

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS DE
NORFLOXACINA A PARTIR DE MICROEMULSIONES POR DOS TÉCNICAS DIFERENTES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LORENA GARCÍA GONZÁLEZ

MÉXICO, DF.

2006



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Norma Trinidad González Monzón
Vocal Prof. María del Socorro Alpizar Ramos
Secretario Prof. María Josefa Bernad Bernad
1er suplente Prof. Francisco García Olivares
2do suplente Prof. Joaquín González Robledo

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA

Laboratorio Anexo 1F, Edificio A, Facultad de Química

Asesor de tesis

Supervisor Técnico

Dra. Ma Josefa Bernad Bernad

cDra. Ma de Guadalupe Díaz Nanclares

Sustentante

Lorena García González

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1.0 Norfloxacin.....	3
1.1 Ficha técnica.....	5
1.2 Farmacocinética.....	6
2.0 Sistemas de liberación modificada	8
2.1 Factores que determinan el diseño de un sistema de liberación modificada	11
2.2 Sistemas acarreadores.....	16
2.2.1 Clasificación de sistemas acarreadores.....	18
2.2.2 Nanopartículas.....	19
2.2.2.1 Métodos de preparación.....	21
2.2.2.1.2 Microemulsión por fusión y disolvente.....	22
2.2.2.2 Caracterización de nanopartículas.....	23
3.0 Estudios realizados sobre liberación modificada de norfloxacin.....	25
III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIALES Y EQUIPO	29
V. METODOLOGÍA	30
1.0 Fabricación de diagramas de fase	30
2.0 Estudio de inversión de fases en microemulsión	31
3.0 Elaboración de las nanopartículas sólidas lipídicas.....	31
4.0 Caracterización de las nanopartículas sólidas lipídicas.....	32
5.0 Liberación in Vitro.....	33
VI. RESULTADOS Y DICUSIÓN	34
1.0 Diagrama de fase.....	34
2.0 Estudio de inversión de fase.....	35
2.1 Tamaño de partícula.....	36
2.2 Conductividad.....	37
3. Selección del punto (composición) para obtener las nanopartículas.....	37
4.0 Caracterización de los sistemas seleccionados (microemulsiones y nanopartículas).....	39
4.1 Tamaño de partícula.....	39
4.2 Potencial Z (ζ).....	40
5. Morfología.....	41

6. Cinética de liberación.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	45
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	46

I. INTRODUCCIÓN

La quimioterapia antimicrobiana se inicio en la década de los años treinta. Desde entonces se han sintetizado un gran número de antibióticos con mayor o menor efecto y con la finalidad de mejorar la potencia y efectividad de los ya existentes.

Por desgracia, el desarrollo de las defensas de las bacterias ha dado lugar a la aparición de las resistencias, originadas por el uso frecuente, indiscriminado y excesivo de antibióticos.

En la actualidad se están realizando numerosos esfuerzos en muchos países para encontrar nuevos antibióticos eficaces contra las bacterias multirresistentes, lo que involucra costos altos de investigación y tiempos prolongados. Pensando en que llegará un momento que la síntesis no será la vía adecuada y probablemente la solución será el uso racional de los ya existentes.

Este impacto origina la necesidad de rediseñar formulaciones involucrando a la investigación farmacéutica que ha desarrollado los llamados sistemas de liberación modificada (SLM), los cuales tienen por objetivo obtener formas farmacéuticas que garanticen que la liberación del fármaco sea de una manera no convencional haciendo así que la pauta posológica y el aprovechamiento de la dosis administrada sea mayor. La opción de formular los fármacos en SLM acarrea el desarrollo de nuevos sistemas y procesos, entre ellos se engloban las microemulsiones y las nanopartículas.

Las microemulsiones son sistemas constituidos por dos fases líquidas inmiscibles entre sí, que de manera espontánea una se dispersa en la otra con la ayuda de un tensoactivo o una mezcla de tensoactivo-contensoactivo, siendo éstas un medio para la generación de las nanopartículas, destacando las Nanopartículas Sólidas Lipídicas

(NSL) formadas por lípidos sólidos derivados de ácidos grasos. Las nanopartículas presentan como ventajas para su uso farmacéutico baja toxicidad, tamaño nanométrico y poca respuesta inmune.

Por otra parte, la norfloxacin es una fluoroquinolona con un amplio espectro antibacterial, ésta se administra en el ser humano. Se considera un antibiótico de elección en muchas enfermedades (prostatitis, cistitis, neutropenia, infecciones del tracto urinario y a nivel de vías respiratorias). Sin embargo, esta molécula presenta baja solubilidad, lo que ha llevado a buscar la síntesis de sales, presenta una pobre penetración en tejidos y alcanza bajos niveles en sangre, por otro lado su tiempo de vida media corto, lleva a tener una pauta posológica multidosis dando posibilidad de la generación de resistencia bacteriana, aunada a la mala disciplina del paciente. Una dosificación o toma frecuente origina reacciones adversas como trastornos gastrointestinales, que se presentan en un 2-4% de los pacientes, efectos sobre el sistema nervioso central que suelen ser mínimos, pero incluyen aturdimiento, mareos, cefaleas y somnolencia dado que la forma farmacéutica de elección es oral.

La presente tesis propone como una alternativa de solución, la formulación de este activo de elección en un sistema de liberación modificada basada en nanopartículas sólidas lipídicas de ácido esteárico con norfloxacin, buscando como opción una administración parenteral, además de obtener conocimientos básicos sobre la influencia de la metodología de formulación en el sistema resultante.

II. ANTECEDENTES

1. Norfloxacin

La primera quinolona utilizada en clínica, a principio de los 60's, fue el ácido nalidíxico. Se clasificó como antiséptico urinario debido a que sólo en orina alcanza concentraciones suficientes como para actuar frente a bacterias patógenas. Más tarde surgieron otras quinolonas, denominadas de 1ª generación, que aunque superaban algunas de las limitaciones del ácido nalidíxico, seguían siendo antisépticos urinarios (oxolínico, pipemídico).

La introducción de un átomo de flúor en la molécula básica de las quinolonas dio lugar a la aparición de las fluoroquinolonas, que presentan una potente actividad antibacteriana, principalmente frente a bacterias gram (-) aerobias y facultativas. Norfloxacin fue la primera fluoroquinolona comercializada.

Desde 1973 a la fecha se han llevado acabo 8710 reportes bibliográficos en revistas de ámbito internacional que alcanzan estudios tanto en medicina humana como veterinaria implicado como principio activo a la norfloxacin.

54

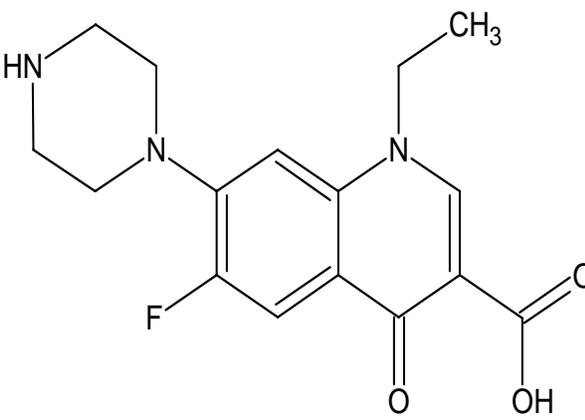
De los cuales, la mayoría son relevantes desde el punto de vista del interés de varios países, referente a la sensibilidad o resistencia hacia las bacterias, comparando esa actividad con otros principios activos para radicar los problemas de enfermedades del tracto urinario y respiratorio que tienen diferentes orígenes, presentando la norfloxacin una actividad diferente según sea el tipo de bacteria.

Unos pocos más se enfocan a la determinación de la cantidad de norfloxacin presente en tejidos por ejemplo de cerdos y gallinas, a través de técnicas analíticas, concluyendo que existe presencia del principio activo en concentraciones de ng/g de tejido.

El resto, se centra en encontrar una formulación que ofrezca ventajas terapéuticas, considerando la correlación de estudios *in vitro-in vivo*.

A partir de estos informes de investigación podemos discernir la gran importancia de este antibiótico tanto en medicina humana como en veterinaria.

1.1 Ficha técnica.

<p>Fórmula desarrollada de norfloxacin:</p>	
<p>Fórmula condensada:</p>	<p>$C_{16}H_{18}FN_3O_3$</p>
<p>Peso molecular:</p>	<p>319.34</p>
<p>Nombre químico:</p>	<p>1-etilo-6-flúor-1,4-dihidroxi-4-oxo-7(1-piperazinil)-3-ácido quinolinocarboxílico.</p>
<p>Descripción:</p>	<p>Polvo cristalino amarillento.</p>
<p>Punto de fusión de:</p>	<p>227-228 °C</p>
<p>Solubilidad en agua:</p>	<p>1.78E+005 mg/L</p>
<p>pKa.</p>	<p>8.76, 2.75</p>

1.2 Farmacocinética

La norfloxacin es una fluoroquinolona, estructuralmente similar al ácido nalidíxico. Señala Stein.GE¹ que la estructura anfotérica de este fármaco produce una rápida disolución, absorción y penetración tisular. Debido a que no se dispone de una preparación intravenosa de norfloxacin para ser utilizada en seres humanos, algunos parámetros farmacocinéticos no han sido completamente dilucidados.

Absorción

Luego de su administración oral, el 30 al 40% de la dosis de norfloxacin se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal con una tasa de absorción media de 3.22 horas. Aproximadamente 1.5 horas (t_{max}) después de una dosis oral de 400 mg se alcanzan los niveles séricos pico de 1.5 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$. Si bien la dosis de norfloxacin de 200 a 800 mg produce un aumento lineal en el pico del nivel sérico y del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo, las dosis superiores a 800 mg producen un incremento no lineal en estos parámetros.

Distribución

Luego de su administración oral, el fármaco alcanza rápidamente concentraciones terapéuticas en suero y orina, y su baja unión proteica (14%) y alta solubilidad en los lípidos determinan un gran volumen de distribución de la misma. La vida media de eliminación sérica de la norfloxacin es 3.25 horas pero, luego de 14 días de tratamiento con norfloxacin en voluntarios sanos estos no mostraron una acumulación plasmática importante ni un aumento en la vida media de eliminación sérica. Se ha demostrado, que la norfloxacin penetra en diversos tejidos, incluyendo líquidos de ampollas, tejido renal y prostático, amígdalas faríngeas, senos paranasales, líquido amniótico y sangre del cordón umbilical (luego de la ingesta materna del fármaco).

Metabolismo

El hígado parece ser el sitio primario del metabolismo de la norfloxacin, 6 metabolitos del principio activo se excretan en la orina en forma no conjugada. Un estudio realizado en 3 pacientes con diagnóstico de hepatitis B aguda y anomalías hepáticas moderadas no reveló modificaciones farmacocinéticas en comparación con lo observado en voluntarios sanos.

