que si esto sucede, la liberación se detendrá. Si el fármaco es poco soluble en agua, está permitido agregar solventes no acuosos o agentes solubilizantes. Es fundamental estudiar la tasa de liberación en función de la concentración de solubilizante para garantizar que éste no influirá en la liberación del fármaco. Hay que tener en cuenta que si el disolvente penetra en la matriz, es probable que influya en la velocidad de liberación.

El volumen de muestra que se extrae está definido por la sensibilidad de la técnica de cuantificación (D’Souza, 2019; Fotak y Klein, 2019), y se recomienda reponer el volumen extraído para garantizar la condición de sumidero.

Respecto de la temperatura del ensayo, como se mencionó previamente, los ensayos se pueden realizar en algunos casos a 32 °C o a 37 °C, según la vía de administración. En algunas condiciones se plantean ensayos a mayor temperatura para acelerar la liberación de formulaciones que lo hacen en tiempos muy prolongados (Chakraborty y Banzala, 2022; Kim et al., 2021). Lo importante es garantizar que la temperatura se mantenga constante a lo largo de toda la duración del ensayo, que puede ser desde minutos, horas y hasta meses (D’Souza, 2019; Fotak y Klein, 2019). Para períodos largos de estudio, es importante considerar la evaporación del medio y tratar de evitarla (Gray et al., 2019).

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN EN FORMULACIONES CON EXTRACTOS VEGETALES O PRODUCTOS NATURALES

Los extractos vegetales son de interés para una gran variedad de actividades biológicas. Una formulación farmacéutica que contenga como principio activo un extracto vegetal, al momento del diseño y caracterización, presenta los mismos desafíos que las formulaciones elaboradas con principios activos de síntesis. El ensayo de liberación es uno de los ensayos de caracterización más importante del producto. En este punto, se presenta una dificultad adicional para evaluar la liberación del componente activo del extracto, dado que presenta una composición compleja debido a la variedad de metabolitos vegetales que contiene. Muchas veces, la actividad biológica es dada por una interacción sinérgica entre esos metabolitos y no por la presencia de uno solo, por lo que se dificulta identificar y cuantificar a la molécula responsable de la

actividad biológica de interés. Por lo tanto, ¿cómo se puede garantizar que se libera el componente bioactivo de la formulación, y que la formulación mantiene la actividad biológica del extracto?

Gran cantidad de artículos científicos analizan el desarrollo de formulaciones farmacéuticas incorporando extractos vegetales, y en su caracterización plantean su propio diseño para el estudio de liberación. Para micropartículas con extractos se informó el uso del método por muestra y separación. Por ejemplo, al estudiar la liberación de un extracto mixto de *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, *Trigonella foenum* y *Anethum graveolens*, vehiculado en micropartículas de quitosano (Yousefi et al., 2019), se dispersaron 300 mg en 100 ml de dos medios acuosos diferentes (pH 1,5 y 7,0), a 37 °C, durante 24 h, con agitación a 100 rpm. Se extrajeron muestras de 5 ml con reposición del medio. Las muestras se analizaron para cuantificar flavonoides mediante una técnica espectrofotométrica que implica una reacción previa con cloruro de aluminio. Se observó que a pH 1,5 se produjo una liberación inicial rápida (32,9%) durante las primeras 6 h, seguida de una liberación lenta y continua (55,19%). En medio neutro, se observan ambas fases de liberación, rápida y lenta, en período similares, pero alcanza un mayor porcentaje de liberación al final (85%). Aplicando la misma metodología, cuando se evaluaron micropartículas de alginato recubiertas con quitosano (Yousefi et al., 2020), a pH 1,5 se produjo una liberación inicial rápida (22,11%) en los primeros 40 min, seguida de una liberación sostenida hasta las 2 h (43,21%). Sin embargo, a pH 7 se alcanzó una liberación de 95,39 % a las 2 h. En otro estudio, se evaluó la liberación del extracto de propóleo desde microcápsulas de alginato de calcio durante 2 h a 37 °C (Keskir et al., 2019). Para ello dispersaron 0,15 g en 30 ml de tres soluciones diferentes (pH 1,5; 6,8 y 7,4), añadiendo Tween® 80 al 1% para aumentar la solubilidad del extracto en el medio de liberación. Se cuantificaron los polifenoles totales liberados mediante la técnica espectrofotométrica que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteau. Se observaron diferencias en la liberación a diferentes pH, con mayor liberación (~100%) a pH 7,4 y mínima liberación (<20%) a pH 1,5. Se puede apreciar cómo el pH influye en la liberación, independientemente de la composición de la formulación.

