



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EMULSIFICACIÓN-
DIFUSIÓN Y ADICIÓN DE SALES PARA OBTENER
NANOPARTÍCULAS CON COLORANTES FLUORESCENTES Y
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS PARA SU POTENCIAL USO
COMO VECTORES FARMACÉUTICOS

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
GILBERTO GARCÍA SALAZAR**

ASESORES:

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

DR. RAFAEL VILLALOBOS GARCÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme fuerza, fortaleza, fe y voluntad para seguir adelante.

A mis padres:

Margarito García L.

y

Margarita Salazar S.

Quienes me dieron la vida, además de darme el apoyo para seguir adelante con mis metas. Son parte importante en mi vida. Gracias por todo. Igualmente a mis hermanos por impulsarme.

A la UNAM y FESC:

Me siento orgulloso de ser universitario y salir de tan grande Institución. Además de vivir una de las mejores etapas de mi vida.

Al Dr. David Quintanar y Dr. Rafael García:

Gracias por darme la oportunidad de trabajar con ellos y descubrir nuevas cosas en el mundo de la Ciencia y Tecnología.

A mis amigos y compañeros de la 26 va Generación de Q.F.B. y en especial a la prángana:

Poncho, Dante, Carlos, Arturo, Carlos ↑, Aidé, Spice, Lalo, Edgardo, Andrea, Teresa, Gabo, Luís, Fernando, Azucena, Adriana, Karla. Si alguien no lo mencione mil disculpas. Gracias por todos los buenos y malos momentos compartidos

A Bety:

Gracias por apoyarme y disfrutar de momentos tanto difíciles y alegres durante nuestra estancia en la FESC.

A todos los profesores de la FESC:

Gracias por transmitirme sus conocimientos en mi formación y aprendizaje.

A todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo.

INDICE

I	Lista de abreviaturas	iv
II	Lista de tablas	vi
III	Lista de figuras	vii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	5
2.1	Sistemas acarreadores farmacéuticos	5
2.1.1	Generalidades	5
2.1.2	Fármacos dirigidos al sitio de acción	6
2.1.3	Definiciones de vectorización	6
2.1.4	Aplicaciones de la vectorización	7
2.1.5	Aplicación de nanopartículas por las diferentes vías de administración	8
2.1.5.1	Vía intravenosa	8
2.1.5.2	Vía oral	11
2.1.5.3	Vía subcutánea	13
2.1.5.4	Vía ocular	13
2.2	Fármacos administrados por vía inhalatoria	15
2.2.1	Anatomía del aparato respiratorio	15
2.2.1.1	Vías respiratorias superiores	15
2.2.1.2	Vías respiratorias inferiores	16
2.2.2	Administración pulmonar	17
2.2.3	Vectorización de fármacos en macrófagos pulmonares	18
2.2.4	Aerosoles Farmacéuticos	20
2.2.5	Suspensiones	22
2.2.5.1	Floculación y defloculación	23
2.2.5.2	Sedimentación y su control	23
2.2.5.3	Velocidad de sedimentación	24
2.2.5.4	Floculación controlada	26

2.3	Nanopartículas	26
2.3.1	Generalidades	26
2.3.2	Métodos de preparación	27
2.3.2.1	Técnica de emulsión-evaporación	28
2.3.2.2	Técnica de desplazamiento de solventes	30
2.3.2.3	Técnica de adición de sales	30
2.3.2.4	Técnica de emulsificación – difusión	33
2.3.3	Nanopartículas cargadas con colorantes fluorescentes.	36
2.4	Tuberculosis	37
2.4.1	Generalidades	37
2.4.2	Patogénesis de la infección con <i>M. Tuberculosis</i>	39
2.4.3	Infección con <i>M. tuberculosis</i>	40
2.4.4	Síntomas y signos	41
2.4.5	Infección de tuberculosis a enfermos de VIH	42
2.4.6	Tratamiento	43
2.4.7	Toxicidad	45
3.	OBJETIVOS	48
4.	PARTE EXPERIMENTAL	49
4.1	Materiales e instrumentos	49
4.1.1	Polímeros	49
4.1.2	Reactivos	49
4.1.3	Principios activos	49
4.1.4	Instrumentos y equipos	49
4.2	Metodología	51
4.2.1	Preparación de nanopartículas por la técnica de emulsificación-difusión	51
4.2.2	Preparación de nanopartículas por la técnica de adición de sales	51
4.2.3	Determinaciones previas	52
4.2.3.1	Espectro de absorción para Clofazimina y Rifampicina	52
4.2.3.2	Curvas de calibración para Clofazimina y Rifampicina	52
4.2.4	Evaluación de las nanopartículas	53
4.2.4.1	Medición del tamaño de partícula	53

4.2.4.2	Morfología	53
4.2.4.3	Calorimetría diferencial de barrido	53
4.2.4.4	Determinación del potencial zeta	54
4.2.4.5	Determinación de Rifampicina en las nanopartículas elaboradas por la técnica de adición de sales.	54
4.2.4.6	Determinación de Clofazimina en las nanopartículas elaboradas por la técnica de emulsificación- difusión.	54
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1	Nanoesferas blanco preparadas por el método de emulsificación-difusión: Efecto de la velocidad de agitación.	55
5.2	Nanoesferas cargadas con Rojo de Nilo y Clofazimina por el método de emulsificación-difusión	60
5.3	Nanoesferas formadas por la técnica de adición de sales y el efecto de la de la velocidad de agitación.	66
5.4	Nanoesferas cargadas con Azul de Nilo y Rifampicina por el método de adición de sales.	69
5.5	Evaluaciones de nanoesferas de cargadas con Rifampicina y Clofazimina.	73
5.5.1	Cantidad de principio activo encapsulado en las nanoesferas	73
5.5.2	Evaluación de la morfología de las nanoesferas	75
5.5.3	Liofilización de las nanoesferas	76
5.5.4	Potencial zeta en las nanopartículas	79
5.5.5	Estudios por Calorimetría Diferencial de Barrido	80
6.	CONCLUSIONES	84
7.	PERSPECTIVAS	85
8.	BIBLIOGRAFIA	86
9.	ANEXOS	95

I LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Acetato de etilo
AN	Azul de Nilo
avv	Agitador de velocidad variable
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
CLFXM	Clofazimina
CyA	Ciclosporina A
D.E.	Desviación estándar
DPIs	Inhaladores de polvo seco
E-D	Emulsificación-difusión
FQ	Fisicoquímica
i.v.	Intravenosa
I.P.	Indicie de polidispersidad
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDIs	Aerosoles de dosis-medida
MEC	Metiletilcetona
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
NP	Nanopartículas
OW	Emulsión aceite en agua
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACA	Poly(alquilcianocrilato)
PECL	Poli- ϵ -caprolactona
PLA	Acido polilactico
PLA-MePEG	Acido polilactico-metoxipolyetilenglicol
PLGA	Acido poliláctico-co-glicólico
PVAL	Alcohol polivinílico
RIF	Rifampicina

RN	Rojo de Nilo
SCAF	Sistemas Coloidales de Acarreadores de Fármacos
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
S-O	Adición de sales
SSA	Secretaría de Salud
TB	Tuberculosis
TGI	Tracto gastrointestinal
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
W/O	Emulsión agua en aceite
Ψ_z	Potencial zeta
μm	Micrómetro
λ	Longitud de onda

II LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Fármacos encapsulados, así como sus diferentes sitios/microorganismos blanco.	9
Tabla 2.	Tratamiento para TB (seis meses).	44
Tabla 3.	Principales reacciones adversas de fármacos antituberculosos.	45
Tabla 4.	Talla de partícula promedio para NE blanco por el método E-D a diferentes velocidades de agitación, con un agitador de velocidad variable.	56
Tabla 5.	Talla de partícula promedio para NE blanco por el método E-D usando como solvente MEC.	61
Tabla 6.	Talla de partícula promedio para NE por el método E-D de RN y CLFXM antes de liofilizar.	62
Tabla 7.	Talla de partícula promedio para NE por el método E-D de RN y CLFXM después de liofilizar.	64
Tabla 8.	Talla de partícula promedio para NE por la técnica de S-O a diferentes rpm utilizando como solvente AE.	67
Tabla 9.	Talla de partícula promedio para NE de AN y RIF antes de liofilizar por la técnica de S-O utilizando como solvente AE.	70
Tabla 10.	Talla de partícula promedio para NE liofilizadas de AN y RIF preparadas por la técnica de S-O.	72
Tabla 11.	Resultados del porcentaje de RIF y CLFXM cargados en NE y su eficiencia de encapsulación.	74
Tabla 12.	Talla de partícula promedio para NE por el método de E-D de CLFXM con y sin crioprotector (trealosa).	78
Tabla 13.	Datos de Potencial Zeta en NE cargados con RN, RIF, CLFXM y AN.	79

III LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Endocitosis de NP en cultivos celulares observados por microscopia electrónica de transmisión.	10
Fig. 2.	Comportamiento adhesivo de un sistema de partículas coloidales después de una administración oral.	12
Fig. 3.	Representación esquemática del aparato respiratorio.	15
Fig. 4.	Anatomía de los pulmones.	17
Fig. 5.	Representación esquemática de las NE y NC.	27
Fig. 6.	Representación esquemática de la técnica “emulsificación-evaporación” para obtener NP.	29
Fig. 7.	Representación esquemática de la técnica “desplazamiento de solventes” para obtener NP.	31
Fig. 8.	Representación esquemática de la técnica “adición de sales (S-O) ” para obtener NE.	32
Fig. 9.	Representación esquemática de la técnica E-D para obtener NE.	34
Fig. 10.	Descripción de los fenómenos ocurridos para la formación de NP por la técnica de E-D.	35
Fig. 11.	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1200 rpm por la técnica de E-D.	57
Fig. 12.	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1400 rpm	57

	por la técnica de E-D.	
Fig. 13.	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1600 rpm por la técnica de E-D.	58
Fig. 14.	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1800 rpm por la técnica de E-D.	58
Fig. 15	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1900 rpm por la técnica de E-D.	60
Fig. 16	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1700 rpm por la técnica de E-D utilizando como solvente MEC.	62
Fig. 17.	Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con RN formadas mediante la técnica de E-D a 1700 rpm.	63
Fig. 18.	Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con CLFXM formadas mediante la técnica de E-D a 1700 rpm.	63
Fig. 19.	Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con RN mediante la técnica de E-D a 1700 rpm después de liofilizar.	65
Fig. 20.	Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con CLFXM mediante la técnica de E-D a 1700 rpm después de liofilizar.	65
Fig. 21.	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco a 2000 rpm mediante la técnica de S-O ocupando como solvente AE, con una talla promedio de 1736.7 nm..	68
Fig. 22.	Distribución del tamaño de partícula para NE blanco a 11 000 rpm mediante la técnica de S-O ocupando como solvente AE, con una talla	68

promedio de 358.7 nm.

- Fig. 23. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco a 13 000 rpm mediante la técnica de S-O ocupando como solvente AE, con una talla promedio de 313.8 nm. 69
- Fig. 24. Distribución del tamaño de partícula para NE de AN preparadas por la técnica de S-O antes del proceso de liofilización. 70
- Fig. 25. Distribución del tamaño de partícula para NE de RIF preparadas por la técnica de S-O antes del proceso de liofilizado. 71
- Fig. 26. Distribución del tamaño de partícula para NE de AN preparadas por la técnica de S-O después del proceso de liofilización. 72
- Fig. 27. Distribución del tamaño de partícula para NE de RIF preparadas por la técnica de S-O después del proceso de liofilización. 73
- Fig. 28. Microfotografías de NE tomadas por medio de microscopia electrónica de barrido. A) AN, y B) RN, fueron tomados a 15000 X, C) RIF y D) CLFXM fueron tomadas a 10000 X. La barra representa 1 μ m. 76
- Fig. 29. Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con CLFXM mediante la técnica de E-D a 1700 rpm después de liofilizar con trealosa, con un diámetro promedio de 312.0 nm. 78
- Fig. 30. Termogramas de PVAL, PLGA, CLFXM y NE de CLFXM. 81
- Fig. 31. Termogramas de PVAL, PLGA, RIF y NE de RIF 82

1. INTRODUCCIÓN

La eficacia de muchos fármacos es limitada por su habilidad para alcanzar el sitio de acción. Es decir, solamente una pequeña cantidad de dosis administrada alcanza este sitio, mientras que la mayor cantidad del fármaco es distribuida al resto del cuerpo. En contraste, una forma farmacéutica que libera en un sitio específico puede incrementar la cantidad de fármaco en ese sitio, disminuir efectos no deseados y además, reducir la dosis de administración. Hay autores quienes afirman que los sistemas coloidales de liberación de fármacos tienen estas ventajas [Kreuter, 1994]. Estos sistemas son acarreadores de fármacos constituidos en gran parte por polímeros y lípidos, los que proporcionan una nueva alternativa para la fabricación de nuevas formas farmacéuticas capaces de liberar su activo en sitios específicos del cuerpo. Los sistemas coloidales pueden ser: liposomas, niosomas, microemulsiones y nanopartículas (NP); teniendo en común, la talla y forma de administrarse [Piñón-Segundo y cols., 2003]

La nanotecnología es el área que involucra, entre otros aspectos, el diseño y la manufactura de componentes con dimensiones submicrónicas. Área que está teniendo implicaciones muy importantes porque en las últimas tres décadas se han tenido espectaculares avances en diferentes áreas de la Química, Biología y Medicina [Chávez Monroy y cols., 2002].

Las NP han recibido una considerable atención como coloide reservorio de numerosos fármacos, debido a su mayor estabilidad en fluidos biológicos. Hace algunas décadas se habían aprovechado a los liposomas como acarreadores farmacéuticos por su capacidad de proteger al fármaco de su degradación, de transportar al sitio blanco y de tener poca toxicidad; pero presentaron inconvenientes como: baja eficiencia de encapsulamiento y problemas de estabilidad por periodos prolongados. Así que, por un lado, las NP son más eficientes como acarreadores farmacéuticos que los liposomas gracias a su mayor estabilidad y una mejor liberación. Por estas razones muchos fármacos han sido formulados en NP, por ejemplo, los antibióticos, antivirales, antiparasitarios, citostáticos, vitaminas, proteínas y péptidos, incluyendo enzimas y hormonas, para fines de investigación. Y por otro lado, tenemos que las NP pueden ser preparadas con polímeros que se biodegradan en el cuerpo humano sin causar ningún daño [Bogunia-Kubitk y Sugisaka, M., 2002].

Una de las potenciales aplicaciones para los sistemas dispersos nanoparticulados es su uso como vectores coloidales o acarreadores de entidades químicas con actividad biológica (principios activos). En la actualidad hay grupos de investigación que trabajan en el diseño de nuevos sistemas farmacéuticos con capacidad de entrega de un principio activo a un sitio específico, a una velocidad y régimen de dosificación óptimo. Este tipo de sistemas con las propiedades mencionadas podrían evitar efectos tóxicos, y proteger la entidad química de interés y prolongar su estancia en el organismo [Chavez–Monrroy y cols., 2002].

Los sistemas nanoparticulados al ser administrados se distribuyen por todo el cuerpo, con ésto, se obtienen ciertas ventajas en comparación con fármacos convencionales, porque las NP tienen la capacidad de cruzar diferentes barreras fisiológicas por su diminuto tamaño, logrando llegar a tumores sólidos, sitios inflamados o infectados, por ejemplo:

- a) Los fármacos de elevado peso molecular formulados en NP tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en comparación con formas farmacéuticas convencionales, entre éstos se incluyen antibióticos, agentes antineoplásicos y una gran variedad de fármacos con actividad en el sistema nervioso [Bogunia-Kubitzk y Sugisaka, M., 2002].
- b) Llegar a células infectadas en distintos órganos, donde las NP al ser atrapadas, ofrecen una respuesta farmacológica más eficaz en comparación a una formulación convencional.
- c) Minimizar los efectos secundarios o adversos que se presentan con frecuencia al administrar una forma farmacéutica convencional.
- d) Poder acarrear vitaminas con aplicaciones dermatológicas y cosméticas.

En años recientes, los sistemas poliméricos biodegradables han atraído considerable atención como dispositivos nanoparticulados para la liberación de fármacos. En primer lugar, porque tienen muchas aplicaciones en la liberación controlada de diferentes principios activos. En segundo lugar, porque tienen la habilidad para llegar al órgano o tejido blanco como acarreador de oligonucleótidos, en terapias genéticas y administración de vacunas con DNA; además por su habilidad para liberar proteínas, péptidos y genes a través de una administración oral [Bogunia-Kubitzk y Sugisaka, M., 2002].

Hay muchas técnicas para preparar nanopartículas, algunas son

- a) Desplazamiento de solvente
- b) Emulsificación- evaporación
- c) Adición de sales
- d) Emulsificación-difusión

Estas tienen ciertos aspectos en común como:

Una solución orgánica que contiene los componentes de las NP (polímero y principio activo) que funciona como fase interna durante la preparación y una solución acuosa (que contiene los estabilizadores) esta funciona como un medio de dispersión de las NP.

En la actualidad los fármacos con actividad terapéutica antituberculosa como la Rifampicina (RIF), Pirazinamida, Etambutol, Estreptomina, Clofazimina (CLFXM), entre otros, tienen varios efectos adversos: pérdida de apetito, náuseas, ictericia, fiebre y alteraciones inmunológicas. Por lo tanto, grupos de investigación están desarrollando nuevas formas farmacéuticas con el fin de aumentar la concentración de fármaco en los diferentes órganos infectados, disminuir los efectos adversos, aumentar la estabilidad del fármaco y conseguir una liberación controlada del mismo.

En la bibliografía se encuentran descritas formulaciones de liposomas, micropartículas y NP, pero existen pocos artículos publicados de fármacos antituberculosos encapsulados en NP. En este proyecto se prepararon NP con la técnica de emulsificación-difusión (E-D) y adición de sales "salting-out" (S-O) y así obtener NP biodegradables cargadas de fármacos antituberculosos para su posterior utilización como vectores en el tratamiento de la tuberculosis (TB); así mismo, lograr que las NP provean una alta concentración de fármaco en los sitios blanco, logrando un mejor tratamiento.

Se encapsularon colorantes fluorescentes rojo de Nilo (RN) y Azul de Nilo (AN) para emplearlos como marcadores; de igual manera, se encapsularon fármacos antituberculosos RIF y CLFXM, con el fin de utilizarlos en proyectos futuros; estas NP se pondrán en contacto con células pulmonares infectadas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) para evaluar su efectividad contra esta microbacteria.

A las NP se caracterizaron por su forma y tamaño, además de observar su morfología esférica, observando tallas menor a 1 μm ; así mismo, se determinó la concentración de fármaco y además, se les midió su potencial zeta, el cual determina su redispersión de acuerdo a sus valores propios. Se realizó, también, un análisis térmico para determinar si el fármaco se encontraba disperso molecularmente en las NP.

Cabe subrayar que la preparación de NP por los métodos antes mencionados, es la primera fase del proyecto para evaluar la potencialidad de éstas en el tratamiento de TB. El presente proyecto se realiza conjuntamente con la Universidad de Nuevo León, en donde esta evaluará la interacción de las NP con células pulmonares *in vitro*, posteriormente *in vivo* con animales de experimentación para evidenciar su efecto terapéutico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Sistemas acarreadores farmacéuticos

2.1.1 Generalidades

La propuesta de crear sistemas dirigidos de entrega de fármacos fue introducida por Paul Erlich a principios de siglo XX con su concepto de “balas mágicas”. Erlich imaginó que podrían desarrollarse sistemas que únicamente actuarían sobre un sitio blanco, depositando en él la sustancia activa. Los acarreadores coloidales de fármacos por su pequeña talla de partícula (generalmente menor a 1 μm) podría hacer posible la propuesta de Erlich. Estos sistemas de liberación de fármacos ofrecerán muchas ventajas en diferentes áreas de la medicina, agricultura, veterinaria y en aplicaciones industriales [Kreuter, 1994].

Una de las aplicaciones de los Sistemas Coloidales Acarreadores de Fármacos (SCAF) es llevar al fármaco, por las diferentes regiones del cuerpo en altas concentraciones, hacia el lugar de la infección, de la inflamación o tumores sólidos; por lo tanto, se aumenta el tiempo de circulación y se disminuye la toxicidad del fármaco. Estos sistemas incluyen liposomas, niosomas, sistemas micelares, complejos macromoleculares, microemulsiones, sistemas micró - y nanoparticulados. Todos éstos son semejantes en tamaño y forma, es decir, a su estabilidad a largo plazo y su potencial escalamiento industrial las NP se han posicionado como los SCAF más prometedores, reflejo de ello, tenemos el gran número de investigaciones destinadas a probar su efectividad [Piñon–Segundo y cols., 2003].

Los SCAF ideales deberían estar compuestos por moléculas del acarreador y del fármaco, además deben de satisfacer los siguientes criterios:

- a) Ser aceptados farmacéuticamente, estables y de fácil administración.
- b) Ser susceptibles de esterilización (si se contempla para uso parenteral).
- c) Transportar el fármaco al sitio de acción deseado.
- d) Liberar el fármaco a una velocidad adecuada y conveniente hacia el sitio de acción.
- e) El acarreador debe ser biodegradable y no tóxico [Piñon–Segundo y cols., 2003].

Aunque es difícil que algún sistema acarreador cumpla con todos los criterios antes mencionados, en la actualidad, se están desarrollando formas farmacéuticas con estas características, donde las NP cumplen con la mayoría de los criterios de un acarreador ideal.

2.1.2 Fármacos dirigidos al sitio de acción

Uno de los objetivos principales, en el diseño de nuevos sistemas de liberación, es controlar la liberación de agentes farmacológicos a un sitio específico de acción (órgano, tejido, célula) con una óptima velocidad terapéutica y un adecuado régimen de dosificación. En este sentido, al liberar en el sitio específico podría no solamente mejorar la eficacia del fármaco, sino, además reducir la posibilidad de efectos tóxicos no deseados y mejorar el índice terapéutico. Entre los sistemas más prometedores para lograr éstas metas se encuentran los SCAF [Kreuter, 1994].

2.1.3 Definiciones de vectorización

Las finalidades de los vectores farmacéuticos son

1. Lograr una respuesta farmacológica deseada a un sitio selectivo sin interacciones indeseables en otros sitios adjuntos. La vectorización puede ser lograda por una modificación química de los componentes principales de la formulación para lograr este objetivo.
2. Utilizar acarreadores como liposomas, microesferas, NP cargados con anticuerpos y macromoléculas, los cuales, tienen la finalidad de dirigir el fármaco al sitio de acción.
3. Manipular la liberación y paso del fármaco a compartimientos específicos dentro del cuerpo, para lograr una acción prolongada, o bien, para proteger el fármaco [Robinson R. y Lee V., 1987; Schreier, 2001].

2.1.4 Aplicaciones de la vectorización

Se ha tenido mucho éxito en la vectorización de fármacos con formas farmacéuticas como: comprimidos, cápsulas o gránulos; las cuales, fueron las pioneras. Los comprimidos o cápsulas con recubrimiento de película (excipientes o agentes protectores poliméricos) pueden actuar como vehículos y modificar la liberación de sustancias activas en sitios específicos del tracto gastrointestinal (TGI). Por ejemplo, actúan a un cierto nivel de pH en el estómago o intestino, ayudando a contrarrestar los efectos irritantes del principio activo cuando éste es liberado. En la actualidad, a estas formas farmacéuticas se les pueden llamar clásicos. Uno de los objetivos del recubrimiento entérico es proteger principios activos que sean sensibles a pH ácidos como las enzimas y proteínas, ya que éstas rápidamente se hidrolizan e inactivan en medio ácido, como en el caso de los antibióticos. Fármacos como diclofenaco, ácido valproico o ácido acetilsalicílico necesitan poseer un recubrimiento entérico para prevenir la irritación de la mucosa en el estómago. En fármacos como ácido aminosalicílico o profármacos, el recubrimiento entérico es aprovechado para liberar la mayor parte de la concentración del fármaco en partes bajas del TGI (colón) [Schreier, 2001].

Otro ejemplo, es la administración pulmonar, ésta ha experimentado un gran avance en la liberación de fármacos con la ayuda de dispositivos, llegando a ser una vía de administración aprovechable. Por lo tanto, los pulmones pueden servir como una alternativa en la administración de una gran cantidad de fármacos que pueden reemplazar a ciertas formas de administración, inclusive la vía oral e i.v. Por otra parte, los parches transdérmicos cargados con activos, como la nitroglicerina, nicotina y estrógenos, tienden a reemplazar inyecciones parenterales. Este logro atañe a la vectorización de fármacos, en forma de parches, a través de la piel sin la eliminación instantánea de fármaco en la circulación sanguínea. La vectorización viral es uno de los últimos avances en el desarrollo de la vectorización de fármacos, en donde se utilizan procesos biológicos sofisticados para la liberación o expresión de agentes activos. Dato que ha sido mostrado utilizando gran variedad de virus, los cuales, han tenido excelentes resultados en la vectorización de sitios cancerígenos [Schreier, 2001].

La innovación de vectores farmacéuticos tienen ligados específicos sobre la superficie externa como: inmunoglobulinas, anticuerpos, carbohidratos o péptidos; y además tienen la característica de llegar a una población celular específica [Robinson R. y Lee V., 1987].

La intención de lo anterior es destacar que existe gran diversidad de vectores farmacéuticos que están dirigidos a diferentes sitios. Además para la concepción de estos vectores se han aprovechado los beneficios de los adelantos tecnológicos y conocimientos científicos en diversas áreas de la Química, Bioquímica y Fisiología Celular, así, como también, de la Microbiología e Inmunología. Gracias a estos conocimientos se han desarrollado estrategias y nuevas ideas para la vectorización de fármacos. La propuesta de Erlich es potencialmente alcanzable, pues se enfoca en desarrollar modernos sistemas de liberación a un sitio específico como: tejido, órgano o población celular. Posiblemente, más adelante, se crearán óptimos sistemas de liberación; por un lado se lograrían excelentes tratamientos y la satisfacción del paciente; y por otro, disminuiría los costos en un tratamiento terapéutico [Schreier, 2001].

Se han encapsulado gran variedad de fármacos, entre éstos, tenemos a los anticancerígenos, antibióticos, antituberculosos, hipoglucémicos; por mencionar algunos. No olvidemos su empleo en distintos tratamientos dirigidos a diferentes órganos y tejidos del cuerpo.

En la Tabla 1 se muestran una variedad de fármacos encapsulados, desde antibióticos hasta fármacos con acción anticancerígena, que tienen la capacidad de llegar a diferentes sitios blanco. A continuación se muestran algunas aplicaciones de las NP por las vías i.v., oral, subcutánea y ocular. La vía inhalatoria se retomará con más profundidad debido a que será por esta vía en donde se pretende administrar las moléculas encapsuladas.

2.1.5 Aplicación de nanopartículas por las diferentes vías de administración

2.1.5.1 Vía intravenosa

La administración i.v. es atractiva porque los fármacos son llevados directamente hacia la sangre para dar una respuesta inmediata, debido a que se mantienen altas concentraciones de

fármaco en sangre. Pero hay limitaciones como la biocompatibilidad y tamaño de partícula de los fármacos inyectados; por ejemplo, algunas formas farmacéuticas al ser administradas bloquean pequeños capilares, por lo tanto, se requieren partículas pequeñas para una administración intravenosa [Robinsón, R. y Lee, V. 1987].