Excreción

A partir de una sola dosis de norfloxacin de 400 mg la recuperación en las heces es de aproximadamente un 29% (entre 8.3 y 53.5%) en las 48 horas siguientes. El pico de los niveles fecales (23 a 36 horas después de la administración) de norfloxacin, de 207 a 2.716µg/g de heces. Si bien los niveles biliares de norfloxacin exceden los séricos, el árbol biliar no se considera una ruta importante en la eliminación del principio activo. El aclaramiento renal de norfloxacin, es alto (272 a 296 mL/minuto) y las concentraciones urinarias del fármaco varían de 100 a 300 veces las concentraciones séricas simultáneas. El 30%, aproximadamente, de la dosis oral de norfloxacin se excreta en la orina sin modificaciones. Sin embargo, la administración concomitante de probenecid disminuye a la mitad la recuperación urinaria del principio activo. Sugiere en consecuencia, que además de la filtración glomerular, la secreción tubular activa puede participar en la secreción urinaria de la norfloxacin. Las reducciones en la tasa de filtración glomerular se asocian con un incremento en la vida media de eliminación sérica y del área bajo la curva concentración plasmática-tiempo de norfloxacin. Es necesario ajustar la dosis cuando el aclaramiento de creatinina es inferior a 20 mL/minuto.

2.0 Sistemas de liberación modificada

En muchas enfermedades, el régimen posológico ideal sería aquel con el cual se consiguiera inmediatamente una concentración terapéutica aceptable de fármaco en el lugar o lugares de acción y esta concentración se mantuviera constante durante el tratamiento. Esto, se puede conseguir modificando la forma convencional de cesión del fármaco. La necesidad de formular estas formas farmacéuticas en sistemas de liberación modificada acarrea el desarrollo de novedosos sistemas y procesos.

Se entiende, como un sistema de liberación modificada, aquellas formas farmacéuticas diseñadas de tal manera que se modifica la velocidad o el lugar de liberación del mismo principio activo respecto a las formas farmacéuticas de liberación inmediata del mismo fármaco. La terminología empleada para estos sistemas no es bastante precisa y todavía no existe armonización.

El término “liberación modificada” es el que emplean las farmacopeas europea y americana como alternativa a la expresión convencional *formas retard*. Estrictamente la denominación de formas retard sólo debería utilizarse para las formas de liberación retardada.

De esta forma de liberación se distinguen diferentes tipos:

Liberación acelerada. Es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del activo es mucho más rápida que la de una forma de liberación convencional destinada a la misma vía.

Entre las cuales se encuentran dos tipos de formulaciones:

Comprimidos efervescentes en contacto con la saliva: Efferalgan odis® (paracetamol).

Tabletas liofilizadas o liotabs: Son matrices en las que se encuentra disperso el principio activo y en contacto con cualquier solución acuosa (saliva) se disuelven instantáneamente y liberan el principio activo que contienen: Feldene flas® (piroxicam), Zyprexa velotab® (olanzapina), Vastat flas® y Rexer flas® (mirtazapina).

¡OJO! No se debe confundir el concepto liberación con absorción; en general, estas formas de liberación acelerada no tienen una absorción más rápida que las formas convencionales; la diferencia entre ellas radica en que se libera o dispersa rápidamente sin necesidad de administración con agua, pero no se diferencian en el inicio de acción.

Liberación diferida. Indica que el fármaco no se libera inmediatamente después de la administración, sino más tarde, existiendo un control en cuanto a la forma y el tiempo de liberación. Ejemplo de tipo de formulación:

Cubierta entérica o sensible al pH. Ej.: especialidades farmacéuticas que contienen AINE (ej.: Voltaren® 50 mg 40 comprimidos gastrorresistentes, Orudis® 50 mg 40 comprimidos entéricos) o inhibidores de la bomba de protones (ej.: omeprazol 20 mg 28 cápsulas EFG).

Liberación extendida o prolongada. Es la forma farmacéutica que permite una reducción de al menos dos veces la frecuencia de administración en comparación con una forma convencional. Tipos de formulación:

Matrices inertes lipídicas o hidrófilas: dispersiones moleculares o particulares del medicamento en un sistema generalmente polimérico que resiste la disgregación y regula la liberación (ej.: MST Continus).

Microcápsulas, microgránulos o microesferas: aplicación de una fina cubierta de gelatina u otros materiales de naturaleza polimérica sobre pequeñas partículas que contienen uno o varios principios activos. La permeabilidad de la cubierta condiciona la velocidad de liberación. Las microcápsulas, microgránulos o microesferas pueden comprimirse (ej.: Beloken retard®) o introducirse en una cápsula (ej.: Skenan®).

Formas obtenidas por modificación farmacéutica: la velocidad de liberación del principio activo se reduce, bien aumentando el tamaño de partícula, bien modificando la cristalización (ej.: Adalat Retard®).

Liberación controlada. Son formas farmacéuticas que liberan el fármaco a la velocidad constante y proporcionan concentraciones plasmáticas que permanecen invariables con el tiempo. Ej.: Versatrol T, un nuevo soltgel de Banner.

La *liberación temporal* es una forma de liberación controlada que involucra la velocidad con la cual el sistema libera el activo que debe ser suficiente para alcanzar y mantener el efecto deseado por un lapso predeterminado. En otras palabras, la cantidad del activo que entra en el organismo es igualada con la cantidad removida. La idealización de esta liberación es que siga una cinética de orden cero, esto es constante e independiente de la cantidad del activo en el sistema de liberación.⁵¹⁻⁵³

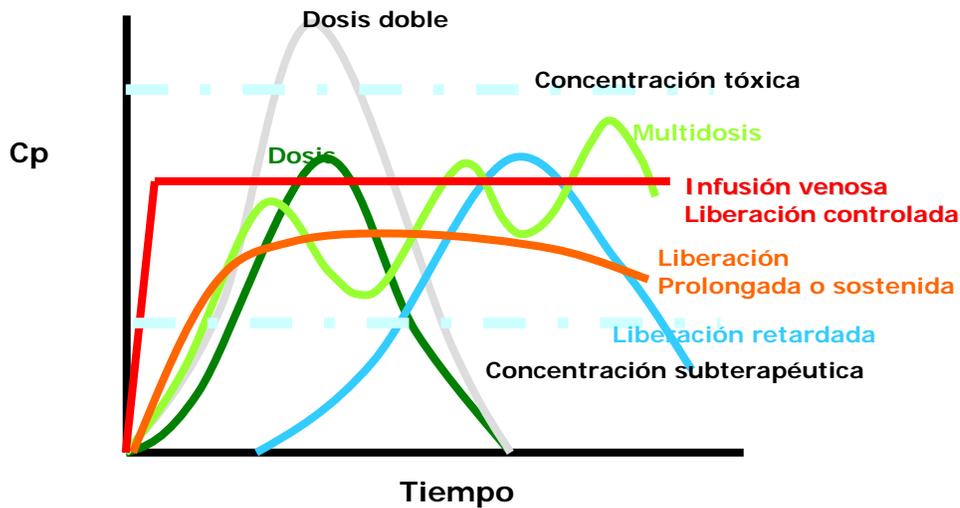


Figura 2.1. Niveles plasmáticos vs. Tiempo para diferentes sistemas de liberación de activos.

2.1 Factores que determinan el diseño de un sistema de liberación modificada.

Cuando se cavila en perfilar un sistema de liberación modificada se debe tomar en cuenta una serie de factores fisicoquímicos, biológicos y terapéuticos que nos pueden guiar en la concepción del dispositivo a fabricar.

Lo primero a reflexionar es si es justificable colocar el o los activos en un sistema de liberación controlado (SLC). Para dar respuesta a este cuestionamiento se recurre al tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la sustancia activa, ya que está es indicativo de la velocidad a la que se elimina el activo y por ende sugiere la frecuencia de la dosis. Un fármaco con $t_{1/2}$ corto (2-4 horas) es potencial candidato para ser formulado en un SLC.

Un segundo aspecto a considerar es la factibilidad física y tecnológica del SLC. Por ejemplo, por vía oral no se podrá tener un dispositivo rígido mayor a un gramo por las obvias dificultades de deglución. En casos de grandes cantidades de activo se podría pensar en un sistema fluido, por ejemplo, una suspensión de acarreadores.

El tercer aspecto es la ruta de administración del SLC. El área del organismo en la cual se pretenda administrar el SLC puede dar pauta para el desarrollo tecnológico.

También se deberá considerar la factibilidad económica y tecnológica.²

Existen otras propiedades del activo que nos pueden servir para saber si es válido y posible el desarrollo de un sistema de liberación modificada. Los activos que presentan muy baja velocidad de absorción o con regiones de absorción específicas, son malos candidatos. La baja absorción también va ligada a una desfavorable solubilidad acuosa. El valor más pequeño reportado para un sistema de liberación controlado es de 0.1 mg/mL.

Finalmente activos que tengan alta afinidad por los lípidos celulares o por unirse a proteínas, tenderán a permanecer retenidos en el organismo por largos periodos y evidentemente no serán susceptibles de ser medicados en SLC (coeficiente elevado de partición aceite/agua).

Esto no implica que el fármaco seleccionado deba cumplir con todos los aspectos mencionados anteriormente. A continuación se presenta una tabla de fármacos autorizados para ser formulados de este modo.

