



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INFLUENCIA DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE SAL,
SOBRE LA FORMACIÓN DE NANOPARTICULAS
DE CIPERMETRINA Y ÁCIDO ESTEÁRICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
JUAN CARLOS PÉREZ LOZADA.

MÉXICO, D. F.

2007





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: Q.F.B. NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON
VOCAL: M. EN C. LILIANA AGUILAR CONTRERAS
SECRETARIO: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD
1er.SUPLENTE: Q.F.B. JOAQUIN GONZALEZ ROBLEDO
2º SUPLENTE: Q.F.B. MARIA DE GUADALUPE DIAZ NANCLARES

ANEXO DE LABORATORIO 1 E/F “NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN”
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



ASESOR DE TESIS: **DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**



SUPERVISOR TÉCNICO: **Q.F.B. MARÍA DE GUADALUPE DÍAZ NANCLARES**



SUSTENTANTE: **JUAN CARLOS PÉREZ LOZADA**

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por haberme dado la vida y haberme permitido llegar a este momento.

A la **VIDA** por darme la fuerza, la energía y la entereza para conseguir un objetivo más de mi vida.

A la **UNAM** por ser la mejor Universidad de México y por proveerme de todas las herramientas para poder terminar una carrera y por darme la oportunidad de ser uno más de sus hijos.

Al **MACRO PROYECTO** productividad sostenible de los hatos de cría en pastoreo. Sub proyecto. Control de enfermedades parasitarias: Sistemas de liberación controlada de fármacos

A **FINA** por apoyarme tanto y por tener paciencia para que lograra el titularme. Y que aún desde el otro lado del mundo me sigue apoyando y ayudando.

A mi **MADRE** que desde el cielo me ha cuidado y protegido y que gracias a todo el amor que siempre me tuvo, a sus enseñanzas, paciencia, comprensión, consejos, desvelos, esfuerzos, cuidados, sacrificios, confianza y por creer en mí, que con nada acabo de agradecer todo lo que mi MADRE hizo por mi durante toda su vida, y que aún sigue haciendo día a día desde el cielo, y que todo el esfuerzo que Yo realicé para terminar mi tesis ha sido para darle el regalo que tanto quiso.

A mis ABUELOS por todo el apoyo y cariño que me tuvieron.

A mi TIO Genaro por todos los consejos y enseñanzas que me dio.

A mis TIOS Pablo y Blanca por la confianza y el apoyo que durante todos estos años me han brindado.

A mis TIOS Oscar, Toña, Poncho, Tila, Morena, Julia y Chucho que durante tantos años me han ayudado y apoyado en todo momento de mi vida.

A mi gran amiga Sofy que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, por todos sus consejos, buenos deseos, por que siempre ha creído en mí.

A mis **AMIGOS** del Jazmín Club Jazz, Juan, Carlos, Anahí, Norma, Belinda, Claudia, Catana, Ángel, Cintia, Roberto, que durante toda la carrera convivimos, estudiamos, reímos y que afortunadamente aún seguimos frecuentándonos.

A todos los **FINITOS** (Abraham, Lupis, Tony, Monik, Jorge, Lorena, César, Mirna, Leo) que hicieron de mi trabajo en el laboratorio una experiencia más enriquecedora y por el apoyo e impulsos para concluir mi proyecto.

A mí **AMIGA** Claudia Yenitzel por tantos buenos recuerdos en los salones de clase y en los laboratorios.

A mí **NOVIA** Margot que se ha convertido en una parte esencial en mí vida y que gracias a Ella conozco el amor.

A mis **HERMANOS**, Oscar, Marlene, Toño, Pepe, Nayeli, Cony, Genaro, Gilberto, por tantos años felices junto a ustedes.

Y claro a mis **BEBES**, Monze, Karina, Alexia, Mariana, Fer y Valeria. Que sin tantas risas, juegos y buenos ratos que paso en compañía de ellos mi vida no sería tan feliz como lo es ahora.

I RESUMEN.....	4
II. ANTECEDENTES.....	7
1 GARRAPATAS.....	7
1.1 CICLO DE VIDA.....	10
1.2 PATOGENIA.....	12
1.3 DIAGNÓSTICO.....	15
1.4 CONTROL.....	16
1.5 BAÑOS DE INMERSIÓN.....	17
2 HISTORIA DE LOS INSECTICIDAS.....	20
2.1 PIRETRINAS Y PIRETROIDES.....	22
2.2 CIPERMETRINA.....	27
2.2.1 TOXICIDAD AGUDA.....	29
2.2.2 TOXICIDAD CRÓNICA.....	30
2.2.3 CARCINOGENICIDAD.....	30
2.2.4 SUPRESIÓN INMUNOLÓGICA.....	30
2.2.5 TOXICIDAD EN LA REPRODUCCIÓN.....	31
2.2.6 RECOMENDACIONES PARA SU USO.....	31
3 SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA.....	32
3.1 TIPOS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA.....	34
3.2 FACTORES QUE INFLUENCIAN EL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN MODIFICADA.....	35
3.3 MODELOS DE INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO.....	38
3.4 CLASIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS DE LIBERACIÓN.....	41
3.4.1 VELOCIDAD DE LIBERACIÓN PREPROGRAMADA.....	42
3.4.2 ACTIVACIÓN MODULADA DE LA LIBERACIÓN.....	44
3.4.2.1 MECANISMOS FÍSICOS.....	44
3.4.2.2 MECANISMOS QUÍMICOS.....	46
3.4.2.3 MECANISMOS BIOQUÍMICOS.....	46

3.4.3	REGULACIÓN POR RETROALIMENTACIÓN	47
3.4.3.1	BIOEROSIÓN	47
3.4.3.2	BIORRESPUESTA	47
3.5	VENTAJAS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA.....	49
4	SISTEMAS ACARREADORES	50
4.1	SISTEMAS COLOIDALES	51
4.1.1	LIPOSOMAS	52
4.1.2	NIOSOMAS.....	52
4.1.3	MICROPARTÍCULAS	53
4.2	NANOPARTÍCULAS.....	54
4.2.1	DEFINICIÓN	54
4.2.2	MÉTODOS DE PREPARACIÓN	56
4.2.2.1	EMULSIFICACIÓN-EVAPORACIÓN	56
4.2.2.2	DESPLAZAMIENTO DEL DISOLVENTE.	56
4.2.2.3	EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN	56
4.2.2.4	SALTING OUT	57
4.2.3	CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE NANOPARTÍCULAS .	60
4.2.3.1	TAMAÑO DE PARTÍCULA	60
4.2.3.2	POTENCIAL Z (ζ)	62
4.2.3.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	63
4.2.3.4	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) ...	63
4.2.3.5	CAPACIDAD DE ENCAPSULACIÓN	64
4.2.3.6	LIBERACIÓN IN VITRO	65
4.3	ACARREADORES MOLECULARES.....	66
4.3.1	CICLODEXTRINAS	66
4.3.2	DENDRÍMEROS.....	67
4.4	ACARREADORES CELULARES	67
4.4.1	ERITROCITOS RESELLADOS	67
4.5	REVISIÓN DE PIETROIDES Y LIBERARACIÓN MODIFICADA .	68
III	OBJETIVOS	69
IV	METODOLOGÍA Y REACTIVOS.	70

V RESULTADOS	75
5.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	75
5.2 ÍNDICE DE REFRACCIÓN	75
5.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN Y TIPO DE SAL SOBRE EL TAMAÑO DE PARTÍCULA Φ	76
5.4 INFLUENCIA DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE SAL SOBRE EL POTENCIAL Z (ζ)	88
VI CONCLUSIONES	92
VII BIBLIOGRAFÍA.....	94

I RESUMEN

Las garrapatas del ganado vacuno son un grupo de parásitos artrópodos hematófagos causantes de una enfermedad parasitaria externa que afecta a los bovinos en todas sus edades, causándoles una anemia perjudicial afectando principalmente la producción de carne y leche, lo que implica grandes pérdidas económicas, además [1] constituye la puerta de entrada de infecciones microbianas secundarias y focos de infección de la miiasis (infestación del organismo causada por larvas de moscas, habitualmente a través de una herida o úlcera), motivo por el cual se requiere de un tratamiento preventivo para su control. Actualmente los más utilizados son los baños de inmersión con Cipermetrina. [2, 3]

La Cipermetrina es un insecticida de origen sintético que tiene un amplio uso en ganadería y agricultura, en la cría de animales se utiliza como garrapaticida para disminuir los padecimientos en el ganado bovino producido por las garrapatas, sin embargo se han encontrado algunos inconvenientes como son la hipersensibilización del personal que manipula al ganado, el estrés al que se ven sometidos los animales al trasladarlos a los baños, y que si no se controlan las concentraciones del fármaco durante la aplicación del baño éste deja de ser funcional. [2, 4, 5]

Una propuesta para solucionar esta problemática es el uso de los sistemas coloidales como acarreadores de fármacos, los cuales son sistemas constituidos por partículas menores a 10 micras. Entre los más utilizados para la liberación controlada se encuentran: liposomas, niosomas, nanopartículas y micropartículas.

Los sistemas coloidales mencionados previamente son similares en su tamaño, forma y modo de acción, y es ésta la razón por las que pueden usarse alternativamente sin embargo hay que tomar en cuenta las desventajas que presenta cada acarreador al momento de elegir el sistema idóneo a nuestras necesidades; por ejemplo los liposomas y niosomas muestran conocidos problemas de estabilidad y las micropartículas tienen problemas en la administración debido a su tamaño. Las nanopartículas por su parte surgen como una interesante alternativa de solución a la problemática de los sistemas coloidales. Ellas poseen una mejor estabilidad en fluidos biológicos y durante su almacenamiento, además son más favorables para su escalamiento con respecto a los otros acarreadores y gracias a su pequeño tamaño ayudan a minimizar reacciones de irritación en la zona de aplicación ya que no son rechazadas por el sistema inmunológico, también pueden comportarse como sistemas de cesión modificada, por lo cual y aunado a su capacidad de incorporar cantidades terapéuticas de fármaco los hacen vehículos idóneos para mejorar las condiciones de administración de este pesticida.

De acuerdo a lo anterior el objetivo de este trabajo es obtener nanopartículas de Cipermetrina y ácido esteárico por el método de salting out para evaluar el efecto del tipo y la concentración de sal y con lo cual encontrar un sistema de liberación modificado para tratar el problema de las garrapatas en el ganado vacuno en México.

Con base en los estudios de tamaño de partícula y potencial Z se llega a la conclusión de que a bajas concentraciones de sal (0.1M), todos los agentes mantienen un mismo comportamiento, obteniéndose mayor cantidad de sólidos en el intervalo menor a 220 nm.

Para obtener partículas de menor diámetro en mayor cantidad, la mejor opción es el $MgCl_2$. No obstante, si el interés es producir partículas más pequeñas aun con menor rendimiento, la mejor opción es el $NaCl$.

A medida que se incrementa la concentración de sal, la cantidad de sólidos obtenidos menores 220 nm disminuye.