Fármaco	Sitios / microorganismos blanco	Referencia
Ampicilina	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Vauthier y cols., 2003
Anfotericina B	Antibiótico Fungicida	Espuelas y cols., 1997
Ciclosporina	Infecciones oculares	Lallemand y cols., 2003
Ciprofloxacina	Infecciones intracelulares	Page-Clisson y cols., 1998
Doxorrubicina	Leucemias	Vauthier y cols., 2003
Enlapril	Antihistamínico	Ahlin y cols., 2002
Estradiol –benzoato	Terapia Hormonal	Hye-Young y cols., 2001
Fenil Butazona	Tratamiento del reumatismo	Alleman y cols., 1989
Gentamicida	Antibiótico amplio espectro	Kreuter, 1994
Ibuprofeno	Analgésico y antipirético	Kreuter, 1994
Indometacina	Antiinflamatorio	Quintanar-Guerrero y cols 1997a
Miconazol	Antimicótico	Kreuter, 1994
Paclitaxel	Anticancerígeno	Mu y Feng , 2002
Rifabutina	Tratamiento contra la Toxoplasmosis	Dalencon y cols, 1997
Rifampicina	Tuberculosis	Calleja y cols, 2003
Triclosan	Antibacteriano en enfermedades periodontales	Piñon-Segundo y cols., 2003
Vitamina E	Antianémico	Quintanar- Guerrero y cols 1997a

Tabla 1. Fármacos encapsulados, así como sus diferentes sitios/microorganismos blanco.

En una administración i.v las NP son distribuidas en toda la circulación sanguínea, llegando a células del hígado, bazo y médula ósea, como se observa en la Figura 1. Estas partículas no bloquean los capilares debido a su tamaño nanométrico (menor a 1 μm) [Hans y cols., 2003].

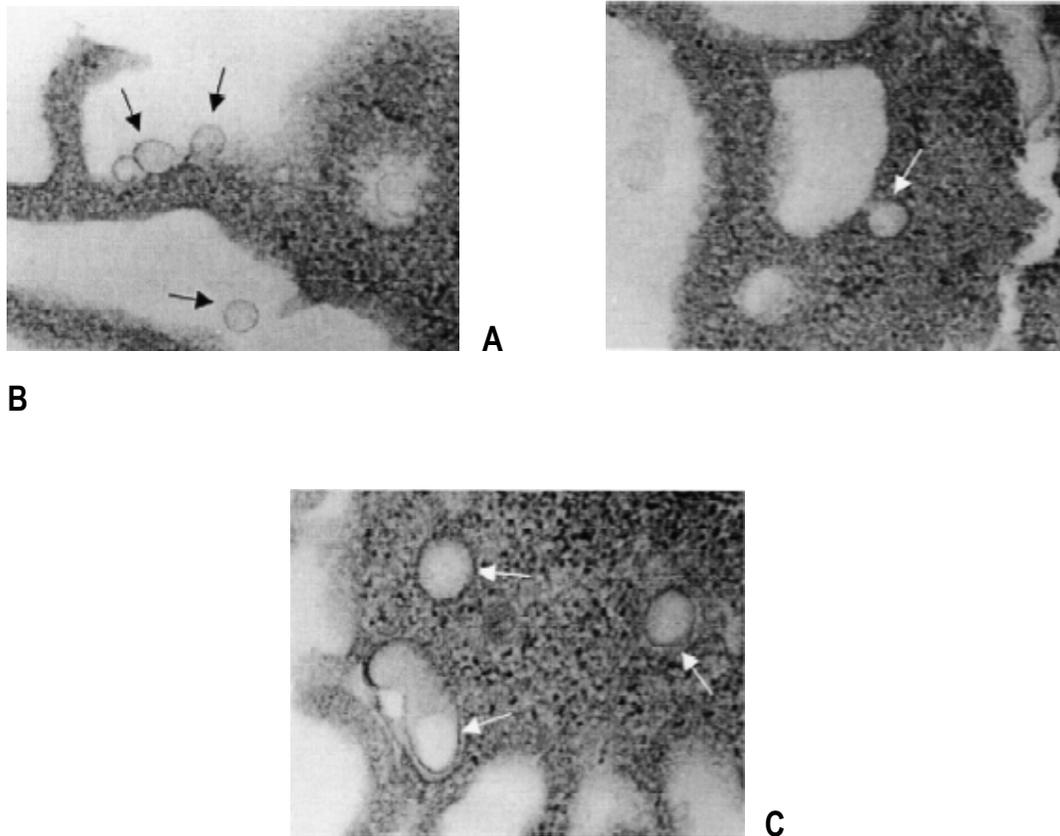


Fig. 1. Endocitosis de NP en cultivos celulares observados con microscopia electrónica de transmisión. A) Interacción de nanopartículas con la membrana de las células. B) Endocitosis de las nanoesferas. C) Nanoesferas en fagosomas (las flechas indican la posición de las nanopartículas) [Vauthier C. y cols, 2003].

Como el hígado es un sitio de acumulación, las NP son capturadas por las células Kupffer [Couvreur y cols., 1995]. La interacción de las NP con las células Kupffer abre posibilidades para

el tratamiento de algunas enfermedades parasitarias y bacterianas, porque las NP, después de una administración i.v., pueden ser fagocitadas por los macrófagos de la circulación sanguínea y así llegar a las células infectadas (Kupffer) y liberar el fármaco. Si la comparamos con una forma farmacéutica convencional, tendría ventaja, porque ésta llegaría en concentraciones mínimas a los macrófagos; problema que se puede resolver al encapsularlo dentro de NP [Barratt, 2000]. Este tipo de infecciones intracelulares han sido establecidas como un campo de interés para la liberación de fármacos por medio de nanoesferas (NE) [Vauthier y cols., 2003].

Se han realizado varios experimentos y se ha comprobado que hay una mayor eficacia del fármaco encapsulado en NP, que en una forma convencional [Couvreur y cols., 1995; Barratt, 2000]; por ejemplo: se han formulado NE cargadas de ampicilina contra el tratamiento de *Listeria monocytogenes* (localizada en macrófagos de hígado y bazo) y salmonellosis. Se hizo un estudio comparativo en donde se administró; por un lado, NP cargadas de ampicilina; y por otro, una forma farmacéutica convencional de ampicilina. Después de la administración de NE, la actividad terapéutica se incrementó en comparación con la forma farmacéutica convencional, esto se corroboró con un conteo bacterial, donde se determinó que había una reducción de la población bacteriana 20 veces menor con la administración de NE en comparación del fármaco libre [Vauthier y cols., 2003]

2.1.5.2 Vía oral

En años recientes se han efectuado diversas investigaciones en donde se emplearon NP como vehículos de liberación oral [Hans y cols., 2002]. La vía oral ha sido una de las más elegidas; sin embargo, podría tener una pobre disposición de algunos fármacos cuando son absorbidos por el organismo, porque deben cumplir con ciertos requerimientos como: biocompatibilidad y biodegradabilidad [Jung y cols., 2000]. Además de factores inherentes a las NP, éstas incluyen talla, distribución, consistencia, hidrofobicidad y propiedades de superficie.

Muchos fármacos tienen poca biodisponibilidad cuando son administrados por esta vía. Para mejorar su biodisponibilidad se ha propuesto la administración de sistemas nanoparticulados. Guilles y cols (1997) administraron NP por vía oral en donde observaron que

se quedaban adheridas a la mucosa del TGI. Este proceso se realiza en diferentes pasos, como se observa en la Figura 2. Primero, la suspensión de NP es administrada, llega al TGI e inmediatamente entra en contacto con una porción de la mucosa intestinal (paso II). El concentrado de NP actúa como un reservorio y sólo una fracción de las NP es adsorbida por la capa de la mucosa. Las que no son retenidas en la porción inicial del intestino transitan a través de éste (paso III), facilitándose la absorción en pequeñas fracciones, las NP que no son atrapadas se eliminan por las heces (paso IV) [Gilles y cols., 1997].

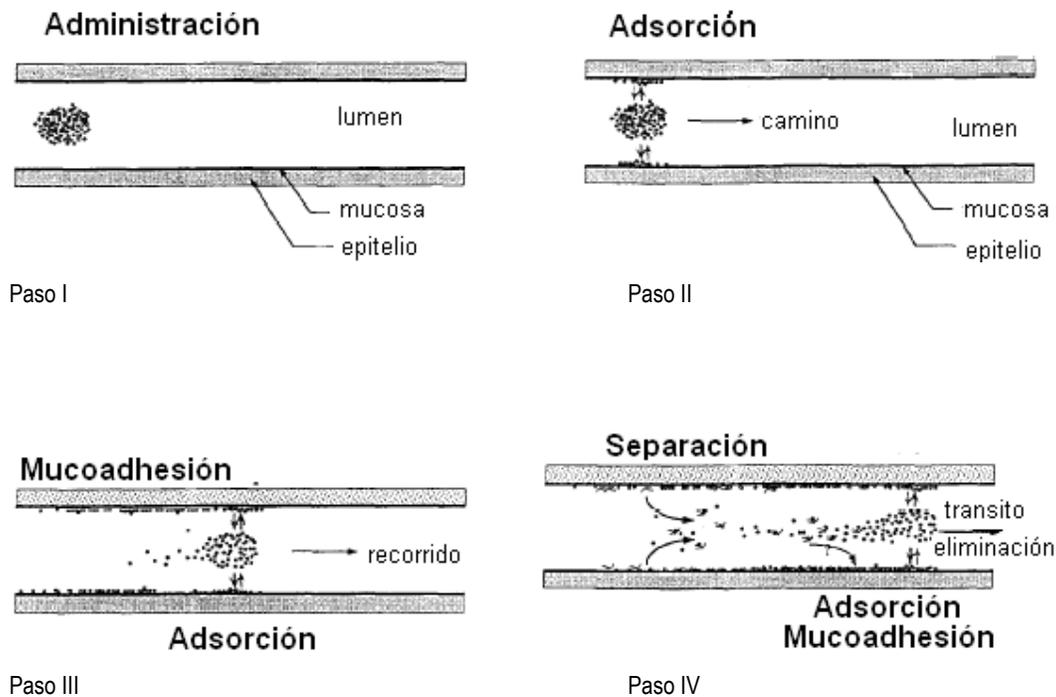


Fig. 2. Comportamiento adhesivo de un sistema de partículas coloidales después de una administración oral) [Gilles y cols., 1997].

Se puede tener un efecto terapéutico prolongado debido a que las propiedades bioadhesivas de las partículas podrían ser absorbidas sobre la mucosa intestinal e incrementar el tiempo de residencia en el TGI y así liberar lentamente el activo [Gilles y cols., 1997]. El

encapsulamiento dentro de nanocápsulas (NC) mejora y prolonga el efecto terapéutico por la ruta oral. Sin embargo, las propiedades bioadhesivas de las NP podrían tener interesantes implicaciones para mejorar la pobre absorción de fármacos pocos solubles, así como proteger la mucosa del TGI [Barratt, 2000].

2.1.5.3 Vía subcutánea.

Esta ruta de administración es comúnmente usada cuando las propiedades farmacocinéticas de un fármaco no son favorecidas por la administración oral; los fármacos incluyen vehículos como: geles, implantes, inyecciones subcutáneas usando sistemas biodegradables [Robinson, R. y Lee, V. 1987].

Las NP lipídicas han ganado gran interés en las formulaciones farmacéuticas y cosméticas, pues gracias a su tamaño pueden abarcar una gran superficie, permitiendo formar grandes películas sobre una parte específica sobre la piel. Esto se puede aplicar en bloqueadores solares, porque incrementan el efecto húmedo, lo que contribuye a la protección de la piel de los efectos adversos del sol [Müller-Goymann, 2004].

Por otra parte, se tendría una liberación sostenida de principios activos irritantes en altas concentraciones, ya que por otras vías no es posible administrarlos (intramuscular, oral o i.v.) porque el fármaco dañaría al organismo. O bien, si se pretende administrar un fármaco por un periodo prolongado y no se quiera tener daños fisiológicos, estos fármacos pueden ser formulados en NP para ser administrados sobre la piel sin que tengan algún efecto irreversible [Müller-Goymann, 2004].

2.1.5.4 Vía ocular

Para el tratamiento de enfermedades oculares, la instilación tópica es la más escogida que otras vías de administración, porque se puede tener una alta absorción de fármaco sobre el epitelio corneal, no solo maximiza la liberación de fármacos a tejidos oculares afectados, sino

también minimiza los efectos sistémicos. De cualquier forma la aplicación tópica de fármacos a los ojos y su efectividad farmacológica se ve impedida significativamente por la eficiencia de los mecanismos de protección fisiológica, los de drenaje y circulación lagrimal. Cuando los fármacos son instilados en solución acuosa éstos son eliminados del área precorneal de 1-2 minutos, después de la aplicación, así que una dosis menor del 3 % del total penetra en el humor acuoso, y por ende, la acción del fármaco es corta y será necesario aplicar otra dosis [Robinson, R. y Lee, V. 1987].

Debido al drenaje lagrimal y a la estructura hidrofóbica del epitelio corneal, la biodisponibilidad ocular predispone que las soluciones oftálmicas resulten ineficientes. Por lo tanto, se han experimentado con nuevos sistemas de entrega de fármacos, entre los cuáles, los más efectivos fueron las NP. Estos sistemas son capaces de encapsular y proteger el fármaco contra la degradación enzimática y química, además de incrementar el transporte y tiempo de vida media intraocular. Calvo y cols., 1996, realizaron NP de poly-ε-caprolactona (PECL), cargadas con ciclosporina A. Después, las administraron por vía tópica en conejos, conjuntamente con una solución oleosa. Las NP lograron mayores niveles de concentración, en comparación con la solución oleosa. Clavo y cols., 1996, suponen que las NP fueron tomadas por las células del epitelio corneal, logrando una liberación por un extenso periodo de tiempo, además de ser bien toleradas.

En otro experimento, Boundelle y cols. (1996) compararon el efecto después de la administración tópica de una dispersión de NP cargadas con policarpina por una parte, y de una solución (convencional) a conejos por vía ocular. En los resultados comprobaron que las NP tenían mayor retención debido a su bioadhesividad en comparación a la solución convencional. Indudablemente existe una clara ventaja sobre las formulaciones convencionales, las cuales, son incapaces de mantener los niveles terapéuticos en estos tejidos. Asimismo se detectaron bajos niveles de policarpina en sangre, lo cual, indica que se tienen mínimos efectos sistémicos [Boundelle y cols., 1996].

2.2 Fármacos administrados por vía inhalatoria

2.2.1 Anatomía del aparato respiratorio

El aparato respiratorio consta de nariz, faringe (garganta), laringe, tráquea, bronquios y pulmones. En lo estructural, se divide en dos porciones estas son 1) vías respiratorias superiores estas son nariz y faringe; 2) vías respiratorias inferiores, que incluyen laringe, tráquea, bronquios y pulmones [Tortora, 2002]. En La Figura 3 se observa un esquema de las vías respiratorias.

2.2.1.1 Vías respiratorias superiores

La nariz incluye una porción externa que sobresale del rostro y una cavidad interna para el paso del aire. Los senos paranasales ayudan, en pequeña medida, a calentar y humedecer el aire inspirado. La cavidad nasal está dividida en dos mitades laterales o fosas nasales, por el tabique nasal. [Mellado-Balderas, 2000]. La faringe o garganta es un conducto ahusado de unos 13 cm. de longitud que inicia en los orificios posteriores de la nariz y llega hasta la laringe. La faringe constituye un conducto para el paso del aire y alimentos, con una cámara de resonancia para la voz y el sitio donde se alojan las amígdalas, quienes participan en respuestas inmunitarias contra microorganismos invasores [Tortora, 2002].

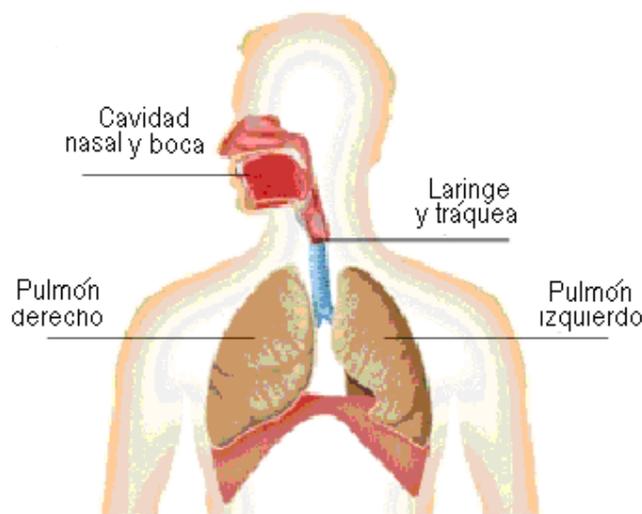


Fig. 3. Representación esquemática del aparato respiratorio [Tortora, 2002].

2.2.1.2 Vías respiratorias inferiores

La laringe es un conducto corto que se conecta la tráquea. Se ubica en la línea media del cuello, por delante de las vértebras cervicales. La función primaria de la laringe es evitar la entrada de líquidos y/o alimentos a la tráquea en los pulmones durante la deglución, así como permitir el paso del aire a la tráquea en otros momentos. La tráquea es un conducto tubular, por el cual, fluye aire, tiene 12 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro en personas adultas. Se localiza por delante del esófago y abarca desde la laringe hasta el borde superior de la vértebra T5 y en la entrada a los pulmones se divide en bronquio derecho e izquierdo [Tortora, 2002].

Los pulmones son dos órganos cónicos situados en la cavidad torácica; los separan el corazón y otras estructuras del mediastino, que divide la cavidad torácica en dos partes anatómicamente distintas. El pulmón derecho se compone de tres lóbulos: superior, medio e inferior; separados entre sí, por fisuras o cisuras horizontales. El izquierdo, de menor volumen debido a la presencia del corazón, tiene dos lóbulos: superior e inferior [Mellado-Balderas y cols., 2000].

En el borde superior de la vértebra T5, la tráquea se bifurca en los bronquios primarios derecho e izquierdo, que se dirigen a los pulmones respectivos. Posteriormente, los bronquios primarios se subdividen en otros más pequeños: los bronquios secundarios (o lobulares), uno para cada lóbulo pulmonar. Los bronquios secundarios dan origen a los bronquios terciarios (segmentarios), que a su vez se ramifican en bronquiolos. Éstos se dividen repetidas veces y los más pequeños se denominan bronquiolos terminales; los bronquiolos terminales se subdividen en bronquiolos respiratorios. A su vez éstos se subdividen en varios conductos alveolares. Desde la tráquea hasta dichos conductos, existen unas 25 ordenes de ramificación, es decir, la división ocurre 25 veces entre la tráquea y los conductos alveolares [Tortora, 2002].

La circunferencia de los conductos alveolares está rodeada por numerosos alvéolos y sacos alveolares. Un alvéolo es una excrecencia en forma de taza con revestimiento de epitelio escamoso sencillo y además es sostén de una membrana basal elástica delgada; mientras que un saco alveolar consiste en dos o más alvéolos que comparten una abertura común. Los macrófagos alveolares son fagocitos errantes que retiran las partículas diminutas de polvo y

otros desechos de los espacios entre los alvéolos [Tortora, 2002]. En la Figura 4 se observan las diferentes subdivisiones de los bronquios hasta llegar a los bronquiolos.

2.2.2 Administración pulmonar

La administración de medicamentos por vía inhalatoria es útil para tratar enfermedades pulmonares con acción local y disminución de efectos sistémicos. La liberación de fármaco al pulmón a través de la inhalación parece trivial, pero la efectividad de la terapia pulmonar es altamente compleja y difícil de lograr. Esto es, porque de todos los dispositivos ocupados para la administración pulmonar (aerosol, inhalación de polvos secos, y nebulizadores), solo una parte de la dosis liberada llega directamente hacia los pulmones, mientras la otra porción puede ser depositada en el estómago. La porción de la dosis depositada en el estómago, dependiendo de su biodisponibilidad, puede absorberse pudiendo contribuir con efectos adversos [Schreier, 2001].

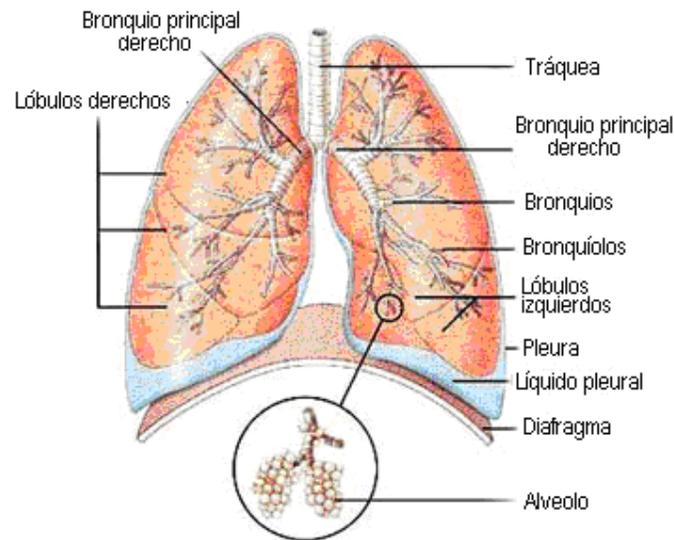


Fig. 4. Anatomía de los pulmones [Tortora, 2002].

La deposición de partículas aerolizadas es mediada por factores como: talla de partícula, forma, densidad, carga e higroscopicidad, además de la geometría de las vías aéreas y factores fisiológicos, tales como: patrones de respiración, flujo dinámico del aire en el tracto respiratorio, variaciones en la humedad relativa y temperatura dentro de las vías respiratorias. Todas las partículas menores a 10 μm de diámetro son depositadas en alguna extensión de la región pulmonar mediante inhalación. Una vez, que las partículas aerolizadas son depositadas sobre la superficie alveolar, ellas tiene que atravesar la barrera capilar–alveolar antes de alcanzar la circulación sanguínea [Robinsón, R. y Lee, V. 1987]. Se considera que la absorción de fármacos en el pulmón es mucho más rápida que en el intestino.

Se han diseñado varias formas de liberación (liposomas, micropartículas, microesferas, partículas cubiertas y NP) con las que se desea alcanzar altos niveles de concentración de fármaco en los pulmones, ofreciendo protección en el medio que se encuentren, además de un control de su liberación. Estos sistemas de liberación pueden aumentar su biodisponibilidad debido a su tamaño, ya que alcanzan a los alvéolos pulmonares, que son de alta absorción. Una ventaja de la nebulización de fármacos por sistemas micro - y nanoparticulados se debe a su tamaño que nanométrico que son fácilmente nebulizadas [Dailey y cols., 2003].

La terapia inhalatoria pulmonar tiene algunas ventajas sobre otras rutas como:

- a) La superficie del área de los pulmones es extremadamente grande y la permeación mucosal de los fármacos es de fácil acceso, debido a que las paredes del sistema vascular alveolar son extremadamente delgadas.
- b) La metabolización de los fármacos por enzimas intracelulares o extracelulares es relativamente baja [Takeuchi y cols., 2001].

2.2.3 Vectorización de fármacos en macrófagos pulmonares

Los macrófagos pulmonares son sitios blanco, prometedores para la liberación de fármacos. En la región no ciliada de los pulmones, se encuentra una línea de defensa,

responsable de la fagocitosis de partículas inhaladas menores a 5 μm de diámetro. La función de los macrófagos pulmonares es eliminar las partículas ingeridas (incluyendo patógenos), ésto se lleva a cabo por la producción de sustancias como proteasas y radicales oxígeno, los cuales, capacitan a los macrófagos en su función. Si, la función de los macrófagos es eliminar a ciertos patógenos facultativos e intracelulares como *M. avium* y *M. tuberculosis*. Entonces una opción para los vectores es llegar al macrófago infectado y promover un canal de entrada para los antibióticos. El potencial para usar liposomas y NP al tejido infectado es que los macrófagos alveolares, sean un sitio blanco para que así llegue el fármaco [Schreier, 2001].

Los macrófagos alveolares tiene la capacidad de engullir (ingerir) liposomas. Esto, ha sido demostrado, en estudios *in vivo* e *in vitro*, donde los liposomas son tomados por los macrófagos alveolares; posteriormente, al ser engullidos liberaran el principio activo en los macrófagos alveolares, como fue en el caso de *M. avium* que es un patógeno intracelular. En estudios *in vivo* se aerolizaron liposomas cargados con ciprofloxacina a ratones infectados con *Francisella tularensis*, la cual, es una bacteria intracelular que usan los macrófagos alveolares como hospedero. Se encontró que todos los ratones tratados con liposomas cargados con ciprofloxacina sobrevivieron, mientras los ratones tratados con ciprofloxacina, de una forma farmacéutica convencional, murieron. Los investigadores atribuyeron que los liposomas fueron capaces de liberar el fármaco en los macrófagos y prolongar la retención del fármaco en los pulmones [Schreier, 2001].

Pandey y cols. (2003) realizaron experimentaciones de NP cargadas con fármacos antituberculosos (rifampicina, isonizacida y pirazinamida), mediante aerolización con un nebulizador tipo Anderson. Esta suspensión de NP fue aerolizada, las gotas tenían un diámetro promedio de un 1 μm ; y más del 90 % de las partículas, se depositaron en las regiones profundas de los pulmones (alvéolos). Posteriormente, se dieron a la tarea de detectar los principios activos en el plasma, donde identificaron, que después de 6 horas de la administración de las NP, y 200 horas después, el fármaco continuaba en el plasma. De igual manera, se administraron los mismos fármacos por vía oral e i.v. Los investigadores notaron que los niveles plasmáticos administrados por la vía inhalatoria fueron mayores en comparación de fármacos administrados por la vía oral o i.v. Ésto sugiere que la vía pulmonar puede ser una excelente opción para hacer llegar fármacos en altas concentraciones a los pulmones.

2.2.4 Aerosoles Farmacéuticos

El tratamiento de enfermedades respiratorias por inhalación, tiene sus inicios desde la antigüedad. En aquellos tiempos, ocupaban métodos, en los cuales, involucraba la inhalación de sustancias aromáticas, tales como metanol, eucalipto o alcaloides derivados de belladona, entre otros. La síntesis de agentes terapéuticos para tratamientos como asma y bronquitis crónica, conjuntamente con la invención del aerosol de dosis-medida, revolucionaron la forma de administrar fármacos por inhalación. La administración directa a los pulmones por estos dispositivos reduce la dosis necesaria para producir alivio. Se comparó la vía oral con la vía inhalatoria, y así observar el efecto tóxico, mediante fármacos utilizados para el tratamiento de asma crónica. Se administraron 400 µg de dipropionato de beclometasona por inhalación, lo que fue el equivalente a 5 -10 mg de la dosis oral. En general los efectos tóxicos mediante la vía pulmonar fueron mínimos en comparación a la vía oral [Ganderton y Trevor, 1992].

Numerosos estudios experimentales y teóricos han mostrado, que partículas de 1 – 3 µm, tienen una alta probabilidad de depositarse en la región de los alvéolos pulmonares [Ganderton y Trevor, 1992]. Partículas que poseen un diámetro menor a 1 µm son en su mayor parte exhaladas, y en contraste partículas mayores a 10 µm tienen pocas probabilidades de llegar a los pulmones, debido a que se quedan en la boca. Por estas razones, terapias inhalatorias, hoy en día, dependen de cierta talla en los aerosoles o partículas comprimidas de polvos, para producir un efecto terapéutico óptimo [Edwards, 1999].

Una gran variedad de dispositivos inhalatorios están actualmente en el mercado. Los dispositivos inhalatorios están divididos en tres categorías: aerosoles de dosis-medida (MDIs), nebulizadores e inhaladores de polvo seco (DPIs). Estos dispositivos contienen ingredientes activos en solución o suspensión, con partículas finas en un propelente licuado (frecuentemente fluorocarbonados), el cual, le da la presión necesaria para que la suspensión o solución sea expulsado a través de un orificio de la válvula. Las gotitas salen del dispositivo a alta velocidad, causando una deposición orofaríngea. La cantidad máxima de fármaco liberado por una sola presión puede ser de 1- 3 mg en MDIs y DPIs. Los nebulizadores no requieren de propelentes y pueden generar grandes cantidades de pequeñas gotitas, capaces de penetrar en los pulmones.

En la actualidad, los nuevos sistemas de nebulización evitan problemas de sedimentación y excesiva deposición en boca-traquea [Edwards, 1999].