NUEVOS PRINCIPIOS ACTIVOS AUTORIZADOS EN EL 2003

DE FORMAS FARMACEUTICAS DE LIBERACION MODIFICADA

PRINCIPIO ACTIVO	GRUPO TERAPÉUTICO	INDICACIONES	COSTE T ^o /DÍA	POTENCIAL TERAPÉUTICO
ADEFOVIR HEP'SERA*	J05AF H	Tratamiento de la hepatitis B crónica en adultos con: enfermedad hepática compensada con evidencia de replicación viral activa, niveles de ALT elevados y evidencia histológica de inflamación hepática activa y fibrosis o enfermedad hepática descompensada.	14,28	B
ANAKINRA KINERET*	L01E H	Tratamiento de los signos y síntomas de la artritis reumatoide en combinación con metotrexato, en aquellos pacientes que no hayan respondido bien a la administración de metotrexato solo.	28,57	C
BRIVUDINA NERVINEX* NERVOL* ZOSTYDOL*	J05AB	Tratamiento precoz del herpes zoster agudo en adultos inmunocompetentes.	18,06	C
DESLOMATADINA AERIUS*	R06AX27	Alivio de los síntomas asociados a rinitis alérgica y urticaria idiopática crónica.	0,62	C
DIACEREINA ARTRIZAN* GALAXDAR* GLIZOLAN*	M01A1	Tratamiento sintomático de la artrosis.	0,79	C
ENFUVRTIDA FUZEON*	J05AX H	Tratamiento, en combinación con otros medicamentos antirretrovirales, de pacientes infectados por el VIH-1 que han recibido tratamiento, o a los que les han fallado los tratamientos con al menos un medicamento de cada una de las siguientes clases antirretrovirales: inhibidores de la proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleosidos e inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleosidos, o que tienen intolerancia a tratamientos antirretrovirales previos.	51,88	B
ERTAPENEM INVAZ*	J01J H	Tratamiento de las siguientes infecciones en adultos cuando son causadas por bacterias conocidas o muy probablemente sensibles a ertapenem y cuando se requiere tratamiento parenteral: infecciones intraabdominales, neumonías extrahospitalarias, infecciones ginecológicas agudas.	45,00	C
FROVATRIPTAN FORVEY* PERLIC*	N02C	Tratamiento agudo de la fase de cefalea de los ataques de migraña con o sin aura.	5,83	C
IMIDAPRIL HIPERTENE*	C09AA16	Tratamiento de la hipertensión esencial leve a moderada.	0,46	C
INSULINA GLARGINA LANTUS*	A10AE04	Tratamiento de la diabetes mellitus en adultos, adolescentes y niños a partir de los 6 años, cuando se precise tratamiento con insulina.	2,23	D

PRINCIPIO ACTIVO	GRUPO TERAPÉUTICO	INDICACIONES	COSTE T*/DÍA	POTENCIAL TERAPÉUTICO
LARONIDASA ALDURAZYME*	A16AB05 H	Terapia de reemplazo enzimático a largo plazo en pacientes con un diagnóstico confirmado de mucopolisacaridosis I (MSP I; deficiencia de alfa-L-iduronidasa) para tratar las manifestaciones no neurológicas de la enfermedad.	1.450,00	A*
LEVOCETIRIZINA MUNTEL* XAZAL*	R06AE09	Tratamiento de los síntomas asociados a enfermedades alérgicas como: rinitis alérgica estacional (incluyendo los síntomas oculares), rinitis alérgica perenne y urticaria crónica idiopática.	0,56	C
MANIDIPINO ARTEDIL*	C01D2	Tratamiento de la hipertensión arterial esencial leve a moderada.	0,57	C
MEMANTINA(2) AXURA* EBIXA*	N06DX01 DH	Tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer de moderadamente grave a grave.	3,84	D
MOROCTOCOG REFACTO*	B02BD H	Tratamiento y profilaxis de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A (déficit congénito de factor VIII). No contiene factor de von Willebrand y, por tanto, no está indicado en la enfermedad de von Willebrand.	174,29 - 697,17 (envase)	C
NORELGESTROMINA+ ETINILESTRADIOL™ EVRA*	G03AA	Anticoncepción femenina.	0,52	C
OLOPATADINA OPATANOL*	S01GX09	Tratamiento de los signos y síntomas oculares de la conjuntivitis alérgica estacional.	0,48	C
PARICALCITOL ZEMPLAR*	A11C H	Prevención y tratamiento del hiperparatiroidismo secundario y la osteodistrofia renal asociados con fallo renal crónico.	93,00 (envase)	B
PEGFILGRASTIM NEULASTA*	G03AA H	Reducción de la duración de la neutropenia y de la incidencia de neutropenia febril en pacientes con tumores malignos tratados con quimioterapia citotóxica (con excepción de leucemia mieloide crónica y síndromes mielodisplásicos).	1.028,80 (envase)	C
PEGVISOMANT™ SOMAVERT*	H01AX DH	Tratamiento de pacientes con acromegalia que no han respondido adecuadamente a cirugía y/o radiación o en los que con un adecuado tratamiento con análogos de somatostatina (octreotida, lanreotida) no se han normalizado las concentraciones del factor de crecimiento I tipo insulina (IGF-I) o no haya sido tolerado.	73,21	D
PIMECROLIMUS ELIDEL*	D11AX15	Dermatitis atópica (eczema) en pacientes de dos o más años de edad, para el tratamiento a corto plazo de los signos y síntomas o el tratamiento intermitente a largo plazo para prevenir la aparición de brotes.	42,12 (envase)	D
RIFAXIMINA SPIRAXIN* ZAXINE*	A07AA11	Enterocolitis bacteriana resistente al tratamiento sintomático en pacientes de riesgo con patología asociada, inmunodepresión o edad avanzada. Colitis pseudomembranosa en pacientes resistentes a la vancomicina, diverticulitis aguda, profilaxis pre y post operatoria en cirugía del tracto gastrointestinal y como terapia coadyuvante en la hiperamonemia.	3,20	C
RIMEXOLONA VEXOL*	S01BA13	Tratamiento de la inflamación postoperatoria tras la cirugía ocular, tratamiento de la uveítis anterior y de las inflamaciones de la conjuntiva bulbar y palpebral, córnea y segmento anterior del ojo, que responden al tratamiento con esteroides. La inflamación debe ser de naturaleza no infecciosa. En casos más graves, y si la parte posterior del ojo está afectada, se recomienda inyección subconjuntival o tratamiento sistémico.	0,24	C
RUPATADINA ALERGOLIBER* RINIALER* RUPAFIN*	R06AX28	Tratamiento de los síntomas asociados a la rinitis alérgica estacional y perenne.	0,63	C
VARDENAFILO™ LEVITRA*	G04BE09	Tratamiento de la disfunción eréctil.	9,65	C
ZOFENOPRIL ZOFENIL* ZOPRANOL*	C09AA15	Tratamiento de la hipertensión esencial leve a moderada. Tratamiento, iniciado dentro de las primeras 24 horas, de pacientes con infarto agudo de miocardio con o sin signos y síntomas de insuficiencia cardíaca, hemodinámicamente estables, que no hayan recibido terapia con trombolíticos.	0,57	C

(*) Medicamento no financiado por el sistema Nacional de Salud. (2) Se necesita visado de la Inspección. (DH) Diagnóstico Hospitalario. (H) Uso Hospitalario.

Este apéndice informa sobre las notaciones utilizadas en la tabla anterior.

CLASIFICACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO

TIPO A': Novedad terapéutica excepcional

El nuevo medicamento supone un tratamiento o diagnóstico eficaz para una enfermedad que no podía ser tratada o diagnosticada adecuadamente con algún medicamento existente.

TIPO A: Importante mejora terapéutica

El nuevo medicamento proporciona una mejora evidente, bien en cuanto a eficacia o a seguridad de una enfermedad para la que exista ya tratamiento disponible.

TIPO B: Modesta mejora terapéutica

El medicamento constituye un avance modesto, pero lo real, sobre otros medicamentos disponibles en el mercado (menos reacciones adversas, menor costo del tratamiento, más cómodo para el paciente, útil en pacientes concretos).

TIPO C: Nula o muy pequeña mejora terapéutica

El nuevo medicamento no está relacionado estructuralmente con ningún fármaco existente (es una nueva identidad farmacológica), pero no aporta ninguna ventaja significativa respecto a otros fármacos alternativos en la enfermedad para la que está indicado. El nuevo medicamento es similar a unos o más fármacos ya disponibles en el mercado.

TIPO D: Sin clasificación

Del nuevo medicamento existe poca bibliografía y/o poca experiencia de uso para poder establecer una conclusión significativa. El nuevo fármaco no es comparable con ningún otro.

2.2 Sistemas acarreadores

Los sistemas de liberación controlada abarcan una amplia gama de técnicas, desde aerosoles para la terapia de la inhalación hasta cápsula de alta tecnología. Otra forma diferente es el uso de acarreadores que lleven el fármaco al lugar de acción en la dosis y tiempos deseados.^{3,4}

La idea de usar acarreadores no es nueva. Paul Erlich, en 1906, planteaba la búsqueda de una sustancia capaz de actuar como una "bala" la cual eliminará solamente al organismo vector productor de la enfermedad. Erlich encontró el dioxidiamidoarsenobenzol. Éste era el compuesto 606 al que le puso el nombre de salvarsán, o "arsénico que salva". Más tarde, conforme al método científico, cotejó las suposiciones y estableció las pautas de administración y así logró eliminar los gérmenes causantes de la sífilis sin lacerar al organismo mediante la inyección de un producto en la sangre. Es lo que antes denominó "balas mágicas". Una especie de medicina dirigida a un lugar en específico.^{5,6}

Los sistemas acarreadores presentan algunas ventajas sobre el hecho de administrar los fármacos libremente. El organismo es protegido de la posible toxicidad de los activos, mientras que estos son protegidos de la acción del organismo y del medio ambiente, a la vez que mantienen la velocidad de liberación.

Para diseñar formas de dosificación se utilizan materiales que deben ser principalmente, biodegradables,⁷⁻¹⁰ es decir, que su degradación en el organismo sea más rápida que fuera de él y que ni ellos ni sus productos de degradación sean tóxicos. Destacan las ciclodextrinas, fosfolípidos, esteroides, diferentes tipos de tensoactivos y polímeros naturales o sintéticos.¹¹ Algunos de estos

tipos de materiales presentan problemas como rápido aclaramiento de las partículas coloidales por los macrófagos del sistema reticuloendotelial, lo cual es necesario tener conocimiento de algunas de las propiedades de los mismos: distribución y tamaño de partícula, potencial zeta, hidrofobicidad de la superficie y análisis químico.

El estudio de tamaño de partícula es necesario porque de éste dependerán: su distribución en el organismo, su toxicidad y evidentemente el aclaramiento por el sistema reticuloendotelial.^{12, 13} Así, es sabido que el tamaño más pequeño de los capilares es aproximadamente de 4 μm , por lo tanto trabajar con partículas de tamaño mayor a éste implica la posible formación de trombos.

El conocimiento del potencial zeta es determinante para estimar la unión a macrófagos y la agregación entre partículas.¹⁴⁻¹⁶ Prácticamente todos los coloides acuosos son negativos, -14 a -30 mV.

De la hidrofobicidad de la superficie obedece la interacción con las células (más hidrófobico más fagocitosis) y con otros polímeros usados para adsorción (más hidrofóbico más afinidad por los polímeros con esas características). Si se realiza un estudio de la composición química de la superficie se podrá conocer la presencia de contaminantes en el exterior de la partícula, los fenómenos observados en la modificación superficial del vehículo y la distribución *in vivo*. Para conocer este dato se realiza marcación con isótopos radioactivos y se hace un seguimiento mediante centelleo gama.^{17, 18}

2.2.1 Clasificación de sistemas acarreadores

Los acarreadores más utilizados se clasifican en tres tipos:

- a) *coloidales*: liposomas, niosomas, micropartículas y nanopartículas.
- b) *moleculares*: ciclodextrinas, anticuerpos y dendrímeros.
- c) *celulares*: eritrocitos resellados.