Algunas formulaciones diseñadas como apósitos de heridas, suelen emplear diferentes tecnologías en su elaboración (Ramalingam et al., 2019; Shokrollahi et al.,

2020; Ahmadi et al., 2021; Almasian et al. 2020; Pérez Zamora et al., 2022) y están en auge en los últimos años. Para los estudios de liberación, un trozo del apósito se suspende en el medio de liberación, que por lo general es solución tampón con pH entre 7 y 7,4, con agitación a 37 °C. Por ejemplo, para apósitos electrohilados de gelatina y quitosano contenido extracto de canela (*Cinnamom*), una pieza de 2 x 2 cm se sumergió en 5 ml de medio, a 37°C, durante seis días. En tiempos predefinidos, se extrajo 1 ml de muestra (con reposición del medio) y se registró el espectro de absorbancia (180-700 nm). De manera similar al comportamiento de micropartículas, se observó una liberación brusca en las primeras 6 h, seguida de una liberación lenta de orden cero; liberando el 15% del extracto en 5 días y cerca del 70% el sexto día. Los autores estiman que la liberación podría mantenerse por 16 días más. En otros trabajos, se emplearon otras condiciones para formulaciones similares. Por ejemplo, para láminas electrohiladas de alcohol polivinílico y quitosano, contenido extracto de manzanilla (Shokrollahi et al., 2020), piezas de 4 x 4 cm se sumergieron en 8 ml de medio. Se trajeron 2 ml de muestra con reposición del medio. Se cuantificó la cantidad de extracto liberado mediante el registro de absorbancia a una longitud de onda fija, predeterminada. Se observó una liberación brusca en las primeras 5 h, seguida de una liberación gradual, alcanzando al final del ensayo (luego de 336 h) liberar entre 35-73%, dependiendo de la composición de la formulación. Por otro lado, en apósitos tipo películas laminares elaborados con extractos de *Lippa alba* y *L. turbinata* se ha observado un perfil de liberación de polifenoles similar, con una liberación inicial brusca y luego un período de liberación más lento, pero en menor, tiempo superando el 85% de liberación en 2 h (Pérez Zamora et al., 2022). En estos ejemplos, probablemente tanto la composición como la técnica de preparación del producto formulado influyen en el perfil obtenido.

Para formulaciones de tipo liposomas se emplea el método de diálisis, debido a que estos sistemas son de escala nanométrica. En niosomas (un tipo de liposoma, elaborados con Span® 60, Tween® 60 y colesterol) con extracto de henna (*Lawsonia inermis*) la liberación se estudió cargando 1 ml de formulación dentro de bolsas de diálisis y sumergiéndola en 50 ml de solución tampón (pH 7,4), agitado a 150 rpm, a 37 °C, durante 15 h (Baran et al. 2018). Periódicamente se extrajo 1 ml de muestra (con reposición del volumen extraído). La cuantificación se hizo mediante el registro de la

absorbancia a una longitud de onda fija e interpolación en la curva de calibración. Condiciones de ensayos similares fueron empleadas para estudiar la liberación de D-limoneno (compuesto natural bioactivo) vehiculizado en niosomas (formulados con Span® 40, Tween® 40 y colesterol), pero además se agregó 30 % de etanol al medio de liberación para aumentar la solubilidad del compuesto en el medio (Hajizadeh et al., 2019). Para el extracto de henna se observó una liberación rápida dentro de las primeras 4 h y luego una liberación lenta. Sin embargo, para D-limoneno la liberación fue lenta desde un principio y a lo largo de todo el ensayo. En ambas formulaciones, la cantidad máxima liberada estuvo por debajo del 60 %. En estos ejemplos, los diferentes resultados pueden deberse a la composición de la formulación, composición del medio de liberación y las limitaciones de solubilidad del compuesto o extracto vehiculizado.