Los nebulizadores modernos tiene la capacidad de expulsar pequeñas partículas, que son capaces de penetrar en la región distal de los pulmones y mejorar la liberación del fármaco. Entre varios sistemas de liberación, considerados para la terapia pulmonar por medio de nebulización, las NP poliméricas biodegradables y los sistemas liposomales son los mas usados. En investigaciones previas, se ha demostrado, que las NP son más efectivas que los liposomas. Ya en que en varios estudios con liposomas han mostrado que las fuerzas de corte generadas durante la nebulización (debido a la alta energía durante la salida de las gotitas en forma de aerosol), pueden desequilibrar la integridad de los liposomas, ocasionando la ruptura y daño a los componentes de éstos, en forma particular, al principio activo encapsulado. Sin embargo, las NP poliméricas tienen la resistencia necesaria para minimizar el daño al fármaco, cuando son disparadas durante el proceso de nebulización. Por otra parte, las NP, cuando son aerolizadas, por medio de los nebulizadores, pueden ser más fácilmente incorporadas al tracto respiratorio debido a su tamaño nanométrico [Dailey y cols., al. 2003].

Los productos farmacéuticos pueden ser formulados como aerosoles farmacéuticos; utilizando soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos y semisólidos.

Las dispersiones o suspensiones (aerosol de polvo) son las más comúnmente usadas para la formulación de aerosoles, debido a que es posible lograr un control más estricto de la distribución del tamaño de la partícula, de las gotitas expelidas de la solución aerolizada; presentando una mayor estabilidad. Estas dispersiones están compuestas por principio activo, propelente(s) y solventes. El principio activo está suspendido o disperso por todo el propelente; el solvente se emplea para disolver los componentes activos y/o retardar la evaporación del propelente. Este sistema es útil para antibióticos, esteroides y otros componentes difíciles de disolver. Como en toda formulación, se presentan factores a controlar, los cuales son aglomeración, apelmazamiento, aumento del tamaño de la partícula y obstrucción de la válvula del aerosol. Para evitar la aglomeración y apelmazamiento, un aumento en el tamaño de partícula, evitaría la obstrucción de la válvula del aerosol. Además, se han ocupado diferentes surfactantes para dispersar las partículas, como los agentes dispersantes, los cuales, pueden ser trioleato de sorbitan, alcohol oleílico, ácido oleico, lecitina y aceite de maíz, que son útiles para

impedir a que las partículas se aglomeren [Rémington, 1999a]. No solo los factores mencionados en estos sistemas existen; sino que hay otros factores que afectan a los aerosoles, por ejemplo, cuando son formulados con partículas micronizadas, se tienen factores como: propiedades del fármaco y acarreador, talla de partícula, presencia de otros componentes, humedad relativa, comportamiento electrostático y condiciones de proceso [Ganderton y Jones, 1992].

Ejemplo de una suspensión para el inhalador de dosis medida es

- a) Componente(s) activos (s): micronizados y suspendidos
- b) Agente(s) dispersante(s): trioleato de sorbitan, alcohol oleílico, ácido oleílico, entre otros
- c) Propelentes: 12/11, 12/114, 14 o 12/114/11

Con los componentes anteriores se puede formular una suspensión, en la que el principio activo liofilizado se mezcla con agentes dispersantes y propelentes, con ésto se obtiene una suspensión con las características necesarias para un nebulizador. El liofilizado puede ser formado con NP y una mezcla de polvos (lactosa o sucrosa) adecuados para una dispersión o una suspensión para el aerosol.

2.2.5 Suspensiones

Una suspensión farmacéutica puede definirse como una dispersión que contiene material insoluble, finamente dividido y suspendido en un medio líquido. Las formas de dosificación en suspensión se administran por vía oral, se inyectan por vía intramuscular o subcutánea, además, de aplicarse sobre la piel en preparaciones tópicas o se utilizan para propósitos oftálmicos. [Rémington, 1999b].

Hay ciertos criterios que una suspensión debe cumplir, una de ellos son que las partículas dispersadas deben ser de un tamaño tal, que no sedimenten rápidamente en el recipiente. Sin embargo, en caso de que se produzca sedimentación, no deberá formarse una pasta dura; sí llegará a formarse, deberá redispersarse con un mínimo esfuerzo por parte del paciente. Los tres aspectos principales en relación con las suspensiones son 1) asegurar una

dispersión adecuada de las partículas en el vehículo; 2) reducir al mínimo la sedimentación de las partículas dispersadas y 3) prevenir que estas partículas formen “cake” (sedimento en el fondo del envase que lo contengan) en el caso que sedimenten [Rémington, 1999b].

2.2.5.1 Floculación y defloculación

El potencial zeta (Ψ_z) es una medida del potencial presente en la superficie de una partícula. Cuando el Ψ_z es relativamente alto (25 mV o más), las fuerzas de repulsión entre dos partículas son mayores, que las de atracción de London; en consecuencia se dispersan y se dice que están defloculadas. Aun, cuando se acercan por movimientos arbitrarios, las partículas defloculadas resisten la colisión debido a su alto potencial superficial. La adición de un ion adsorbido preferencialmente, cuya carga sea de signo opuesto al de la partícula, producirá un descenso progresivo del Ψ_z . A cierta concentración de ion añadido, las fuerzas de repulsión estarán lo suficientemente disminuidas como para que predomine las de atracción; en estas condiciones, las partículas pueden aproximarse más entre sí y formar agregados laxos, llamados flóculos; se dice entonces que el sistema está floculado [Rémington, 1999b]

2.2.5.2 Sedimentación y su control

Con el fin de controlar la sedimentación del material disperso en suspensión, el formulador debe conocer los factores físicos que afectan la velocidad de sedimentación de las partículas en condiciones ideales y no ideales.

- a) *Humectación o mojado de las partículas*: para obtener una suspensión es indispensable que el líquido humecte las partículas del sólido, si esto no ocurre no se puede dispersar una fase en la otra. Por lo general, muchos de los principios activos son insolubles en el medio acuoso; por lo tanto, se requiere de agentes humectantes para hacer una suspensión. Los más comunes son span, lauril sulfato de sodio, polisorbatos, entre otros.

- b) *Velocidad de sedimentación*: nos determina el tiempo en el que se producirá un depósito de partículas “cake”, durante su tiempo de almacenamiento. Además, este parámetro nos indica si es necesario aumentar o disminuir el tamaño de partícula o aumentar la viscosidad del medio.

- c) *Tamaño de partícula*: Cuando se formula una suspensión se debe de tener un tamaño de partícula adecuado y garantizar que se mantenga, debido que partículas mayores a 5 μm ocasionan una textura desagradable; por lo tanto, se requieren partículas con menor tamaño. Además la disminución del tamaño de partícula reduce la velocidad de sedimentación, así mismo tiene influencia con la velocidad de liberación del principio activo.

- d) *Control de la viscosidad*: Las propiedades reológicas de una suspensión farmacéutica debe tener la característica que cuando se encuentren en reposo tengan una elevada viscosidad; así se evitan procesos de sedimentación “cake” y agregación, pero al agitarla, la viscosidad se reduce para permitir la reconstitución y homogenización necesaria; por lo tanto, se necesitan vehículos plásticos o pseudoplásticos, de forma que en reposo sus viscosidades aparentes sean elevadas y retrasen la sedimentación, mientras con la agitación, disminuya la viscosidad y se pueda realizar una administración fácil y adecuada.

- e) *Control del potencial zeta*: Cuando las partículas se encuentran muy cargadas, se suele modificar las fuerzas de repulsión interparticulares con el fin de lograr un estado de floculación. Esto se puede lograr con la adición de electrólitos a la suspensión, favoreciendo que en la suspensión no se forme un “cake” [Vila, 2001].

2.2.5.3 Velocidad de sedimentación

La velocidad de sedimentación en una suspensión está relacionada con el tamaño de las partículas, al igual que la densidad y la viscosidad del medio de suspensión. El movimiento browniano puede ejercer un efecto significativo, y además la ausencia o presencia de floculación del sistema.

La velocidad de sedimentación de una suspensión uniforme de partículas esféricas está regida por la ley de Stokes:

Donde:

$$V = \frac{D^2 (\rho_1 - \rho_2) g}{18n}$$

r = radio de la partícula

v= volumen de sedimentación

D= diámetro de la partícula

ρ_1 = densidad de la partícula

ρ_2 =densidad del liquido

g= gravedad

n= viscosidad

La ley de Stokes se cumple sólo si el movimiento de las partículas hacia abajo no es lo suficientemente rápido para causar turbulencia o que la suspensión tenga menos de 2 g de sólidos por 100 ml. Si bien, las condiciones de una suspensión farmacéutica no están estrictamente para cumplir la ley de Stokes, la ecuación de Stokes suministra factores que deben influir en la velocidad de sedimentación. Por consiguiente, se reduce si disminuye el tamaño de las partículas, siempre y cuando éstas se mantengan en estado defloculado; pero, si las partículas forman un sedimento muy compacto superando las barreras energéticas, se pueden unir irreversiblemente. La velocidad de sedimentación es una función inversa de la viscosidad del medio de dispersión. Sin embargo, no es deseable una viscosidad muy alta del medio, en especial, si el medio suspensor es newtoniano y no se fluidifica por agitación, dado que resulta difícil la redispersión del material que se ha sedimentado. El tamaño real, que se hace significativo el movimiento browniano, depende de la densidad de la partícula, así como, de la viscosidad del medio de dispersión [Rémington, 1999b]. Existen casos en los que no es posible que una suspensión cumpla con la ecuación de Stokes: como en el caso de las suspensiones concentradas a más de 10 g de sólidos por 100 ml; con tamaños heterogéneos o si las partículas son irregulares [Vila, 2001].

2.2.5.4 Floculación controlada

Cuando se tiene una suspensión defloculada y se quiere producir floculación, se le debe agregar un agente floculante como los electrolitos, polímeros o tensóactivos. El objetivo es controlar la floculación, añadiendo la cantidad de agente floculante que dé como resultado un volumen máximo de sedimentación. Es probable, que los electrolitos sean los agentes floculantes más utilizados, éstos reducen las fuerzas eléctricas de repulsión entre partículas, lo que permite que las partículas formen flóculos laxos tan característicos en las suspensiones floculadas. Dado que la capacidad de las partículas es juntarse y formar un floculó, dependería de su carga superficial. Cuando se le añade un electrolito a la suspensión y se le mide el Ψ_z , nos proporcionaría información valiosa para el grado de floculación en el sistema [Rémington, 1999b].

2.3 NANOPARTÍCULAS

2.3.1. Generalidades

Las NP son definidas como partículas coloidales sólidas, con talla submicrónica (entre 10 y 1000 nm); pueden estar formadas con materiales de naturaleza polimérica, que suelen ser biodegradables o no; también son utilizadas como acarreadores farmacéuticos. Si se comparan con otros acarreadores coloidales, como los liposomas, las NP presentan una mayor estabilidad, cuando están en contacto con fluidos biológicos; debido a su naturaleza polimérica son más susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada. [Piñon-Segundo y cols., 2003].

Las NP pueden ser clasificadas como nanocápsulas (NC) y nanoesferas (NE). La diferencia entre estas dos estructuras está ligada a su morfología y arquitectura como se muestra en la Figura 5. Las NC son sistemas vesiculares, en las cuales, el fármaco en solución acuosa u oleosa está confinado en el centro de la partícula, rodeado por una membrana polimérica; así también, puede ser considerado como un sistema reservorio. Las NE son

sistemas matriciales donde el fármaco se encuentra dispersado por toda la partícula [Brigger y cols., 2002].

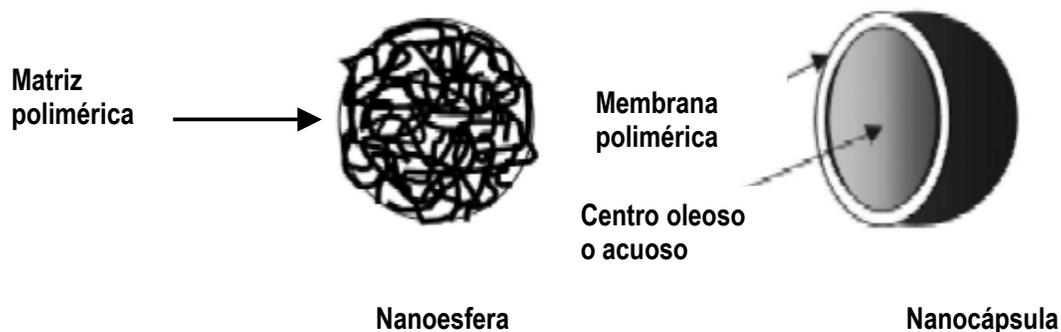


Fig. 5. Representación esquemática de las NE y NC [Brigger y cols., 2002].

Los polímeros, generalmente, se componen con poliésteres, tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y poli- ϵ -caprolactona (PECL), estos son comúnmente usados en el área clínica por su alta seguridad. El PLGA con una relación 50:50 de láctico y glicólico; hidrolizan rápidamente que aquellos que contienen una mayor proporción, de cualquiera de los dos monómeros [Brannon-Peppas, 1995]. Estos polímeros son derivados de monómeros (metabolitos naturales del cuerpo); así la degradación de estos materiales produce el correspondiente hidroxilácido, convirtiéndolos en sistemas seguros para su uso *in vivo*. La biocompatibilidad de los monómeros es el fundamento de la biocompatibilidad del polímero. Los ácidos láctico y glicólicos entran al ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs, que posteriormente, son eliminados del cuerpo como bióxido de carbono y agua [Piñon-Segundo y cols., 2003].

2.3.2 Métodos de preparación

Las NP pueden ser preparadas por métodos que involucran la polimerización de monómeros dispersos o por la dispersión de polímeros preformados, utilizando materiales de origen natural o sintético. De forma general, la preparación de NP, a partir de la polimerización

de monómeros, presenta diversos inconvenientes, pues los productos de reacción podrían no compatibilizar entre sí con el activo, provocar irritación, y además suelen dejar residuos tóxicos. Con lo anterior, desde el punto de vista farmacéutico, se prefiere la preparación de NP a partir de polímeros ya formados [De Jaeghere y cols., 1999].

Las técnicas de preparación de NP con polímeros preformados se pueden clasificar en cuatro categorías:

- a) Emulsificación – evaporación
- b) Desplazamiento de solvente
- c) Adición de sales o insolubilidad por soluciones salinas
- d) Emulsificación - difusión

En forma general, estas técnicas presentan similitud, ya que, todas ocupan una solución orgánica, que funciona como fase interna durante la preparación de las NP, fase que contiene el polímero y principio activo; la fase acuosa funciona como fase externa, ésta contiene los estabilizantes (medio de dispersión). Con estas técnicas se tiene un bajo rendimiento de encapsulación para fármacos solubles en agua, porque tienden a dirigirse por la fase externa, así que estas técnicas son consideradas eficientes para fármacos lipófilos [Quintanar- Guerrero y cols., 1997a].

A continuación se explican de manera general las técnicas de emulsificación – evaporación y desplazamiento de solvente, y también se describen aspectos importantes para las dos técnicas que serán empleadas en este proyecto: adición de sales y emulsificación-difusión.

2.3.2.1 Técnica de emulsificación-evaporación

En esta técnica el polímero y el fármaco son disueltos en un solvente inmisible en agua, los que serán emulsificados en una solución acuosa que contiene un surfactante. Esta emulsión es expuesta a una fuente de alta energía, tal como un dispositivo de ultrasonido o se hace pasar

a través de homogenizadores, molinos coloidales o microfluidizadores. El objetivo es reducir el tamaño de la partícula, seguida por una remoción del solvente orgánico por calor o vacío, obteniendo, finalmente, la formación de una dispersión fina de NP [Álvarez-Roman y cols., 2000]. Una representación esquemática se presenta en la Figura 6. Este método es sugerido para la producción de NE, con diferentes polímeros como: PLGA, PECL y derivados de celulosa. Los solventes orgánicos utilizados por este método son comúnmente cloroformo y cloruro de metileno, y los agentes estabilizantes incluyen a los polisorbatos, poloxameros y alcohol polivinílico (PVAL). Este método ha permitido el encapsulamiento con alta eficiencia de principios activos como testosterona, indometacina y ciclosporina A [Quintanar-Guerrero y cols., 1997a]. [Tortora, 2002].

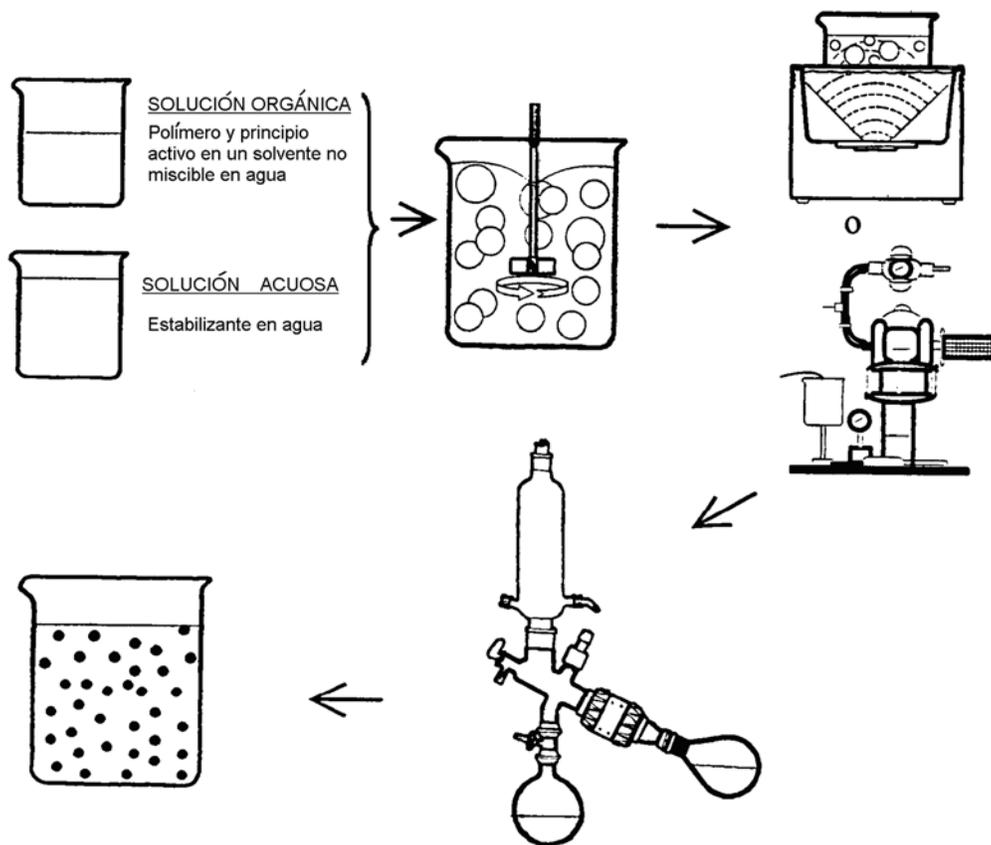


Fig. 6. Representación esquemática de la técnica “emulsificación-evaporación” para obtener NP [Quintanar-Guerrero y cols., 1997]

2.3.2.2 Técnica de desplazamiento de solventes

La formación de NP por este método fue descrito por Fessi y cols., en 1989. Se basa en el desplazamiento rápido del solvente de una solución formada por un solvente semipolar, soluble en agua, como es el caso de la acetona; aunque, también puede usarse etanol y metanol. El polímero, principio activo y, opcionalmente un estabilizante lipofilo (fosfolpidos) es adicionado o inyectado a otra solución que contiene un estabilizante (PVAL o poloxamer 188) hallándose en agitación mecánica. Las NP se forman instantáneamente por una rápida difusión del solvente, posteriormente, el solvente es eliminado de la suspensión por la evaporación, bajo presión reducida [Álvarez-Roman y cols., 2000]. Esta sencilla técnica se muestra en la Figura 7. La aplicación de este método se limita a fármacos muy solubles en solventes polares, pero, ligeramente, solubles en agua para evitar la pérdida de fármaco durante la difusión del solvente. Este método facilita la obtención de NP y NC sin necesidad de formar previamente una emulsión [Piñón-Segundo y cols., 2002].

2.3.2.3 Técnica de adición de sales

La técnica está basada en la separación (inmiscibilidad) de un solvente orgánico semipolar soluble en agua, por ejemplo: acetona, acetato de etilo (AE), entre otros, debido a sus propiedades solubilizantes y a la conocida separación de soluciones por electrolitos. El polímero y el activo son disueltos en el solvente orgánico, y la solución se emulsifica con agitación mecánica vigorosa en un gel acuoso que contiene una sal como el cloruro de magnesio, cloruro de calcio ó acetato de magnesio, y además de un estabilizante coloidal: el PVAL. Esta emulsión aceite/agua (O/W) se diluye con agua para permitir la difusión del solvente orgánico hacia la fase acuosa, induciendo la formación de NE. Posteriormente, el solvente y el electrolito son eliminados por filtración tangencial o centrifugación [Quintanar-Guerrero y cols., 1997a]. La Figura 8 muestra el procedimiento de la técnica de adición de sales.

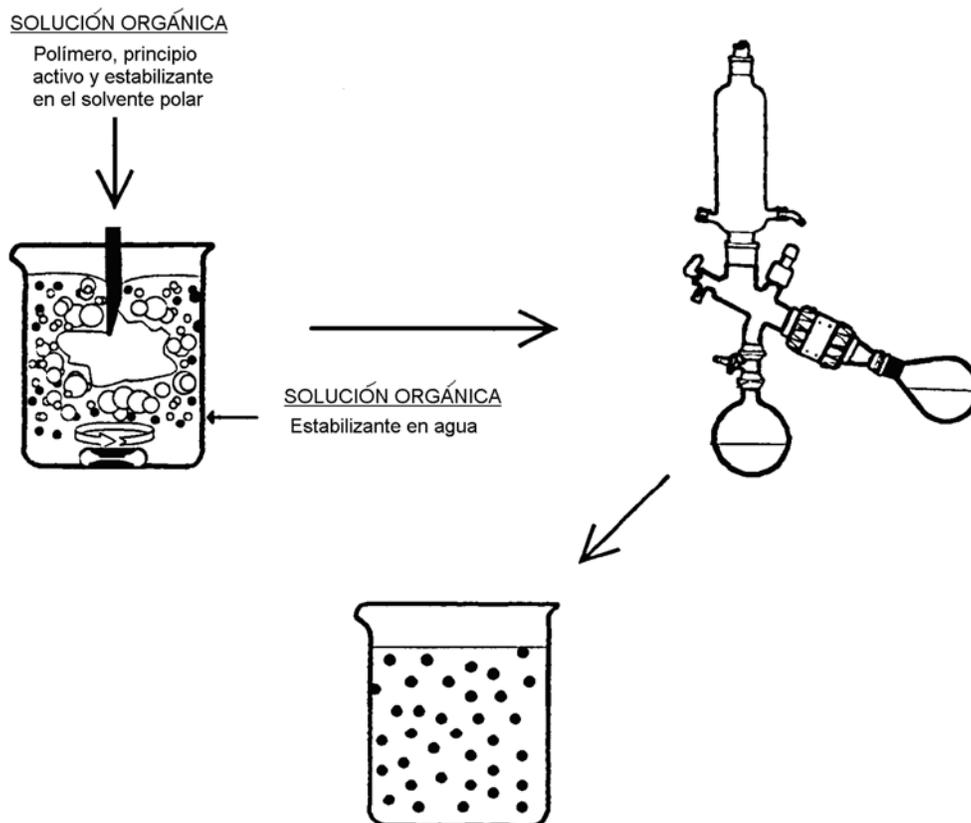


Fig. 7. Representación esquemática de la técnica “desplazamiento de solventes” para obtener NP [Quintanar-Guerrero y cols., 1997].

Aunque el mecanismo de formación no ha sido propuesto, éste podría tener cierta similitud con el observado por la técnica de desplazamiento de solvente. Las ventajas de esta técnica radican en la posibilidad de incorporar altas cantidades de polímero y activo con excelentes rendimientos; además, existe la posibilidad de escalamiento industrial. Por otro lado, esta técnica se limita a activos solubles en los solventes antes mencionados, así como electrolitos que permiten la separación de fases sin precipitación, y los estabilizantes solubles y compatibles con los electrolitos que no coacervan en presencia del solvente orgánico [Quintanar-Guerrero y cols., 1997a].

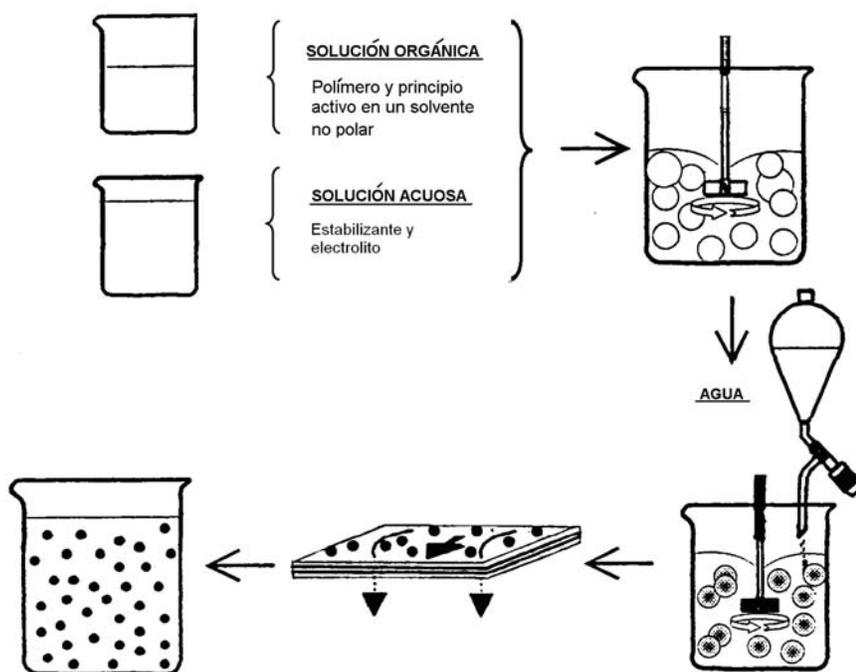


Fig. 8. Representación esquemática de la preparación de NE por el método "adición de sales" (S-O) [Quintanar-Guerrero y cols., 1997].

La técnica de adición de sales permite la utilización de polímeros preformados (por ejemplo poliésteres), éstos evitan problemas en la polimerización de monómeros e iniciadores a veces tóxicos y difíciles de eliminar. Sin embargo la utilización de agentes "salting out" a veces tóxicos y una velocidad de agitación muy elevada, en ocasiones son limitantes de la técnica [Montasser y cols., 2000].

Esta idea fue propuesta por Bisdchaedler y cols., en 1990, posteriormente fue optimizada por Alleman y cols., (1992) para preparar sistemas coloidales a base de polímeros sintéticos. El procedimiento implica por una parte; la disolución de un polímero hidrofílico (PVAL) en una solución saturada de un agente salino, como cloruro de magnesio, para obtener un gel

viscoso; más un polímero insoluble en agua (por ejemplo derivado de celulosa) que se disuelve en solventes miscibles como acetona, metiletilcetona (MEC) ó acetato de etilo, que son solubles en todas las proporciones con agua. La presencia de una gran concentración de electrolitos solvata las moléculas del agua, iniciando la difusión del solvente orgánico (en el agua) y la formación de una fase homogénea. Este proceso permite la emulsificación de ambas fases bajo la agitación mecánica [Montasser y cols., 2000]. La dilución progresiva del medio, mediante la adición de agua permite la difusión del solvente en la fase interna (fase acuosa). Proceso que permite la agregación del polímero insoluble en agua, formando partículas nanométricas [Montasser y cols., 2000].

La selección del electrolito está basada en sus parámetros termodinámicos (energía libre de hidratación) que permiten la separación de ambas fases líquidas. La emulsificación de la fase orgánica en la fase acuosa, sin precipitación del agente salino, después de la dilución del medio [Montasser y cols., 2000]. La utilización de una sal básica, como el acetato de magnesio, da lugar a una sal neutra o ácida (cloruro de magnesio) que mejora la absorción de principios activos básicos como por ejemplo la savoxepina ($pka=8.5$). El aumento del pH en la fase acuosa evita la solubilización de la savoxepina en la fase externa [Montasser y cols., 2000].