Esta revisión se encauzará más sobre los sistemas coloidales porque entre éstos se encuentran las nanopartículas que son parte primordial de este trabajo.

Por definición, se denominan *sistemas coloidales* las dispersiones en las que las partículas tienen un tamaño que oscila entre 10^{-9} m (1 nm) y aproximadamente 10^{-6} m ($1\mu\text{m}$). Sin embargo se suele ampliar el límite superior de tamaño para incluir las emulsiones y las suspensiones, que son sistemas muy polidispersos en los que las gotitas suelen medir más de $1\mu\text{m}$ pero que manifiestan muchas de las propiedades de los sistemas coloidales. Esto conlleva a que exista un amplio criterio de definiciones de estos sistemas, ya que, Alfred Martin menciona que para ser un sistema coloidal el tamaño de las partículas dispersas debe de estar en un rango de 1nm a $0.5\mu\text{m}$, sin embargo, Paul C. Hiemenz, Brian Vicent consideran como sistema coloidal a las partículas que están en el rango de 1nm y $1\mu\text{m}$.

Liposomas: estructuras constituidas por dos o más bicapas de fosfolípidos que cuando se dispersan en el agua se organizan en vesículas cerradas. Fueron descubiertos en 1960 y desde entonces han sido utilizados para diversos fines, entre los que destacan su uso como modelos de membranas celulares y como sistemas de liberación de activos, a nivel farmacéutico y cosmético. Los liposomas

varían según el tipo de lípidos utilizados, la técnica y las condiciones de preparación lo cual influye sobre los procesos, perfil de liberación de los activos y la vida media del liposoma.¹⁹

Niosomas: son vesículas formadas principalmente por tensoactivos no iónicos y presentan mayor estabilidad que los liposomas. Su eficacia de carga depende del método de preparación (inyección de disolvente orgánico lleva a mayor eficacia que por agitación manual) y la composición de la bicapa (a más colesterol, mayor longitud de cadena y mayor carga, mayor atrapamiento).¹⁹

Micropartículas: partículas pequeñas, del orden de micras. Preparadas a partir de diferentes materiales y sus características físicas dependerán del uso que se les va a dar. Existen dos tipos de micropartículas: las microesferas en las que el fármaco se encuentra disuelto o disperso en una matriz polimérica sólida y las microcápsulas cuando el fármaco se encuentra en una fase líquida interior y rodeada por una membrana.

Si bien algunos de estos sistemas ya cuentan con una larga trayectoria como vehículos portadores de fármacos, sin embargo, ha sido en los últimos años cuando se han producido las innovaciones y aplicaciones más interesantes. En éste contexto vamos a centrar nuestra atención, en las nanopartículas como sistemas de más amplia utilización en la actualidad.

2.2.2 Nanopartículas

A finales de los años 1970, debido a los problemas que presentaban los liposomas como la baja estabilidad y baja eficiencia en la incorporación de fármacos, surgieron como alternativa las nanopartículas.

Nanopartículas: son partículas coloidales en el rango de tamaños entre 10 y 1000nm. Están hechas de material macromolecular en el cual el activo está disuelto, atrapado o encapsulado y al cual puede ser absorbido o unido. Este material debe ser preferentemente biodegradable. La elección del polímero, tamaño y método de preparación dependerán de la bioaceptabilidad del mismo, las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del polímero y de la meta terapéutica.

Ej.: la albúmina, como componente de nanopartículas, ha sido ampliamente estudiada por numerosos autores, pero ha adquirido especial relevancia al ser las primeras nanopartículas, aprobadas por la FDA, conteniendo paclitaxel. Estas nanopartículas, desarrolladas según la tecnología de la American Biosciences, pueden pasar a través del epitelio endotelial de los vasos de los tumores vía transporte, mediado por receptores de la albúmina y no contienen los disolventes utilizados para disolver el paclitaxel. Ello permite que la infusión dure 30 minutos en lugar del largo tiempo que se utiliza con la formulación convencional; por otra parte se pueden utilizar equipos de perfusión standard en lugar de los equipos especiales que se requieren para administrar el paclitaxel. La FDA aprobó Abraxane (partículas de paclitaxel unido a albúmina para suspensión inyectable) para el tratamiento del cáncer de mama metastático.

Además de las nanopartículas formadas a partir de polímeros naturales o sintéticos, destacan las *Nanopartículas Sólidas Lipídicas* (NSL) como un novedoso sistema de liberación, el cual propone el uso de lípidos sólidos derivados de ácidos grasos.²⁰⁻²²

Un ejemplo de la importancia de estas, en los últimos tiempos, debido al aumento de cáncer de piel ha surgido la necesidad de formular sistemas de protección eficaces frente a las radiaciones solares con el fin de minimizar los efectos negativos de las mismas. Un problema asociado al uso de filtros

solares como fotoprotectores es su penetración en la piel provocando irritación. Ello podría minimizarse, o incluso evitarse, utilizando estos sistemas nanoparticulares. Dichos sistemas (NSL) ejercen por sí mismos un efecto fotoprotector, debido a que estas partículas son capaces de reflejar la radiación UV-B y A. Por ello, en cualquier formulación en la que se combinen con filtros solares se observará un sinergismo en el efecto fotoprotector. Así por ejemplo, la incorporación de la 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (Eusolex® 4360) en SLN dispersos en una emulsión produce un efecto fotoprotector tres veces superior al obtenido con una emulsión de referencia.⁵⁰

Las principales ventajas y desventajas de las NSL son:

Ventajas: disminución de la toxicidad, tamaño nanométrico, disminución de la respuesta inmune.^{23,}

24

Desventajas: capacidad de carga, reproducibilidad, polimorfismo del lípido.²⁵

2.2.2.1 Métodos de preparación

Las técnicas usadas para preparar NSL son: homogenización por alta presión, evaporación por disolvente y microemulsión.^{26, 27}

Homogenización por alta presión. Se disuelve el fármaco en el lípido fundido entre 5 y 10 °C por encima de su punto de fusión y se dispersa la mezcla con agitación en una disolución caliente (a igual temperatura que la fase lipídica) de tensoactivo. Esta preemulsión se homogeniza con alta presión. La emulsión se enfría y la recristalización del lípido lleva a la formación de las estructuras nanométricas. También es posible encapsular fármacos sensibles a la temperatura mediante

mezclado en frío o moléculas hidrofílicas²⁸ de este modo se evita, en parte, la migración del fármaco a la fase acuosa durante el proceso inicial de formación de la preemulsión.^{2,23}

Evaporación por disolvente. Se disuelve el lípido en un medio orgánico y se dispersa en agua formando una emulsión o/w. Posteriormente se evapora el disolvente, dejando el lípido en contacto con el agua, que al ser no soluble precipitará dando lugar a las NSL. El problema de este método es el uso de disolventes orgánicos.²⁹

En el tercer caso, las *microemulsiones* fueron el medio para la generación de las NSL de este trabajo. Se define una microemulsión como un sistema constituido por dos fases líquidas (acuosa y orgánica) inmiscibles entre sí, que de manera espontánea una se dispersa en la otra con la ayuda de un tensoactivo o una mezcla de tensoactivo-cotensoactivo. Se les considera sistemas termodinámicamente estables, transparentes, con un tamaño de gota menor a 2µm.

Se genera una microemulsión, siendo la fase interna el lípido fundido con el fármaco incorporado; esto es, adicionando con agitación a una fase acuosa con tensoactivos y cotensoactivos a la misma temperatura. La microemulsión formada se adiciona a una disolución acuosa fría y la precipitación de las NSL es instantánea. La desventaja que presenta en este método es que la cantidad de fase lipídica con respecto a la acuosa puede ser pequeña y, por lo tanto, para obtener una cantidad significativa de NSL es necesario eliminar una cantidad excesiva de agua.³⁰⁻³⁴

De este método se derivan las dos técnicas utilizadas para la elaboración de las NSL.

a) *Microemulsión por fusión:* se disuelve el fármaco en el lípido fundido entre 5 y 10°C por encima de su punto de fusión, agregando con agitación los componentes que forman la fase acuosa a la

misma temperatura. Posteriormente se le adiciona agua fría y la precipitación de las nanopartículas es inmediata, eliminando el exceso de agua con el proceso de liofilización.²⁶

b) **Microemulsión por disolvente**: se disuelve la cantidad del lípido y del principio activo en el disolvente orgánico, a continuación se adiciona la fase acuosa, con tensoactivos y cotensoactivos a temperatura ambiente generando la nanopartículas y posteriormente se elimina el disolvente orgánico, el cotensoactivo y el agua con el proceso de liofilización.²⁶

La conservación estable de estos sistemas se logra mediante la liofilización siendo necesaria la incorporación de crioprotectores como la trehalosa que impidan la agregación de las nanopartículas durante la liofilización, hecho que se presenta frecuentemente en las nanocápsulas o con ciertos polímeros.

Por lo tanto los parámetros críticos del proceso tienen que ser determinados y optimizados.

20, 26, 35

2.2.2.2 Caracterización de las nanopartículas.

Las nanopartículas obtenidas por cualquiera de los procedimientos descritos deben ser caracterizadas y controladas de acuerdo con unos ensayos que aseguren su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento biofarmacéutico (liberación).

Ensayos característicos que se suelen realizar a las nanopartículas:

Tamaño de partícula: Se realiza mediante PCS (Espectroscopia de correlación de fotones) o LD (Difracción láser). PCS evalúa la fluctuación de la intensidad de la dispersión de la luz originada por el movimiento de las partículas. LD se fundamenta en el ángulo de difracción de la luz

originado por las partículas, a menor tamaño se observan ángulos más grandes. Los equipos miden el tamaño de partícula de acuerdo a la intensidad, volumen y número.^{26, 27, 36, 37}

Potencial zeta: El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. La evaluación de este parámetro ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales. La medición se basa en la movilidad electroforética.^{26, 36}

Morfología: Se utiliza *Microscopía electrónica:* la técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra (tamaño y forma).^{34, 37}

Transformaciones térmicas, se hacen por *Calorimetría diferencial de barrido:* El análisis térmico diferencial es una técnica mediante la cual se puede conocer las propiedades de cristanilidad de las partículas así como la interacción fármaco-lípido y la modificación que se presenta con respecto al lípido y el fármaco después de someterse a una técnica para formación de nanopartículas. También puede ser un indicador de la estabilidad de las nanopartículas formadas a través del tiempo. Se pueden presentar la desaparición, disminución y corrimiento de picos de fusión.^{26, 27, 29, 36-39}

3.0 Estudios realizados sobre liberación modificada de norfloxacina

Una mala distribución, baja solubilidad, efectos secundarios, aclaramiento reticuloendotelial, la inestabilidad física y química, corto tiempo de vida media, son algunos factores que propician buscar el diseño de forma de dosificación para obtener un sistema más eficiente que los convencionales, conduciendo al desarrollo de novedosos sistemas y procesos.⁴⁰⁻⁴⁴

En una revisión en diferentes bases de datos se encuentran 20 trabajos sobre liberación modificada de norfloxacina, entre éstos destacan los siguientes por lo innovador y la contribución de la formulación para el mejoramiento de las propiedades terapéuticas del principio activo⁵⁴.