Algunos autores informaron para formulaciones autoemulsionables, el empleo del Aparato II de disolución con bolsas de diálisis cargadas con la formulación y sumergidas en el fondo del vaso. Por ejemplo, se utilizó esta adaptación, en la evaluación de una formulación destinada a la absorción vía gastrointestinal (Marrero-Morfa et al., 2023) y para una formulación semisólida de aplicación tópica (Ahmad et al., 2018). Las condiciones del ensayo se adaptaron a la vía de administración y la cuantificación del extracto liberado se realizó con HPLC y cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC, *high-performance thin layer chromatography*).

En muchos trabajos, los estudios de liberación se complementan con pruebas *in vitro* que demuestran que los metabolitos liberados mantienen la actividad biológica del extracto.

REFLEXIONES FINALES

Actualmente en las Farmacopeas Argentina y Brasileña se indica cómo realizar el ensayo de liberación sólo para comprimidos o cápsulas (test de disolución). La Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Europea, especifican además cómo hacer el ensayo de liberación para parches. Desde hace más de dos décadas, se ha planteado la necesidad de contar con condiciones estándares unificadas para realizar estos estudios en FF más novedosas. Sabemos que no es posible establecer un sistema de prueba único para todas las FF, pero sí pensar en condiciones estandarizadas para cada tipo de FF. En este sentido y atendiendo a esta necesidad, en los últimos años la

USP y la FDA emitieron sugerencias y orientaciones sobre cómo realizar ensayos de liberación para nanosuspensiones, liposomas e implantes. Sin embargo, a pesar de ello, se pueden apreciar diferencias metodológicas en los estudios de liberación realizados por diferentes autores para productos similares. En consecuencia, los resultados no son comparables. En muchos casos, la metodología empleada es cuestionable. Por ejemplo, usar el método de muestra y separación para apóritos de uso tópico, cuando tal vez pueda ser más adecuado realizar el estudio con celdas de Franz, debido a que en el primer método el apórito se sumerge completamente en solución produciéndose la liberación desde todos sus lados, situación que no se daría *in vivo*, donde sólo una de las caras entra en contacto con el área de aplicación, a partir de la cual se producirá la liberación. Y aquí es importante tener en cuenta las condiciones de humedad del estudio porque también influyen en el proceso de liberación. Algo similar se puede plantear para formulaciones de tipo emulsiones tópicas, con liposomas o partículas. Para estas formulaciones se suele emplear el método de difusión por membrana, y debido al uso que tendrán, es más apropiado realizar el estudio empleando un sistema tipo celda de Franz.

Los ensayos de liberación con las muestras sumergidas en la solución, a través del modelado matemático de los resultados del estudio, permiten conocer el mecanismo físico por el cual se produce la liberación del principio activo desde el vehículo farmacéutico, pero no pueden representar el comportamiento real del producto aplicado en la piel. Además, las membranas de diálisis pueden adsorber fármacos, especialmente si se trata de pequeñas cantidades de fármacos tensioactivos o hidrofóbicos.

En artículos científicos se puede apreciar que al no haber condiciones estandarizadas para los ensayos de liberación de muchas FF novedosas, los científicos adaptan las condiciones para realizarlos. Es necesario seguir trabajando para finalmente unificar criterios y establecer, a través de organismos oficiales y sus instrumentos, condiciones estandarizadas de estudios de liberación para cada tipo de FF.

En cuanto al estudio de formulaciones con extractos vegetales, los métodos de cuantificación propuestos por varios autores resultan interesantes por su practicidad, y sencillez. Demuestran la liberación de flavonoides y polifenoles, que se asocian con diferentes actividades biológicas, proporcionando estrategias viables. Para

complementar los estudios en estos productos, será necesario establecer pruebas que garanticen que las sustancias liberadas mantienen la actividad biológica de interés.

REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

- Abbasnezhad, N., Zirak, N., Champmartin, S., Shirinbayan, M. y Bakir, F. (2022). An overview of in vitro drug release methods for drug-eluting stents. *Polymers*, 14(13), 2751. <https://doi.org/10.3390/polym14132751>
- Ahmad, A., Abuzinadah, M. F., Alkreathy, H. M., Banaganapalli, B. y Mujeeb, M. (2018). Ursolic acid rich *Ocimum sanctum* L leaf extract loaded nanostructured lipid carriers ameliorate adjuvant induced arthritis in rats by inhibition of COX-1, COX-2, TNF- α and IL-1: Pharmacological and docking studies. *PLoS One*, 13(3), e0193451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193451>
- Ahmadi, S., Hivechi, A., Bahrami, S. H., Milan, P. B. y Ashraf, S. S. (2021). Cinnamon extract loaded electrospun chitosan/gelatin membrane with antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 580-590. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.156>
- Almasian, A., Najafi, F., Eftekhari, M., Ardekani, M. R. S., Sharifzadeh, M., y Khanavi, M. (2020). Polyurethane/carboxymethylcellulose nanofibers containing Malva sylvestris extract for healing diabetic wounds: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Materials Science and Engineering: C*, 114, 111039. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111039>
- Amatya, S., Park, E. J., Park, J. H., Kim, J. S., Seol, E., Lee, H., Choil, H., Shin, Y. y Na, D. H. (2013). Drug release testing methods of polymeric particulate drug formulations. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43, 259-266. <https://doi.org/10.1007/s40005-013-0072-5>

D'Souza, S. (2014). A review of *in vitro* drugs release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in pharmaceutics*, 2014, 1-12.
<https://doi.org/10.1155/2014/304757>

Barani, M., Mirzaei, M., Torkzadeh-Mahani, M. y Nematollahi, M. H. (2018). Lawsone-loaded Niosome and its antitumor activity in MCF-7 breast Cancer cell line: a Nano-herbal treatment for Cancer. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 11-17. <https://doi.org/10.1007/s40199-018-0207-3>

Bao, Q., Wang, X., Zou, Y., Wang, Y. y Burgess, D. J. (2022). *In vitro* release testing method development for long-acting injectable suspensions. *International journal of pharmaceutics*, 622, 121840.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121840>

Bayer, I. S. (2021). A review of sustained drug release studies from nanofiber hydrogels. *Biomedicines*, 9(11), 1612.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9111612>

Bernkop-Schnürch, A. y Jalil, A. (2018). Do drug release studies from SEDDS make any sense?. *Journal of Controlled Release*, 271, 55-59.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.027>

Chakraborty, S. y Banzala, (2022) A.K. Current Updates on In-vitro Drug Release Testing of Long-Acting Injectables *American Pharmaceutical Review*.
<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/584542-Current-Updates-on-In-vitro-Drug-Release-Testing-of-Long-Acting-Injectables/>

Food and Drug Administration – FDA. (2022). Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials. Guidance for Industry.
<https://www.fda.gov/media/157812/download>

Edikresnha, D., Suciati, T., Munir, M. M. y Khairurrijal, K. (2019).

Polyvinylpyrrolidone/cellulose acetate electrospun composite nanofibres loaded by glycerine and garlic extract with *in vitro* antibacterial activity and release behaviour test. *RSC advances*, 9(45), 26351-26363.

<https://doi.org/10.1039/C9RA04072B>

European Pharmacopoeia - 8th Edition. (2013).

Ministerio de Salud de la Nación. (2023). *Farmacopea Argentina* (8^a Ed.).

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2010). *Farmacopeia Brasileira*. 5^a Edição.

Fundação Oswaldo Cruz.

Flamminii, F., Di Mattia, C. D., Nardella, M., Chiarini, M., Valbonetti, L., Neri, L., Difonzo, G. y Pittia, P. (2020). Structuring alginate beads with different biopolymers for the development of functional ingredients loaded with olive leaves phenolic extract. *Food Hydrocolloids*, 108, 105849.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105849>

Fotaki, N. y Klein, S. (Eds.). (2019). *In vitro* drug release testing of special dosage forms. John Wiley & Sons.