El tamaño de partícula aumenta proporcionalmente con la concentración correspondiente de la sal en estudio.

El potencial Z incrementa su valor absoluto al aumentar la cantidad de sal presente.

Se observa que los valores más altos para potencial Z se obtienen con la solución más concentrada de $MgCl_2$ y $CaCl_2$.

II. ANTECEDENTES.

1 GARRAPATAS.

El problema de garrapatas y las enfermedades transmitidas por éstas, tanto en humanos como en animales, tales como numerosos protozoos, bacterias (incluyendo rickettsias), virus y hongos patógenos son sin duda un tema de gran interés en la práctica diaria de la clínica veterinaria, tanto en México, como en el mundo.

Las garrapatas Boophilus spp son ectoparásitos hematófagos que provocan graves alteraciones en los animales infectados, que inciden principalmente en la disminución de la producción de carne y leche, independientemente de que al transmitir enfermedades como la babesiosis bovina y la anaplasmosis, ocasionan la muerte y generan gran cantidad de animales improductivos, lo que repercute desfavorablemente en la economía de la actividad ganadera. [1]

Las diferentes especies de garrapatas son capaces de infestar tanto mamíferos, como aves, reptiles y anfibios. Cerca del 10% de las 800 especies conocidas de garrapatas están establecidas en México. En nuestro país se han identificado 77 especies de garrapatas pertenecientes a 5 géneros de la familia Argasidae y 7 a la familia Ixodidae. El número de especies de garrapatas existentes en México representa el 45% de América Latina, lo que refleja la gran variedad y clima adecuado para el desarrollo de éstas.

Etiología

Taxonómicamente se puede clasificar a las garrapatas del ganado bovino de la siguiente manera:

Phylum: Arthropoda

Clase: Arachnida

Orden: Acarina

Familia: Ixodidae

Género: Boophilus

Especies: *B. microplus*, *B. decoloratus*, *B. calcaratus*

Únicamente dos familias, Ixodidae y Argasidae, son conocidas como garrapatas. La más importante es la familia Ixodidae, frecuentemente llamadas **garrapatas duras**, debido a la presencia de un rígido escudo o quitina que cubre la superficie dorsal del macho adulto, en la hembra adulta, así como en las larvas y en las ninfas; ese escudo se localiza en una pequeña zona que permite la dilatación del abdomen en el curso de la alimentación.

La otra familia es la Argasidae o **garrapatas blandas**, llamadas así por la ausencia de escudo dorsal; en esta familia se incluyen las garrapatas de las aves. [1]



Figura 1.1 Garrapata adulta.

Las garrapatas del tipo de un solo hospedador (Fig. 1.1) tienen un escudo quitinoso que se extiende por toda la superficie dorsal del macho, pero en la larva cubre una pequeña zona del dorso por detrás de la cabeza y lo mismo sucede en las ninfas y en las hembras. El aparato bucal se localiza en la zona anterior del capitulo y es visible desde la superficie dorsal.

Otra característica morfológica es la distribución de una serie de surcos que se observan en el escudo y en el cuerpo, en algunas especies se observan muescas distribuidas en filas, llamados **festones** y que se localizan en el borde posterior del cuerpo. Frecuentemente en la zona ventral de los machos se observan placas quitinosas. La apertura genital se localiza en la línea coloreada similar al esmalte, que se localiza en diversas zonas del cuerpo, se denominan **garrapatas ornamentadas**. Los adultos tiene un par de espiráculos localizados detrás del cuarto par de patas. Los ojos cuando están presentes, se localizan en el margen exterior del escudo.

Al igual que otras garrapatas, los ixódidos son parásitos temporales y se localizan en el hospedador durante cortos periodos de tiempo. El número de hospedadores que pueden parasitar a lo largo de todo su ciclo puede variar entre uno y tres, y en base a este fenómeno, se clasifican como **garrapatas de un hospedador** que desarrollan todo su ciclo desde las fases larvarias a los adultos en un solo hospedador; las **garrapatas de tres hospedadores**, cada estadio se desarrolla en diferente hospedador. [1, 6]

El género *Boophilus* es vulgarmente conocido como la "garrapata común del ganado vacuno" o "garrapata común con ojos".[7]

B. microplus es conocida como "garrapata tropical del ganado vacuno".

1.1 CICLO DE VIDA

Boophilus ssp. tiene un ciclo directo, (Fig. 1.2), que es cumplido en su mayor parte sobre la piel del vacuno. [7] La hembra es inseminada una vez y posteriormente necesita ingerir sangre una vez más, sin embargo, los machos se alimentan intermitentemente y copulan repetidamente. Durante la copula (Fig. 1.3) los machos se localizan debajo de las hembras, manipulan la abertura genital de la hembra con el aparato bucal y ayudándose con las patas, transfieren los espermatozoides al interior del poro genital para depositarlos en el saco que almacenará estas células. [1, 6]

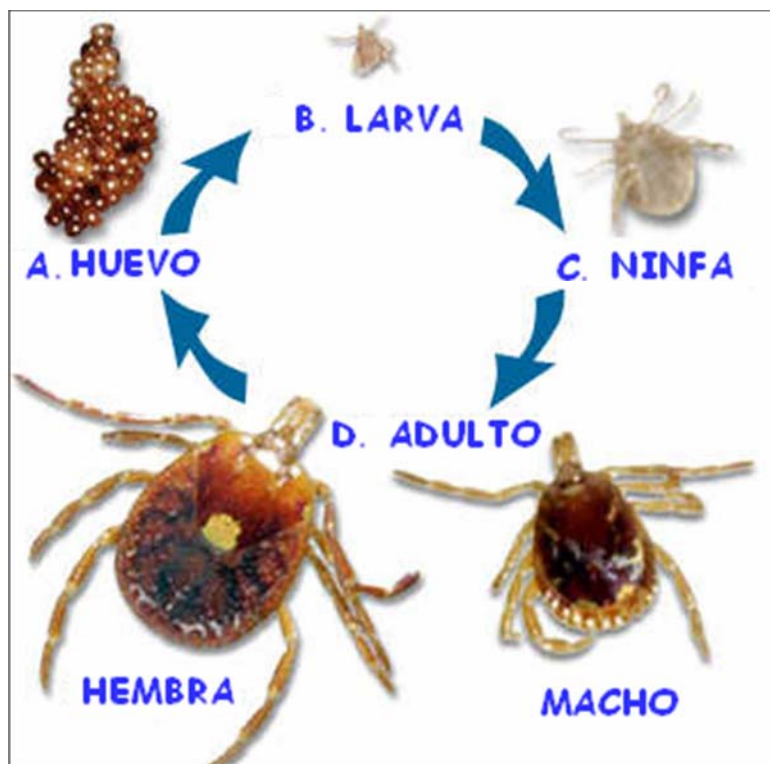


Figura 1.2 Ciclo de vida de *Boophilus ssp.*



Figura 1.3 Garrapatas copulando.

Una vez fecundadas las hembras completan su desarrollo sobre la piel del vacuno, alimentándose durante 14 días, la hembra se desprende y cae al suelo, ocultándose entre el pasto, debajo de los terrones, [4, 7] posteriormente deposita y aglutina de una vez entre 250 y 300 huevos en el medio gracias a la secreción de un barniz protector, de una glándula especial [6, 7] que ella posee. Luego de un periodo de incubación que va desde los 21 a los 27 días en verano y hasta 80 días en invierno, nacen las larvas; estas son muy pequeñas, alcanzando a medir 500 micras.

Son muy ágiles y con la ayuda de sus 3 pares de patas trepan a los pastos en cuyos extremos se ubican para esperar el paso de su hospedador para poder alimentarse de su sangre.[7] Una vez que alcanzó la piel del hospedador se alimentan y luego mudan en el medio a ninfas en aproximadamente 9 días. Estas últimas poseen 4 pares de patas, son también hematófagas, y deben alimentarse de sangre para poder transformarse en machos a los 4,5 días y en hembras a los 5,5 días (el ciclo biológico de esta garrapata posee un solo estadio ninfal). [5]

En el estadio adulto hay dimorfismo sexual, la hembra es mucho más grande que el macho. Una vez alcanzada la madurez sexual copulan y la hembra debe alimentarse hasta que se llena de sangre, luego cae al suelo y busca un lugar protegido para poner los huevos. Una vez que los depositó la hembra muere.

La duración del ciclo varía dependiendo de las condiciones climáticas, ya que dependiendo de éstas, las larvas pueden o no estar más o menos tiempo esperando al hospedador. En cambio la parte del ciclo que se cumple sobre el animal (ciclo de vida parasitaria) no varía ya que las condiciones ambientales las crean la humedad y calor del cuerpo del bovino y es de 23-24 días. Desde que la larva alcanzó al hospedador hasta que se transformó en hembra ovígera (repleta de sangre y huevos) el ciclo se cumple todo sobre el mismo animal.[6]

1.2 PATOGENIA.

Los efectos patógenos (Fig. 1.4) están asociados con los mecanismos de alimentación del parásito que implican perforar la piel e introducir microorganismos.



Figura 1.4 Garrapata penetrando la piel.

En el proceso de alimentación los quelíceros (son órganos sensoriales) se comportan como tijeras que cortan la piel y empujan al hipostoma (que es parte del aparato bucal) hacia el interior del orificio, (Fig. 1.5) los dientes curvos del hipostoma se sujetan al tejido, de forma que éste queda bloqueado. Las glándulas salivales producen una sustancia similar a la hialuronidasa que ayuda a la penetración, un material adherente que se denomina cemento y un anticoagulante. El surco dorsal del hipostoma genera un canal que permite el flujo de saliva hacia el interior del hospedador, así como el flujo de la linfa y la sangre hacia la garrapata.[1, 4, 6]



Figura 1.5 Garrapata succionando la sangre.

Y debido a esto cada vez que se alimentan producen una úlcera en el punto de incisión porque atraviesan la piel del hospedador, además de una placa eritematosa alrededor de dicho punto. La piel reacciona contra la irritación, formándose una inflamación serosa, descamación y baja local de las defensas, por pérdida de sustancia. En caso de existir una contaminación por colonización de bacterias u hongos, la inflamación serosa se torna purulenta o sero sanguinolenta debido a la reacción cutánea y las vesículas se transforman en pústulas. [5, 7]

Si se arranca el cuerpo de la garrapata se puede producir una intensa reacción frente al aparato bucal que queda introducido en el tejido. (Fig. 1.6) Durante la alimentación el peso del cuerpo de la garrapata se incrementa 200 veces.[1]



Figura 1.6 Retirando la garrapata.

Son los hábitos alimenticios de las garrapatas los que llevan a la anemia característica; que repercute en el animal produciéndole una menor producción de carne y leche debido a la incapacidad de la sangre de nutrir y oxigenar a los tejidos corporales en general. Además se agravan los signos de la anemia cuando hay una menor irrigación sanguínea de órganos vitales.[5]

La acción de la garrapata sobre la piel se manifiesta por un proceso inflamatorio de distinta intensidad produciendo aumento de temperatura y del espesor de la piel en relación a la intensidad del parasitismo.