Un tratamiento útil localiza el sitio donde se encuentra la enfermedad, pero la baja solubilidad y permeabilidad del fármaco al sitio de infección, origina que el principio activo permanezca poco tiempo causando resistencia de la bacteria, especialmente en infecciones intracelulares que son difícil de radicar porque la bacteria se encuentra protegida, ya que ésta se localiza en el interior del lisosoma, donde células infectadas pueden actuar como reservorio de microorganismos causando infecciones sistémicas. La necesidad de quimioterapias intracelulares tienen que reorganizarse y esto llevaría tiempo.

Couvreur *et al* reporta que los antibióticos guiados en nanopartículas podrían promover una terapia eficiente contra infecciones intracelulares.

Para este estudio se sintetizaron copolímeros y las micelas poliméricas fueron preparadas por el método de diálisis, incorporando como principio activo a la norfloxacina para posteriormente realizar un estudio de liberación

Concluyendo que el porcentaje de norfloxacin liberada depende de la longitud de la cadena del copolímero correspondiente a la parte hidrofóbica, siendo lentamente liberada la cantidad del principio activo debido a la interacción del fármaco-parte hidrofóbica.⁴⁵

Otro ejemplo es la encapsulación de norfloxacin en niosomas continuando con un estudio de absorción intestinal y nasal., pretendiendo una liberación sostenida, así como estabilidad del compuesto. Sus resultados indican que consiguen un 80% de principio activo encapsulado, no incrementan la biodisponibilidad después de la administración nasal y la absorción intestinal fue significativamente alta en comparación con los complejos de inclusión.⁴⁶

La eficiencia de la norfloxacin como un agente antibacterial en oftalmología esta limitado por la baja solubilidad del fármaco y biodisponibilidad ocular. La preparación de norfloxacin en liposomas usando una técnica nueva logró tener una mayor eficiencia de encapsulación que los métodos convencionales. Posteriormente se realizo el estudio de cinética, donde la liberación del principio activo fue afectada por el pH del medio, además de que la retención de la norfloxacin en la cornea es dependiente del fosfolípido a utilizar y se sugiere que la norfloxacin incorporada en el acarreador son absorbidos en la cornea por la vía de endocitosis.⁴⁷

La norfloxacin en el interior de los catéteres fue con el propósito de prevenir infecciones tracto urinarias en pacientes que tienen que utilizarlo por tiempo prolongado. Este objetivo se logro con la impregnación del copolímero en el interior del catéter, obteniendo una liberación de norfloxacin por mas de 30 días concluyendo que este dispositivo tiene un gran potencial para uso clínico.⁴⁸

Otro caso es que varios antibióticos tales como sulfonamidas tetraciclinas y quinolonas tienen comúnmente a ser usadas en el control de enfermedades en peces. La dispersión del fármaco en el agua presenta desventajas como: poca efectividad, resistencia de la bacteria, impacto en el medio ambiente por lo que surge los bioacarreadores de norfloxacin utilizando a *Macrocopa* donde se incorpora el antibacteriano en la pulga y subsecuentemente dentro del pescado denominando a este proceso como bioencapsulación donde la eficiencia depende de la concentración del fármaco, del medio enriquecido y el tiempo de incubación siendo una forma de dosificación útil.⁴⁹

La opción viable para la preparación se incrementa con avances en métodos tradicionales y muchas nuevas técnicas de preparación tienen que ser desarrolladas y refinadas.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Generar nanopartículas sólidas lipídicas de norfloxacin a partir de microemulsiones como un sistema de liberación modificada.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los diagramas pseudoternarios con los componentes a estudiar (Diclorometano, tween 80, isopropanol y agua) a temperatura ambiente.
- Caracterizar las zonas de microemulsión o/w por medio de la inversión de fases (mediante la medición de tamaño de partícula y conductividad).
- Formar las NSL y caracterizarlas midiendo tamaño de partícula, potencial zeta, evaluación morfológica.
- Evaluar el perfil de liberación de las NSL para comparar las diferentes formulaciones.

IV. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

Acetonitrilo, Reactivo Analítico Baker®

Ácido esteárico, Droguería Cosmopolita, S.A. de CV

Agua desionizada

Diclorometano, Reactivo Analítico Baker®

Isopropanol, Reactivo Analítico Baker®

Norfloxacin, USP 22. Lote 2000071502

Tween 80, Fluka Chemika

Balanza analítica, Explorer Ohaus

Nanosizer Zen 3600

Celdas adaptadas a un control de temperatura

Parrillas de agitación magnética, Fisher Scientific.

Conductímetro, YSI Modelo 3100

Liofilizadora

Celdas horizontales de difusión de Franz con membrana de celulosa regenerada (12000-14000 Da).

Baño Ultrasónico, Cole-Parmer 8890

Espectrofotómetro UV-Visible, Ocean optics S-2000.

DSC Shimadzu 50

V. METODOLOGÍA

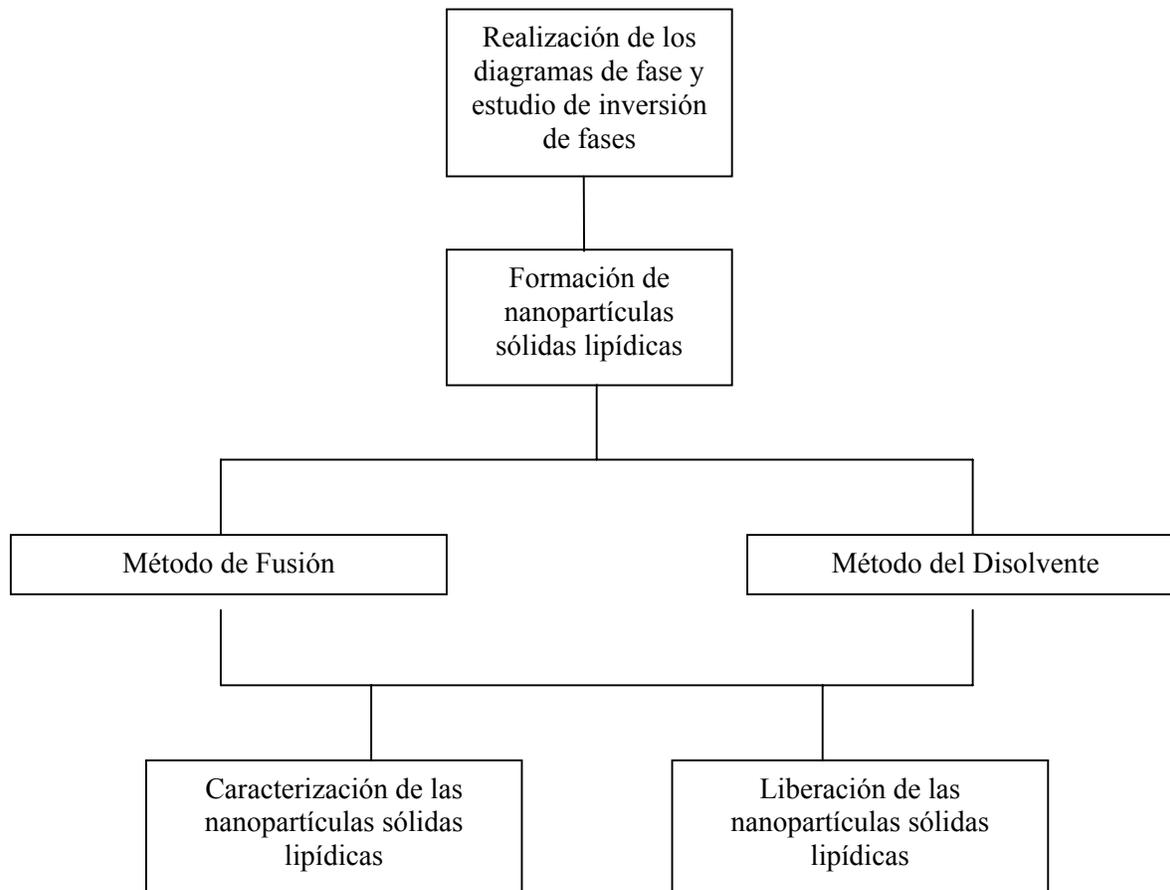


Figura 1. Metodología general

- *Fabricación de los diagramas de fase*

Para la realización del diagrama de fase correspondiente a cada relación de tween/isopropanol (1:0.5, 1:1, 1:2) se utilizaron celdas de reflujo a una temperatura de 25°C con agitación constante.

Una vez adicionados los componentes (tween-isopropanol, diclorometano) en las cantidades adecuadas (siendo el volumen final de 2mL), se procedió a titular con agua desionizada, anotando

las observaciones pertinentes, es decir, los cambios de transparencia, turbidez, lechoso y separación de fases.

Se efectuaron los cálculos de las proporciones en peso de tensoactivo-cotensoactivo, fase oleosa y agua para obtener el diagrama pseudoternario.

- *Estudio de inversión de fases en microemulsión*

Se efectuó determinando tamaño de partícula y conductividad de la línea 90:10. (Línea que parte de la relación 90% en peso de la mezcla de tensoactivos y 10% del disolvente orgánico)

La determinación del *tamaño* de partícula se llevó a cabo mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, usando el equipo Nanosizer Zen 3600 que se basa en la dispersión de un rayo láser a 633nm, en un volumen de muestra, proporcionando los parámetros correspondientes (índice de refracción, temperatura, medio continuo y disperso, número de lecturas) para efectuar la medición del tamaño de acuerdo a la intensidad, volumen y número.

La obtención de los valores de *conductividad* se efectuó mediante el paso de corriente a través de una celda que al ser sumergida en la muestra proporciona una magnitud de conductancia, la cuál, al considerar el área de la celda nos da el valor de conductividad a una temperatura específica, en este caso 25°C.

- *Elaboración de las nanopartículas sólidas lipídicas*

Con el estudio de inversión de fases en microemulsión evaluada por tamaño de partícula y conductividad, se eligió el punto de cada diagrama de fase y su respectiva composición.

El método de microemulsión por fusión consiste en diluir el fármaco (norfloxacina) en el lípido fundido (ácido esteárico) entre 5 y 10°C por arriba de su punto de fusión, esto se realiza en una celda de reflujo a una temperatura de 65°C y con agitación constante, seguido de la adición de los componentes que forman la fase acuosa (tween 80 e isopropanol) a la misma temperatura.