Gray, V., Cady, S., Curran, D., DeMuth, J., Eradiri, O., Hussain, M., Krämer, J., Shabushnig, J. y Stippler, E. (2018). *In vitro* release test methods for drug formulations for parenteral applications. *Dissolution Technologies*, 25(4), 8-13.
dx.doi.org/10.14227/DT250418P8

Gupta, R., Chen, Y. y Xie, H. (2021). *In vitro* dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(6), e1732. <https://doi.org/10.1002/wnan.1732>

Hajizadeh, M. R., Maleki, H., Barani, M., Fahmidehkar, M. A., Mahmoodi, M. y Torkzadeh-Mahani, M. (2019). *In vitro* cytotoxicity assay of D-limonene niosomes: an efficient nano-carrier for enhancing solubility of plant-extracted agents. *Research in pharmaceutical sciences*, 14(5), 448-458.

<https://doi.org/10.4103/1735-5362.268206>

Kim, Y., Park, E. J., Kim, T. W. y Na, D. H. (2021). Recent progress in drug release testing methods of biopolymeric particulate system. *Pharmaceutics*, 13(8), 1313.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081313>

Marrero-Morfa, D., Ibarra-Alvarado, C., Luna-Vázquez, F. J., Estévez, M., Ledesma, E. M., Rojas-Molina, A. y Quirino-Barreda, C. T. (2023). Self-microemulsifying system of an ethanolic extract of *Heliospopsis longipes* root for enhanced solubility and release of affinin. *AAPS Open*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s41120-023-00086-5>

Keskin, M., Keskin, S. y Kolayli, S. (2019). Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization and release property. *LWT*, 108, 89-96.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.036>

Marques, M. R., Loebenberg, R. y Almukainzi, M. (2011). Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol*, 18(3), 15-28.

Natarajan, J. V., Nugraha, C., Ng, X. W. y Venkatraman, S. (2014). Sustained-release from nanocarriers: a review. *Journal of Controlled Release*, 193, 122-138.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.029>

Ramalingam, R., Dhand, C., Leung, C. M., Ezhilarasu, H., Prasannan, P., Ong, S. T., Subramanian S., Kamruddin M., Lakshminarayanan R. , Ramakrishna S., Verma

N. K. y Arunachalam K. D. (2019). Poly-ε-caprolactone/gelatin hybrid electrospun composite nanofibrous mats containing ultrasound assisted herbal extract: Antimicrobial and cell proliferation study. *Nanomaterials*, 9(3), 462.

<https://doi.org/10.3390/nano9030462>

Shah, V. P., Miron, D. S., Rădulescu, F. ř., Cardot, J. M. y Maibach, H. I. (2022). In vitro release test (IVRT): Principles and applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 626, 122159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122159>

Shokrollahi, M., Bahrami, S. H., Nazarpak, M. H. y Solouk, A. (2020). Multilayer nanofibrous patch comprising chamomile loaded carboxyethyl chitosan/poly (vinyl alcohol) and polycaprolactone as a potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 547-559.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.067>

Food and Drug Administration – FDA. (1997). SUPAC-SS. Guidance for Industry. Nonsterile Semisolid Dosage Forms.

Talevi, A. y Bellera, C.L. Capítulo 1: “Liberación de fármacos” en: Talevi A., Quiroga, P. y Ruiz, M. E. (2016). Procesos biofarmacéuticos. Series: Libros de Cátedra.

D'Souza, S. (2019). Chapter 3. Injectables. En: Nikoletta Fotaki, Sandra Klein (Eds.). In Vitro Drug Release Testing of Special Dosage Forms. John Wiley & Sons Ltd, 2019.

The United States Pharmacopoeia (USP 41). The National Formulary (NF 36). (2018).

Yousefi, M., Khanniri, E., Shadnoush, M., Khorshidian, N. y Mortazavian, A. M. (2020). Development, characterization and in vitro antioxidant activity of chitosan-coated alginate microcapsules entrapping *Viola odorata* Linn. extract.

International Journal of Biological Macromolecules, 163, 44-54.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.250>

Yousefi, M., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M. y Khosravi-Darani, K. (2019).

Preparation optimization and characterization of chitosan-tripolyphosphate microcapsules for the encapsulation of herbal galactagogue extract.

International journal of biological macromolecules, 140, 920-928.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.122>

Zamora, C. M. P., Michaluk, A. G., Chiappetta, D. A. y Nuñez, M. B. (2022). Herbal

buccal films with in vitro antibacterial and anti-inflammatory effects. *Journal of*

Herbal Medicine, 31, 100527. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100527>