2.3.2.4 Técnica de emulsificación-difusión

Esta técnica es una modificación del proceso de adición de sales, pero no se ocupan sales; por lo tanto, no se requiere tiempos prolongados de purificación. Así mismo, involucra el uso de solventes parcialmente solubles en agua como: AE, acetato de metilo, acetato de isopropilo, alcohol bencílico, carbonato de propileno y MEC, éstos deben ser, previamente, saturados con agua para alcanzar un equilibrio termodinámico en ambos líquidos.

En esta técnica se tienen dos fases:

- a) La fase orgánica en donde se tiene el solvente saturado de agua, en el cual, se encuentra el principio activo a encapsular y el polímero.

- b) La fase acuosa, compuesta por agua saturada de solvente, en donde se encuentra el estabilizante (poloxámeros o PVAL).

Estas dos fases se emulsifican con agitación mecánica vigorosa formando una emulsión O/W. Después se adiciona agua a la emulsión, lo que causa que el solvente orgánico se difunda hacia la fase externa, provocando la formación de NP. Posteriormente, el exceso de solvente es retirado, por medio de destilación o por filtración tangencial, obteniendo NP libres del solvente orgánico [Quintanar-Guerrero y cols., 1998]. Los pasos de la técnica de obtención de NP por la técnica de emulsión-difusión se muestran en la Figura 9.

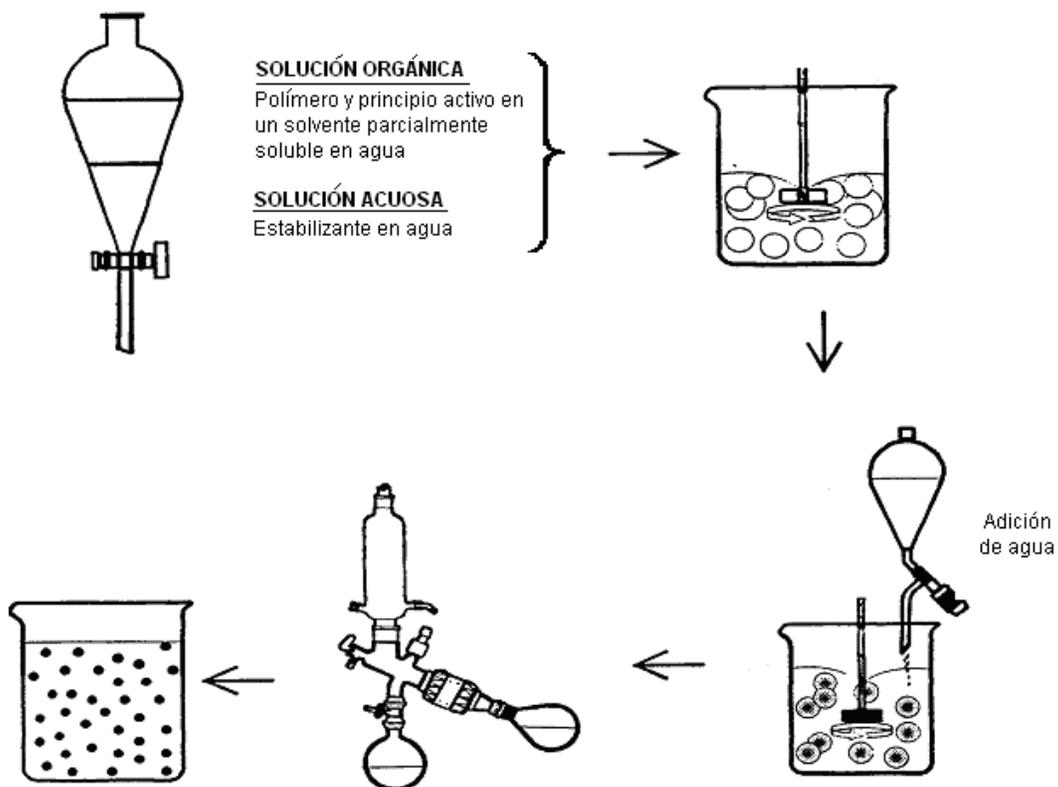


Fig. 9. Representación esquemática de la técnica E-D para obtener NE [Quintanar-Guerrero y cols., 1997].

Esta técnica presenta algunas ventajas sobre los otros métodos: a) el uso de solventes orgánicos aceptados farmacéuticamente como es el caso de la MEC y AE, considerados como los disolventes menos tóxicos y con menor riesgo para la salud humana; b) no necesita paso de homogenización; c) es altamente productivo; d) reproducibilidad de lote a lote y e) con grandes posibilidades de escalamiento industrial [Quintanar–Guerrero y cols., 1998].

Por otra parte, como todo método tiene sus desventajas: a) eliminación de altos volúmenes de agua de la suspensión; b) la probable salida del fármaco hacia la fase externa durante la emulsificación [Quintanar–Guerrero y cols., 1998]. La formación, por este método, involucra una serie de fenómenos secuenciales, como se observa en la Figura 10.

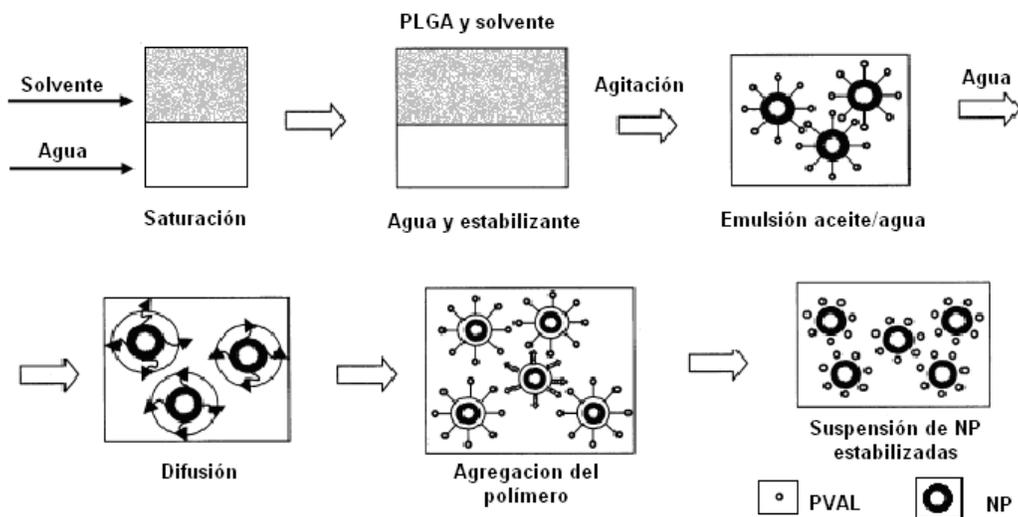


Fig. 10. Descripción de los fenómenos ocurridos para la formación de NP por la técnica de E-D. [Quintanar-Guerrero, et al, 1997b; Hye-Young, et. Al. 2001].

Primeramente hay una mutua saturación del solvente orgánico con el agua y agua con el solvente orgánico. Esta saturación favorece la existencia de un estado de equilibrio termodinámico entre los dos solventes. Después de la mutua saturación de los dos solventes, el

solvente orgánico saturado es mezclado con PLGA y el principio activo; en tanto que, al agua saturada se le adiciona el estabilizador. Posteriormente, se procede a una agitación vigorosa, lo que causa una dispersión en la solución del solvente, formando glóbulos que se encuentran en equilibrio con la fase continua; el agente estabilizante es, después, adsorbido sobre el área interfacial creada. La adición del agua desestabiliza el sistema, causando que el solvente se difunda hacia la fase externa. Durante el transporte del soluto, nuevos glóbulos de talla nanométrica son producidos, los que, gradualmente llegan a ser pobres en solvente. Como resultado, los nuevos glóbulos formados se transforman en diminutos agregados de polímero, sólido con una forma esférica [Quintanar-Guerrero y cols., 1998; Hye-Young y cols., 2001].

2.3.3 Nanopartículas cargadas con colorantes fluorescentes

El uso de NP encapsuladas con colorantes fluorescentes proporciona variedad de aplicaciones en las investigaciones; por su tamaño nanométrico, las NP, son ocupadas para teñir tejidos o localizar algún tumor; así como marcador en la circulación sanguínea, estomago, intestino o cualquier otro órgano interno en animales de experimentación, ésto con la finalidad de determinar si el marcador llega al lugar deseado. A nivel celular, también, se puede realizar; las NP pueden ser engullidas por diferentes células, como monocitos, linfocitos o macrófagos. Algunas de las aplicaciones de las NP cargadas con RN se presentan a continuación.

La primera es de Ganem-Quintanar y cols., (1998) quienes prepararon NP biodegradables de PLA por la técnica de emulsificación – difusión, cargadas con un marcador fluorescente (RN); tenían una talla promedio de 300 nm. Al obtener las NP realizaron estudios *in vitro* con mandíbula porcina. Mediante microscopia confocal láser observaron como las nanopartículas penetraban a través del epitelio dentogingival. Con esto, ellos proponen un tratamiento para enfermedades periodontales mediante el uso de NP [Ganem–Quintanar y cols., 1998].

Además, se han ocupado como un sistema acarreador para atravesar la barrera hematoencefálica. Un grupo de investigadores administraron NP por vía i.v. en ratones, con un carácter lipídico, atravesaron la barrera hematoencefálica; adhiriéndose a las células endoteliales

del cerebro. Ésto fue determinado mediante microscopia electrónica donde se observó una difusión del colorante en los tejidos del cerebro. Una ventaja de poder atravesar la barrera hematoencefálica es administrar fármacos en enfermedades como tripanosomiasis, donde el agente etiológico se halla en el cerebro; ya que los medicamentos ocupados para este tipo de tratamiento tienen poca afinidad al sitio de acción y una alta neurotoxicidad [Gessner y cols., 2000].

La segunda es de Nguyen y cols., (2003), quienes realizaron NP con ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico- metoxipolietilenglicol (PLA- MePEG), que fueron adicionadas a una mezcla de linfocitos y monocitos (aislados de suero humano). Posteriormente, esta mezcla (NP, monocitos y linfocitos) se incubó por 30 minutos a 37 ° C con agitación moderada. La medición de la interacción de NP con las células sanguíneas se realizó con un densitómetro, donde se midió la fluorescencia asociada de los monocitos (por que estas células actúan como fagocitos eficientes). Estudio que demostró la mínima interacción de NP de MePEG con las células sanguíneas que fue de un 20 %. Los resultados sugieren que el MePEG actúa interfiriendo en el proceso de opsonización de las NP con los monocitos y linfocitos. Logrando que las NP permanezcan tiempos prolongados en la circulación sanguínea.

La tercera es de Takeuchi y cols, (2001), quienes realizaron NP con polietilenglicol y colorante RN, se les evaluó la adhesividad en el saco intestinal de rata; para contar el número de partículas, con talla submicrónica adheridas, fue necesario la utilización de medios fluorométricos. Se determinó que las NP se encontraban en mayor número en duodeno; posteriormente en jejunio y finalmente, en ileum [Takeuchi y cols., 2001].

2.4 Tuberculosis

2.4.1 Generalidades

En las últimas décadas, más de 30 nuevas enfermedades infecciosas han sido identificadas. Algunas de éstas son el SIDA, Fiebre del Ebola, Encefalitis, Síndrome Pulmonar, Fiebre Hemorrágica, Hepatitis C, D y E; entre otras. Durante éste mismo período, algunas

enfermedades infecciosas, que ya se habían determinado como extinguidas, han resurgido como el caso de la TB, debido a la resistencia de fármacos antituberculosos, factores sociales, así como los viajes, el desplazamiento social y la pobreza [Snell, 2003].

Entre los diferentes factores asociados al resurgimiento de la TB, los de mayor importancia son los siguientes:

- a) Constitución genética: algunos individuos y grupos étnicos tienen mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, posiblemente por la participación de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).
- b) Condiciones socioeconómicas: la incidencia de la TB es frecuente en las clases sociales con menos recursos económicos; las condiciones de marginación como desnutrición, hacinamiento, falta de servicios sanitarios, falta de servicios de agua potable, atención médica baja escolaridad; los grupos de alto riesgo (niños, ancianos, drogadictos) son determinantes [Mediná-Varela, 2001, García y cols., 1995].

Además, con el advenimiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la diabetes mellitus, resurge la TB como una de las enfermedades de mayor importancia en la salud pública, al modificar su magnitud y naturaleza [Medina-Varela y cols., 2001]. Por lo tanto, en la década de los años noventa la OMS declaró a la TB como emergencia global [Soto, 1997].

A pesar de los avances e investigación en los últimos cien años sobre el tratamiento y prevención para esta enfermedad, continúan muriendo millones de personas cada año, parece extenderse al continente Africano y el sureste de Asia [Collins, 1998]. De acuerdo con la OMS el 90 % de los nuevos casos de TB se encuentran en países del tercer mundo, convirtiéndose en una de las infecciones bacteriales más importantes del mundo [Milian-Suazo y cols., 2002].

La mayoría de los casos de TB en el hombre son causados por *M. tuberculosis*, además de existir otras especies como: *M. avium*, *M. bovis*, *M. bovis*, *M. kanasassi*; entre otras menos comunes: *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. gordaonae* [Tierney, 2003].

La incidencia de la TB ha cambiado dramáticamente, desde el siglo pasado, de una enfermedad que afectaba principalmente a infantes, jóvenes y adultos en grandes comunidades urbanas; ahora empieza a expandirse principalmente a hospitales, casas hogar, albergues y prisiones [Rasolofo-Razanamparany y cols., 2000].

La quimioterapia ocupada inicialmente contra la TB, había resultado satisfactoria, hasta mediados del siglo pasado, para disminuir la mortalidad de esta enfermedad en Europa y Norte América, así como, en países del tercer mundo donde la TB empezó a incrementarse seriamente por problemas de salud pública. La severidad del problema ha sido indudablemente agravada por la epidemia del VIH, la cual, continúa causando muchas muertes a través de África, Asia y gran parte de Latinoamérica [Collins, 1998].

En países asiáticos y africanos encontramos a la TB con los mayores índices de infección, se tienen reportes que en la India, China, Bangla Desh y Pakistán se hallan más de la mitad de los casos de la enfermedad en todo el mundo. Esto se debe a las condiciones de salud antes mencionadas. En países del centro de Europa, Norte y Sudamérica, así como el Mediterráneo no hay tanta incidencia; sin embargo, en países del centro de África va en aumento su tasa de incidencia (de hasta 290 casos por cada 100 000 habitantes), este incremento está fuertemente asociado con la infección de VIH, donde los países más infectados son Botswana, Sur de África, Zambia y Zimbabwe [Frieden y cols., 2003].

La tasa de mortalidad por TB en México es elevada, ya que se tiene un promedio de morbilidad de 21 infectados por cada 100 000 habitantes, según la Secretaria de Salud (SSA) (www.ssa.gov, 2002), en comparación con los países desarrollados donde las tasas son menores al 0.5 por cada 100 000 habitantes [Trejo y cols., 2003].

2.4.2 Patogénesis de la infección con *M. Tuberculosis*

Los pacientes infectados con *M. tuberculosis*, en la mayoría de los casos, no muestran signos de la enfermedad, solamente un 10 % de los individuos infectados pueden desarrollar una reactivación de la enfermedad durante su tiempo de vida. Mucha gente considera a la TB como

un patógeno ineficaz, porque solamente una pequeña proporción de la población infectada muestra signos. De cualquier manera, los recientes brotes en el mundo muestran rápidamente cómo la infección es establecida y expandida [Höner y Rusell, 2001].

M. tuberculosis tiene grandes capacidades asociadas a su patogénesis, estas capacidades le permiten; sobrevivir y replicarse dentro del hospedero (fagocitos mononucleares), donde el acceso de fármacos antituberculosos es limitado [Quenelle y cols., 1999]. Este microorganismo tiene la habilidad específica de permanecer adormecido y de sobrevivir prolongados periodos de tiempo, dentro de los tejidos del hospedero sin, causar síntomas clínicos al paciente [Höner y Rusell, 2001].

2.4.3 Infección con *M. Tuberculosis*

La infección por *M. tuberculosis* se contagia de persona a persona, en la cual, el portador se encuentra enfermo de los pulmones. Cuando el paciente enfermo tose: expulsa aerosoles (gotitas con un diámetro de 3 – 5 μm), que contienen organismos viables [Tierney, 2003; Tossi y Ellner 1998; Collins, 1998]. La(s) persona(s) que estén en contacto con el portador de *M. tuberculosis* y sean susceptibles, inhalan estas gotitas dispersas en el aire (éstas contienen los organismos vivos). Estos bacilos tuberculosos pueden alcanzar los alvéolos pulmonares y como una respuesta inmune del cuerpo, son ingeridos por macrófagos alveolares produciendo una infección pulmonar. Las bacterias que logran escapar de los macrófagos, tienen una característica en su adaptación, ya que emplean varias moléculas celulares que se encuentran sobre la superficie de los macrófagos (receptores fibrolíticos y receptores de manosa) con quienes adquieren acceso al espacio intracelular. De esta forma y con algunos otros eventos celulares (alcalinización del fagosoma, prevención de fusión fagosoma – lisosoma y escape de fagosoma), la *M. tuberculosis* evade los mecanismos de muerte intracelular naturales.

Cuando se desarrolla una respuesta inmune por las células T y macrófagos, estos rodean a la micobacteria formando un granuloma, la cual, limita su multiplicación y propagación. Así la infección es contenida, pero no erradicada, permaneciendo años o décadas dentro del organismo. Los individuos con esta infección no tienen una enfermedad activa y no pueden

transmitir los organismos a otras personas. Sin embargo, es posible que la infección se reactive, si se produce deterioro en las defensas inmunitarias del huésped, debido a los diversos trastornos como: la gastrectomía, silicosis, diabetes mellitus e infección por VIH, tratamiento con corticoesteroides u otros fármacos inmunodepresores [Tierney, 2003].

Si la infección no es controlada ésta micobacteria empieza a crecer, culminando con la ruptura de los fagocitos infectados y de esta manera la infección se extiende a otras células por la circulación sanguínea, dañando tejidos, antes de desarrollarse una respuesta inmune eficaz del huésped contra la micobacteria. Si la infección se extiende la circulación sanguínea, llega a bazo, riñones, huesos y al sistema nervioso central (en su mayoría niños, ya que ellos aún no tienen desarrolladas por completo sus defensas). El desarrollo de la infección continua extendiéndose a pesar de una respuesta inmune celular, ya que esta respuesta es incapaz de limitar el desarrollo de la infección dentro de los pulmones [Collins, 1998].

2.4.4 Signos y síntomas

La TB es a menudo asintomática, de modo, que existe la probabilidad de que el paciente no muestre síntomas, excepto una vaga sensación de “no encontrarse bien”. La tos crónica es el síntoma pulmonar más frecuente; puede ser seca al principio, pero al avanzar la enfermedad, se produce con esputo amarillento o verdoso, éste ocurre por lo general, cuando el paciente se levanta por la mañana. Otro síntoma es la disnea que puede ocurrir debido a la rotura del tejido pulmonar o la existencia de un derrame pleural, causado por una reacción inflamatoria intensa, ya que el material gaseoso fue liberado por un pequeño granuloma, signo que por lo regular, sugiere una infección reciente o TB primaria progresiva [Mellado-Balderas, 2000].

Los síntomas de la TB son característicos, ya que progresan de manera lenta:

1. malestar general
2. anorexia
3. pérdida de peso
4. fiebre
5. sudores nocturnos

Cuando se les realiza un examen físico a pacientes con TB suelen presentarse crónicamente enfermo y desnutrido. En las radiografías del tórax no existen hallazgos específicos de infección tuberculosa (crecimiento de ganglios linfáticos hiliares y paratraqueales, así como atelectasia segmentaria) [Tierney, 2003].

2.4.5 Infección de tuberculosis a enfermos con VIH.

Las condiciones de una débil inmunidad incrementan la posibilidad de provocar una infección primaria y por lo tanto, incrementar el desarrollo *M. tuberculosis*. En personas infectadas con VIH corren un alto riesgo para desarrollar TB, cuando están infectados con esta micobacteria, ya que *M. tuberculosis* es comúnmente oportunista [Tossi y Ellner, 1998].

Recientemente, la infección por VIH se ha sumado a la larga lista de factores de riesgo, y en la actualidad constituye el de mayor asociación con el desarrollo de TB. En sujetos VIH positivos existen situaciones en relación con la TB, son las siguientes:

1. Representa un riesgo importante que ocasiona deterioro en la calidad de vida y de sus funciones cotidianas.
2. Mayor frecuencia de infecciones ante la exposición del bacilo; ya que, un individuo con VIH positivo tiene mayores posibilidades de ser más susceptible a la exposición, que un individuo VIH negativo.
3. Cuando los pacientes VIH positivos desarrollan TB activa, son más frecuentes las localizaciones extrapulmonares, sufren mayor número de recaídas y la mortalidad es más elevada.
4. Se infectan por cepas de *M. tuberculosis* más resistentes a uno o a más fármacos antituberculosos, desarrollando la enfermedad.
5. Señala la probabilidad de que el padecimiento no se diagnostique en vida del paciente.

La magnitud del problema destaca la importancia para reforzar la prevención y el control de la TB en estos pacientes. La herramienta con la que se cuenta para disminuir la transmisión es la búsqueda y el tratamiento de los casos de TB activa. Esta actividad presenta graves fallas;

porque existe una diferencia entre la tasa notificada y la tasa estimada; por lo tanto es probable que se diagnostique sólo una tercera parte de los pacientes. La frecuencia de TB activa detectada en pacientes con VIH indica la posibilidad de presentación de brotes nosocomiales, institucionales o comunitarios en México [García y cols., 1995].

2.4.6 Tratamiento

La meta del tratamiento es asegurar la cura de la TB sin recaídas, prevenir la muerte, detener la transmisión y prever la resistencia a fármacos por *M. Tuberculosis* [Frieden y cols., 2003]. Casi todos los tratamientos recomendados tienen dos basados en ensayos clínicos extensivos. Hay una fase inicial intensiva diseñada a detener el crecimiento y matar el bacilo adormecido. Esta acción disminuye hasta un 80-90 %, después de dos meses. En la segunda parte se limita el crecimiento de *M. tuberculosis* y empieza a matar a los bacilos lentamente [Frieden y cols., 2003].

Los tratamientos por seis meses han demostrado su efectividad en prácticamente 100% de los casos, bajo una estricta supervisión del paciente. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la OMS y Norma Oficial Mexicana (NOM) contempla un tratamiento supervisado a todos los enfermos de TB bajo un régimen de seis meses [Trejo y cols., 2003]. En la Tabla 1 se muestra el esquema de un tratamiento contra la TB ocupado en el IMSS.

Debido al prolongado periodo de generación de las micobacterias y sus largos periodos de inactividad metabólica, los tratamientos prolongados son siempre necesarios. Los regímenes terapéuticos no difieren en el tratamiento de TB pulmonar y extrapulmonar, excepto en los casos de TB miliar, ósea-articular y meníngea el tratamiento debe ser al menos 12 meses de duración [Soto, 1997].

Hoy la TB puede ser resuelta usando quimioterapia. El régimen de tratamientos con fármacos, es largo (6, 9 y hasta 12 meses) y el incumplimiento es uno de los mayores obstáculos para la efectividad del tratamiento. Sin embargo, nuestro arsenal de antibióticos para el tratamiento de TB activa es relativamente ineficiente contra esta micobacteria; por lo tanto,

nuevos fármacos necesitan acelerar el curso de la quimioterapia debido a la resistencia de la micobacteria [Höner y cols., 2001].

Fase	Individuos con peso > 50 kg	Individuos con peso < 50 kg	
		Niño	Adulto
	Niño/adulto	Dosis: mg/kg, vía oral	
Fase intensiva (dos meses)	Cuatro comprimidos al día, vía oral, de la siguiente combinación Isoniazida 75 mg Rifampicina 150 mg Pirazinamida 400 mg Tres capsulas al día, vía oral Etambutol 400mg	Isoniazida 10 -20 (300) Rifampicina 10-20 (600) Pirazinamida 15-30 (2g) Etambutol 15- 25(2.5g)	Isoniazida 5 (300) Rifampicina 10 (600) Pirazinamida 15-30 (2g) Etambutol 15-25 (2.5g)
Fase de mantenimiento	Cuatro capsulas al día (lunes, miércoles y viernes), vía oral, de la siguiente combinación	Dosis: mg/kg, vía oral	Dosis: mg/kg, vía oral
	Isoniazida 200	Isoniazida 20-40	Isoniazida 15
	Rifampicina 150	Rifampicina 10- 20	Rifampicina 10
Quimioprofilaxis	Durante 6 a 12 meses, Isoniazida 10 -15 mg/kg (300 mg)		

Entre paréntesis aparecen las dosis máximas recomendadas; los medicamentos deben ingerirse en una sola toma

Tabla 2. Tratamiento para TB (seis meses). [Trejo y cols., 2003; Soto y cols., 1997].

Para combatir la TB son necesarias formas farmacéuticas que tengan la capacidad de llegar a los pulmones y generar un efecto farmacológico prolongado, así como efectivo; por ende, se tendrían tratamientos de periodos cortos, sin tener efectos tóxicos y una minimización

en las reacciones adversas. Candidatos excelentes pueden ser las NP para lograr las metas antes mencionadas. Los tratamientos ocupados en la actualidad con formas farmacéuticas convencionales no tienen los requerimientos antes mencionados, debido a que no llegan en grandes concentraciones a los pulmones, ocasionando tratamientos largos y tediosos, esto implica en los pacientes un alto porcentaje de desertación antes de concluir su tratamiento, provocando un número elevado de brotes de nuevos casos, que en su mayoría no se registran.

2.4.7 Toxicidad

Fármaco	Efecto Adverso
Rifampicina	Hepatitis, fiebre, trombocitopenia
Isoniazida	Hepatitis, neuropatía periférica, niveles elevados de difenilhidantoina
Pirarnizida	Diarrea, dolor abdominal, hepatitis, hiperuricemia, artralgias, urticaria
Etambutol	Urticaria, neuritis peptica, disminuye la discriminación visual entre el rojo y el verde
Estreptomizina	Eosinofilia, hipomagnesemia, e hipocalcemia; toxicidad auditiva, vestibular y renal
Etionamida	Hepatitis
Cicloserina	Depresión y convulsiones

Tabla 3. Principales reacciones adversas de fármacos antituberculosos. Fuentes de: [Trejo y cols., 2003; Soto, 1997].

Como se ha revisado bibliográficamente se tiene una alta incidencia de la TB, tanto en México como en el resto del mundo, debido a sus tiempos prolongados del tratamiento (3, 6 9 y hasta 12 meses). Por lo tanto, se ha tomado la iniciativa de crear o descubrir nuevas formas farmacéuticas, las cuales tengan, un efecto sostenido y puedan llegar al sitio blanco de infección, con el fin de disminuir el tiempo en el tratamiento y los costos, donde las NP pueden ser una

opción. En el presente trabajo se ocuparon los SCAF (sistemas acarreadores) porque no solo tienen la capacidad de incrementar la concentración de fármaco en sitios blanco (tejidos, órganos y células); sino, además contribuyen a la protección del fármaco y a la degradación en el medio donde son expuestas [Brzoska y cols., 2004].

Para saber si una sustancia o principio activo pueda llegar al sitio donde nosotros deseamos, se utilizan los marcadores intracelulares, en los cuales, los colorantes fluorescentes, han tenido mucho éxito. Estos colorantes se han podido encapsular en NP, en la actualidad los marcadores han servido en varias investigaciones (ver punto 2.3.3.).Cuya finalidad es saber si un fármaco o sustancia puede llegar a cierto órgano, tejido o célula, ó en su caso, saber si puede atravesar cierta barrera fisiológica.

Las NP fluorescentes han servido como marcadores en varias experimentaciones para llegar al sitio deseado, por lo tanto, nosotros encapsulamos dos colorantes fluorescentes: RN ya utilizado como marcador intracelular y AN que no se ha ocupado como marcador intracelular.