Posteriormente se le agrega agua fría y la precipitación de las nanopartículas es inmediata, eliminando el exceso de agua con el proceso de liofilización por 24 horas.

El método de microemulsión por disolvente se basa en disolver la cantidad del lípido (ácido esteárico) y el principio activo (norfloxacina) en el disolvente orgánico (diclorometano). Posteriormente se toma la proporción de la disolución anterior que le corresponde a la fase oleosa y a continuación se añade la fase acuosa (tween 80, isopropanol y agua) a temperatura ambiente generando las nanopartículas y se excluye el disolvente orgánico (DCM), el co-tensioactivo (isopropanol) y el agua con la sucesión de liofilización por 24 horas.

- *Caracterización de las nanopartículas sólidas lipídicas.*

Tamaño de partícula (ϕ)

Las nanopartículas producidas por los dos métodos fue dispersada en agua determinando su tamaño mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, empleando el equipo Nanosize Zen 3600 proporcionando los parámetros correspondientes, para realizar la medición del tamaño de acuerdo a la intensidad, volumen y número.

Potencial Z (ζ)

En la celda de plástico con electrodos se coloca las nanopartículas que se encuentran diseminadas en agua y se mide dicha magnitud utilizando el equipo Nanosize Zen 3600, aportando los parámetros pertinentes para realizar la evaluación del potencial Z.

Microscopía Electrónica de transmisión

Por medio de esta técnica es posible evaluar la morfología y tamaño de las nanopartículas para así corroborar tanto la presencia de las mismas como su forma y tamaño.

Liberación *in vivo*

El estudio de liberación del fármaco a partir de las formulaciones obtenidas se efectuó mediante celdas horizontales de difusión de Franz utilizando agua como medio en el donador y en el receptor acetronitrilo separados por una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro aproximadamente de 3 nm (14000 Da). Se coloca una cantidad de la muestra de acuerdo a la capacidad de la celda que funciona como donador manteniendo el sistema a temperatura de 37°C y en agitación constante. Se toman muestras a diferentes tiempos durante 24 horas, recuperando el volumen total de la alícuota analizada (5 mL). Se cuantifica la cantidad de norfloxacin liberada a cada tiempo utilizando espectrofotometría UV-Visible, considerando la longitud de onda a la cual absorbe el fármaco (316.83nm) y comparando cada absorbancia contra una curva patrón, previamente realizada.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Diagramas de fase

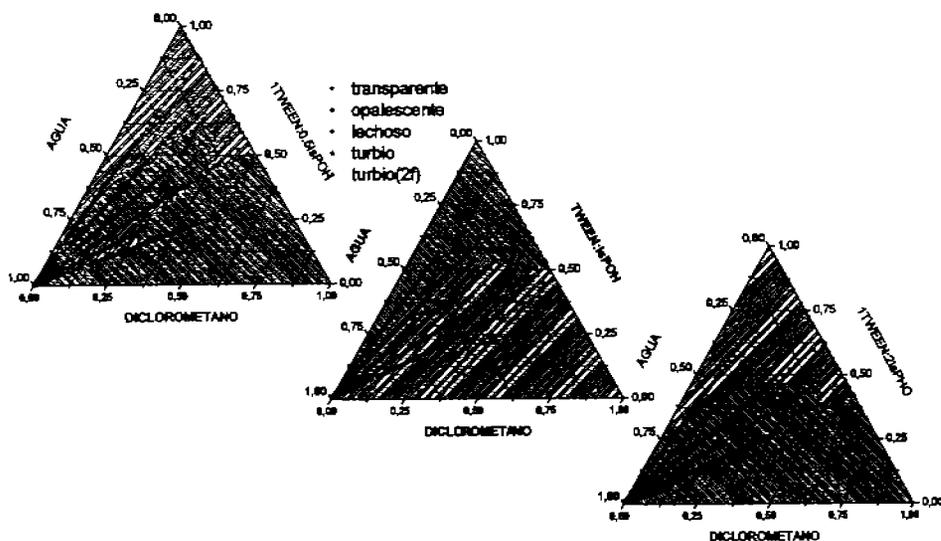


Figura 2. Diagramas pseudoternarios a 25°C de los sistemas: DCM-tween 80-isopropanol-agua, (relación tensoactivo/cotensioactivo 1:0.5, 1:1, 1:2).

Se observa que al incrementar la cantidad de cotensioactivo, el área total de microemulsión acrecienta, lo cual indicaría que la presencia de isopropanol favorece la incorporación del diclorometano en agua y viceversa, es decir, disminuye la CMC (concentración micelar crítica), por lo tanto, al aumentar la cantidad de éste favorece la formación de agregados a concentraciones menores de tensoactivo, mejorando así la zona de microemulsión.

A bajas cantidades de cotensioactivo se percibe gran variabilidad de comportamiento, a medida que incrementa éste se observa que va siendo más definido solo en turbidez y lechoso, no se ve

aparición de dos fases. Lo cual se puede explicar con lo comentado anteriormente, a mayor cantidad de cotensoactivo el mezclado de las dos fases inmiscibles se ve favorecido y no hay separación visible, se puede mantener gotas de un disolvente en el otro a pesar de su gran superficie, dado que el isopropanol, favorece la disminución de la tensión interfacial mejorando así la energía libre (ΔG).

2. Estudio de inversión de fase

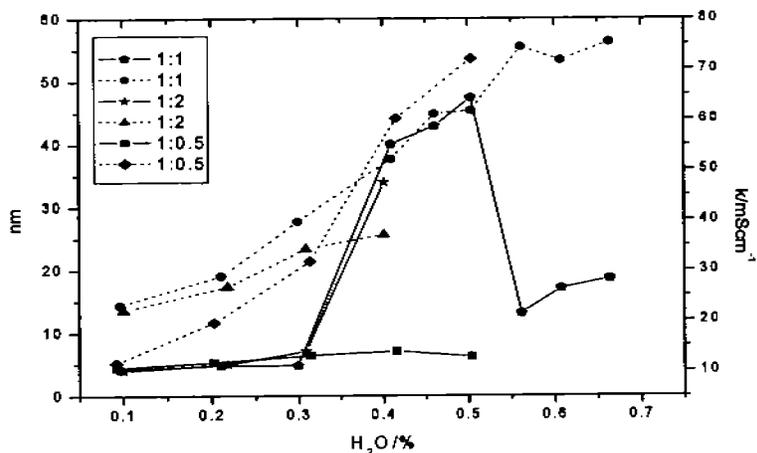


Figura 3. Variación de la conductividad, κ (azul), y del tamaño de partícula (negro) con el contenido de agua en la línea 90:10 del sistema de microemulsión en las diferentes relaciones tensoactivo/cotensoactivo.

Este estudio se llevó a cabo basándose en una metodología explicada en el capítulo V. Las bases científicas en que se apoyó esta determinación son las siguientes:

2.1 Tamaño de partícula

Al ir incrementando la cantidad de agua en el medio se va favoreciendo la formación de glóbulos, ya sea en cantidad o en tamaño dado que se debe incorporar una mayor cantidad de fase interna en el mismo volumen de fase externa (DCM). La concentración de tensoactivo va disminuyendo a medida que aumenta el volumen total de la dispersión, así que es necesario disminuir el área superficial para paliar el aumento de la tensión interfacial y favorecer así termodinámicamente el proceso (disminuir ΔG).

De esta forma se puede entender que va aumentando paulatinamente el tamaño del glóbulo (relación 1:1), hasta llegar al 70% de fase acuosa donde se observa una caída abrupta del tamaño (relación 1:1) esto se debe a que la fase interna pasa a ser fase externa. La cantidad relativa de diclorometano disminuye considerablemente a lo largo de la línea 90:10, por eso cuando éste pasa a ser fase interna el tamaño del glóbulo es pequeño, pudiendo mantenerse el mismo a lo largo de la línea o crecer para disminuir el problema de la menor concentración de tensoactivo ya comentados. Como se puede ver en la figura 3, al 30% de agua en peso, hay un gran aumento de tamaño, lo cual pudiera ser explicado por un comportamiento típico bicontinuo, es decir, que se trata de una estructura que no es microemulsión o/w o w/o sino una zona de inversión de fase. Esta gráfica sigue un comportamiento típicamente percolativo, observándose dos umbrales de percolación a 30 y 40%, porcentajes que nos muestran los dos grandes cambios estructurales ya mencionados.

El comportamiento en los otros diagramas es similar a lo comentado anteriormente. La única variación consiste en que la inversión de fases tiene lugar a menor concentración de agua. Esto puede explicarse por la presencia del cotensoactivo en mayor proporción, ya que éste va a favorecer la mezcla o/w, puesto que su solubilidad con el agua y sus propiedades conllevaría a un tensoactivo neto de mayor HLB.

2.2 Conductividad

La conductividad eléctrica se midió como función de la composición de los sistemas estudiados (Figura 3). A medida que la cantidad de agua aumenta, la conductividad se incrementa exponencialmente. Estos cambios se atribuyen a un comportamiento percolativo. De acuerdo a este modelo, la curva de conductividad se puede dividir en tres partes, cada una de las cuales corresponde a un tipo de microestructura de la microemulsión.

Inicialmente, la microemulsión es w/o y el aumento de conductividad es muy lento. Poco a poco, este incremento se hace más rápido debido a un proceso de formación de clusters interligados entre sí, lo que se relaciona con una estructura interconectada bicontinua debida a una mayor concentración de agua que lleva a más formación de glóbulos, los cuales pueden interactuar entre ellos. Al seguir aumentando el agua se da la inversión de fases y se genera la microemulsión o/w.

3. Selección del punto (composición) para obtener las nanopartículas.

En base a los resultados anteriores se seleccionaron tres puntos de microemulsiones o/w, uno de cada diagrama de fases. Para lo anterior se tuvieron en cuenta las siguientes características:

- alta concentración de DCM (para incorporar mayor cantidad de fármaco)
- evidencia de ser una mezcla o/w (por las características del principio activo ya que es lipofílico, así se asegura que la norfloxacin se encuentra en la fase interna y esto conllevaría a una mayor encapsulación).
- pequeño tamaño de los glóbulos (para tener un mayor posibilidad de vías de administración y disminuir la respuesta inmune).

	% CH ₂ Cl ₂	% Tween:IsPOH	% H ₂ O
Relación 1:1	5.03	34.24	60.73
Relación 1:2	8.02	51.90	40.09
Relación 1:0.5	6.05	43.55	50.40

Tabla 1. Composición en peso de los puntos seleccionados para adicionar el fármaco y formar las SLN.

Como se indicó en la metodología, a este nivel del trabajo se incluyó una técnica alternativa para la formación de nanopartículas, excluyendo la presencia del disolvente orgánico.