Como consecuencia de la acción traumática y después del desprendimiento de las garrapatas (por si mismas u otras causas), se producen extensas zonas alopécicas, con esclerosis de la piel y abundante descamación.

Los daños que ocasiona la garrapata son múltiples; debilita a los animales por la extracción de sangre; como consecuencia se produce atraso en el

desarrollo, pérdida de peso, disminución en la producción de leche y predispone a la adquisición de otras enfermedades.

Otro hecho importante es que dificulta una ágil comercialización tanto de la piel, así como de la carne, con las zonas indemnes, es decir, aquellas en las que no se registra el ectoparásito.[7]

1.3 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de una infestación de garrapatas en el ganado es relativamente sencillo si la cantidad de parásitos es elevada (Fig. 1.7). Ahora bien, si se desea un diagnóstico cualitativo es necesario recolectar garrapatas y realizar su identificación morfológica.



Figura 1.7 Infestación con garrapatas en la oreja.

La determinación del número de garrapatas sobre un animal requiere de un cuidadoso examen de todas las partes del animal. Las hembras de las garrapatas generalmente son más grandes y por lo tanto son más fáciles de identificar. Algunas especies, como la garrapata espinosa de las orejas (*Otobius megnini*) o la tropical de los caballos (*Anocetor nitens*) se encuentran

en las orejas del huésped. Otras especies prefieren partes de la piel entre la parte interna de las patas, en la base de la cola o en la espalda. Frecuentemente se observan en estas zonas nódulos inflamados que corresponden a zonas de reacción a la picadura de la garrapata. (Fig. 1.8) [4, 6]

1.4 CONTROL

Las garrapatas se controlan de varias maneras, por medio de depredadores (hormigas, roedores, aves y otros), modificando el medio (revestir áreas con cemento, asoleaderos, etc.), el clima es una gran ayuda en el control de garrapatas, o bien el uso de medios físicos o químicos tales como los baños de inmersión. Debido a las diferencias de hábitos entre las diversas especies de garrapatas, en un programa de control deben de precisarse "la" o "las" especies que se desean controlar, ya que un plan que es efectivo contra una especie de un solo huésped, puede no funcionar con otra de 3 huéspedes.

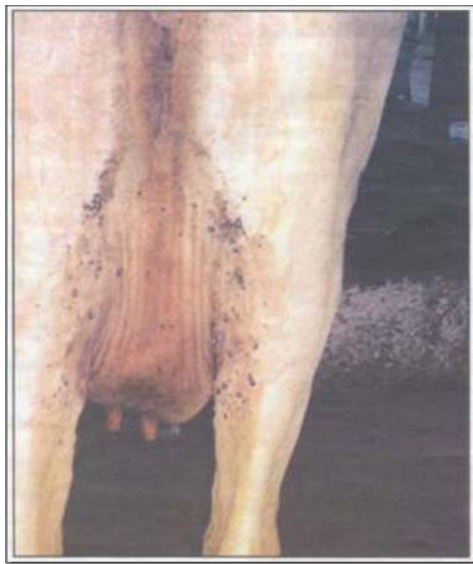


Figura 1.8 Garrapatas en la vaca.

Es decir, es indispensable la identificación, al menos, del género de la garrapata que se quiere controlar.[2, 3]

1.5 BAÑOS DE INMERSIÓN.

Al momento de realizar baños con productos ixodicidas es importante tomar en cuenta algunos puntos. (Fig. 1.9)

El tanque debe ser de un tamaño adecuado para permitir que el animal quede completamente mojado. Debe estar en un área ventilada para que al momento de usar los pesticidas no se generan vapores dañinos para el personal.[3, 7, 8]

El baño debe estar localizado en un área de fácil acceso para poder actuar de manera sencilla en caso de cualquier percance.

Otro punto importante es la persistencia, ésta se define como el tiempo que permanece un producto activo en la piel del animal tratado y mantiene concentraciones mínimas. En general por grupos de productos, los órganofosforados, en polvo o solución tienen una persistencia de 1 día, los piretroides en baño de 4 a 5 días. No hay que olvidar mantener las mejores condiciones de estabilidad del principio activo para que sigan ejerciendo su acción insecticida a lo largo del tratamiento.[3, 9, 10]

"La periodicidad de los baños", es decir el intervalo en días entre uno y otro está en función de la especie de ixódido que se combate y está determinado por los días en que se alimentan los diferentes estadios evolutivos. Lo ideal es buscar que todos los estadios sean atacados por el ixodicida y que el periodo entre los baños no sea más largo que el periodo de alimentación del estado que permanece menos tiempo sobre el huésped.

Cuando se tienen garrapatas de un huésped generalmente es suficiente con tratar a éste, como se hace con *Boophilus ssp* en bovinos, cada 18 a 21 días, el tratamiento debe de ser tan seguido como el tiempo mínimo que tarda en

cerrarse el ciclo, es decir se debe de bañar antes de que la hembra adulta esté en condiciones de poner huevos, lo importante es romper el ciclo.[6, 9]



Figura 1.9 Baño de inmersión.

Al tener animales infestados por garrapatas de 3 huéspedes, hay que considerar que los estadios inmaduros (larvas y ninfas) pueden no estar en el huésped definitivo, por lo que en caso de que queramos controlar el problema solo en el animal y con productos de corta persistencia (órgano fosforados, piretroides, carbamatos, amidininas) el baño debe ser tan seguido como el tiempo que tarda una hembra adulta en alimentarse, repletarse y estar en

capacidad de ovoponer. Al usar productos tradicionales, debemos bañar tan seguido al animal como 5 o 6 días, un día menos que el tiempo mínimo necesario para completar su alimentación. En caso de que este tiempo se alargue lo que ocurre es que la hembra alcanza a bajar del huésped definitivo y ovopone, provocando que el ciclo continúe y el control fracasa.[2, 4, 5]

Probablemente los baños de inmersión son la forma más usada de control, sin embargo esto le supone tal estrés al animal que ubica en pérdidas económicas importantes. Además de que es difícil controlar las dosis de insecticidas en los mismos.

2 HISTORIA DE LOS INSECTICIDAS.

El empleo de productos químicos inorgánicos para destruir insectos se remonta posiblemente a los tiempos de la Grecia y la Roma clásica. Unos 1,000 años antes de Cristo, Homero, menciona la utilidad del azufre quemado como preventivo de diferentes enfermedades y como fumigante para combatir los insectos.

79 años después de Cristo, Plinio el Viejo recomendaba usar el arsénico como insecticida y alude al empleo de sosa y aceite de oliva para tratar las semillas de leguminosas.

Luego en el siglo XVII apareció el primer insecticida natural; la nicotina, obtenida de los extractos de hoja de tabaco.

En 1705, Hamberg propuso el cloruro de mercurio como preservativo para la madera y, 100 años después, Prévost describió la inhibición de las esporas de anublo por el sulfato de cobre. Hasta el siglo XVIII, se culpaba a fuerzas demoníacas de los estragos causados en la agricultura por plagas de insectos y enfermedades y no fue sino hasta mediados del siglo XIX, que comenzaron a aplicarse sistemáticamente los métodos científicos en el control de las plagas agrícolas.

Hacia 1850 se introdujeron dos importantes insecticidas naturales: la rotenona y el *peritró* ambos aún ampliamente utilizados. En 1867, los trabajos realizados con arsenicales se plasmaron en la introducción del verde París, forma impura del arsénico de cobre, que se utilizó en los Estados Unidos para combatir el escarabajo de la patata y en 1892 se usó el arseniato de plomo para el control de la mariposilla gitana. Hacia el 1900 el uso del verde París estaba tan extendido que provocó la introducción de la primera legislación estatal para regular el uso de los insecticidas en los Estados Unidos.

En 1912 W. C. Piver descubrió el arseniato de calcio, como sustituto del verde París y el arseniato de plomo utilizado para combatir el picudo del algodón en los Estados Unidos. En 1913, se utilizaron por primera vez como fungicidas los compuestos órgano-mercuriales para el recubrimiento de las semillas contra las royas de cereales. La década de los 30 marca el verdadero comienzo de la era moderna, con la introducción de los pesticidas orgánicos sintéticos; entre los ejemplos más importantes están el tiocianato de alquilo, la salicilanilida y el dinitro-ortocresol como desherbante de los cereales.

En 1939 el Dr. Paul Muller, en Suiza, descubrió las propiedades insecticidas del diclorodifeniltricloroetano (DDT).

En 1945 se introdujeron varios hidrocarburos clorados derivados del ciclodieno, con propiedades insecticidas como el aldrín, dieldrín, heptacloro y endrín. Los compuestos organofosforados representan otra clase de insecticidas orgánicos. El punto de partida para su desarrollo inicial lo constituyeron las investigaciones sobre gases neurotóxicos llevados a cabo por el Dr. Gerhard Schrader y sus colaboradores en Alemania con el fin de usar dichos productos en el área agrícola. Entre las primeras muestras están los compuestos como el schradán y el paratión de muy alta toxicidad para los mamíferos.

En 1950, el malatión fue el primero de los insecticidas de amplio espectro de acción y a la vez de una toxicidad muy baja para los mamíferos. En 1947, en Suiza, se descubrieron varios insecticidas derivados de los ésteres carbámicos, siendo el más efectivo el carbaryl o sevín. En los años comprendidos entre 1950-1960 empezaron a usarse los herbicidas derivados de la urea y aparecieron los fungicidas captan y gliodín. Además aparecieron

otros productos nuevos, entre ellos los herbicidas triazínicos y los derivados del amonio cuaternario.

En 1958 se introdujeron dos herbicidas de tipo biperidilo: el diquat y paraquat. Entre 1960-1965 fueron descritos el diclobenil, trifluralín y bromoxilino, mientras que en 1968 se introdujo el benomilo como fungicida sistémico. Poco tiempo después apareció el glifosato. Durante los dos decenios siguientes a 1970 aparecieron muchos plaguicidas nuevos, basados en un conocimiento más completo de los mecanismos biológicos que a menudo son más eficaces a dosis bajas que los plaguicidas más antiguos. Los ejemplos más representativos de esta generación son las sulfonilureas herbicidas y los nuevos fungicidas sistémicos, tales como metalaxilo y el triadimefón. Un nuevo e importante grupo de insecticidas comprende los piretroides sintéticos fotoestables obtenidos a partir de piretrinas naturales.[11]

2.1 PIRETRINAS Y PIRETROIDES

Las piretrinas son sustancias que se usan como insecticidas y son derivados del extracto de las flores de crisantemo.[12] (Fig. 2.1) Las piretrinas son muy útiles como insecticidas naturales.[13]

El piretro natural rara vez ha sido usado para propósitos agrícolas debido a su alto costo y a su inestabilidad en la luz solar, pero en las dos últimas décadas muchos materiales sintéticos similares al piretro han estado disponibles. Originalmente se los denominó *piretroides sintéticos*. Actualmente se usa una mejor nomenclatura que es simplemente *piretroides*. Éstos son muy estables bajo la luz y generalmente son efectivos contra la mayoría de los insectos plagas cuando se usan a dosis muy bajas de 0.01 a 0.1 kilo por hectárea. [13]



Figura 2.1 Flores de Crisantemo.