En la actualidad, un cuadro básico de fármacos se ocupan para el tratamiento de la TB, pero entre los de mayor uso contra esta micobacteria es la RIF debido a su eficacia. La RIF es un antibiótico de espectro reducido, considerado como el fármaco más eficaz contra *M. tuberculosis*; actúa en bacilos intracelulares y extracelulares, además se ha comprobado su sinergismo, cuando se emplea junto con la Isoniazida, produciendo una excelente respuesta en TB pulmonar, con la desaparición de fiebre, disminución de tos y desaparición de los bacilos en los esputos [Litter, 1992]. Este fármaco se ha encapsulado en micropartículas, las cuales, tuvieron un efecto sostenido, ya que disminuyeron las UFC (unidades formadoras de colonias) con una sola administración por mas de tres semanas [Quenelle y cols., 1999] (ver sección 2.2.3).

Entre otros, se encuentra la CLFXM que es un agente antibactericida para combatir *M. tuberculosis*, pero, aún se encuentra en investigación para determinar su potencialidad contra la TB [Soto, 1997], sin embargo, su mayor actividad es actuar contra *Mycobacterium leprae*. Este fármaco está incluido en una terapia múltiple de 4 medicamentos, contra *Mycobacterium leprae*

incluyendo la RIF, además, tiene la capacidad de ser antibacteriostático y tener poca actividad bactericida [Godman y Gilman, 1998].

Las NP fluorescentes se utilizarán en otros proyectos, donde se piensa estudiar la relación *in vitro*, los cuales, se pondrán en contacto con células infectadas por *M. tuberculosis*, cuyo fin será saber si pueden ser engullidas o internarse en dichas células infectadas. Cuando se tengan resultados favorables, posteriormente, se pondrán en contacto NP cargadas con fármacos antituberculosos y determinar si tienen los mismos resultados que las NP fluorescentes. Mas adelante, se pretende realizar estudios *in vivo*, en donde las NP se pondrán en contacto directamente con tejido, órganos o conejillos de indias para determinar su efecto en organismos vivos. En proyectos futuros se piensa formular las NP en aerosoles, ya que éstos tienen la capacidad de llegar a los pulmones y lograr un efecto más sostenido, con ventajas sobre las otras formas farmacéuticas, cuya finalidad, será no tener efectos adversos, porque el fármaco únicamente llegará al sitio infectado; además disminuiría los costos en los tratamientos

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar las técnicas de emulsificación-difusión y adición de sales para obtener nanopartículas biodegradables con tallas menores a 500 nm cargadas de colorantes fluorescentes y fármacos antituberculosos para su potencial uso como vectores farmacéuticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Encapsular un colorante fluorescente (Rojo de Nilo) y un principio activo lipofílico (Clofazimina) mediante la técnica de emulsificación – difusión.
2. Encapsular un colorante fluorescente (Azul de Nilo) y un principio activo antituberculoso (Rifampicina) mediante la técnica de adición de sales.
3. Analizar el efecto de la velocidad de agitación y tipo de solvente sobre el tamaño de las NP en las técnicas de emulsificación-difusión y adición de sales.
4. Evaluar las nanopartículas obtenidas por medio de su forma mediante Microscopia Electrónica de Barrido, tamaño promedio, eficiencia de encapsulamiento y análisis térmico.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES E INSTRUMENTOS

4.1.1 POLÍMEROS

1. Poli (D, L-láctico - co-glicólico) 50:50, Resomer® RG502; Boheringer Ingelheim, Alemania
2. Poli-ε-caprolocatona; Sigma Aldrich, Estados Unidos de America
3. Alcohol polivinilico, Mowiol ® 4-88, Glomarza, Mexico

4.1.2 REACTIVOS

1. Acetato de etilo grado espectrofotométrico, Fermot, México
2. Metiletilcetona, grado HPLC; Fermot, México
3. Acetona, grado HPLC; Fermot, México
4. Agua destilada obtenida de un equipo RiOs Millipore, Estados Unidos

4.1.3 COLORANTES Y PRINCIPIOS ACTIVOS

1. Rojo de Nilo, Sigma Aldrich, Estados Unidos de América
2. Azul de Nilo Sigma Aldrich, Estados Unidos de América
3. Rifampicina Sigma Aldrich, Estados Unidos de América
4. CLOfazimina Sigma Aldrich, Estados Unidos de América

4.1.4 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

1. Filtros Millex®-GV con poro de 0.22 µm Millipore®, Estados Unidos de América
2. Rota vapor, Buche, Heidolph, Q01Tipo Laborota 4000, Alemania

3. Liofilizador de mesa; Labconco®, Estados Unidos de América
4. Agitador de velocidad variable RZR – 1; Caframo®, Alemania
5. Ultracentrifuga Optima® LE-80K; Beckman, Estados Unidos de América
6. Centrifuga Hettich, EBA 12, Estados Unidos de América
7. Ph metro 430, Cornig® Ucrania.
8. Ultrasonicador, Branson® 5210, Estados Unidos de América
9. Nanosizer® Coulter N4 Plus, Beckman, Estados Unidos de América
10. Espectrofotómetro DU® – RU, Beckman, Estados Unidos de América
11. Balanza Analítica BBC32, Boeco Alemania
12. Microbalanza MS, E. Mettler®, Zurich
13. Zetasiser Nano ZS, Zen 3600, Inglaterra
14. Ultraturrax TS5BS1, IKA, Labortechik®, Estados Unidos de América
15. Parilla eléctrica con agitación Cimarec®, Thermoline, Estados Unidos de América
16. Agitador magnético Magnestir, Lab-Line Instumentes, Estados Unidos de América
17. Microscopio electrónico de barrido JSM-25 S II; JEOL, Japón
18. Campana para recubrimiento de oro JFC-1100; JOEL, Japón
19. Calorímetro diferencial de Barrido DSC Q10; TA Instruments, Estados Unidos de América
20. Recirculador de líquidos con termostato; 9105 Scientific, Estados Unidos de América
21. Filtros Pirex ASTM 10-15 M4-10 mμ, GB, Suiza
22. Material de cristalería

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Preparación de nanopartículas por la técnica de emulsificación difusión

1. Se mezclaron 80 ml de AE o MEC con 120 ml de agua en un embudo de separación. Posteriormente, se colocó el embudo en posición vertical dejando reposar de 20 – 30 minutos hasta la separación de ambas fases.
2. Se tomó la fase acuosa y se preparó una solución de PVAL al 5% p/v.
3. En la fase orgánica se disolvió el colorante, principio activo y polímero.
4. La fase acuosa y orgánica se emulsificaron mediante agitación mecánica (agitador de velocidad variable) a 1700 rpm durante 10 min.
5. A los diez minutos se le adicionó agua destilada sin parar de agitarla.
6. El solvente orgánico es eliminado bajo presión reducida por medio de un rotavapor
7. La suspensión es concentrada hasta la mitad del volumen inicial (aproximadamente 100 ml) por la eliminación del agua.
8. Las NP se lavaron por medio de centrifugación a una velocidad de 20000 rpm por 10 minutos.
9. La pastilla se resuspendió con agua destilada por medio de sonicación o vortex.
10. Se repiten dos veces los pasos 8 y 9.
11. La pastilla se resuspendió con agua destilada. Esta suspensión se congeló a – 20 ° C en un enfriador de inmersión etanol – agua 50: 50 y posteriormente, se liofilizó.

4.2.2 Preparación de nanopartículas por la técnica de adición de sales.

I Preparación de la fase acuosa:

Se realizó una solución al 60% p/p de Cloruro de Magnesio Hexahidratado, en la fase acuosa. Posteriormente, a esta solución se le adicionó PVAL en una proporción al 1 % p/p y se le dejó humedeciendo de 30 – 60 min; después se calentó a una temperatura de 80 °C por 20 minutos con agitación continua. Por último se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

II Preparación de la fase orgánica:

En 20 ml AE se disolvió de 5 – 20 mg de principio activo y 400 mg de PLGA, posteriormente, se colocó en agitación por 5 minutos, hasta disolución total.

Preparación de nanoesferas:

1. En un vaso se mezclaron 40 ml de la fase acuosa con 20 ml de la fase orgánica con ultraturrax a 13000 rpm por 5 minutos.
2. El solvente orgánico se eliminó bajo presión reducida por medio de un rotavapor
3. Esta solución se centrifugó a una velocidad de 20000 rpm por 10 minutos.
4. La pastilla se resuspendió en agua destilada por medio de vortex y sonicación.
5. Los dos pasos anteriores se realizaron por duplicado.
6. La pastilla se resuspendió en agua destilada. Esta suspensión se congeló a -20°C en un enfriador de inmersión etanol – agua 50:50 y posteriormente se liofilizó.
7. Por último, se tomaron 5 mg del polvo liofilizado y se resuspendió en 10 ml de agua destilada, esta solución se leyó en un Nanosizer.

4.2.3 Determinaciones previas

4.2.3.1 Espectros de Absorción para Clofazimina y Rifampicina

Se estableció la λ (longitud de onda) de máxima absorción de CLFXM en metanol. Los barridos se realizaron de 200 – 400 nm (observar anexos). Así mismo se realizó un barrido para saber la λ de máxima absorción de RIF en NaOH 0.1 N de 200-400 nm (observar anexos).

4.2.3.2 Curva de calibración para Clofazimina y Rifampicina

Se realizaron dos curvas de calibración por triplicado con 6 concentraciones diferentes cada una leyéndose a las diferentes λ de cada principio activo por medio de Espectrofotometría UV (observar en anexos).

CLFXM en metanol $\lambda = 285\text{ nm}$

RIF en NaOH $\lambda = 234\text{ nm}$

4.2.4 EVALUACIONES DE LAS NANOPARTICULAS

4.2.4.1 Medición del tamaño de partícula

Se determinó la talla de partícula promedio y la distribución de las nanoesferas, por medio de un Nanosizer®. Las mediciones se hicieron por triplicado en una suspensión de nanopartículas liofilizadas y no liofilizadas.

Los datos obtenidos, con este análisis, son la talla promedió de las partículas, la distribución de tamaño de partícula y la desviación estándar de la misma; además del índice de polidispersidad de la muestra. La desviación estándar (d.e.) de la distribución del tamaño de partícula proporciona una indicación cualitativa de la polidispersidad de la muestra. El índice de polidispersidad (I.P.) está relacionado con el coeficiente de variación (C.V.) de la distribución del tamaño de partícula por la expresión:

$$CV = \sqrt{\frac{1}{2 * I.P.}}$$

CV = Coeficiente de Variación
I.P. = Índice de Polidispersidad

4.2.4.2 Morfología

Las NP de las diferentes sustancias encapsuladas RN, AN, RIF y CLFXM, se observaron por Microscopia Electrónica de Barrido con un previo baño de oro (grosor aproximado de 20-30 nm).

4.2.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido.

Se tomaron entre 5-10 mg de NE de los lotes liofilizados de RN, AN, RIF y CLFXM. Las muestras se colocaron en celdas y se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de calentamiento de 10 °C/ min. Todos los termogramas se corrieron de 25 a 250 °C.

4.2.4.4 Determinación del potencial Zeta

Se tomaron entre 5 y 10 mg del liofilizado de nanopartículas de los lotes liofilizados de RN, AN, RIF y CLFXM, los cuales, fueron suspendidos en 10 ml de agua destilada previamente filtrada con Filtros Millex®-GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.40 μm (Millipore®). A esta solución se le realizó una dilución de 1:10 que posteriormente, se le evaluó la movilidad electroforética con un equipo Malvem (ZEN3600), utilizando una aproximación de Smoluchowski para medios acuosos obteniendo el potencial Z correspondiente. Las mediciones de las NP se realizaron por triplicado.

4.2.4.5 Determinación de Rifampicina en las nanopartículas elaboradas por la técnica de adición de sales.

Se digirió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10mg) con 5 ml de hidróxido de Sodio 0.1 N (NaOH 0.1N), con agitación magnética por 72 horas. Después, el sistema se filtró con membrana Millipore de 0.22 μm y se ajustó el volumen a 10 ml con agua destilada. Se determinó la absorbancia a $\lambda = 234 \text{ nm}$ interpolando en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración del compuesto atrapado en el sistema. El blanco utilizado fue NaOH 0.1 N.

4.2.4.6 Determinación de Clofazimina en las nanopartículas elaboradas por la técnica de emulsificación -difusión.

Se tomó una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (10-20 mg), la cuál, se suspendió en 10 ml de H_2O ; posteriormente, se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos. Se tomó el precipitado de la muestra y se colocó en un vidrio de reloj dentro de un desecador; una vez seca la muestra es colocada en 5 ml de metanol y en agitación por 48 horas. Después se llevó a centrifugación para eliminar la cantidad de PVAL residual; se determinó la absorbancia a $\lambda = 285 \text{ nm}$ y se interpoló en la curva de calibración correspondiente, para obtener la concentración del ingrediente encapsulado en el sistema. El blanco fue metanol.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Nanoesferas blanco preparadas por el método de emulsificación-difusión: Efecto de la velocidad de agitación

Se prepararon NP blanco por el método de E-D (ver metodología, sección 4.2.1.) utilizando AE, solvente parcialmente soluble en agua. La técnica utilizada para la preparación de NP se apoyó en trabajos investigación previamente realizados en nuestro laboratorio [Piñón-Segundo y cols., 2003; Chavez-Monrroy y cols., 2002].

Se realizaron los primeros lotes blanco, posteriormente se les midió la talla de partícula con un Nanosizer® Coulter N4 Plus obteniendo NE con una talla promedio de 2000 nanómetros (nm). Uno de los objetivos primordiales era obtener NP menores a 500 nm por lo tanto se le realizaron modificaciones al proceso original

El método de E-D consiste de dos etapas: la emulsificación y la difusión. Quintanar-Guerrero (1997) y Hye-Young (2001), consideraron la emulsificación como el proceso más importante, debido a que en esta etapa se define el tamaño de glóbulo formado y a partir de este glóbulo se forman NP debido a la difusión del solvente. Por consiguiente entre más pequeños son los glóbulos más pequeñas son las NP.

Por lo tanto para obtener NP menores a 500 nm se realizaron las siguientes modificaciones al proceso original:

a) Aumento de la velocidad de agitación para disminuir el tamaño de partícula.

Se prepararon lotes de NE blanco a 1200, 1400, 1600 y 1800 rpm con un agitador de velocidad variable, además, de obtener las tallas de partícula se les determinó la D.E. e I.P, estos datos son mostrados en la Tabla 4 pagina 56 y figuras 11- 14 (paginas 57, 58). Se determinó que al incrementar la velocidad de agitación disminuye la talla promedio, asimismo obteniendo valores de I. P. alrededor de 1.00. Con este valor se tiene una población polidispersa (NP con diferentes tallas), pero, el objetivo era obtener una población monodispersa (NP del

mismo tamaño) para tener reproducibilidad del tamaño de partícula de lote a lote, para lograrlo es indispensable tener valores menores a 0.2 del I.P., por lo tanto no hay reproducibilidad del tamaño de NP en los lotes preparados.

RPM	Talla de Partícula (nm)	D.E (nm)	I.P.
1200	1906.9	344.8	0.602
	1976.7	356.8	1.184
	1896.0	351.0	1.002
\bar{X}	1926.9	350.8	0.926
1400	1229.2	474.8	0.706
	1125.4	442.2	0.404
	1123.6	509.3	1.153
\bar{X}	1159.4	475.4	0.754
1600	1008.3	325.0	0.329
	1002.1	509.3	1.153
	945.5	528.6	2.264
\bar{X}	985.3	454.3	1.249
1800	740.2	312.5	0.380
	749.5	260.6	1.341
	734.7	337.9	1.374
\bar{X}	741.5	303.7	1.023
1900	535.2	175.5	0.148
	518.9	261.5	0.816
	524.4	171.5	0.151
\bar{X}	526.2	202.8	0.371

Tabla 4. Talla de partícula promedio para NE blanco por el método E-D a diferentes velocidades de agitación, con un agitador de velocidad variable.

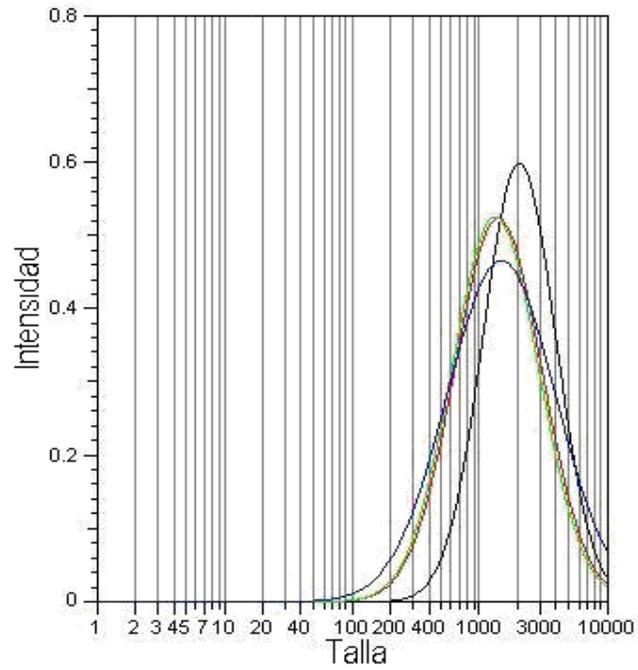


Fig. 11. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1200 rpm por la técnica de E-D.

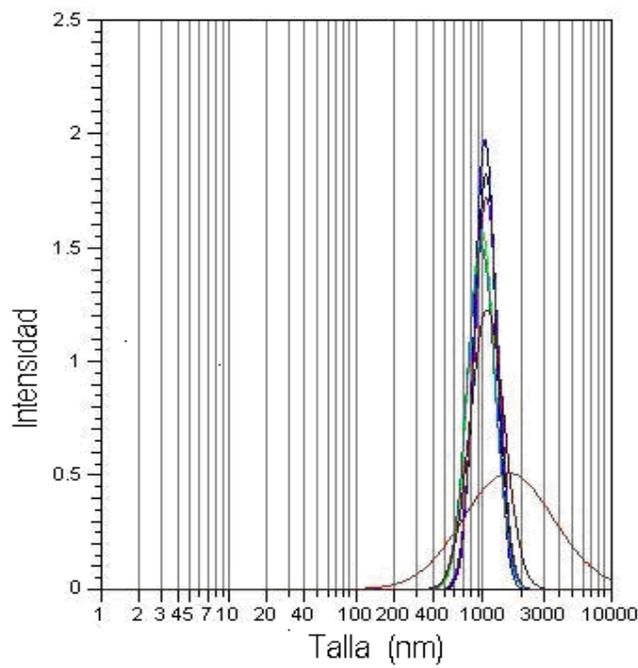


Fig. 12. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1400 rpm por técnica de E-D.

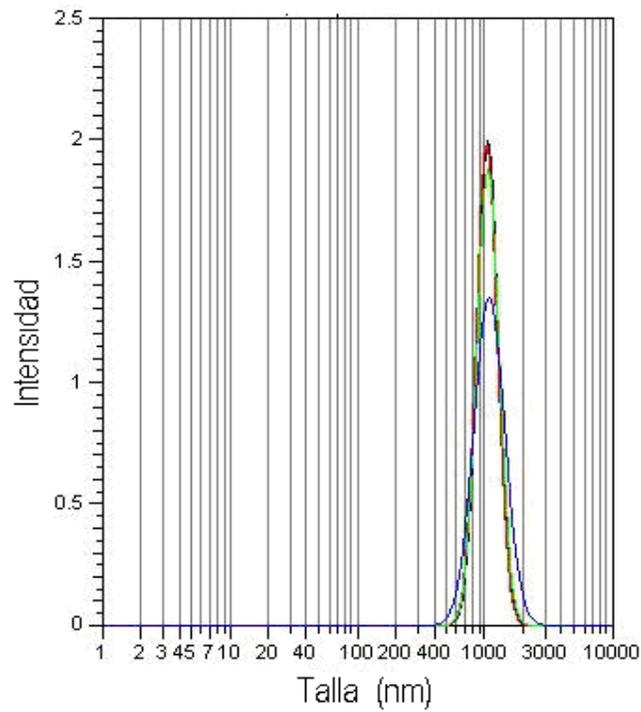


Fig. 13. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1600 rpm por técnica de E-D.

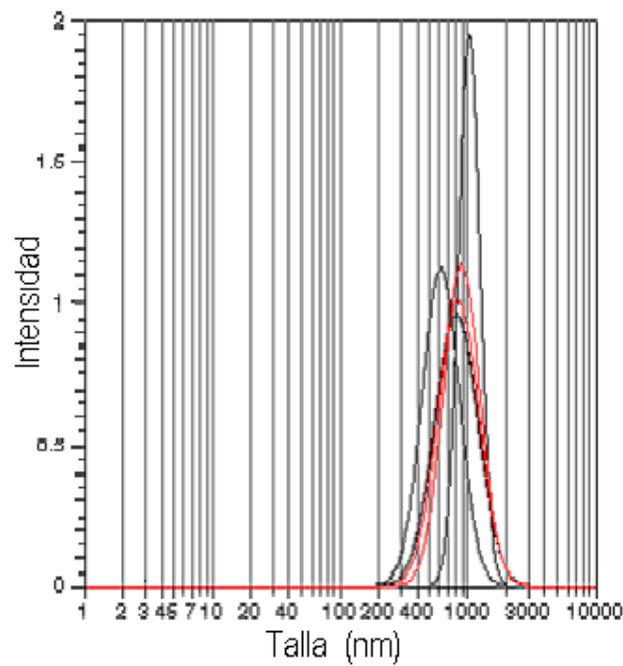


Fig. 14. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1800 rpm por técnica de E-D.

b) Modificaciones al método de preparación de la solución de PVAL

El PVAL determina forma, propiedades físicas, características de superficie, productividad y uniformidad en el tamaño de partícula, además, evita la coalescencia y formación de aglomerados, porque cadenas de PVAL se unen fuertemente en la superficie de las NP formando una capa estable [Murakami, H. y cols, 1997; Piñón-Segundo y cols., 2003]. En estudios previos realizados por Quintanar-Guerrero y cols., (1996) experimentaron con polímeros que funcionan como estabilizantes en la técnica de E-D los cuales fueron: PVAL (Mowiol® 4-88), polioxitelino sorbitan monoleato (polysorbato 80), gelatina, poloxamero 188 (Pluronic®, F-68), polyvinilpirrolidona (Kollidon®) y dextran 70. De entre todos estos se confirmó que el PVAL es el mejor estabilizante para la técnica de E-D.

Para lograr NE con una capa estable de PVAL, se modificó la preparación del estabilizante. Los gránulos de PVAL se dejaron humedeciendo con la solución saturada de solvente por un lapso de 30 – 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se calentó la solución a una temperatura de 60–70 °C por un tiempo de 30-60 min. evitando la evaporación del solvente. Se continuó con agitación continua hasta enfriar la solución. Posteriormente, se filtró para eliminar impurezas.

- c) Disminución de la temperatura del baño del rotavapor de 40 a 30 °C, debido a que en esta temperatura el polímero se encuentra por debajo de su Tg.*
- d) Aumentó del tiempo de evaporación, para eliminar todo el solvente (20 a 40 min).*
- e) Disminución del tiempo y velocidad de centrifugación (en los lavados) evitando que se forme una pastilla difícil de resuspender.*
- f) Realización de ciclos de 5 minutos de agitación con el sonicador para poder resuspender la suspensión de NP, de igual manera se hicieron ciclos de resuspensión con el vortex*
- g) Utilización de filtros Schot num. 2 y 4, para selección de NP con talla menores a 500 nm.*

Con estas modificaciones se obtuvieron los resultados deseados, llegando a una talla promedio de 500 – 600 nm en los lotes preparados con AE. Esto se observa en el lote a 1900 rpm obteniéndose un I. P. menor a 0.2 lo que indica una estrecha distribución del tamaño de partícula. Cuando se tiene una talla constante de partícula y angosta distribución, se sugiere que

la preparación de la técnica es reproducible y las partículas formadas, tienen una talla homogénea [Bivas-Benita y cols., 2004]. Por consiguiente un índice de polidispersidad menor a 0.2 es población monodispersa. Donde el 90–95 % de las partículas se encuentran en la talla referida.

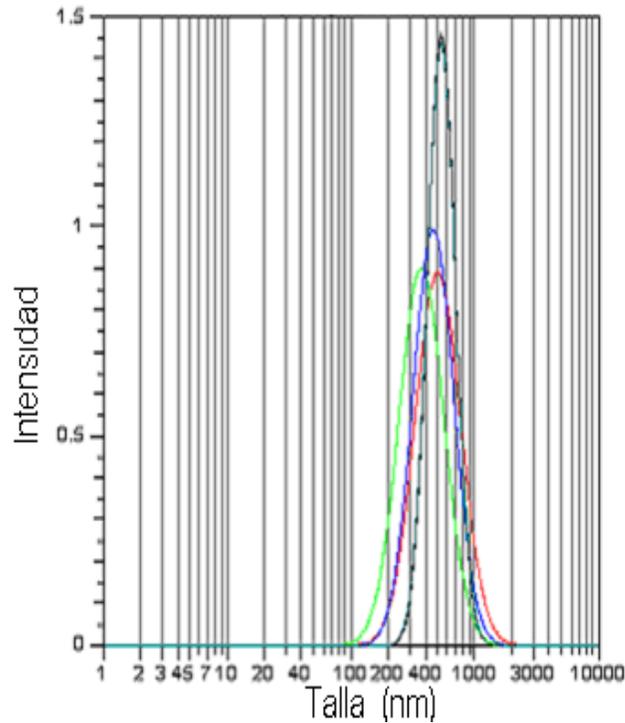


Fig. 15. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1900 rpm por técnica de E-D.

5.2 Nanoesferas cargadas con Rojo de Nilo y Clofazimina por el método de emulsificación-difusión.

Después de que se obtuvieron los lotes blancos de NE con el tamaño requerido (500 nm), se procedió a encapsular el Rojo de Nilo. Después de preparar varios lotes con las condiciones antes mencionadas, se obtuvieron NE con una talla promedio de 500 – 600 nm. No obstante se tuvieron problemas con los lavados debido a que se formaba una pastilla dura y difícil de resuspender. Por lo que se intentó separarlas con una disminución del tiempo y

velocidad de centrifugación, aplicando ciclos de agitación por más de 10 minutos y el uso de filtros Schot pero sin ningún resultado favorable. Por lo tanto se decidió evaluarlas por medio de MEB, donde se observó que se habían formado agregados (grupos de NP) ver Figura 28 paginas 60 y 61. Estos agregados tenían tallas mayores a 1000 nm y eran muy difíciles de separar por lo que se optó por cambiar de solvente.

Se eligió MEC, al igual que el AE, es altamente miscible con el agua [Ibrahim y cols., 1992]. Éstos solventes son considerados como los menos tóxicos y con menor riesgo para la salud humana, por lo tanto son aceptados para su uso farmacéutico según la Federación Estadounidense de Medicamentos y Alimentos [www.fda.gov].

Se prepararon lotes blanco con MEC a 1700 rpm y con las modificaciones antes mencionadas obteniendo NE con una talla menor a 500 nm. En la Tabla 5 y Figura 16 se muestran los lotes blanco realizados con MEC a 1700 rpm con un agitador de velocidad variable. Como se puede observar se obtuvieron NE con tallas semejantes a las reportadas por Piñon-Segundó y cols. (2003). En dicha investigación se prepararon NE a la velocidad de agitación mencionada, obteniendo NE con talla menor a 300 nm. Debido a que está talla de NP (< 500 nm) es la indicada para ocuparlas como vectores farmacéuticos [Hans y cols., 2002; Couvreur y cols., 1995]. Por otra parte se obtuvo un índice de polidispersidad menor a 0.2 en la mayoría de las mediciones, indicando una estrecha distribución de la talla de partícula. Esto se puede observar en la Tabla 5 y Figura 16 que es una representación de tres lotes realizados, donde la mayoría de las tallas de partícula se encuentran entre 305 y 317 nm.