TEC. FUSION		Tween:IsPOH (g)	H ₂ O (g)	Ac. Estéarico (mg)	Norfloxacina (mg)
Relación 1:2		6.2144	4.8	961.0	50.0
Relación 1:1		6.5416	11.6	960.2	50.0
Relación 1:0.5		6.9136	8.0	961.5	50.0
TEC. DISOLVENTE	CH ₂ Cl ₂ (mL)	Tween:IsPOH (mL)	H ₂ O (mL)	Ac. Estéarico (mg)	Norfloxacina (mg)
Relación 1:2	0.6	5.4	3.6	0.577	0.648
Relación 1:1	0.4	3.6	5.8	0.384	0.432
Relación 1:0.5	0.5	4.5	5.0	0.481	0.540

Tabla 2. Composición de los puntos seleccionados para la formación de nanopartículas.

4. Caracterización de los sistemas seleccionados (microemulsiones y nanopartículas)

4.1 Tamaño de partícula

TAMAÑO	Microemulsión (Sin fármaco y ácido esteárico)	Microemulsión (técnica de disolvente)	Nanopartículas (técnica de disolvente)	Nanopartículas (técnica de fusión)
Relación 1:2	33nm	27.5nm	3.88nm	380.3nm
Relación 1:1	17nm	26.1nm	4.42nm	315.3nm
Relación 1:0.5	6nm	14.5nm	4.28nm	293.6nm

Tabla 3. Valores de tamaño de partícula de las diferentes formulaciones generadas por ambas técnicas.

Al evaluar el diámetro hidrodinámico de los glóbulos obtenidos en las diferentes microemulsiones con diclorometano, se observa (Tabla 3) que al aumentar la cantidad de isopropanol presente se incrementa el tamaño de partícula en todos los casos cuando solo es la mezcla inicial, en presencia de ácido esteárico o cuando todos los componentes están presentes.

Lo anterior está de acuerdo con lo discutido en el apartado (2.1) donde se menciona que debido a una disminución en la tensión interfacial por el cotensoactivo se puede aceptar el mismo volumen de fases internas en esferas de mayor tamaño sin desestabilizar la dispersión. También está informado que los cotensoactivos disminuyen la curvatura de los glóbulos y esto hace que el

tamaño aumente.

Las mezclas con ácido esteárico no fueron caracterizados por si solos debido a que no pueden usarse como sistemas de liberación, ya que la microemulsión se genera a altas temperaturas.

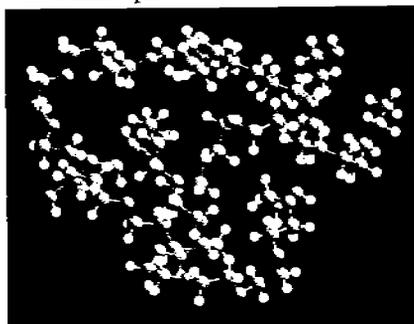


Figura 4: Estructura molecular del Tween 80

Las nanopartículas obtenidas a partir de la mezcla con diclorometano son mucho más pequeñas que las obtenidas por el método de fusión. En base al estudio de optimización geométrica de la molécula de tween 80 realizado (Hyperchem Vs 7) figura 4 se observa que su conformación más estable tiene un máximo de 2.07nm, o sea que dos moléculas confrontadas medirían lo que se obtiene experimentalmente. Esto nos da evidencia de que los coloides formados son glóbulos de tensoactivo entre cuyas cadenas hidrófobas se encuentran atrapados el ácido esteárico y la norfloxacin. Los tamaños de partícula del método de fusión son considerablemente mayores que las partículas que se elaboraron por el método de disolvente, debido a que la matriz es un lípido sólido y que se encuentra en una mayor proporción así como la cantidad de norfloxacin, pero a pesar de ello se observa que al aumentar la cantidad de isopropanol se incrementa el tamaño de las partículas.

4.2 Potencial Z (ζ)

Potencial Z	Nanopartículas (técnica de disolvente)	Nanopartículas (técnica de fusión)
Relación 1:2	-4.45	-22.23
Relación 1:1	-11.56	-36.56
Relación 1:0.5	-11.83	-35.63

Tabla 4. Valores de potencial Z de las nanopartículas generadas por ambas técnicas.

En general los resultados mostrados en la tabla 4 indican poca estabilidad física, ya que, indica la posibilidad de agregación temporal, debido a que el valor es inferior o cercano a -30 mVolt.

No obstante, se observa que a mayor cantidad de cotensoactivo se desfavorece la estabilidad física. Probablemente la carga negativa venga dada por los grupos carboxilo del ácido esteárico, los cuales

son neutralizados por la adsorción en superficie del fármaco, siendo esta mayor a más cantidad de isopropanol, lo cual puede deberse a una mayor solubilidad de la quinolona en la fase acuosa y por ende una mayor presencia de la misma en la superficie de las nanopartículas.

En la técnica por fusión, los resultados son más alentadores. Es posible que esto se deba a la menor relación existente entre la cantidad de ácido esteárico y tensoactivos.

5. Morfología

Se tomaron micrografías de algunas de las formulaciones con el fin de observar la presencia de las nanopartículas, su morfología y su tamaño.



Figura 5. Micrografía de la formulación (1:2) por la técnica de disolvente.



Figura 6. Micrografía de la formulación (1:2) por la técnica de fusión.

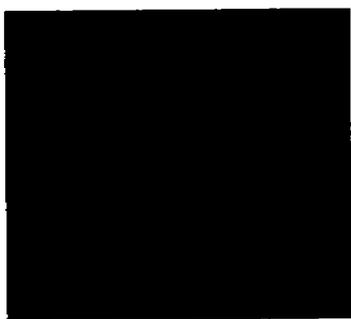


Figura 7. Micrografía de la formulación (1:1) por la técnica de disolvente.



Figura 8. Micrografía de la formulación (1:1) por la técnica de fusión.

Se puede observar que en el caso de la técnica de fusión, los tamaños obtenidos son mayores a los conseguidos por medio del uso de diclorometano, lo cual concuerda con los resultados ya comentados anteriormente.

6. Cinética de liberación

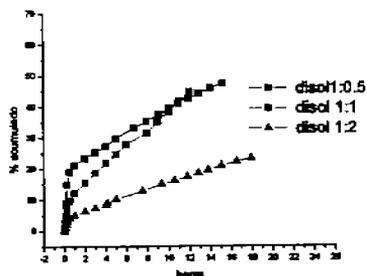


Figura 9. Liberación *in vitro* de norfloxacina a partir de la microemulsión como tal por la técnica de disolvente

En esta grafica se presenta tres formulaciones por la técnica de disolvente en donde la diferencia entre ellas es la relación de isopropanol, se observa que a mayor cantidad de isopropanol la liberación es mas lenta, probablemente esto se debe al tamaño de los glóbulos formados en cada caso, dado que al incrementar la cantidad de alcohol, mayor es el tamaño de la partícula.

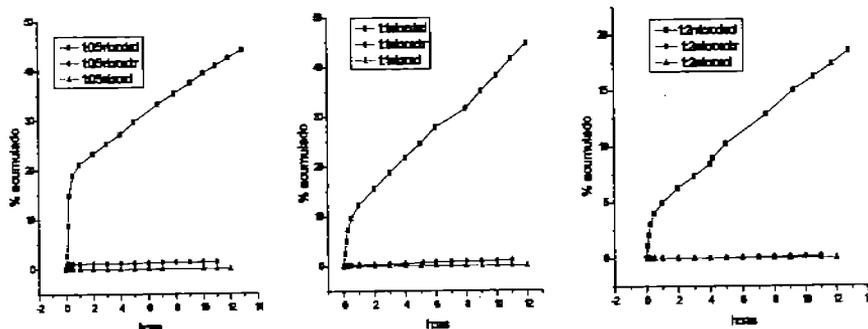


Figura 10. Liberación *in vitro* de norfloxacina a partir de la técnica de disolvente y fusión.

Comparando las microemulsiones con Diclorometano, con sólidos (>220 nm) dispersados en agua y sobrenadante (<220 nm) obtenidos de las microemulsiones por fusión se percibe que independientemente de la cuantía de cotensoactivo la liberación es más rápida en el caso de la microemulsión por disolvente, lo cual es lógico considerando que en este caso el activo se encuentra disuelto en la matriz líquida y solo impedido para liberar por la monocapa del tensioactivo-cotensioactivo. Es notorio que la diferencia de liberación entre la microemulsión con disolvente y las nanopartículas por fusión se va haciendo menos a medida que aumenta el cotensioactivo, lo cual está en concordancia con la discusión hecha anteriormente (fig. 8) al respecto del tamaño de partícula.

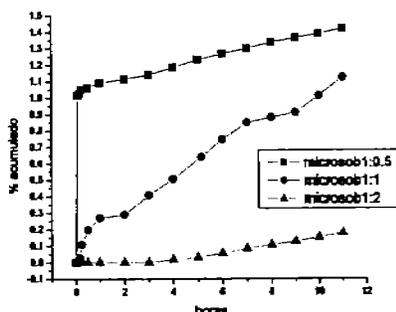


Figura 11. Liberación in Vitro de las partículas elaboradas por la técnica de fusión sobrenadantes (<220 nm)

presencia del tween 80, a mayor cantidad de éste se ve favorecida la liberación, dado que la norfloxacin tiene afinidad por éste que por el isopropanol.

En esta figura la información obtenida es muy poca, dado que si observamos los porcentajes de liberación son

Al analizar el comportamiento de cesión de las nanopartículas < 220 nm (sobrenadante, obtenidas por fusión) vemos un tendencia similar a la microemulsión con diclorometano, al aumentar la cantidad de cotensioactivo disminuye la velocidad de liberación. En este caso la explicación puede venir dada por la

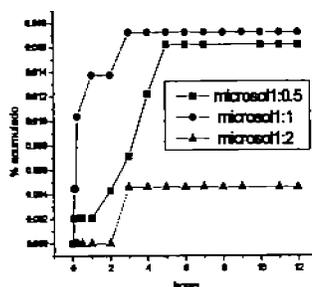


Figura 12. Liberación in vitro de las partículas elaboradas por la técnica de fusión (sólidos > 220 nm).

inferiores al 0.018. Aún así es factible, al menos, asegurar que la norfloxacin se fue prácticamente en su totalidad al sobrenadante, lo cual no es de extrañar considerando su solubilidad en el mismo (agua, tween 80 e isopropanol). No obstante, en vista de los resultados se podría indicar que no hay diferencia significativa entre ellos.

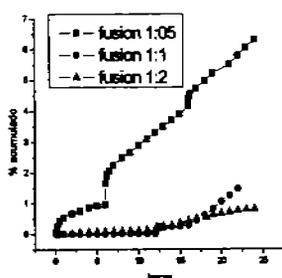


Figura 12. Liberación in vitro de las partículas elaboradas por la técnica de fusión.