Los piretroides tienen una evolución interesante, que se divide por conveniencia en cuatro generaciones. La **primera** generación contiene solo un piretroide, la aletrina (Pynamin®), que apareció en 1949. Su síntesis era muy compleja, e implicaba 22 reacciones químicas para llegar hasta el producto final.

La **segunda** generación incluye tetrametrina (Neo-Pynamin®) (1965), seguida por resmetrina (Synthrin®) en 1967 (20X más efectiva que el piretro), luego la bioresmetrina (50X tan efectiva como el piretro) (1967), después Bioallethrin® (1969), y finalmente fonotrina (Sumithrin®) (1973).

La **tercera** generación incluye el fenvalerato (Pydrin® [descontinuado], Tribute®, & Bellmark®), y permetrina (Ambush®, Astro®, Dragnet®, Flee®, Pounce®, Prelude®, Talcord® & Torpedo®) (Figura 2.2) los cuales aparecieron en 1972-73. Éstos realmente se convirtieron en los primeros piretroides agrícolas debido a su excepcional actividad insecticida (0.1 Kg/ha) y a su fotoestabilidad. Virtualmente no son afectados por la luz solar, y duran 4-7 días como residuos efectivos sobre el follaje de los cultivos.[14]

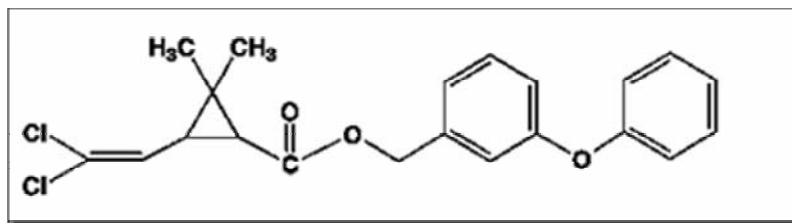


Figura 2.2 Permetrina.

La **cuarta** y actual generación, realmente es excitante debido a su efectividad en el rango de 0.01 a 0.05 Kg/ha. Aquí están incluidos bifentrin (Capture®, Talstar®), *lambda*-cihalotrina (Demand®, Karate®, Scimitar® & Warrior®), cipermetrina (Ammo®, Barricade®, Cymbush®, Cynoff® & Ripcord®), ciflutrina (Baythroid®, Countdown®, Cylense®, Laser® & Tempo®), deltametrina (Decis®) esfenvalerato (Asana®, Hallmark®), Todos ellos son fotoestables, es decir, que no sufren fotólisis (descomposición) al ser expuestos a la luz solar. Y como tienen una volatilidad mínima, dan una efectividad residual prolongada, hasta de 10 días en condiciones óptimas.

La química de los piretroides y su modo de acción son clasificadas como de Tipo 1 o Tipo 2, dependiendo del alcohol substitutivo.

El grupo del **Tipo 1** está definido de una manera bastante amplia e incluye los piretroides que contienen desciano-3-fenoxibencil u otros alcoholes. Muchos de los antiguos compuestos de Tipo 1 del grupo del que no es fenoxibencil (*por ejemplo*, piretrinas, aletrina, tetrametrina) son inestables en condiciones ambientales y ésta característica impide su uso en cultivos de campo. La introducción del fenoxibencil (*por ejemplo*, permetrina) o ciertos alcoholes halogenados (*por ejemplo*, teflutrina) mejoraron la estabilidad química y permitieron el uso de los piretroides en el campo.

Los piretroides del **Tipo 2** están definidos de una manera más estrecha en términos de su estructura química. Específicamente, ellos contienen un

alcohol a-ciano-3-fenoxibencil, el cual aumenta la actividad insecticida aproximadamente por un factor de 10. Aún más, en algunos importantes piretroides del Tipo 2 se ha alterado la porción ácido de la molécula para incluir un anillo fenílico (*por ejemplo*, fenvalerato y fluvalinato). El estereoisomerismo de los piretroides es importante para su acción tóxica.[15-17]

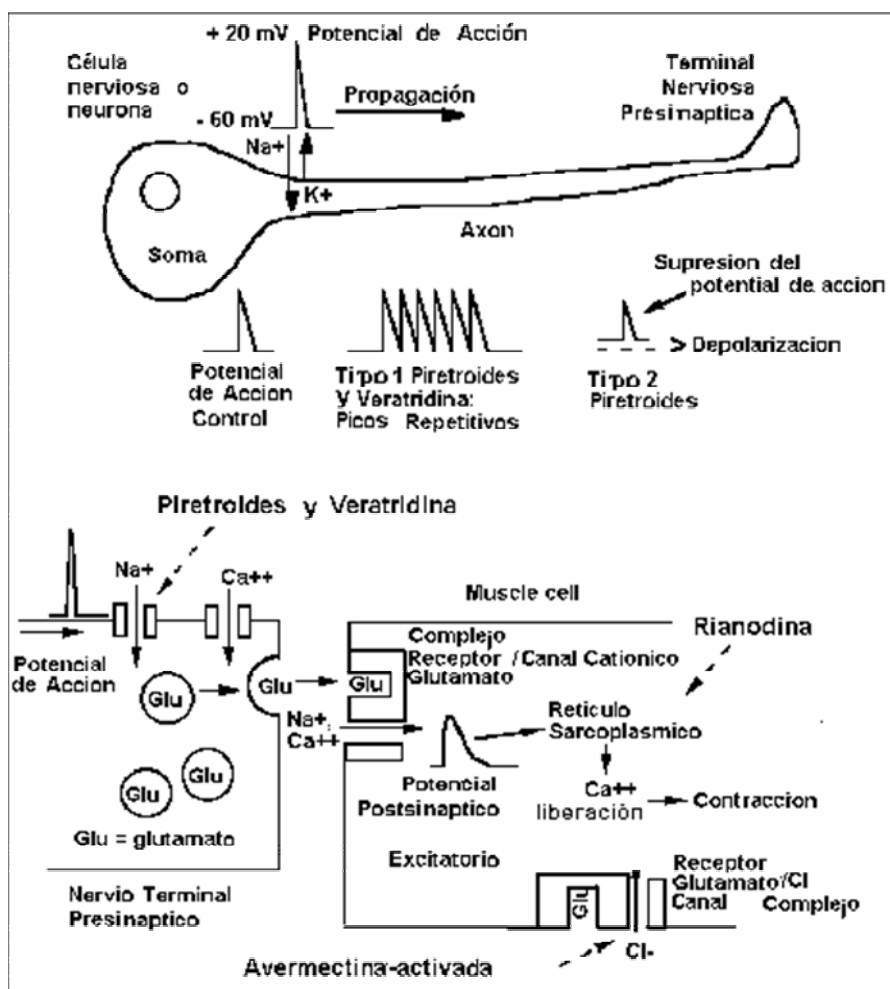


Figura 2.3 Potencial de acción

Los signos de intoxicación con piretroides se desarrollan rápidamente y existen varios síndromes de envenenamiento para los dos tipos de compuestos. Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo 1 incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones en insectos, y temblores de todo el cuerpo en

mamíferos. En insectos, los piretroides del Tipo 2 causan principalmente ataxia y descoordinación, mientras que en mamíferos producen coreoatetosis (retorsiones sinuosas) y salivación. En insectos, los efectos de los piretroides (especialmente los del Tipo 1) pueden desarrollarse en 1-2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en la caída, es decir, la pérdida de la postura normal y de la locomoción. La exposición de humanos a cualquiera de los dos tipos de piretroides puede causar parestesia, una sensación de quemazón o picazón de la piel, pero este efecto es más intenso con los compuestos del Tipo 2.

La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico. (Fig. 2.3) En condiciones normales, las neuronas poseen un voltaje que traspasa las membranas, de unos -60 mV, en el lado interno. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización transitoria (onda positiva) cuya onda de ascenso es impulsada por un flujo de iones Na^+ , seguidos por un descenso del flujo hacia afuera de iones K^+ . [18]

Estos flujos de iones ocurren debido a la apertura y cierre de canales iónicos de proteínas que están empotrados dentro de la membrana nerviosa. El potencial de acción se propaga a lo largo del axón hasta que llega a las terminales nerviosas, donde estimula la liberación de los transmisores químicos. Los compuestos del Tipo 1 inducen picos múltiples de las descargas en los nervios sensoriales periféricos y de los nervios motores, lo mismo que las interneuronas dentro del sistema nervioso central (SNC). En contraste, los piretroides del Tipo 2 despolarizan el potencial de las membranas de los axones, lo cual reduce la amplitud del potencial de acción y eventualmente lleva a la pérdida de excitabilidad eléctrica. Todos estos efectos ocurren porque los

piretroides prolongan la corriente que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales. Las acciones algo diferentes observadas para los compuestos de Tipo 1 y Tipo 2 se deben a las diferencias en el grado del efecto fisiológico: la duración de las corrientes de sodio modificadas para los compuestos del Tipo 1 dura décimas o centésimas de milisegundos, mientras que las del Tipo 2 duran algunos minutos o aún más. Estos efectos sobre la corriente de sodio también causan un profundo incremento en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas. La sinapsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides, como también para otros insecticidas.

Los efectos indeseados de los pesticidas se han reconocido como un serio problema para salud pública en décadas pasadas. Piretroides sintéticos como la Cipermetrina, Permetrina y Deltametrina han incrementado su uso para control de plagas en interiores, debido a su alta actividad insecticida y baja toxicidad en mamíferos.[19]

2.2 CIPERMETRINA

Cipermetrina [(RS)- α -ciano-3-fenoxybencil-(1 RS)- cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (Fig. 2.4) (CM) es uno de los insecticidas del tipo de los piretroides sintéticos más potentes que se usa actualmente en agricultura así como en ganadería.[19, 20]

Características físicas: [21]

- **Aspecto:** De forma pura son cristales incoloros de Cipermetrina. Cuando hay isómeros presentes, la Cipermetrina es un líquido o semisólido viscoso de color amarillo.
- **Número del CAS:** 52315-07-8

- **Peso molecular:** 416.30.
- **Solubilidad en agua:** 0.01 mg/L a 20 °C; insoluble en el agua.
- **Solubilidad en otros solventes:** metanol, acetona, xileno.
- **Punto de fusión:** 60-80 °C (isómeros puros).
- **Presión del vapor:** nPa 5.1×10^{-7} a 70 °C.
- **Coefficiente de la partición:** 6.6020
- **Coefficiente de la adsorción:** 100.000

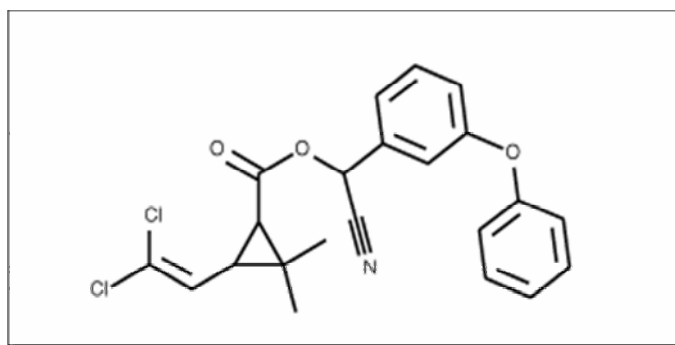


Figura 2.4 Cipermetrina.