RPM	Talla de partícula (nm)	D.E (nm)	I.P.
1700	317.3	67.6	0.075
	310.3	46.1	0.020
	305.8	46.1	0.332
\bar{X}	311.13	53.3	0.142

Tabla 5. Talla de partícula promedio para NE blanco por el método E-D usando como solvente MEC.

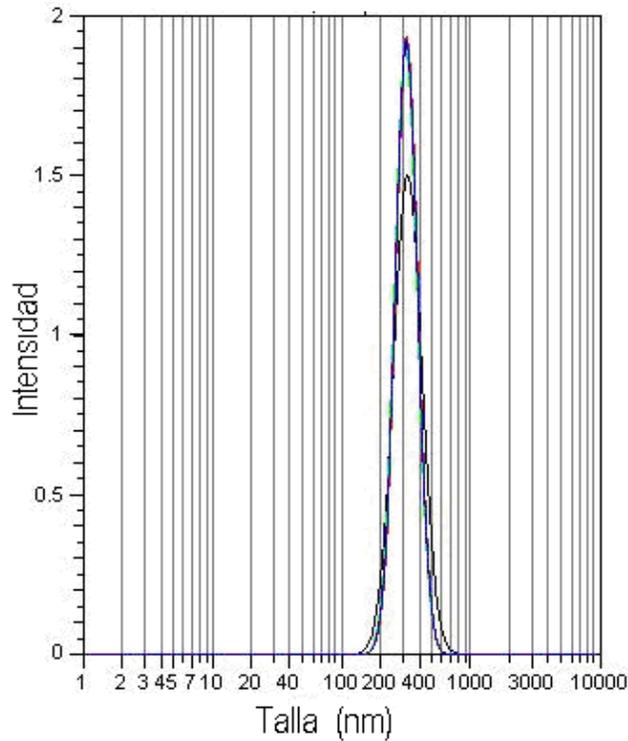


Fig. 16. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco realizadas a 1700 rpm por la técnica de E-D utilizando como solvente MEC.

Lote	Talla de partícula (nm)	D.E (nm)	I.P.
RN	312.5	46.1	0.225
	313.8	46.1	0.023
	315.3	46.1	0.121
\bar{X}	313.8	46.1	0.123
CLFXM	290.8	64.4	0.006
	291.5	63.6	0.060
	293.2	61.8	0.025
\bar{X}	291.8	63.3	0.030

Tabla 6. Talla de partícula promedio para NE por el método E-D de RN y CLFXM antes de liofilizar.

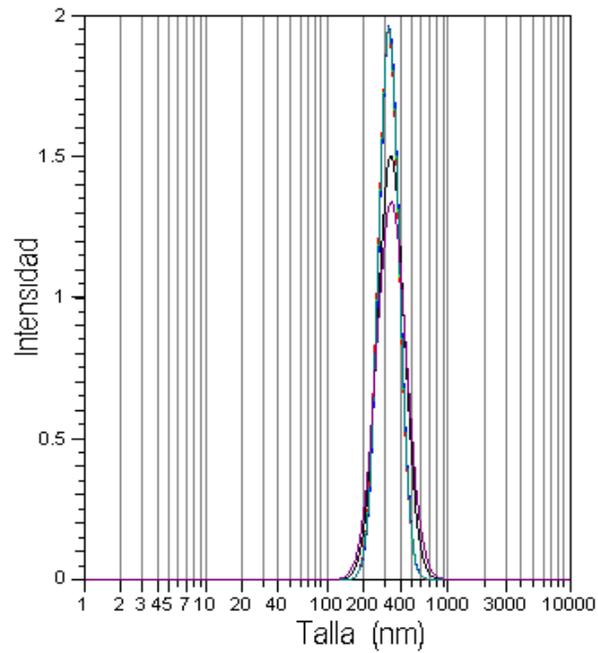


Fig. 17. Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con RN formadas mediante la técnica de E-D a 1700 rpm.

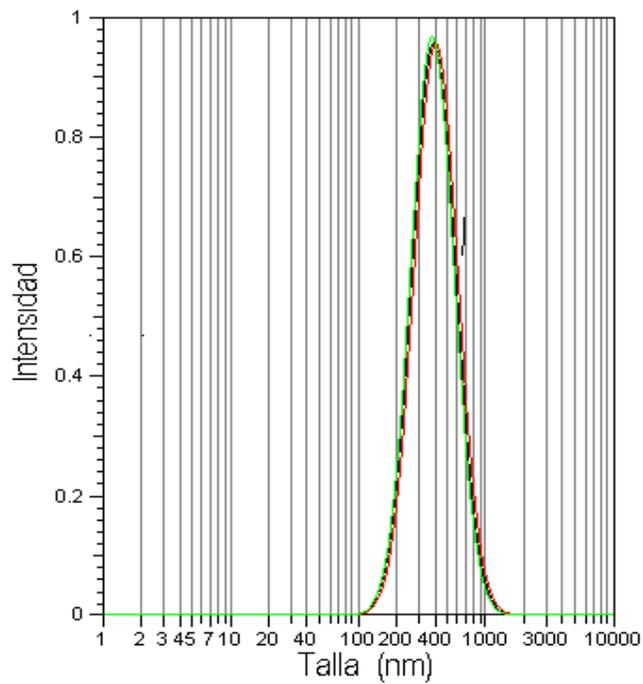


Fig. 18. Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con CLFXM formadas mediante la técnica de E-D a 1700 rpm.

Uno de los problemas que se encontraron en las NP de PLGA fue su alta inestabilidad en medio acuoso. Por consiguiente si se obtiene una completa eliminación del agua, se tendrían NP anhidras y con ello extender el tiempo de vida media, proporcionando así alta estabilidad. Para obtener partículas deshidratadas se ocupó la liofilización, con la que obtienen productos no hidratados [Konan y cols. 2002]. En la Tabla 7, Figuras 19 y 20 se muestran las tallas de las NE de RN y CLFXM después de liofilizar. El proceso de liofilización afectó al lote de NE cargadas con CLFXM, debido a que se determinó un aumento en la talla de partícula además de obtener NE mayores a 500 nm.

Principio Activo	Lote	Talla (µm)	DE (µm)	I.P.
RN	1	403.7	141.7	0.156
	2	402.7	152.7	0.163
	3	373.1	124.5	0.035
	\bar{X}	393.16	136.3	0.118
CLFXM	1	772.0	588.6	0.376
	2	597.8	403.3	0.237
	3	425.7	153.5	0.018
	\bar{X}	598.5	381.8	0.210

Tabla 7. Talla de partícula promedio para NE por el método E-D de RN y CLFXM después de liofilizar.

Además del aumento en la talla de partícula de los lotes cargados con CLFXM y RN se observó agregación de las NE después de liofilizar. Para poder eliminar este problema se le adicionó un crioprotector (trealosa) el cual tiene la característica de evitar la agregación de las partículas, esto se retomará con más detalle en la sección 5.5.

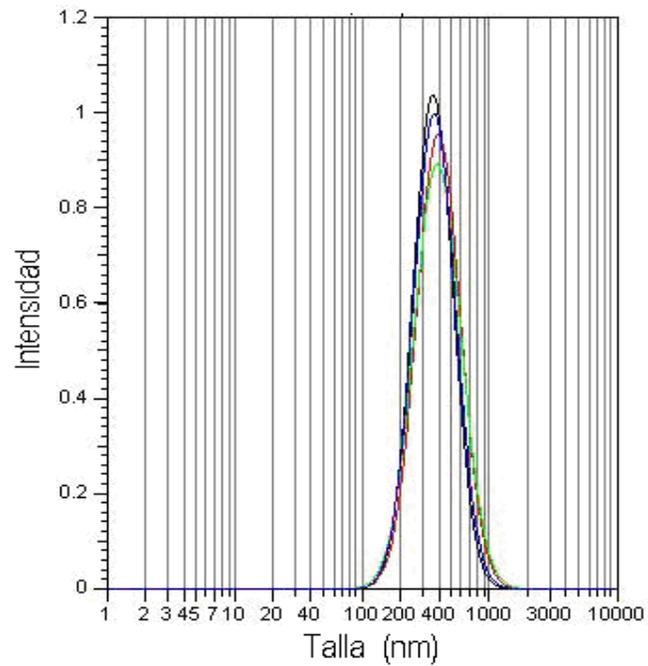


Fig. 19. Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con RN mediante la técnica de E-D a 1700 rpm después de liofilizar.

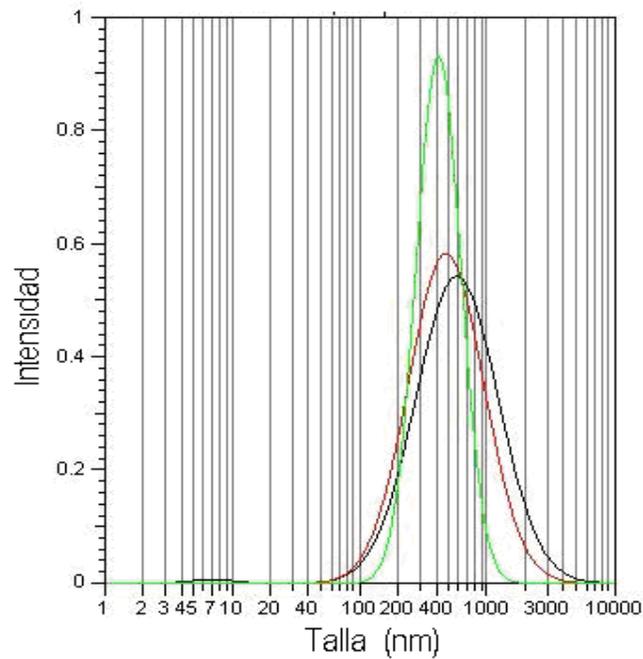


Fig. 20. Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con CLFXM mediante la técnica de E-D a 1700 rpm después de liofilizar.

5.3 Nanoesferas formadas por la técnica de adición de sales y el efecto de la velocidad de agitación

En esta técnica se recomienda usar acetona como fase oleosa, pero debido a la insolubilidad de los principios activos en este solvente, se eligió AE, el cual también ha sido ocupado en esta técnica [Alleman y cols., 1992]. Los principios activos se disolvían fácilmente en este solvente.

La metodología ocupada fue basada en trabajos previos de Allemán y cols., 1992; Allemán y cols., 1993. En esta técnica se ocuparon las mismas proporciones de la fase oleosa (misma cantidad de polímero y solvente) y la fase acuosa (mismo volumen de solución de PVAL) de la técnica de E-D. Cabe recalcar que al método se le hizo una modificación la cual fue la ausencia de adición de agua después de emulsificar. Es importante mencionar que a nuestro conocimiento es la primera vez que se realiza NE por el método de S-O sin el paso de dilución, para encapsular principios activos hidrofílicos.

Los lotes de NE blanco se prepararon con un agitador de velocidad variable obteniendo NE con tallas $\approx 2\ 000$ nm, como ya se había mencionado anteriormente el objetivo era obtener NP con tallas menores a 500 nm, por lo consiguiente se optó por cambiar de agitador, utilizando un dispositivo de alta velocidad (ultraturrax). Realizando lotes a diferentes velocidades de 11 000 a 22 000 rpm. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8, Figuras 21, 22 y 23.

Como se esperaba, la talla de partícula disminuyó cuando la velocidad de agitación fue incrementada. Entre las velocidades de agitación de 11 000 a 22 000 rpm, se observó una disminución en la talla de partícula de 100 nm. Konan y cols., (2002) realizaron NP de PLGA, por el método de S-O con un agitador de altas velocidades, de igual manera ellos determinaron que al aumentar la velocidad de agitación, disminuía la talla de partícula. Estos investigadores ocuparon velocidades de agitación de 2000 rpm a 13500 rpm logrando tallas de aproximadamente 200 nm.

RPM	Talla de partícula (nm)	D.E (nm)	I.P.
2000	1716.1	259.2	1.157
	1636.7	360.3	1.866
	1736.1	264.7	1.054
\bar{X}	1693.3	294.7	1.357
11000	356.3	109.0	0.496
	361.7	114.7	0.308
	358.7	111.6	0.263
\bar{X}	358.9	111.8	0.356
13 000	312.5	46.1	0.140
	313.6	46.1	0.476
	315.5	46.1	0.163
\bar{X}	313.8	46.1	0.259
16 000	297.5	56.8	0.281
	297.8	56.4	0.305
	290.7	64.5	0.294
\bar{X}	295.3	55.8	0.293
19 000	269.4	78.6	0.079
	267.1	79.5	0.053
	271.2	77.8	0.004
\bar{X}	269.2	78.6	0.045
22 000	265.9	74.9	0.085
	266.8	79.6	0.071
	255.9	82.4	0.062
\bar{X}	262.8	78.9	0.072

Tabla 8. Talla de partícula promedio para NE por la técnica de S-O a diferentes rpm utilizando como solvente AE.

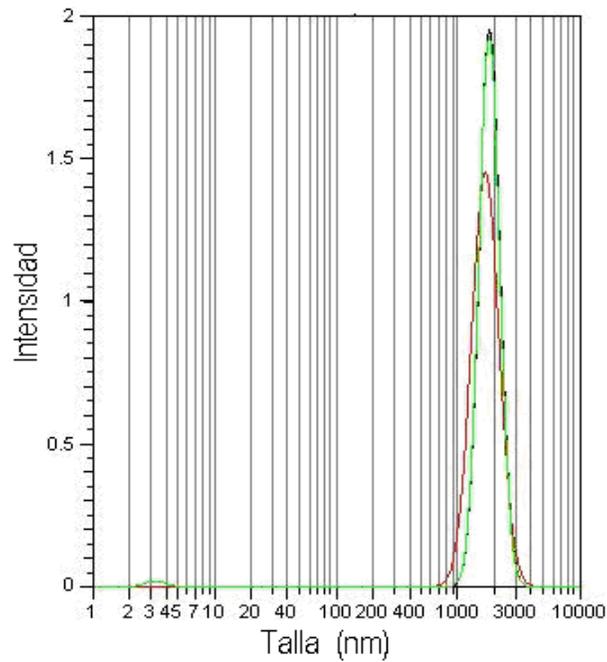


Fig. 21. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco a 2000 rpm mediante la técnica de S-O ocupando como solvente AE, con una talla promedio de 1736.7 nm

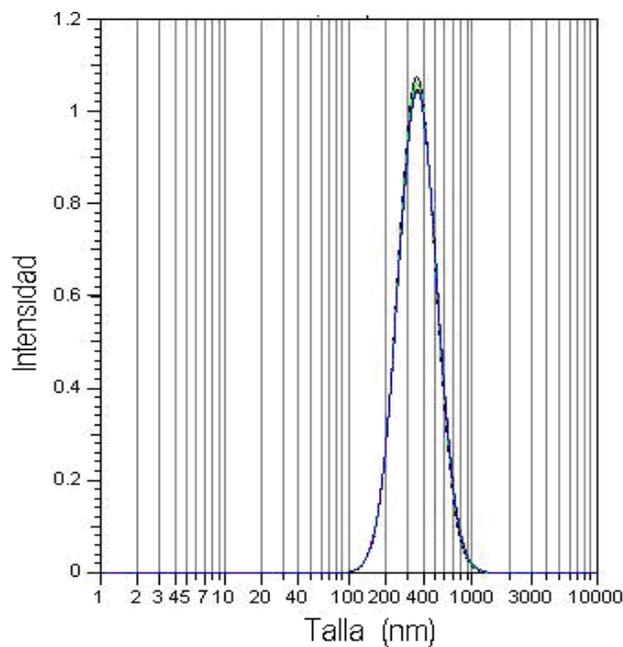


Fig. 22. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco a 11 000 rpm mediante la técnica de S-O ocupando como solvente AE, con una talla promedio de 358.7 nm.

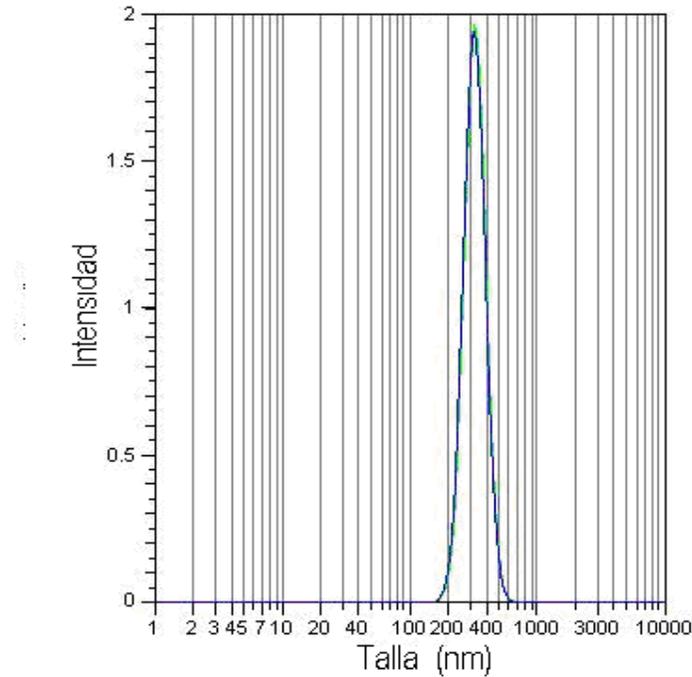


Fig. 23. Distribución del tamaño de partícula para NE blanco a 13 000 rpm mediante la técnica de S-O ocupando como solvente AE, con una talla promedio de 313.8 nm.

5.4 Nanoesferas cargadas con Azul de Nilo y Rifampicina por el método de adición de sales.

Se eligió una velocidad de agitación de 13 000 rpm para preparar los lotes cargados con AN y RIF los resultados de estos lotes se muestran en la Tabla 9, Figuras 24 y 25. No se eligieron las velocidades de agitación de 16000, 19000 ó 22000 rpm debido a que se producía bastante espuma y calentamiento en el medio de homogenización, disminuyendo la eficiencia del proceso, además de una posible degradación del principio activo por la elevación de la temperatura. Se ha establecido que el mezclado a alta velocidad genera una considerable energía, debido a una gran fuerza de corte, la cual incrementa la temperatura. Por lo tanto se debe de mantener una adecuada temperatura de trabajo, debido a que si hay un aumento de temperatura se tiene una transferencia de calor hacia el fármaco [Konan y cols., 2002].

Principio activo	Lote	Talla (nm)	D.E (nm)	I.P.
Azul de Nilo	1	278.5	74.0	0.117
	2	276.0	75.4	0.123
	3	274.6	76.2	0.150
	\bar{X}	276.3	75.2	0.130
Rifampicina	1	229.1	80.2	0.021
	2	229.1	80.2	0.019
	3	233.2	81.4	0.093
	\bar{X}	230.4	80.6	0.044

Tabla 9. Talla de partícula promedio para NE de AN y RIF antes de liofilizar por la técnica de adición de sales utilizando como solvente AE.

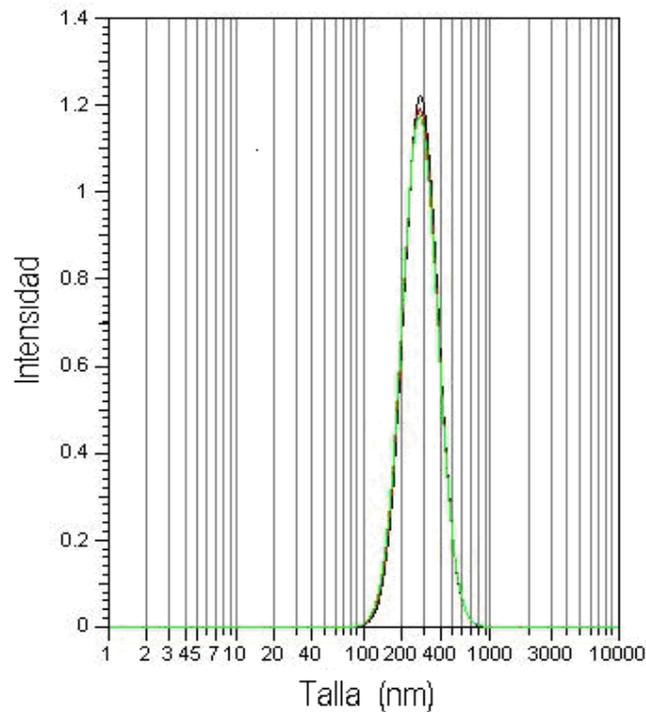


Fig. 24. Distribución del tamaño de partícula para NE de AN preparadas por la técnica de S-O antes del proceso de liofilización.

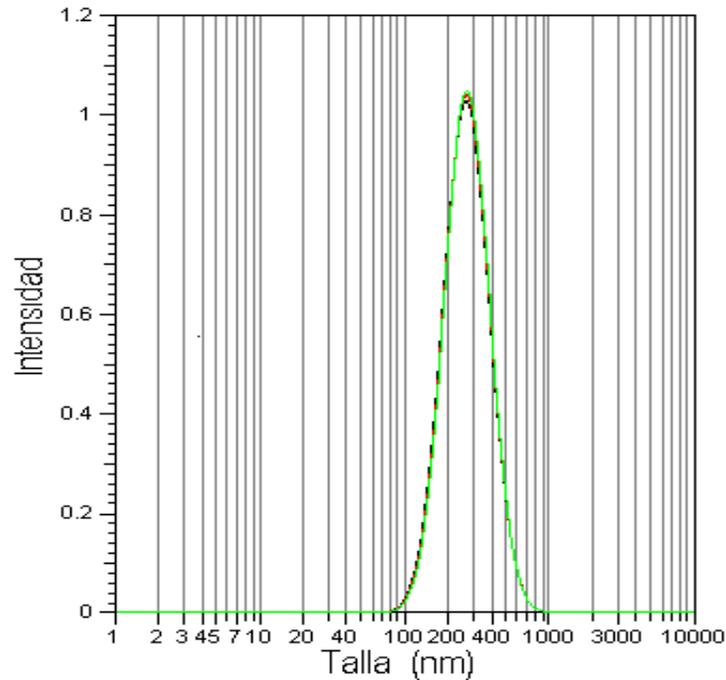


Fig. 25. Distribución del tamaño de partícula para NE de RIF preparadas por la técnica de S-O antes del proceso de liofilizado.

Al encapsular RIF se formaron agregados (grupos de NP), después de liofilizar se determinó la talla de partícula obtenida, también sucedió lo mismo con los lotes de NE cargados de CLFXM por el método de E-D (Tabla 10 y Figura 27). En la figura 27 se observan los histogramas, el histograma con mayor área nos indica un 90% de NE con una talla mayor a 1000 nm, esto se debe a los agregados que se forman durante el proceso de liofilización. y el histograma de menor área representa el 10 % de NE con tallas menores a 1000 nm.

Principio activo	Lote	Talla (nm)	D.E (nm)	I.P.
Azul de Nilo	1	316.2	46.1	0.098
	2	308.4	46.1	0.180
	3	317.4	66.7	0.127
	\bar{X}	314.0	158.9	0.135
Rifampicina	1	4840.7	363.1	1.305
	2	4426.0	297.4	0.482
	3	2795.1	490.3	0.748
	\bar{X}	4020.6	383.6	0.845

Tabla 10. Talla de partícula promedio para NE liofilizadas de AN y RIF preparadas por la técnica de S-O.

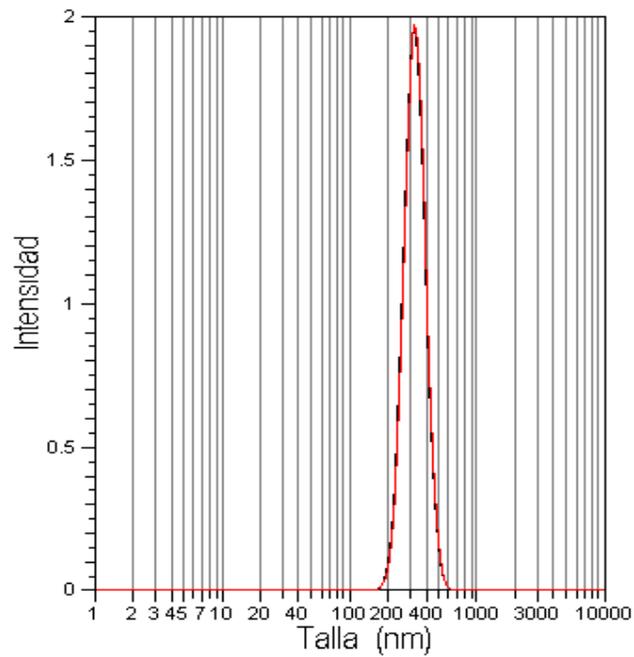


Fig. 26. Distribución del tamaño de partícula para NE de AN preparadas por la técnica de S-O después del proceso de liofilización.

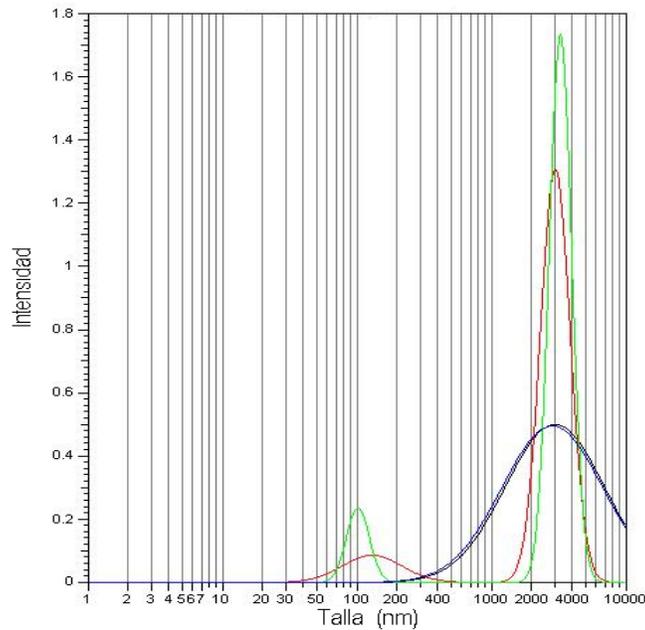


Fig. 27. Distribución del tamaño de partícula para NE de RIF preparadas por la técnica de S-O después del proceso de liofilización.

5.5 Evaluación de Nanoesferas de Rifampicina y Clofazimina

5.5.1 Cantidad de principio activo encapsulado en las nanoesferas

Después de determinar espectrofotométricamente la cantidad de CLFXM y RIF presente en las NE se procedió a determinar la cantidad de fármaco encapsulado (% de fármaco cargado) ecuación 1 y eficiencia de encapsulamiento (E.E.) ecuación 2 para cada uno de los lotes. Leroux y cols., (1994) y Görner y cols. (1999) proponen las siguientes formulas:

$$\text{Fármaco cargado} = \frac{\text{Cantidad de fármaco en nanoesferas}}{\text{Cantidad de nanoesferas}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

$$\text{E. E. (\%)} = \frac{\% \text{ Fármaco cargado}}{\% \text{ Fármaco inicial}} * 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Los datos se resumen en la Tabla 11, donde se considera que el porcentaje de encapsulación puede considerarse como alto para CLFXM, pues generalmente es difícil alcanzar eficiencias de encapsulación cercanas al 80 %. En contraste para la RIF que alcanzó un 8.80 % de fármaco encapsulado. Aunque el porcentaje de encapsulamiento es bajo cabe considerar que el fármaco es soluble en agua, donde una parte del fármaco pudo haber sido arrastrado con los lavados- centrifugación, lo cual pudo haber disminuido la cantidad de RIF en las NE. En otras experiencias realizadas por nuestro grupo de trabajo Quintanar-Guerrero y cols., (1997) realizó NE, encapsulado un 3 % de un principio activo hidrofílico. Por lo que la propuesta se considera como aceptable. Para RIF se tiene referencia de un porcentaje de encapsulamiento del 12 % por el método de doble emulsificación (Ain Q. y cols, 2002), un 35.9 % por el método de evaporación de solvente (Calleja A y cols.) y un 55 % por el método de múltiple emulsificación (Pandey R. y cols., 2003). Los métodos antes mencionados son complicados y requieren de solventes no aceptados farmacéuticamente.