En esta gráfica se observa una disminución de la velocidad al aumentar la cantidad de cotensoactivo, lo cual como tal, no debería influir ya que éste se elimina en el proceso. Sin embargo, su presencia en la formación del sistema particulado lleva a obtener tamaños de partícula mayores, acorde a lo comentado anteriormente en la figura 8. Por lo tanto a menor área superficial de un volumen igual de activo y lípido, habrá un retardo en la salida del fármaco.

A esto le podemos adicionar que el tensioactivo no fue eliminado de la formulación y por ello, éste va a estar presente en las nanopartículas formadas, como se decía en la figura 10. a mayor presencia de tween en la formulación, más rápida se da la cesión, debido a la solubilidad del principio activo en el tensioactivo.

VII. CONCLUSIONES

- 1.- De los diagramas pseudoternarios, estudiados con los componentes correspondientes donde se modificó la relación P/P de tween-isopropanol se encontró que a medida que aumenta la cantidad de cotensoactivo y disminuye la concentración de tensoactivo (0.5:1, 1:1, 1:2) se favorece el área de formación de microemulsión.
- 2.- La medición de tamaño de partícula y de conductividad son técnicas adecuadas para el estudio de inversión de fase “por percolación”.
- 3.- La composición de las microemulsiones o/w elegidas fueron sistemas adecuados para la generación de nanopartículas.
- 5.-Las nanopartículas generadas por el método de fusión revelan que la cantidad de cotensoactivo influye en la formación del sistema particulado obteniendo tamaños de partícula mayores que las obtenidas a partir del método de disolvente. Además, a mayor presencia de tween en la formulación, más rápida se da la cesión, debido a la solubilidad del principio activo en el tensoactivo.
- 6.- Los resultados de la medición de potencial zeta de las nanopartículas muestran poca estabilidad física.
- 7.- Se percibe que independientemente de la cantidad de cotensoactivo la liberación es más rápida en el caso de la microemulsión por disolvente que por el método de fusión.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Junghans, M., Loitsch, S. M., Steiniger, S. C. J., Kreuter, J. & Zimmer, A. Cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for delivery of antisense c-myc oligonucleotides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 287-294 (2005).
2. Dingler, A. & Gohla, S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): Scaling up feasibilities. *Journal of Microencapsulation* 19, 11-16 (2002).
3. Alonso, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58, 168-172 (2004).
4. Calvo, P., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 530-536 (1996).
5. Friedrich, I., Reichl, S. & Muller-Goymann, C. C. Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). *International Journal of Pharmaceutics* 305, 167-175 (2005).
6. Schwartz, R. S. Paul Ehrlich's Magic Bullets. *New England Journal of Medicine* 350, 1079-1080 (2004).
7. Akagi, T. & Akashi, M. Development of polymeric nanoparticles-based vaccine. *Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine.* 64, 279-285 (2006).
8. Akagi, T., Kaneko, T., Kida, T. & Akashi, M. in *Polymer Preprints, Japan* 2177 (2005).
9. Allen, T. M. & Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* 303, 1818-1822 (2004).

-
-
10. Brannon-Peppas, L. et al. Nanoparticles for delivery of pifithrins to combat cell death due to chemotherapy and radiation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 14, 257-264 (2004).
 11. Chen, D. B., Yang, T. Z., Lu, W. L. & Zhang, Q. In vitro and in vivo study of two kinds of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel. *Yaoxue Xuebao* 37, 54-58 (2002).
 12. Chen, W. & Yang, X. Researches on PEG-modified copolymer nanoparticle. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* 20, 143-147 (2003).
 13. Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 16, 1576-1581 (1999).
 14. Choi, S. W., Kim, W. S. & Kim, J. H. Surface modification of functional nanoparticles for controlled drug delivery. *Journal of Dispersion Science and Technology* 24, 475-487 (2003).
 15. Muller, R. H. & Olbrich, C. Solid lipid nanoparticles: Phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation: 2nd Communication. *Pharmazeutische Industrie* 61, 564-569 (1999).
 16. Muller, R. H. & Olbrich, C. Solid lipid nanoparticles: Phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation. 1st communication. *Drugs Made in Germany* 42, 49-53 (1999).
 17. Martinez-Sancho, C., Herrero-Vanrell, R. & Negro, S. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co- glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *Journal of Controlled Release* 99, 41-52 (2004).

-
-
18. Desai, K. G. & Hyun, J. P. Study of gamma-irradiation effects on chitosan microparticles. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* 13, 39-50 (2006).
 19. Basu, M. K. & Lala, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. *Current Molecular Medicine* 4, 681-689 (2004).
 20. Muller, R. H., Weyhers, H., Zur Muhlen, A., Dingler, A. & Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles - A novel carrier system for cosmetics and pharmaceuticals. 1st Communication: Properties, production and scaling up
[Solid Lipid Nanoparticles - Ein neuartiger Wirkstoff-Carrier fur Kosmetika und Pharmazeutika. 1. Mitteilung: Systemeigenschaften, Herstellung und Scaling-up]. *Pharmazeutische Industrie* 59, 423-427 (1997).
 21. Venkateswarlu, V. & Manjunath, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 95, 627-638 (2004).
 22. Bummer, P. M. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery - Solid lipid nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 21, 1-19 (2004).
 23. Lledo, R., Prats, L., Nacher, A., Diez-Sales, O. & Herraiz-Dominguez, M. Importance of the lipidic nanoparticles systems in dermatological preparations
[Importancia de los sistemas lipidicos nanoparticulares (SLN) en preparados dermatologicos]. *Ciencia y Tecnologia Pharmaceutica* 14, 135-141 (2004).
 24. Amidi, M. et al. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release* 111, 107-116 (2006).
 25. Cavalli, R., Caputo, O., Ugazio, E. & Gasco, M. R. The effect of butanol and pentanol isomers on the crystallization of stearic acid polymorphs in solid lipid nanoparticles. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti* 7, 101-111 (1996).

-
-
26. Mehnert, W. & Mader, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 165-196 (2001).
 27. Muller, R. H., Mader, K. & Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 161-177 (2000).
 28. Demirel, M. & Yazan, Y. Solid lipid non-particles (SLN) [Kati lipid nanopartikuller (SLN)]. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* 25, 167-179 (2000).
 29. Hu, F. Q. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 167-173 (2005).
 30. Bondi, M. L., Fontana, G., Carlisi, B. & Giammona, G. Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Containing Cloricromene. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* 10, 245-250 (2003).
 31. Cavalli, R., Gasco, M. R., Barresi, A. A. & Rovero, G. Evaporative drying of aqueous dispersions of solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27, 919-924 (2001).
 32. Lu, Y. Y., Xia, Q., Xia, Y., Ma, Q. H. & Gu, N. Studies on the phase behaviors of drug-loading microemulsions. *Acta Physico - Chimica Sinica* 21, 98-101 (2005).
 33. Mao, S. R., Wang, Y. Z., Ji, H. Y. & Bi, D. Z. Preparation of solid lipid nanoparticles by microemulsion technique. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 38, 624-626 (2003).
 34. Ugazio, E., Cavalli, R. & Gasco, M. R. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics* 241, 341-344 (2002).

-
-
35. Zobel, H. P. et al. Enhanced antisense efficacy of oligonucleotides adsorbed to monomethylaminoethylmethacrylate methylmethacrylate copolymer nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49, 203-210 (2000).
 36. Lai, F., Wissing, S. A., Muller, R. H. & Fadda, A. M. Artemisia arborescens L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech* [electronic resource]. 7 (2006).
 37. Xiang, J. J. et al. IONP-PLL: A novel non-viral vector for efficient gene delivery. *Journal of Gene Medicine* 5, 803-817 (2003).
 38. Castelli, F., Puglia, C., Sarpietro, M. G., Rizza, L. & Bonina, F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics* 304, 231-238 (2005).
 39. Zur Muhlen, A., Zur Muhlen, E., Niehus, H. & Mehnert, W. Atomic force microscopy studies of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 13, 1411-1416 (1996).
 40. Jeon, H. J., Jeong, Y. I., Jang, M. K., Park, Y. H. & Nah, J. W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 207, 99-108 (2000).
 41. Gac, S., Coudane, J., Boustta, M., Domurado, M. & Vert, M. Synthesis, characterisation and in vivo behaviour of a norfloxacin-poly(L-lysine citramide imide) conjugate bearing mannosyl residues. *Journal of Drug Targeting* 7, 393-406 (2000).
 42. Gac-Breton, S., Coudane, J., Boustta, M. & Vert, M. Norfloxacin-poly (L-lysine citramide imide) conjugates and structure-dependence of the drug release. *Journal of Drug Targeting* 12, 297-307 (2004).
 43. Hu, Z. et al. Characterization of norfloxacin release from tablet coated with a new pH-sensitive polymer, P-4135F. *Journal of Drug Targeting* 7, 223-232 (1999).

-
-
44. Kweon, J. K., Jeong, Y. I., Jang, M. K., Chang, H. L. & Nah, J. W. Norfloxacin release from surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide) and biodegradation. *Polymer* 26, 535-542 (2002).
 45. Nah, J. W., Jeong, Y. I. & Cho, C. S. Norfloxacin Release from Polymeric Micelle of Poly(-benzyl L-glutamate)/Poly (ethylene oxide)/Poly(-benzyl L-glutamate) Block Copolymer. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 19, 962-967 (1998).
 46. D'Souza, S. A., Ray, J., Pandey, S. & Udupa, N. Absorption of ciprofloxacin and norfloxacin when administered as niosome-encapsulated inclusion complexes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49, 145-149 (1997).
 47. Lin, H. H., Ko, S. M., Hsu, L. R. & Tsai, Y. H. The preparation of norfloxacin-loaded liposomes and their in-vitro evaluation in pig's eye. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48, 801-805 (1996).
 48. Park, J. H. et al. Norfloxacin-releasing urethral catheter for long-term catheterization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14, 951-962 (2003).
 49. Wiwattanapatapee, R., Padoongsombat, N., Choochom, T., Tang, S. & Chaimongkol, A. Water flea *Moina macrocopa* as a novel biocarrier of norfloxacin in aquaculture. *Journal of Controlled Release* 83, 23-28 (2002).
 50. Wissing SA y Müller RH. (2002) Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J. Control. Release*, 2002; **81**: 225-233
 51. Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra VOLUMEN 13, Nº 1/ FEBRERO 2005.

-
-
52. Información Farmacoterapéutica de la Comarca VOLUMEN2, N° 8/ SEPTIEMBRE 2003.
 53. Boletín de Información Farmacoterapéutica Sacylite N° 4/2004.
 54. <http://www.scopus.com>