La Cipermetrina es muy utilizada por su alta potencia insecticida y sus pocos efectos secundarios en mamíferos y aves, debido a estas ventajas se ha observado un incremento en el uso de la Cipermetrina en muchas partes del mundo. La baja toxicidad en mamíferos se debe a la baja solubilidad de esta en el agua. [19]

La vida media de la Cipermetrina se ha encontrado que es de 14-21 días en agua y 35-45 en el suelo.

La Cipermetrina es un insecticida de origen sintético que tiene un amplio uso en ganadería y agricultura (tiene amplitud de usos en el algodón, los cereales, los vegetales y las frutas, para el almacenamiento de la comida), en salud pública y en la cría de los animales se utiliza como garrapaticida para

disminuir los padecimientos en el ganado bovino producido por las garrapatas.
[22]

En 1988, los piretroides constituían el 40% de las ventas de insecticidas para tratar el algodón a nivel mundial (CIPERMETRINA 8%)[13], y la cipermetrina es uno de los insecticidas más importantes para los cereales y los vegetales en el Reino Unido. Hubo un incremento dramático del uso de cipermetrina en las tierras de cultivo del Reino Unido: de aproximadamente 216,000 has. en 1988 a 1, 582,000 has. rociadas en 1992; cayendo a 863,000 has. en 1994[23]. También se usa para impregnar las redes de mosquito para prevenir la malaria, y de manera extensiva para plagas domésticas.[24]

2.2.1 TOXICIDAD AGUDA

La Cipermetrina está clasificada por la Organización Mundial de la Salud (WHO), como "moderadamente dañina" (clase II)[25]. Ésta interactúa con los canales de sodio en las células nerviosas mediante los cuales el sodio entra a la célula para transmitir una señal nerviosa. Estos canales pueden permanecer abiertos por segundos a diferencia del periodo normal de pocas milésimas de segundo, después de la transmisión de la señal. La Cipermetrina también interfiere con otros receptores en el sistema nervioso. El efecto resultante es una larga secuencia de impulsos repetitivos en los órganos sensitivos.

Los síntomas del envenenamiento incluyen sensaciones faciales anormales, mareo, dolor de cabeza, náusea, anorexia, fatiga, vómito y secreción estomacal incrementada. La Cipermetrina es también un irritante para la piel y los ojos. Por lo regular, los síntomas deberán aparecer después de algunos días pero los pacientes severamente expuestos pueden sufrir además estirones

musculares y ataques convulsivos. En tales casos, los síntomas pueden persistir por varias semanas.

2.2.2 TOXICIDAD CRÓNICA.

Se han reportado síntomas crónicos después de estar en contacto con los piretroides.[26] Los síntomas que se incluyen son trastornos cerebrales y locomotores, polineuropatía y supresiones inmunológicas, y que además se asemejan al síndrome de sensibilidad química múltiple.

2.2.3 CARCINOGENICIDAD

Las opiniones difieren en cuanto al hecho de si la Cipermetrina es un carcinógeno o no. La Cipermetrina está clasificada por la (Agencia de Protección Ambiental) EPA de Estados Unidos como una débil categoría C, oncogén un posible carcinógeno humano con evidencia limitada de carcinogenicidad en los animales pero sin ninguna evidencia en el caso de los humanos: produjo tumores benignos de pulmón en ratones hembras con dosis muy altas y tiene carcinogenicidad probable en el hígado de los roedores. Sin embargo, el punto de vista de la Organización Mundial de la Salud es que no hay ninguna evidencia de carcinogenicidad en ratones machos ya que los resultados de los estudios mutágenos han sido principalmente negativos, "se concluye que no existe suficiente evidencia de las posibilidades carcinogénicas de la Cipermetrina".[27]

2.2.4 SUPRESIÓN INMUNOLÓGICA

Las pruebas hechas con ratones han sugerido que los piretroides en general pueden tener un efecto de supresión inmunológica. La Organización

Mundial de la Salud concluye que "se debería poner más atención a ese aspecto, pero a la fecha, no se puede formular ninguna opinión acerca de su relevancia en la extrapolación de esta información para el ser humano"[27].

2.2.5 TOXICIDAD EN LA REPRODUCCIÓN

Si la Cipermetrina se les da a ratas embarazadas y recién nacidas puede causar un retraso funcional en la maduración del cerebro de las crías. El nivel de toxicidad en los críos es más alto mientras más pequeños sean éstos, esto también se debe a que las vías para degradar la Cipermetrina aún no están bien desarrolladas en las ratas más pequeñas.

2.2.6 RECOMENDACIONES PARA SU USO

Las medidas de precaución para el manejo incluyen: evitar el contacto con los ojos y la piel; usar guantes, gafas, máscara respiratoria, overoles y zapatos protectores hechos de PVC; y mantener a niños y mascotas alejados de las áreas que están siendo tratadas.

En caso de accidente, se aplican las siguientes reglas:

- Contacto con la piel: remover la ropa que ha sido contaminada, lavar las áreas expuestas con abundante jabón y agua;
- Contacto con los ojos: enjuagar con agua limpia durante 15 minutos, buscar auxilio médico;
- Inhalación: mantener al sujeto en observación;
- Ingestión: cuando el paciente está consciente, provocar el vómito (por medio de estimulación de la faringe). Buscar auxilio médico.

Después de haberse realizado varias investigaciones acerca de los envenenamientos en China, F. He hace las siguientes recomendaciones para el uso de los piretroides [25] :

"Los trabajadores con enfermedades de la piel, enfermedades nerviosas centrales o periféricas, no deben ser expuestos a los piretroides".

"La aparición de sensaciones faciales anormales durante el contacto con los piretroides indica la necesidad de reducir el contacto (prácticas de trabajo medidas, protección personal mejorada, amplia ventilación, etc.)".

"El contacto con piretroides deberá ser interrumpido si los sujetos que están en contacto, además de tener sensaciones faciales anormales desarrollan síntomas sistemáticos tales como dolores de cabeza, mareos, náusea y fatiga. No se les debe permitir a estos sujetos su retorno al trabajo que implique contacto con los piretroides hasta que todos los síntomas arriba mencionados hayan desaparecido." [28]

3 SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

En los últimos años se han desarrollado nuevas formas de liberación modificada (conocida también como liberación controlada) las cuales surgen como una alternativa a las formas de dosificación convencionales. Estas nuevas formas poseen ventajas en las pautas posológicas, son más cómodas, coincidiendo con las principales comidas, y requieren menor número de tomas por día. También presentan rapidez de acción o la liberación en un determinado tramo del tracto gastrointestinal, así como la posibilidad de conseguir que los niveles plasmáticos eficaces se mantengan durante más tiempo. Asimismo mediante estos sistemas es posible transportar y liberar proteínas, así como dirigir los fármacos a lugares específicos reduciendo su toxicidad. [29-31] En

la Fig. 3.1 se observan algunos perfiles de disolución de los diferentes sistemas de liberación.

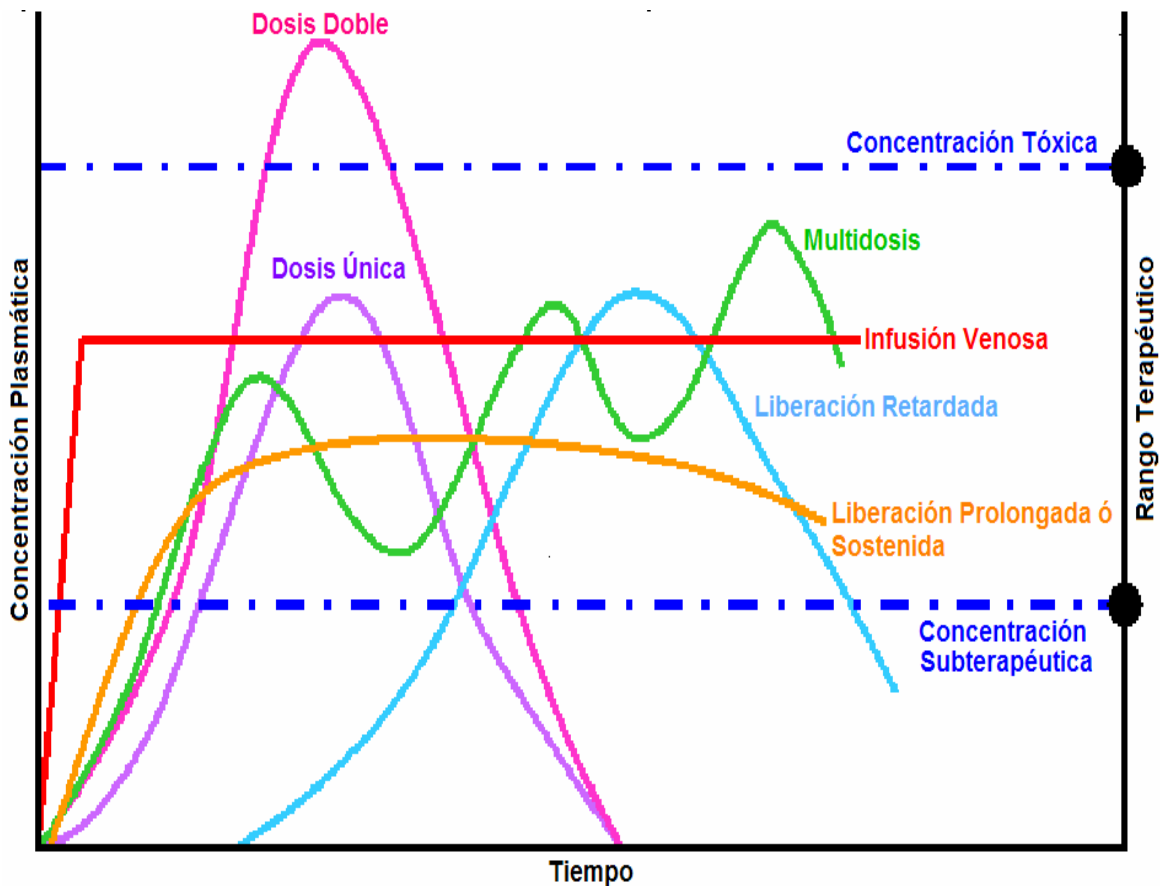


Figura 3.1 Perfil de disolución.