Lote	Polímero (mg)	fármaco (mg)	mg fármaco/ mg NE	% Fármaco inicial	% Fármaco cargado	%E. E.
CLFXM	400.0	20.0	0.037	4.76	3.71	77.94
RIF	250.0	25.0	0.076	9.09	7.60	8.80

% Fármaco inicial: cantidad de fármaco empleado en cada lote

% Fármaco cargado: cantidad de fármaco contenido en las NE

% E. E.: porcentaje de fármaco en NE

Tabla 11. Resultados del porcentaje de RIF y CLFXM cargados en NE y su eficiencia de encapsulación

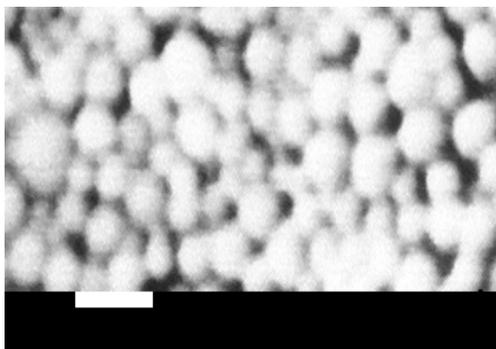
La técnica de adición de sales se realizó con la emulsificación del polímero y fármaco disueltos en AE la solución se emulsificó con un agente salino y PVAL. La emulsión se diluyó con agua, permitiendo la difusión del solvente orgánico en la fase acuosa y de esta manera disminuye la concentración de agentes salinos en la fase externa. Este proceso permite la agregación del polímero insoluble en el agua permitiendo la formación de NE.

En esta experimentación se omitió el paso de la adición de agua, para evitar que parte de la RIF fuera arrastrada, lo cual puede disminuir la cantidad de fármaco cargado en las NE, evitando así la disolución del fármaco que es soluble en agua y de esta manera obtener un mayor porcentaje de encapsulamiento. Pero es claro que no se logró lo esperado teóricamente.

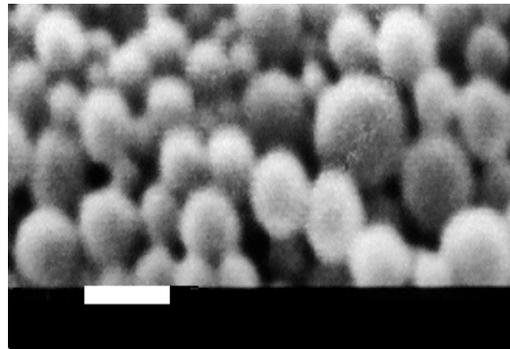
Es probable que al manejar AE como solvente (parcialmente soluble en agua) la RIF pudo haber sido arrastrada fuera de los glóbulos de la emulsión durante la etapa de difusión en el proceso de formación de las NP. Además suponemos que en la eliminación del solvente una parte del fármaco pudo haberse eliminado junto con el sobrenadante, en los procesos de lavado-centrifugado, lo cual ocasionó una disminución de la cantidad de RIF en las NE.

5.5.2 Evaluación de la morfología de las nanoesferas

Las NE de RN, AN, RIF y CLFXM fueron analizadas por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), para observar sus detalles morfológicos y presencia de cristales. Se determinaron características tales como la forma esférica sólida, diámetro menor a 1 μm . En las NE no se encontraron cristales en los materiales encapsulados tanto aislados como incluidos en las NP. En la Figura 28 (paginas 75 y 76) se muestran fotografías de los principios activos encapsulados, donde la barra blanca representa 1 μm . Un detalle percibido en las NE de RIF y CLFXM es que aunque se observaron estructuras esféricas, estas tienden a formar agregados, formando películas de NP o grupos de éstas.



A



B

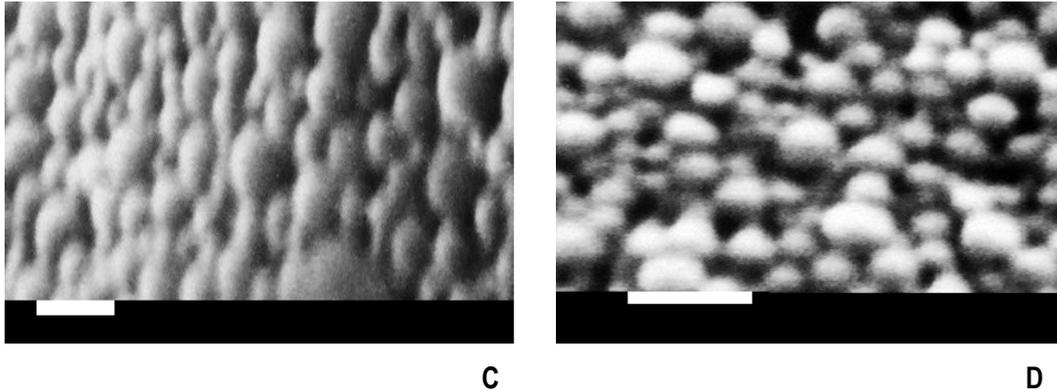


Fig. 28. Macrofotografías de NE tomadas por medio de microscopia electrónica de barrido. A) AN, y B) RN, fueron tomados a 15000 X; C) RIF y D) CLFXM fueron tomadas a 10000 X. La barra representa 1 μm .

5.5.3 Liofilización de las nanoesferas

Cuando las NP son capaces de dispersarse en un medio acuoso posterior al proceso de liofilización, se debe a que se forma una capa de PVAL sobre su superficie, esta capa tiene la característica de ser hidrofílica, por lo tanto se favorece la redispersión de las NP después de rehidratarlos. Pero para algunos fármacos encapsulados no es suficiente esta capa hidrofílica debido a que no conservan su tamaño original después del proceso de liofilización, debido a las características del principio activo encapsulado como fue el caso para RIF y CLFXM.

El proceso de liofilización puede producir fenómenos fisicoquímicos tales como adsorción de aire y/o modificación en la superficie de las NP, esto puede suceder durante los diferentes pasos del complejo proceso de deshidratación y de esta manera conducir a una difícil redispersión de las NP en medio acuoso [Konan y cols., 2002].

El proceso de secado, el cual es considerado como un proceso de deshidratación parece ser problemático para pequeñas partículas debido a su tendencia a agregarse. Este procedimiento parece generar tensiones durante el congelamiento y secado, lo cual induce a

modificar la superficie de la partícula resultando en la formación de agregados. Por lo tanto se debe proteger la formulación contra varios de estos esfuerzos fisicoquímicos inducidos por la liofilización y los cuales se pueden evitar al adicionar excipientes tales como azúcares. Los azúcares han mostrado ser estabilizadores efectivos, debido a que previenen la formación de agregados, éstos son adicionados a las NP antes de liofilizarlas, ya que ayudan a conservar su tamaño original después del proceso de liofilización [Konan y cols., 2002].

Debido a los problemas antes mencionados con el proceso de liofilización se decidió ocupar DL- trealosa como lióprotector para evitar la agregación de las NP. Numerosos estudios han mostrado un efecto lióprotector de los azúcares previniendo la agregación de las partículas durante el proceso de liofilización.

El efecto de los lióprotectores se describe por la formación de una matriz amorfa alrededor de las NP, previniendo la adhesión de éstas durante la eliminación del agua [Konan y cols., 2002]. Azúcares como la trealosa, tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno y separar la capa del estabilizante, estas capas son remplazan por moléculas de azúcar, originando una repulsión entre las partículas [Quintanar –Guerrero y cols., 1998].

En la preparación de NE cargados con CLFXM se observó que antes de liofilizarlas tenían una talla promedio de 300 nm y posteriormente al liofilizarlas sin trealosa aumentaron a tallas mayores de 500 nm. Pero al adicionarle trealosa (5% p/v), la talla promedio no tuvo un cambio significativo, solo en algunos casos aumento el 6.6 % que no se considera significativo. En la Tabla 12 y Figura 29 se observa el efecto del lióprotector en los lotes realizados antes y después de liofilizar las NE de CLFXM. En algunos casos la agregación se debe a que el activo funciona como un plastificante no convencional que disminuye la temperatura de transición vítrea del polímero.

Después de liofilizar las NE con el lióprotector se observó que solamente se necesitaban algunos minutos de agitación, para una completa redispersión del liofilizado. Comparándose con los lotes de CLFXM sin lióprotector, a estos lotes se les realizaron varios ciclos de agitación de 10 – 15 minutos con vortex, también ciclos por medio de sonicación de 10 minutos, sin poder separar los agregados de NE.

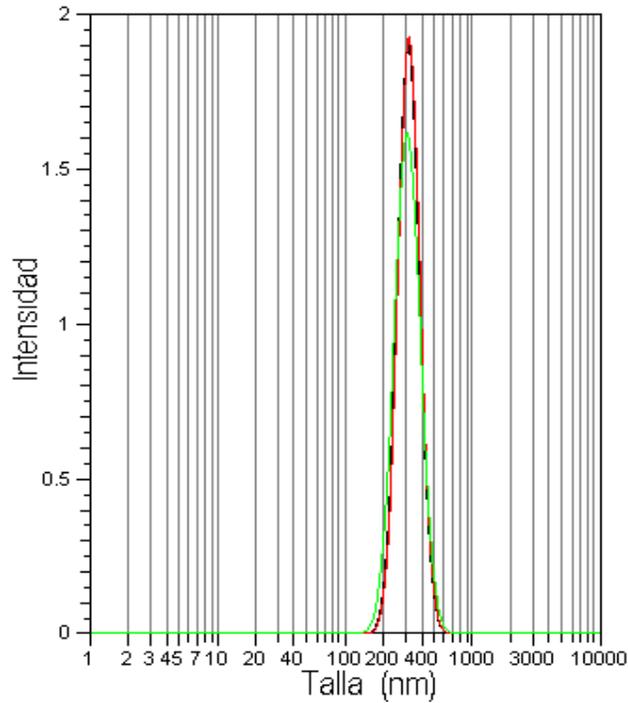


Fig. 29. Distribución del tamaño de partícula para NE cargadas con CLFXM mediante la técnica de E-D a 1700 rpm después de liofilizar con trealosa, con un diámetro promedio de 312.0 nm.

Principio activo	Lote	Talla antes de liofilizar	Tallas después de liofilizar		D.E.	I.P.
			s/trealosa	c/trealosa		
Clofazimina	1	290.8	772.0	305.4	46.1	0.135
	2	291.5	597.8	317.9	54.5	0.034
	3	293.2	425.7	312.9	46.1	0.140
	\bar{X}	291.9	598.5	312.0	48.9	0.103

Tabla 12. Talla de partícula promedio para NE por el método de E-D de CLFXM con y sin crioprotector (trealosa).

5.5.4 Potencial zeta en las nanopartículas

El valor del potencial zeta es una característica importante en una suspensión debido a que es un indicador de la estabilidad física de las partículas en suspensión. Esta estabilidad está referida a que las partículas se mantengan en la suspensión sin precipitarse o aglomerarse. Bajo ciertas condiciones, un alto valor absoluto del potencial zeta y su elevada carga en su superficie guía a fuertes interacciones de repulsión entre las mismas partículas dispersadas [Ahlin y cols., 2002]. En teoría valores altos de potencial zeta, positivos o negativos, tienden a estabilizar físicamente una suspensión. Así mismo la repulsión electrostática entre partículas con igual carga evitan la agregación [Ravi y cols., 2004].

Quintanar-Guerrero y cols. (1998) realizaron NP de PLA con PVAL como estabilizante, posteriormente les midieron el potencial zeta obteniendo valores cercanos -10 mV. Ellos propusieron que este valor está referido a las de cadenas de PVAL ancladas en la superficie de las NP, formando una capa estable.

Muestra	Potencial Zeta (mV)
Rojo de Nilo	- 15.44
Rifampicina	-3.54
Clofazimina	-20.61
Azul de Nilo	-5.71

Tabla 13. Datos de Potencial Zeta de NE cargados con RN, RIF, CLFXM y AN.

La presencia del activo en las nanopartículas dependiendo de su carga puede aumentar o disminuir el Ψ_z . Por lo tanto los cambios del Ψ_z en los activos nos indican que están presentes en las NP y que influyen en su carga de superficie. Por consiguiente un cambio del potencial zeta afecta la estabilidad del sistema

Por otra parte un valor elevado de Ψ_z no establece que una suspensión de NP pueda resuspenderse, esto se pudo corroborar con los lotes de CLFXM los cuales tenían un potencial zeta de -20.61, con este valor suponíamos que se resuspenderían fácilmente, pero fue todo lo contrario. Sin embargo si se comparan los lotes de RIF y AN, los primeros tuvieron un pobre efecto del PVAL sobre la superficie de las partículas de igual manera una recristalización de las partículas, por otra parte el lote de AN tenía un valor de - 5.47, estos lotes se redispersaron fácilmente después del liofilizado.

5.5.5 Estudios por Calorimetría Diferencial de Barrido

El análisis por medio de Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC), provee información cuantitativa y cualitativa del estado físico del fármaco en las NE, así como de los componentes de su formulación [Mu y Feng,, 2002], las cuales son: principio activo, polímero y estabilizante. El DSC también permite determinar si hay interacciones entre el fármaco y el polímero dentro de las redes poliméricas de las NP [Espuelas y cols., 1997]. Otras de las aplicaciones es determinar si el activo se encuentra disperso molecularmente en la matriz o en forma de cristales. Así cuando existe una dispersión molecular del activo en las NP, no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del activo [Piñon-Segundo., 2003].

En la Figuras 30 y 31 se muestran los termogramas de las NP cargadas con RIF y CLFXM, estas muestras se analizaron bajo las mismas condiciones y se presentan en un solo gráfico para facilitar su análisis.

El termograma para el principio activo CLFXM (Fig. 30) presenta una pico nítido endotérmico de fusión a 224.04 °C, este valor está por encima del punto de fusión (210-212 °C) conforme con lo reportado en la bibliografía [Index Merck, 2002]. Mu y Feng (2002) se percataron de algo similar al realizar un análisis por DSC de Vitamina E donde observa que el punto de fusión era más alto que el reportado en bibliografía. Ellos determinaron que el punto de fusión del principio activo tenía una alta cristalinidad. Por lo que el estado cristalino requiere de más energía térmica para su fusión que un estado amorfo. Entonces la CLFXM se encuentra en un estado cristalino.

Con referencia al termograma del PLGA (Fig. 30), presenta una endoterma relacionada con la temperatura de transición vítrea a 48.48 °C del PLGA. El termograma de PVAL presenta un pico endotermico a 194.5 °C, el cual está relacionado con su punto de fusión y coincide con el reportado en la literatura.

En el termograma para NE cargadas con CLFXM (Fig.30) se observa que no hay ninguna endoterma característica del principio activo entre 100 a 300 °C, por lo que se puede afirmar que el principio activo se encuentra dispersado molecularmente en las NE (las moléculas de fármaco se encuentran dispersadas en toda la NE). Así mismo se puede observar que el polímero y estabilizante no influyeron en la preparación de las NE, ya que este termograma no se vio alterado por los termogramas del PLGA y PVAL [Mu y Feng., 2002].

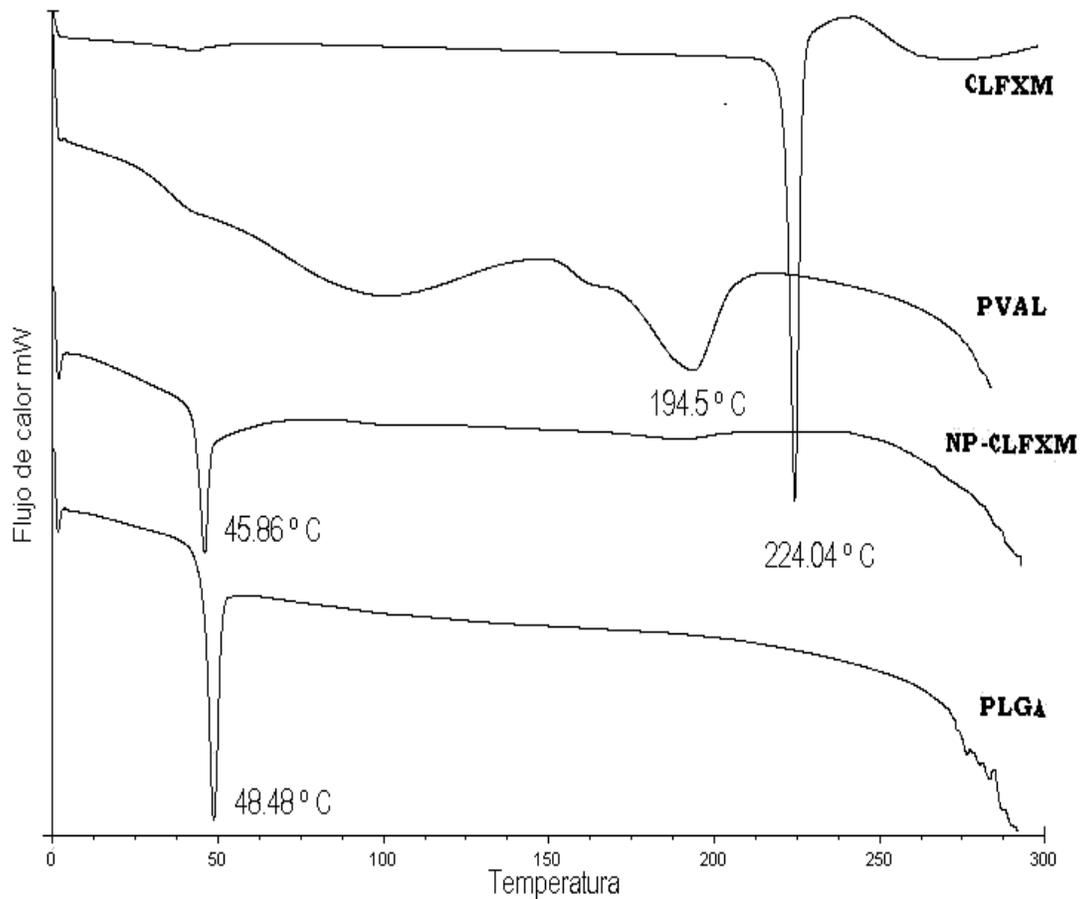


Fig. 30. Termogramas de PVAL, PLGA, CLFXM y NE de CLFXM.

En el termograma de RIF (Fig. 31) se forma una endoterma de fusión forma II a 189.01°C, después el material sufre una cristalización y reacomodo formándose una exoterma tipo I, ya que a 256.85 °C, continua con una fusión y degradación de la RIF, este pico es mayor que el de la forma amorfa. Alvarez- Roman y cols. (2000) realizaron un análisis térmico al Naproxeno el cual mostró dos picos, similares al de Rifampicina, donde ellos determinan un pico de fusión y otro de cristalización en su termograma.

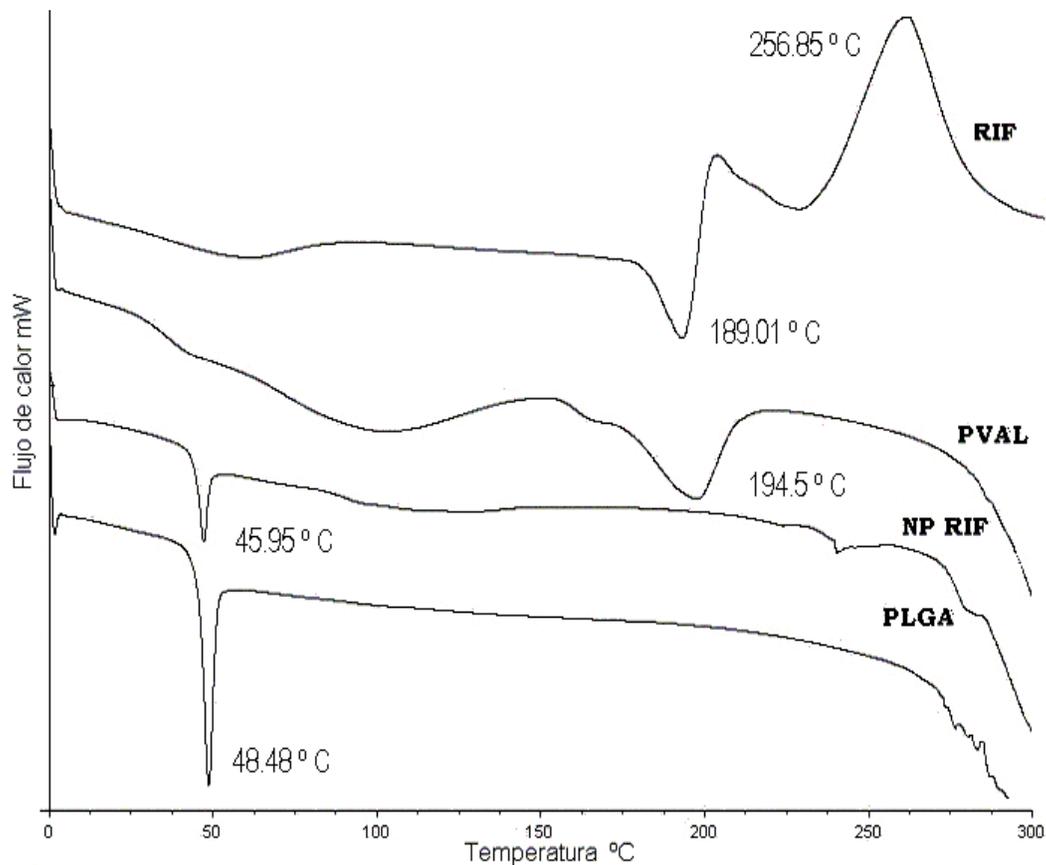


Fig. 31. Termogramas de PVAL, PLGA, RIF y NE de RIF.

En el termograma de NE de RIF (Fig. 31) no se observa un pico característico de la RIF, solamente se aprecia una endoterma a 50 °C característica a Tg del polímero así como un endoterma a 230 °C, este pico puede relacionarse con la evidencia a la recristalización de la RIF

después de fundido el polímero [Chacón y cols., 1999], esto significa que el activo está dispersado molecularmente dentro de la matriz polimérica y el ligero corrimiento del pico del PLGA es debido a un efecto del activo en la matriz (plastificación no convencional).

Entonces se confirma lo observado en MEB, donde disminuye la temperatura del punto de fusión del polímero por la presencia del activo, por ende hay un aumento de la motilidad de las cadenas del polímero y esto hace que se agreguen y forme película para Clofazimina y Rifampicina

6. CONCLUSIONES

1. Se lograron obtener nanoesferas con una talla promedio de 300 nm, talla ideal para ocuparse como vectores farmacéuticos cargadas con un colorante fluorescente Rojo de Nilo y un agente antituberculoso Rifampicina por el método de emulsificación-difusión, con una eficiencia de encapsulación del 77.94 % para Rifampicina.
2. Se encapsulo un colorante fluorescente Azul de Nilo y un fármaco antileproso Clofazimina por el método de adición de sales, el cuál fue modificado en la etapa de difusión con una eficiencia de encapsulamiento del 8.81% para Clofazimina y con una talla de partícula promedio de 300 nm.
3. Se determinó que al aumentar la velocidad de agitación tanto en el método de emulsificación-difusión así como el método de adición de sales la talla de partícula disminuye drásticamente.
4. Mediante microscopia electrónica de barrido se pudo observar la morfología de las nanoesferas las cuales eran de forma esférica, sin presencia de cristales.
5. La adición de trealosa durante el proceso de liofilización previene la agregación de las nanoesferas ayudando a formar una capa estable, lográndose una fácil resuspensión de estas.
6. Mediante estudios de calorimetría diferencial se determinó que ambas moléculas encapsuladas se encuentran dispersos molecularmente en las nanoesferas.

7. PERSPECTIVAS

1. Se realizó la primera fase de un proyecto que pretende poder aplicar nuevos tratamientos contra la tuberculosis, esta primera etapa fue la producción de nanoesferas. A estas nanoesferas se les realizaron estudios *in vitro* en colaboración con la Universidad de Nuevo León. Estos estudios pretenden estudiar la fagocitosis de células pulmonares sobre las nanoesferas. Se esperan obtener buenos resultados para así poder realizar estudios *in vivo* donde las nanoesferas serán administradas en animales de experimentación. Estos animales serán inoculados con cepas de tuberculosis para determinar el efecto antituberculoso de las nanoesferas.
2. Finalmente se pretende formular estas nanoesferas en una forma farmacéutica como aerosoles, ya que estos dispositivos pueden lograr que el fármaco llegue directamente al sitio de acción, ya que en este sitio se encuentran las micobacterias causante de la patología.
3. Además de encapsular Rifampicina se recomienda trabajar con otros fármacos antituberculosos y otras técnicas de encapsulamiento fáciles de realizar, además de los solventes a ocupar sean aceptados farmacéuticamente para obtener nanopartículas que se pueda utilizar contra la *M. tuberculosis* y así tener una gran variedad de fármacos y formas farmacéuticas para combatir esta enfermedad.
4. Con el método de emulsificación-difusión se logró un alto porcentaje de encapsulación, con lo cual se propone trabajar con mayores volúmenes, para comenzar con el potencial escalamiento del proceso propuesto.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ahlin, P.; Kristl, J.; Kristl, A. y Vrečer, F. "Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration". *Int. J. Pharm.* (2002), 239, 113-120.
2. Alleman, E.; Préparation et evaluation in vitro et in vivo d'un médicament neuroleptique à libération prolongée, sous forme de nanoparticules biodégradables injectables. Tesis Doctoral, No. 2619, Universidad de Genova (1989).
3. Alleman, E.; Gruñí, R. y Doelker E. "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size". *Int. J. Pharm.* (1992), 87, 247-253.
4. Alleman, E.; Doelker, E. y Gurny, R. "Drug Loaded poly (lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1993), 39 (1), 13-18.
5. Alvarez-Roman, R. "Diseño, elaboración y evaluación de un parche transdermico a partir de una dispersión polimérica coloidal de tamaño nanométrico formada por la técnica de emulsificación-difusión". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
6. Barratt, G.M. "Therapeutic applications of colloidal drugs carriers" *PSST.* (2000), 3 (5), 163-171.
7. Bivas-Benita, M.; Romeijn, S.; Junginger, H. y Borchard, G. "PAGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2004), 58, 1-6.
8. Bogunia-Kubitk, K. y Sugisaka, M. "From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine", *BioSystems.* (2002), 65, 123 -128.

9. Bounduelle, S.; Carrier, M.; Pimienta, C.; Benoit, J.P. y Lenaerts, V. "Tissue Concentration of Nanoencapsulated Radi-labelled cyclosporin Following Peroral Delivery in Mice or Ophthalmic Application in Rabbits". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1996), 42 (5), 313-319.
10. Branonn-Peppas, L. "Recent Advances on the use of biodegradable microparticles a nanoparticles in controlled drug delivery". *Int. J. Pharm.* (1995), 116, 1-9.
11. Brigger, I.; Dubernet, C. y Couvreur, P. "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis" *Advanced Drug Delivery Reviews.* (2002), 54, 631-651.
12. Brzoska, M.; Langer, K.; Coester, C.; Loitsch, S.; Wagner, T. y Mallinckrodt, C. "Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells-in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases" *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (2004), 318, 562-570.
13. Calvo P., Sanchez, A., Martinez J., Lopez, M., Calonge, M., Pastor, J., Alonso, M., "Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporine A." *Pharmaceutical Research,* (1996), 13, 311-315.
14. Calleja, A. I.; Dios, V. M.; Ruz, E. N.; Renedo, O. M. y Blanco, P. M., "Desarrollo y caracterización de nanopartículas de rifampicina para su aplicación en el tratamiento de la tuberculosis". *IV Congreso SEFIG y 3ª Jorn. Tecn. Farm,* 57-59, 2003.
15. Chacon, M.; Molpeceres, J.; Berges, L.; Guzman, M. y Aberturas, M. R. "Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly (D,L lactide-glycolide) carriers". *Eur. J Pharm Sci.* (1999), 8, 99-107.
16. Chavez-Monroy, F. "Estudios de liberación de sustancias lipofílicas en sistemas nanoencapsulados". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 2002
17. Chavez, F.; Olvera, B. I.; Ganem, A. y Quintnar, D. "Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocapsulas poliméricas". *Rev. de la Soc. Química de Méx.,* (2002), 46 (4), 349-356.