El término liberación modificada define a las especialidades farmacéuticas que se han diseñado de tal forma que **se ha modificado el lugar o la velocidad** a la que **es liberado el principio activo**. Habitualmente, se utiliza la expresión "formas retard" para englobar diferentes sistemas de liberación, aunque estrictamente estas formas solamente corresponden a las de liberación retardada.[29]

Los nuevos sistemas de liberación modificada abarcan los conceptos de liberación prolongada o sostenida, controlada o retardada y repetida o

multidosis.[32] Cabe mencionar que cada autor llama de un modo a cada tipo de sistema de liberación sin embargo el principio es el mismo.

3.1 TIPOS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

3.1.1 SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTINUA O SOSTENIDA

El principio activo se libera a una velocidad constante con el objetivo de mantener niveles constantes de fármaco en sangre o en el órgano (tejido) deseado, conseguir una velocidad de absorción también constante y disminuir las fluctuaciones de los niveles plasmáticos. Son las ideales desde el punto de vista terapéutico consiguiéndose niveles plasmáticos semejantes a una perfusión intravenosa.[29, 33] En este tipo de liberación se encuentra la siguiente formulación.

Bombas osmóticas (sistema GITS). El medicamento y el sistema osmótico se integran en una membrana semipermeable. Cuando el agua penetra en la estructura, el medicamento disuelto se libera de forma constante a través de un pequeño orificio practicado con láser.[33]

3.1.2 SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA O RETARDADA

El principio activo se libera inicialmente proporcionando una cantidad de fármaco suficiente para producir su efecto, y después se libera de forma lenta a una velocidad no necesariamente constante, manteniendo la concentración eficaz durante más tiempo que con las formas de liberación inmediata.[29, 33]

Matrices inertes lipídicas o hidrófilas: dispersiones moleculares o particulares del fármaco en un sistema generalmente polimérico que resiste la disgregación y regula la liberación.

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 o introducirse en una cápsula.

3.1.3 SISTEMAS DE LIBERACIÓN MULTIDOSIS O DIFERIDA

Son aquellas que liberan el principio activo en fracciones semejantes y a determinados tiempos.[34]

3.1.4 SISTEMAS DE LIBERACIÓN RÁPIDA

Esta liberación se caracteriza por alcanzar concentraciones terapéuticas rápidamente (como en una infusión) pero el perfil cae también rápidamente.[34]

3.2 FACTORES QUE INFLUENCIAN EL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN MODIFICADA

El desarrollo de un sistema de liberación modificada de fármacos requiere del conocimiento de parámetros que influyen en la liberación y absorción del fármaco. Es importante conocer las propiedades químicas y fisicoquímicas del fármaco, sus características farmacocinéticas, así como la interacción de éste con el sistema de liberación y los fluidos biológicos.[34, 35]

Durante el desarrollo de un sistema de liberación es necesario considerar la biocompatibilidad de todos los agentes, los cuales deben ser químicamente inertes, no carcinogénicos, hipoalergénicos y estables en el sitio de administración y no desencadenar respuesta inmunológica.[34]

En la industria veterinaria la incorporación de fármacos en matrices poliméricas se hace con la idea de controlar la liberación en periodos de tiempo determinados y reproducibles. Entre los beneficios se encuentra reducción en el dolor y en el estrés del animal por la disminución en las ocasiones en que el animal es manipulado, beneficios económicos al dejar a los trabajadores hacer otras labores, entre otras. La elección de la ruta de administración considera aspectos como la especie, la dosis y el costo. Las vías de administración más utilizadas en este campo son: bucal, nasal, rectal, oral, intravaginal, intramuscular y transdérmica; y con ellas se abarca desde unas horas hasta días o años de liberación de fármaco.[35]

Algunos de los parámetros involucrados en el desarrollo de un sistema de liberación controlada de fármacos son los siguientes:

3.2.1 FISICOQUÍMICOS

- *pKa*: Afecta la permeabilidad en función del pH y el estado iónico del fármaco. La solubilidad se incrementa con la ionización pero la absorción disminuye. En el caso de formas parenterales los cambios del estado de ionización pueden provocar precipitación del fármaco que conduciría a una irritación local, el tamaño de partícula del precipitado puede afectar el perfil de liberación.[35, 36]
- *Coeficiente de partición*: éste y el tamaño de partícula del fármaco influencia no solo el paso a través de las barreras biológicas para ser absorbido, sino que la liberación del fármaco desde una matriz está relacionada directamente con la diferencia de solubilidad en ésta y el medio al que se libera.[35, 36]

-
-
- *Solubilidad:* La solubilidad del fármaco en el polímero que constituye el sistema, determina la velocidad de liberación. También la solubilidad que presente el fármaco en el medio de disolución al que va a llegar influye en la velocidad de liberación, esta solubilidad se puede mejorar con el uso de cosolventes. Es importante que al hacer estudios de liberación del sistema se mantengan condiciones sink (concentración de soluto 10 veces por debajo de la solubilidad).
 - *Estabilidad:* La estabilidad del fármaco a factores como pH, humedad y temperatura es importante tanto en el proceso de fabricación como en su transporte y almacenamiento para garantizar la seguridad del producto y su efecto terapéutico. Los fármacos administrados por vía oral pueden estar sujetos a hidrólisis ácido-base y a degradación enzimática, se recomienda que aquellos fármacos inestables en el tracto gastrointestinal sean administrados por una ruta alterna. [35, 36]
 - *Difusividad:* La difusión es el paso de moléculas de fármaco a través de la matriz polimérica o del reservorio y se lleva a cabo por un gradiente de concentración del fármaco e involucra el doblamiento de las cadenas poliméricas para dejar el espacio necesario para la difusión del fármaco. Esta propiedad resulta importante porque de ella depende la velocidad con la que el fármaco sea liberado por este mecanismo.[35, 36]

3.2.2 FARMACOCINÉTICOS

- *Absorción:* Es una etapa importante principalmente en las formas de dosificación orales ya que de la eficiencia de este proceso depende en

muchas ocasiones el efecto terapéutico que se desea. Cuando los fármacos presentan una biodisponibilidad deficiente se recomienda su administración parenteral o la incorporación de los mismos en un sistema de liberación modificada.[35, 36]

- *Distribución:* Una vez que el fármaco es absorbido se distribuye en el organismo dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Esta distribución puede ocasionar toxicidad en algunos órganos por lo cual se busca un sistema de liberación modificada que esté dirigido a un sitio específico.[35, 36]
- *Metabolismo:* Los fármacos que presentan metabolismo de primer paso son candidatos para un sistema de liberación modificada en una formulación parenteral. Asimismo, si el fármaco es muy susceptible a condiciones fisiológicas como el pH gástrico y la unión a proteínas plasmáticas.[35, 36]
- *Eliminación:* Cuando la excreción es dependiente de las concentraciones plasmáticas, la liberación modificada puede afectar la rapidez de eliminación para mantener la concentración del fármaco en plasma y alargar su efecto. Los fármacos cuya vida media en el organismo es muy corta son buenos candidatos para incorporarlos en un sistema de liberación modificada.[35, 36]

3.3 MODELOS DE INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO

Cuando se busca la producción de sistemas de liberación modificada como son las nanopartículas es importante considerar que uno de los principales problemas que se presenta en estos sistemas es el llamado "Efecto Burst" que es la liberación espontánea del fármaco que se encuentra fuera de la

nanopartícula, el fármaco incorporado dentro es liberado de manera prolongada. La liberación se puede modificar en función de la matriz, la concentración de tensoactivo y los parámetros de producción. Para eliminar o minimizar el efecto Burst, los sistemas de liberación modificada se deben fabricar sin usar tensoactivos o usando agentes activos de superficie en los cuales el fármaco no sea soluble en la fase acuosa. Algunos de los modelos de encapsulación propuestos son los siguientes:[37-39]

3.3.1 Sistema reservorio o fármaco en el centro

Un reservorio es un núcleo líquido con el fármaco disuelto o suspendido rodeado de una capa de lípido sólido o polímero (Figura 3.2); a veces se menciona como reservorio un sólido rodeado por una membrana lipídica o polimérica, la concentración del fármaco corresponde a la solubilidad de éste a la temperatura de solidificación del lípido.

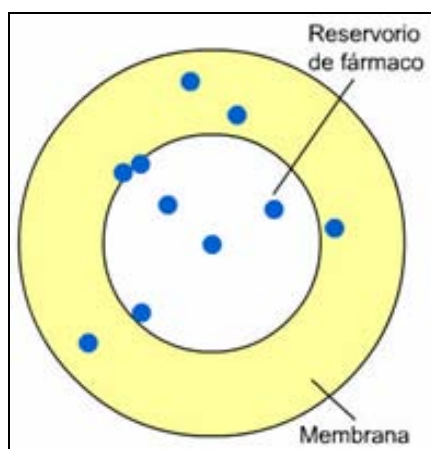


Figura 4.2 Sistema reservorio

El fármaco difunde a través de la membrana y la velocidad de cesión está determinada por la naturaleza de la membrana, (porosidad, espesor, tipo, etc.)[37-39]

3.3.2 Dispersión sólida

Involucra una dispersión molecular del fármaco y el lípido o polímero que forma la membrana, las partículas son reducidas en tamaño con presión de homogenización, pero conservan su estructura de dispersión sólida. (Figura 3.3)

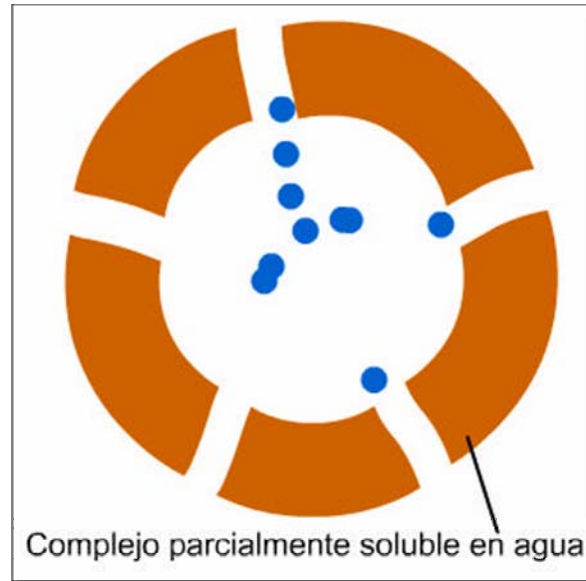


Figura 3.3 Sistemas controlados por difusión y disolución.

La liberación del fármaco depende de la disolución de partes de la membrana y la posterior difusión del fármaco a través de los agujeros (poros) generados en ésta.[37-39]

3.3.3 Fármaco en la capa

El fármaco se encuentra en la capa externa de la partícula y presenta liberación en burst. (Figura 3.4) El lípido precipita primero, formando centros libres de fármaco, la posterior precipitación del fármaco forma una capa que rodea el centro lipídico. [37-39]

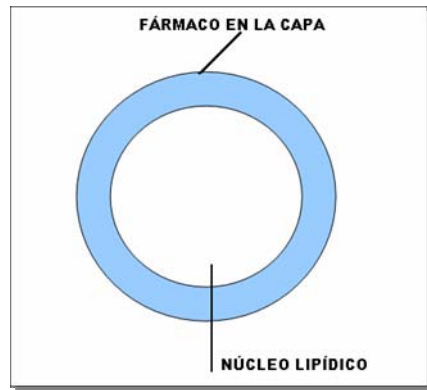


Figura 3.4 Fármaco en la capa.

3.4 CLASIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS DE LIBERACIÓN

Algunos tratados de tecnología farmacéutica realizan una clasificación sencilla de los mecanismos de liberación, atendiendo tanto a los mecanismos que afectan al proceso de liberación como a los determinados aspectos de la fisiología del aparato digestivo. En nuestro caso se hará de acuerdo a su mecanismo de liberación (Fig. 3.5) de la siguiente manera:[32, 35, 40]

1. Velocidad de liberación preprogramada.
2. Activación modulada de la liberación.
3. Regulación por retroalimentación.
4. Liberación dirigida.

Las tres primeras se refieren a un control en el tiempo de liberación y la última se refiere a un control en la ubicación espacial en la que es liberado el fármaco.

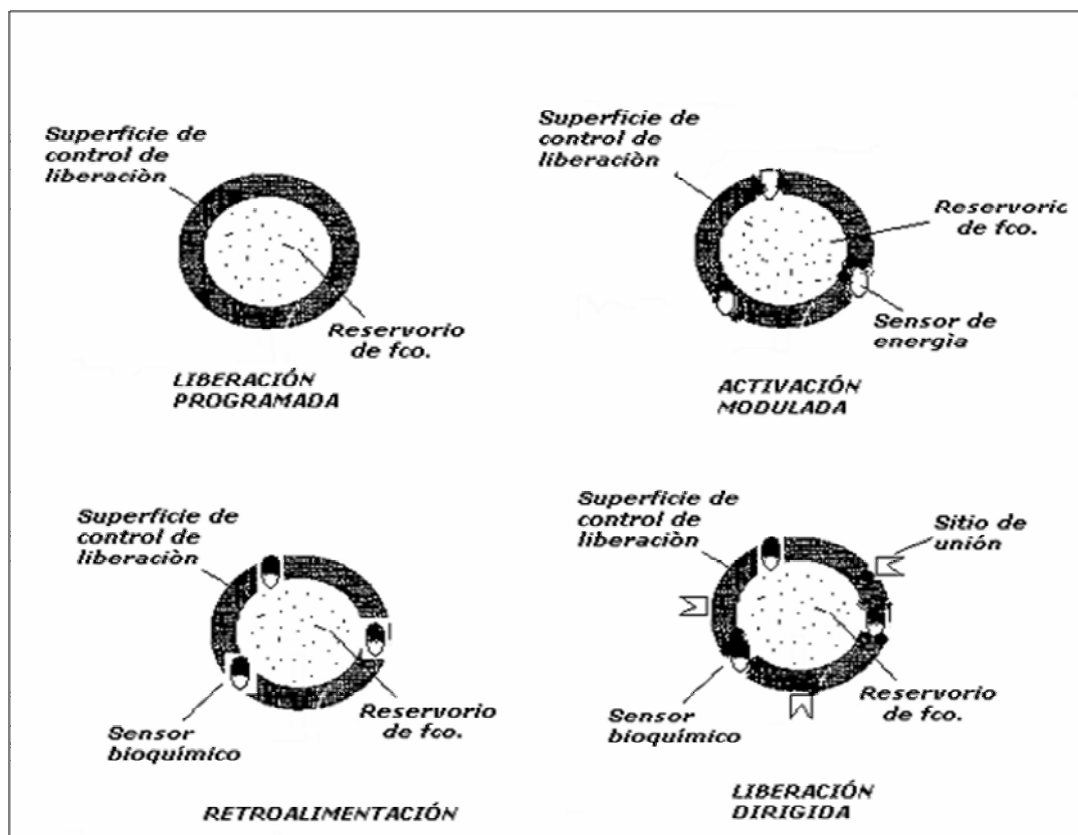


Figura 3.5 Mecanismos de liberación.

3.4.1 VELOCIDAD DE LIBERACIÓN PREPROGRAMADA

El perfil de liberación se controla por difusión molecular del fármaco a través de una barrera. Se describe mediante la segunda Ley de difusión de Fick. Existen tres tipos:

A) *Permeación a través de una membrana polimérica:* El fármaco se encapsula con una membrana de permeabilidad específica para formar un reservorio el cual puede ser sólido, una suspensión o una solución. La liberación depende de los coeficientes de partición y difusión del fármaco, de la porosidad de la membrana y de la concentración del fármaco en el reservorio. El grado de permeabilidad de la membrana se controla variando el espesor y tipo de polímero.[32, 35, 40]

Ejemplos: Progestasert[®] es una suspensión de progesterona contenida en un dispositivo intrauterino de etilen-vinil acetato, Ocusert[®] es un inserto ocular de alginato de pilocarpina útil en el tratamiento del glaucoma.

B) Difusión a través de una matriz polimérica: El reservorio es preparado como una dispersión homogénea del fármaco en el polímero (hidrofílico o lipofílico), esta dispersión puede lograrse mediante diferentes técnicas como la de difusión del disolvente o por una fusión del polímero. La liberación está controlada por la cantidad de fármaco en el reservorio, la solubilidad de éste en el polímero y su difusión a través de la matriz. La sesión del fármaco se produce mediante mecanismos de disolución, difusión y/o erosión, siendo frecuente que coincidan dos o tres a la vez.[32, 35, 40] Las matrices hidrofílicas se obtienen mezclando el principio activo con polímeros hidrofílicos, de forma que, en presencia de medios acuosos, presentan una elevada capacidad gelificante y son capaces de hincharse aumentando sensiblemente su volumen. En estas matrices se presenta el efecto de erosión. Ejemplos: Compudose[®] es un implante subcutáneo de estradiol en una matriz de silicón, se utiliza como anticonceptivo.

C) Microreservorio: Implica la microdispersión de una suspensión acuosa del fármaco con un polímero mediante un proceso mecánico de dispersión (homogenización). La liberación es dependiente de variables fisicoquímicas como la solubilidad del fármaco en el polímero y se lleva a cabo por difusión o disolución.

Ejemplos: Nitrodisc system[®] en el que el reservorio del fármaco lo constituye una suspensión de nitroglicerina en un disco de silicón, de administración transdérmica útil en el tratamiento de angina de pecho.

3.4.2 ACTIVACIÓN MODULADA DE LA LIBERACIÓN

La liberación del fármaco desde un reservorio o matriz puede ser facilitada por el suministro de energía mediante diferentes medios. Dependiendo del tipo de energía usada y el proceso de aplicación, estos sistemas se clasifican como físicos y químicos.

3.4.2.1 MECANISMOS FÍSICOS

- **Presión osmótica:** La liberación se modula mediante un gradiente de presión osmótica entre el reservorio del fármaco y el medio en el que se encuentra. Depende de la permeabilidad al agua y del área superficial efectiva de la membrana semipermeable utilizada. La diferencia de presión provoca la reducción de volumen en el reservorio liberando el fármaco de manera controlada. La formulación puede ser sólida o en solución.

Ejemplos: Alzet[®] es un dispositivo subcutáneo que libera vasopresina (antidiurético) mediante una activación osmótica con cloruro de sodio (Fig. 3.6).

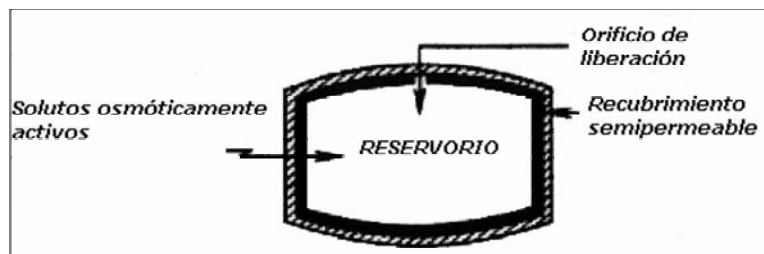


Figura 3.6 Regulación por presión osmótica.

- **Presión hidrodinámica:** Está constituido por un contenedor en el que se encuentra el reservorio de fármaco, entre estos compartimentos se encuentra una capa absorbente de un polímero hidrofílico la cual genera una diferencial de presión hidrodinámica que reduce el volumen del reservorio forzando al fármaco a salir por un orificio de manera controlada. (Fig. 3.7)

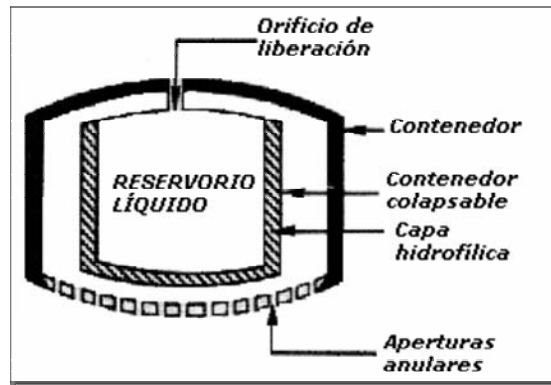


Figura 3.7 Regulación por presión hidrodinámica.

- Activación mecánica: El reservorio de fármaco es contenido en un equipo con un sistema mecánico de bombeo que libera el fármaco en una cavidad específica como la nariz, el volumen liberado es independiente de la fuerza aplicada y la duración de la activación. Ejemplo: Nebulizador de insulina.
- Activación magnética: El reservorio es una dispersión del fármaco en una matriz polimérica. La liberación es lenta por la incorporación de un mecanismo electromagnético (anillos magnéticos) que es activado por vibración. Ejemplos: Liberación de albúmina sérica bovina. (Fig. 3.8)

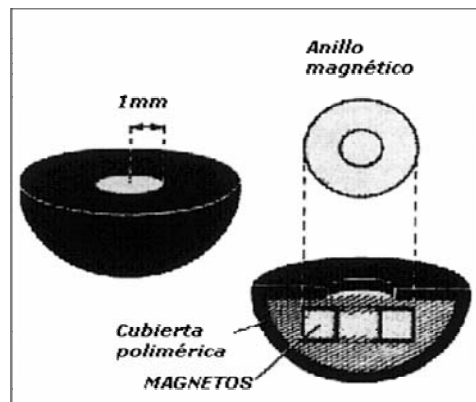


Figura 3.8 Regulación magnética.

3.4.2.2 MECANISMOS QUÍMICOS

• Activación por pH: Permite dirigir la liberación en una región con un rango de pH específico. El reservorio es una dispersión del fármaco con un polímero sensible a cambios de pH que se encapsula con una membrana polimérica como de etilcelulosa. El fármaco es liberado por difusión y controlado por la solubilidad de la membrana y la penetrabilidad. Ejemplo tabletas y cápsulas con recubrimiento entérico (Fig. 3.9).