18. Clarke's, "Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and post-mortem material". 2ª Edición, The Pharmaceutical Press, Inglaterra, 1986.
19. Collins, F. "Mycobacterial pathogenesis: a historical perspective". *Front. Biosci.* (1998), 3,123-132.
20. Couvrer, P.; Dubernet, C. y Puisieux, F. "Controlled Drug Delivery Nanoparticles: Current Possibilities and Future Trends". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1995), 41 (1) 2 -13.
21. Dalecon, F.; Amjoud, Y.; Lafforgue, C.; Derouin, F. y Fessi, H. "Atavoque and rifabutine-load nanocapsules: formulation studies". *Int. J. Pharm.* (1997), 153, 127-130.
22. Dailey, L. A.; Schmehl, T.; Gessler, T.; Wittmar, M.; Grimminger, F.; Seeger, W. y Kissel, T. "Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features". *J. Control Rel.* (2003), 86, 131–144.
23. De Jaeghere, F.; Doelker, E. y Gurny, R. "Encyclopedia of Controlled Drug Delivery". Vol. 2. (Editado por Mathiowitz E.) John Wiley & Sons, Inc., E.U.A. 1999, p.p., 661-664.
24. Edwards, A. D. "Encyclopedia of Control of Delivery". Vol. 2, (Editado por Mathiowitz E.) Wiley J. & Sons., Inc, E.U.A. 1999, p.p., 936-941.
25. Espuelas, M. S.; Legrand, P.; Irache, J. M.; Gamazo, C.; Orecchioni, A. M.; Devissaguet, J. y Ygartua, P. "Poly(ϵ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity". *Int. J. Pharm.* (1997), 158, 19-27.
26. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammouy, N. y Benita, S. "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement". *Int. J. Pharm.* (1989), 55, R1-R4.

27. Frieden, R. R.; Sterling, R. T.; Munsiff, S. S.; Watt, J. C. y Dye, C. "Tuberculosis", *The Lancet*. (2003), 362, 887-899.
28. García G. Ma.; Valdespino, G. J.; Palacios, M. M.; Mayar, M. Ma.; García, S. C. y Sepúlveda, A. J., "Tuberculosis y SIDA en México". *Salud Pública de Méx.* (1995), 37, 539-548.
29. Ganderton, D. y Trevor, J. "Advances in Pharmaceutical Sciences". Vol. 6, Academia Press, Inglaterra 1992, p.p.165-191.
30. Ganem-Quintanar, A.; Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Falson-Rieg, F. y Buri, P. "Transport of biodegradable poly (D, L – lactic acid) nanoparticles through pig junctional epithelium ex vivo". *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1998), 25, 699-700.
31. Gessner, A.; Olbrich, C.; Schröder, W.; Kayser, O. y Müller, R. H. "The role of plasma proteins in brain targeting: species dependent protein adsorption patterns son brain-specific lipid drug conjugate (LCD) nanoparticles". *Int. J. Pharm.* (2000), 214, 87-91.
32. Gilles, P.; Marie-Jeanne, M.; Assia, D.; Carlo, D. y Dominique, D. "Mucoadhesión of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1997), 44, 5-31.
33. Goodman y Gilman, "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 9ª Edición, Vol.2, McGraw-Hill Interamericana, México, D.F. 1998.
34. Görner, T.; Grez, R.; Michenot, D.; Sommer, F.; Trna, M. N y Dellacherie, E. "Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix". *J. Control. Rel.* (1999), 57, 259-268.
35. Hans, M. L. y Lowman, A. M. "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting". *Current Opinion in solid State and Mat. Sci.* (2002), 6, 319-327.

36. Höner, Z. H. y Russell, G. D. "Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment". *Trends in Microbiology*. (2001), 9 (12), 597-605.
37. Huangxian, J.; Yongkang, Y. y Yunglin, Z. "Interaction between Nile blue an immobilized single or double stranded DNA and its application electrochemical recognition". *Electroquimic. Acta*. (2005), 50, 1361-1367.
38. Hye-Young, K.; Jun-Young, L.; Sung-Wook, C.; Yangsoo, J. y Jung-Hyun, K. "Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method". *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engin Aspects*. (2001), 182, 123-130.
39. Ibrahim, H.; Bindschanedler, C.; Doelker, E.; Buri, P. y Gurny, R. "Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process". *Int. J. Pharm.* (1992), 87, 239-246.
40. Jung, T.; Kamm, W.; Breitenbach, A.; Kaiserling, E.; Xiao, J. y Kisse, T. "Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is the re a role for polymers to affect mucosal uptake?". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2000), 50, 147-160.
41. Kibbe, H. A., "Handbook of pharmaceutical excipients". 3ª Edición, Pharmaceutical Press Londres Inglaterra, 2000.
42. Konan, Y. N.; Gruñí, R. y Alleman, E. "Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles". *Int. J. Pharm.* (2002), 233, 239-252.
43. Kreuter, J. "Colloidal Drug Delivery Systems". Editado por Kreuter, Marcel Dekker, E. U. A. 1994, p.p. 219-341
44. Leroux, J. J.; Allémann, E.; Doelker, E. y Gurny, R. "New Approach for the Preparation of Nanoparticles by an Emulsification-Diffusion Method". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1995), 41 (1), 14-18.

45. Litter, M. "Compendio de Farmacología". 4ª, Edición, Librería El Ateneo, Argentina 1992, p.p. 1575-1667.
46. Medina-Varela, "Revisión bibliográfica del manejo terapéutico en pacientes con tuberculosis". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
47. Mellado-Balderas J. "Manejo terapéutico del paciente con tuberculosis pulmonar". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
48. Milian-Sauzo, F.; Banda-Ruiz, V.; Ramírez-Casillas, C. y Arriaga-Díaz, C. "Genotyping of *Micobacterium bovis* by geographic location within México". Preventive Veterinary Medicine. (2002), 55, 255-264.
49. Montasser, I.; Briançon, S. ; Lieto, J. y Fessi, H. "Méthodes d` obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques". J. Pharm. Belg. (2000), 55(6), 155-167.
50. Mu, L. y Feng, S. S. "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol ®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS". J. Control. Rel. (2003), 86, 33-48.
51. Mu, L. y Feng, S. S. "Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/ extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol ®)". J. Control. Rel. (2002), 80, 129-144.
52. Müller-Goymann, C. C. "Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration." Eur. J. Pharm. Biopharm. (2004), 58, 343-356.
53. Murakami, H.; Kawashima, Y.; Niwa T.; Tomoaki, H.; Takeuchi, H. y Kobayashi, M. "Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinyl alcohol) on the

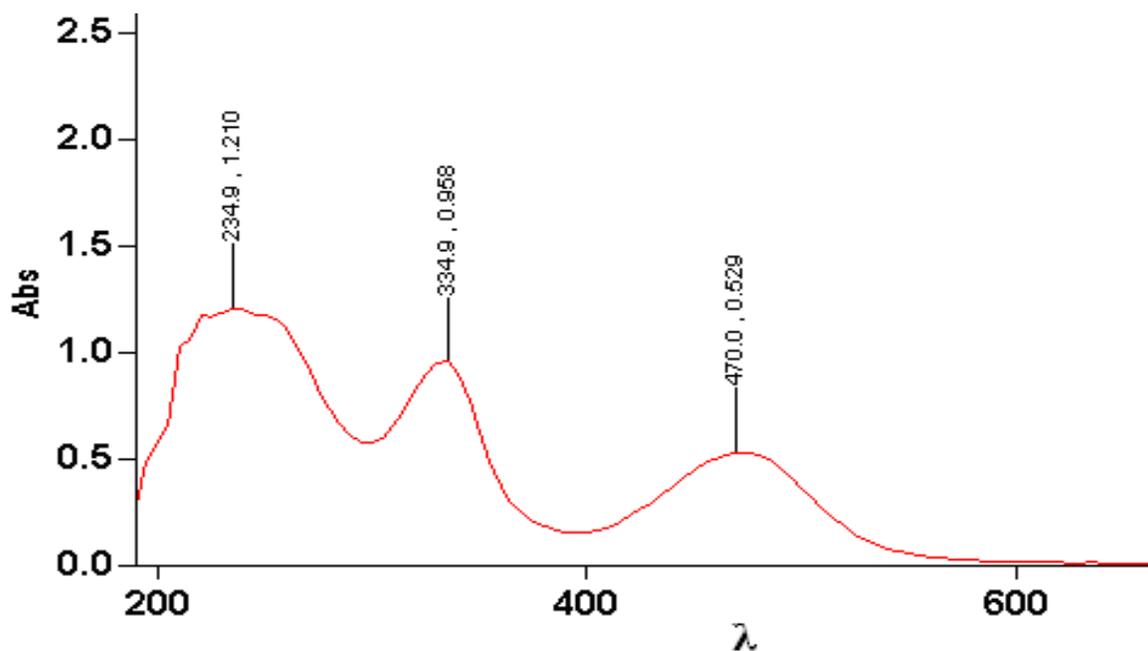
- preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle". *Int. J. Pharm.* (1997), 149, 43-49.
54. Nguyen, C. A.; Allegan, E.; Schwach, G.; Doelker, E. y Gurny, R. "Cell interaction studies of PLA-MePEG nanoparticles". *Int. J. Pharm.* (2003), 254, 69-72.
55. Page-Clisson, M.-E.; Pinto-Alphandary, H.; Ourevitch, M. y Andremont, A. "Development of ciprofloxacin-loaded nanoparticles: physicochemical study of the drug carrier". *J. Control. Rel.* (1998), 56, 23-32.
56. Pandey, R.; Sharma, A.; Zahoor, A.; Sharma, S.; Khuller, G. y Prasad, B. "Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-base inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis". *J. Antimicrobial Chemotherapy.* (2003), 52, 981-986.
57. Piñón-Segundo, E. "Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicronicas poliméricas como vectores terapéuticas para el tratamiento de enfermedades periodontales". Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
58. Quenelle, C. D.; Stass, K. J.; Winchester, A. G.; Barrow, W. L. y Barrow, W. W. "Efficacy of Microencapsulate Rifampin in Mycobacterium tuberculosis-infect Mice". *Antimicrobial Agents and chemotherapy.* (1999), 43 (5), 1144-1151.
59. Quintanar-Guerrero, D. "Etude de nouvelles techniques d'obtention de suspensions de nanoparticules à partir de polymères préformés" Tesis Doctoral. Universidad de Genova/ Universidad de Claude Bernard-Lyon, Genova 1997.
60. Quintanar –Guerrero, D.; Ganem-Quintar, A.; Alleman, E.; Fessi, H. y Doelker, E. "Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly (D,L-lactid acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique". *J. Microencapsulation.* (1998), 15,107-119.

61. Quintanar Guerrero, D.; Fessi, H.; Alleman, E. y Doelker, E. "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique". *Int. J. Pharm.* (1996), 143, 133-141.
62. Quintanar-Guerrero, D.; Alleman, E.; Doelker, E.; y Fessi, H. "A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique". *Colloid. Polym. Sci.* (1997), 275, 640-647.
63. Rasolofo-Razanamparany, V.; Ménarda, D.; Ratsitorahina, M.; Auréganb, G.; Gicquelc, B. y Chanteau, S. "Transmisión of tuberculosis in the prisión of Antananarivo (Madagascar)". *Res. Microbiol.* (2000), 151, 785–795.
64. Ravi, K.V.; Bakowsky, U. y Lehr, C. M. "Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers". *Biomaterials.* (2004), 25, 1771-1777.
65. Rémington, "Farmacia". Tomo I, 19ª Edición, Panamericana, Buenos Aires, Argentina 1999a, p.p. 406-411.
66. Rémington, Farmacia Tomo II, 19ª Edición, Panamericana, Buenos Aires, Argentina 1999b, p.p. 2575-,2576.
67. Robinson, R. J. y Lee, V. H. "Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications" 2ª Edición, Marcel Dekker, Inc., E.U.A. New York, 1987. p.p. 37 -59.
68. Schreier, H., "Drug Targeting Technology". Marcel Dekker, Inc., E.U.A. New York, 2001, p.p. 51-74.
69. Snell, J. C. "Examining unmet needs in infectious disease" *Drug Discovery Today.* (2003), 8, 22-30.
70. Soto, R. L. "Tratamiento de la tuberculosis", *Gaceta Medica de México.* (1997), 133 (6), 613-616.

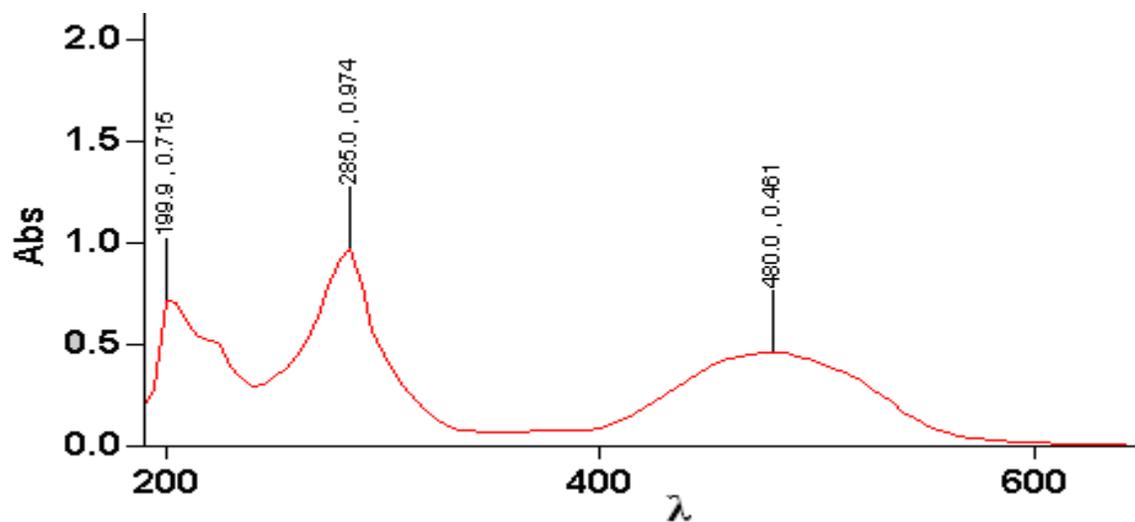
71. Takeuchi, H.; Yamamoto, H. y Kawashima, Y. "Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2001), 47, 39-54.
72. Tierney, L. M. "Diagnóstico Clínico". 38ª Edición, El Manual Moderno, México D. F., 2003, p.p. 302- 309.
73. Tortora, G. "Principios de Anatomía y Fisiología". 9ª Edición, Oxford, 2002, México, p.p. 783-797.
74. Tossi, Z. y Ellner, J. J. "Host response to Mycobacterium tuberculosis". *Frontera Bioscience*. (1998), 3, 133-140.
75. Trejo y Perez, J.; Díaz R. R.; Moreno M. G.; Palacios J. N.; Soriano, A. y Carrasco, R. J. "Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar" *Revista Medica del IMSS*. (2003), 41 (Supl), S83-S90.
76. Vauthier, C.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H. y Couvreur, P. "Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2003), 55, 519-548.
77. Vijayalaskshimi, S.; Karthika, T. N.; Mirsha, A. K. y Chandra, T. S. "Spectrofluorometrics method for the estimation of total lipids in Eremothecium ashbyii fungal filaments using Nile Blue and avoid interference of auto fluorescent riboflavin". *J. Microb. Methods*. (2003), 55, 99-103.
78. Vila, J. J. "Tecnología Farmacéutica". Vol. I, Síntesis, España, 2001, p.p. 299-316.
79. http://www.rsc.org/lap/education/eic/2005/sodhi_jul02.htm.
80. <http://www.fda.gov/cder/dviance/Q3ct1/pdf> "Guidance for the Industry Q3C-tables and list"

9. ANEXOS

ANEXO 1. Barridos de Rifampicina y Clofazimina

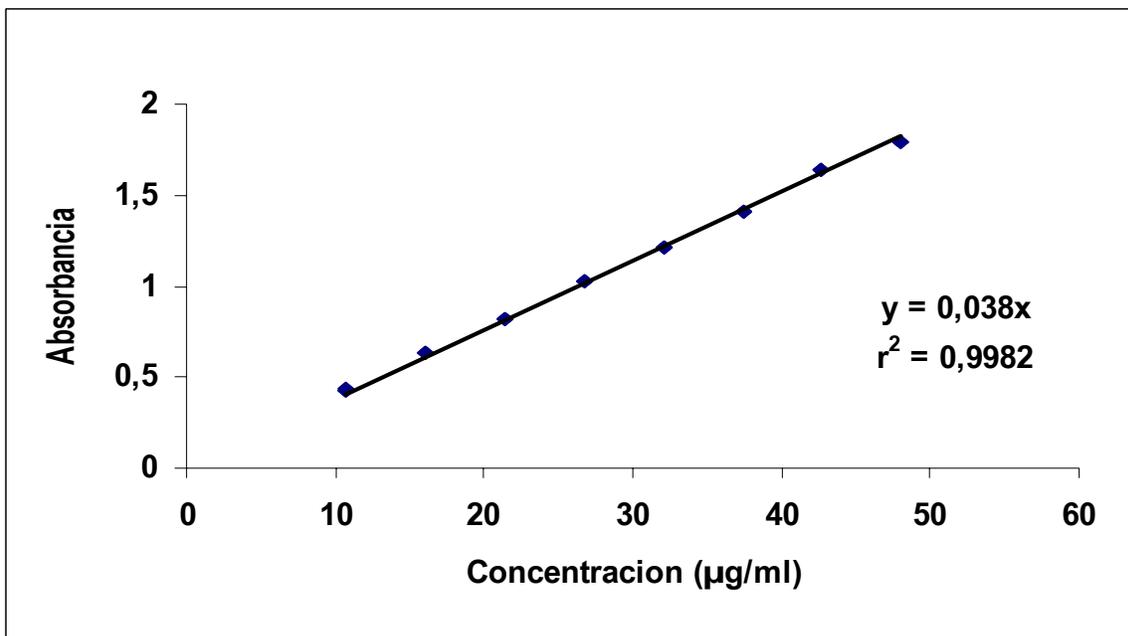


Barrido de Rifampicina en NaOH 0.1 N, con una concentración de 30 µg/ml.

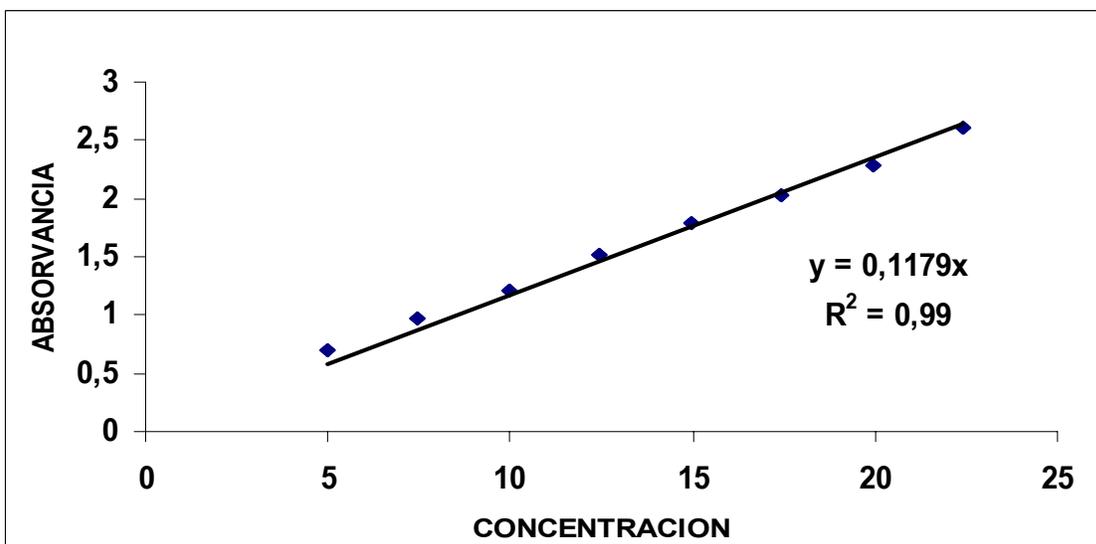


Barrido de Clofazimina en metanol, con una concertación de 30 µg/ml.

ANEXO II. Curvas de calibración de Rifampicina y Clofazimina



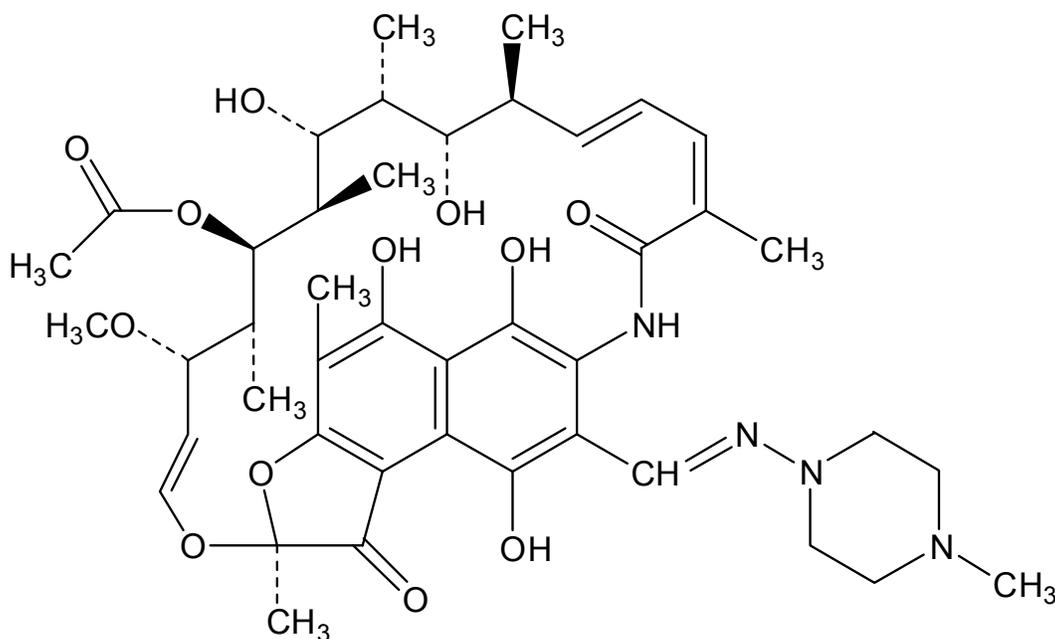
Curva de calibración de Rifampicina en NaOH 0.1 N



Curva de calibración de Clofazimina en metanol

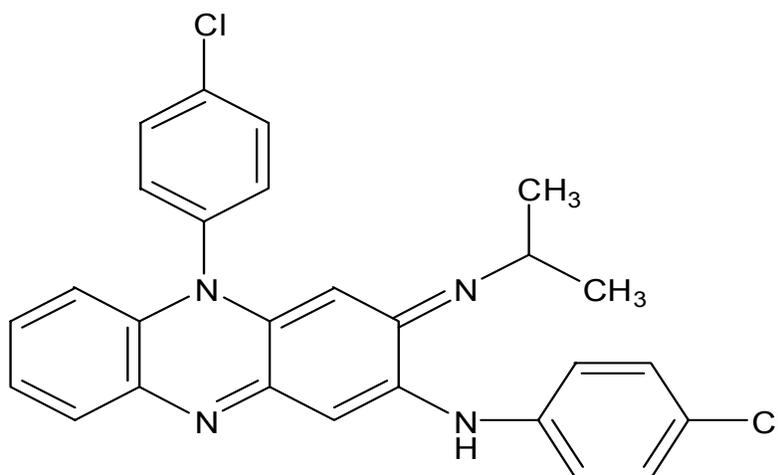
ANEXO III. Estructuras químicas y generalidades de principios activos

Rifampicina



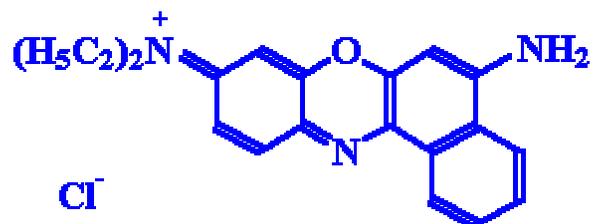
- Nombre químico: 3-[[[(4-metil-1-piperazinil) imino] metil]rifamicin.
- Formula condensada: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$
- Peso molecular: 822.94. g/mol
- Características: polvo rojo a anaranjado
- Solubilidad: Levemente soluble en CH_3Cl , DMSO; soluble en metanol, acetato de etilo, tetrahidrofurano (1/200); es relativamente insoluble en agua, pero a bajos valores de pH aumenta su solubilidad, levemente soluble en agua (pH <6).
- Pka: 1.7. 7.9
- DL50: en ratas y ratones (mg/kg): 885, 1720 oralmente; 260, 330 i.v.; 640, 550 i.p
- Usos: Es principalmente usado en el uso del tratamiento de tuberculosis y lepra.

Clofazimina



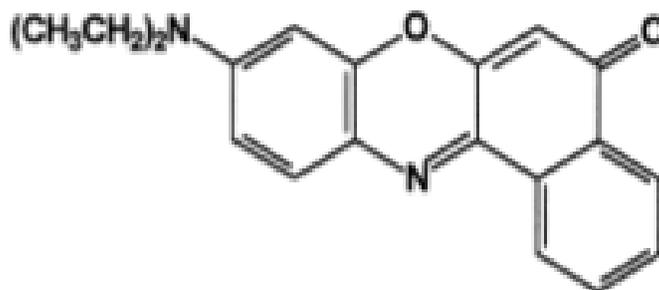
- a) Nombre químico: *N,5-Bis(4-clorofenil)-3,5-dihidro-3-[(1-metiletil)imino]-2-phenazinamine*.
- b) Formula condensada: $C_{27}H_{22}Cl_2N_4$
- c) Peso molecular: 822.94 g/mol
- d) Características: polvo rojo oscuro
- e) Solubilidad: casi insoluble en agua (1/10 000), levemente soluble en cloroformo, benceno y dimetil sulfoxido (1/15), poco soluble en etanol de 1/700 partes, 1/ 1000 partes de eter
- f) pka: 8.51
- g) Punto de fusión: 210-212 ° C
- h) DL₅₀ : en ratas, ratones y credos: > 4 g/kg
- i) Usos: fármaco antibacteriano, especialmente efectivo contra *Mycobacterium leprae*, el cual también tiene propiedades antiinflamatorias en altas dosis. Es un colorante catiónico usado en histoquímica para teñir lípidos [Vijayalaskshimi y cols., 2003], también es empleado como colorante anílico e indicador ácido-base, que cambia de amarillo pasando por el azul llegando a magento cuando el pH se eleva (www.rsc.org), incluso puede ser ocupado como indicador electroquímico para detectar DNA [Huangxian y cols., 2005].

Azul de Nilo



- a) Nombre químico:
- b) Formula condensada: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{OCl}$
- c) Peso molecular: 353.861 g/mol
- d) Características: polvo azul intenso
- e) Solubilidad: soluble en agua, acetato de etilo
- f) Absorción máxima en UV: 638 nm
- g) Usos: Preferencialmente en la tinción de lípidos, ácidos nucleicos

Rojo de Nilo



- a) Nombre químico: 9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxa-]phenoxazine-5-one)
- b) Formula condensada: $C_{20}H_{18}N_2O_2$
- c) Peso molecular: 318.495g/mol
- d) Características: polvo rojo ladrillo
- e) Solubilidad: insoluble en agua, soluble en metanol, acetona, acetato de etilo, metil etil cetona,
- f) Absorción máxima en UV: 565 nm
- g) Usos: colorante lipofílico, para marcar intracelularmente grasas