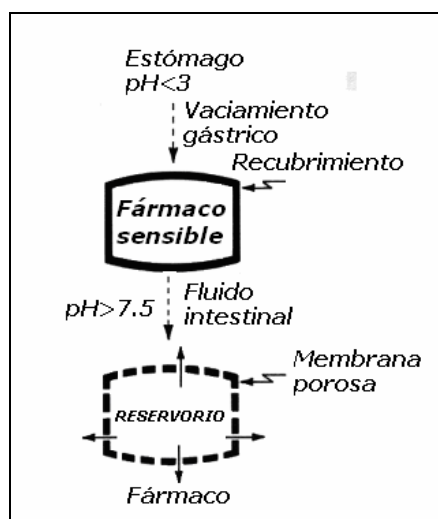


Figura 3.9 Regulación por pH.

• Hidrólisis: El reservorio de fármaco es dispersado homogéneamente con un polímero en sistemas particulados. La liberación del fármaco es regulada por la hidrólisis que es capaz de degradar el polímero del que se constituyen las partículas (Ej. PLGA copolímero de ácido láctico y ácido glicólico). Ejemplos: Implante subdérmico de un análogo de la hormona reguladora de la hormona luteinizante (LHRH) utilizada para el tratamiento de carcinoma prostático.

3.4.2.3 MECANISMOS BIOQUÍMICOS

• Activación enzimática: El reservorio es encapsulado en microesferas junto con un polímero biodegradable. La liberación es activada por la hidrólisis

enzimática del polímero mediante una enzima específica en un cierto tejido. Ejemplos: Microesferas de albúmina que liberan 5-fluorouracilo al ser degradadas por proteasas.

3.4.3 REGULACIÓN POR RETROALIMENTACIÓN

La regulación se realiza por la concentración de una sustancia química presente en el organismo, la cual es detectada por un sensor que se encuentra dentro del sistema de liberación. Existen varios tipos.[32, 34, 35]

3.4.3.1 BIOEROSIÓN

El fármaco es dispersado en una matriz polimérica que es recubierta por una enzima específica como la ureasa, la cual al encontrarse con su sustrato urea, la degrada generando amonio que incrementa el pH del medio e induce la degradación del polímero para liberar el fármaco. (Figura 3.10)

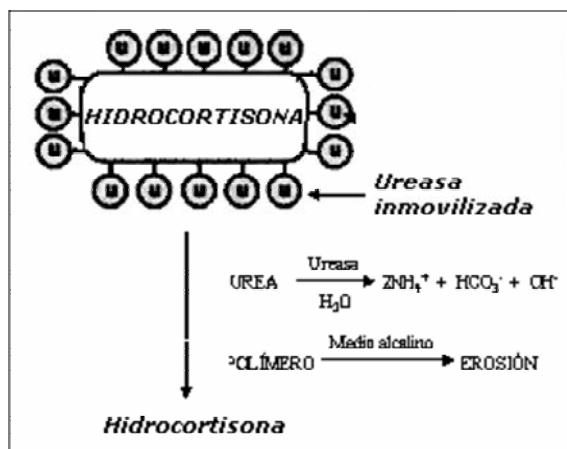


Figura 3.10 Bioerosión.

3.4.3.2 BIORRESPUESTA

El fármaco es contenido en una membrana polimérica sensible a la penetrabilidad de un agente químico que se encuentra presente en el tejido.

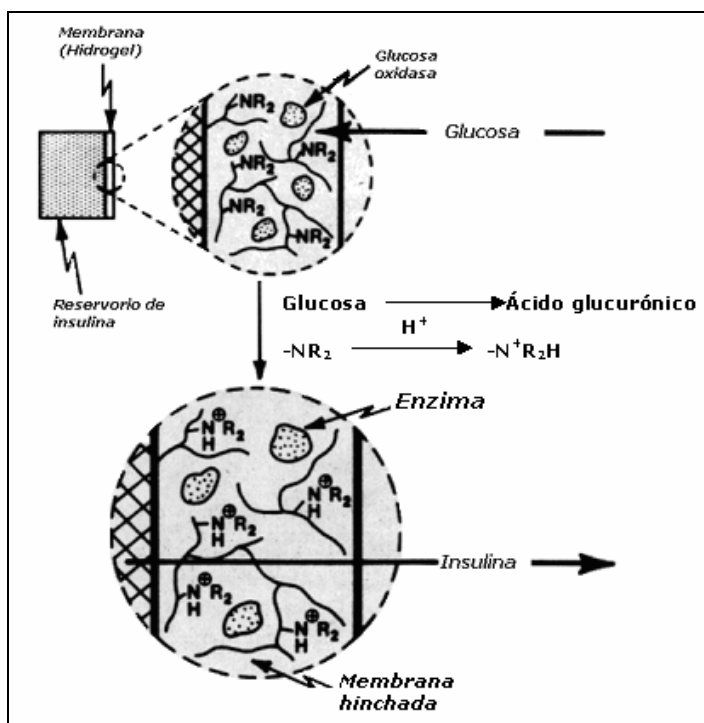


Figura 3.11 Biorrespuesta.

Ejemplo: Un reservorio de insulina es encapsulado en un hidrogel que contiene grupos $-NR_2$ y una enzima glucosa oxidasa, la glucosa penetra en la membrana polimérica y es oxidada por la enzima generando ácido glucurónico, el pH provoca la formación de grupos $-NR_2H^+$ por lo que la membrana se vuelve permeable para que la insulina pueda ser liberada. (Figura 3.11)

3.4.4 LIBERACIÓN DIRIGIDA

El desarrollo de un sistema de liberación dirigido a un sitio específico busca reducir la toxicidad de ciertos fármacos inespecíficos. El diseño de estos dispositivos implica la incorporación de un elemento de reconocimiento como un anticuerpo, para que se una selectivamente a una célula o tejido blanco de tal manera que el fármaco contenido en el sistema donador pueda ser depositado en ese lugar y ejerza su efecto. Algunos sistemas también incluyen

un agente solubilizante que facilite la disponibilidad del fármaco.
[34](Figura3.12)

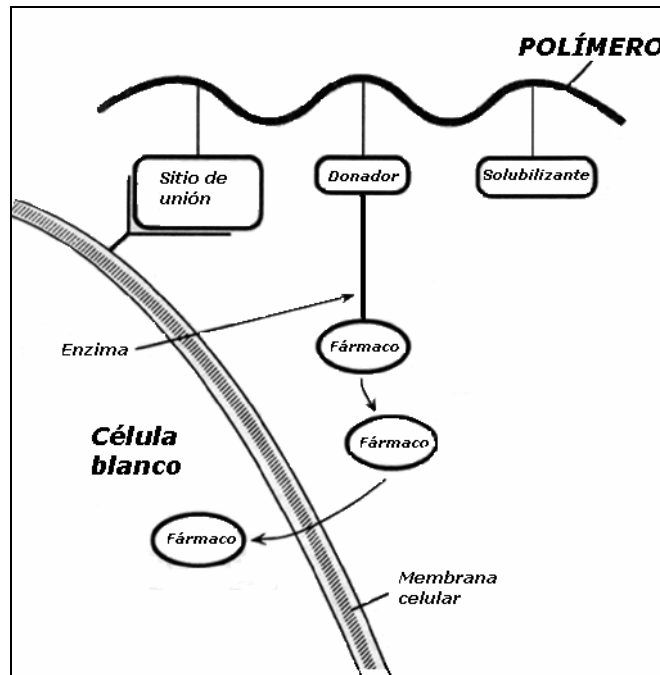


Figura 3.12 Liberación dirigida.

3.5 VENTAJAS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

Existe una gran variedad de aplicaciones para los sistemas de liberación modificada de fármacos ya que pueden ser administrados en diferentes formas farmacéuticas como son:[32, 41]

Bucal: Pastas y tabletas adhesivas.

Oral: Tablet y cápsulas con recubrimiento entérico.

Dispositivos intrauterinos.

Dispositivos transdérmicos.

Parenterales: Inyectables.

Implantes subcutáneos, oculares.

Todas estas formas de dosificación presentan ventajas sobre las formas convencionales de dosificación, la farmacoterapia con preparados de liberación

modificada pretende mejorar el tratamiento farmacológico a través de ventajas como son:[32, 41]

- ✓ Evitar los problemas de incumplimiento por parte del paciente, reduciendo el número de administraciones.
- ✓ Reducción de la dosis con lo que se pueden minimizar los efectos colaterales, así como evitar la acumulación de fármaco.
- ✓ Mejorar la eficiencia en el tratamiento que se verá reflejada en la rapidez de recuperación de la enfermedad.
- ✓ Incrementar la biodisponibilidad de algunos fármacos que son susceptibles a la inactivación enzimática o bacteriana, así como protegerlos de su metabolismo.

Todas las ventajas antes mencionadas son para tener sistemas de liberación modificada con éxito en terapéutica y esto depende de su capacidad para mantenerse en la circulación y su habilidad para alcanzar las células o tejidos "meta".

4 SISTEMAS ACARREADORES

Los acarreadores más utilizados se pueden clasificar en tres grupos:

- Coloidales: liposomas, niosomas, micropartículas y nanopartículas.
- Moleculares: ciclodextrinas, anticuerpos y dendrímeros.
- Celulares: eritrocitos resellados.

Un sistema disperso o coloide es un sistema bifásico constituido por partículas que se encuentran suspendidas en un medio, en el cual están en dispersión. Así podemos decir que una dispersión coloidal es una suspensión de pequeñas partículas en un medio continuo. Las partículas constituyen la fase

dispersa y el medio recibe el nombre de *medio de dispersión o medio dispersante*.

Se dice que las partículas se encuentran en *estado coloidal*, que es el estado de toda clase de materia puede tomar cuando está finamente dividida (al tamaño coloidal) y dispersa en un medio en el cual conserva su entidad como partícula. Al subdividir la materia en partículas pequeñas se producen un enorme aumento, tanto en su superficie como en su *superficie específica* (área/volumen).

4.1 SISTEMAS COLOIDALES

Son todos aquellos constituidos por partículas menores a $1\mu\text{m}$. Entre los más mencionados para la liberación controlada se encuentran: liposomas, niosomas, nanopartículas, y micropartículas[42], (pomadas y los geles los cuales también se pueden considerar como sistemas coloidales de liberación de fármacos, son principalmente usados en forma tópica, sin embargo el modo de acción es muy diferente a las otras 4 formas de liberación mencionadas.)[43]

Liposomas, niosomas, nanopartículas y micropartículas son muy similares en su tamaño, forma y modo de acción, y es por esta razón que se pueden usar alternativamente, sin embargo hay que tomar en cuenta las desventajas que presenta cada acarreador al momento de elegir el sistema idóneo a nuestras necesidades; por ejemplo los liposomas y niosomas muestran conocidos problemas de estabilidad y las micropartículas tienen problemas en la administración debido a su tamaño.

4.1.1 LIPOSOMAS

Se definen como vesículas de diferentes tamaños, formadas por una o más capas concéntricas de fosfolípidos y que presentan en su interior una cavidad hidrofílica. Figura 4.1. [32, 43-45]

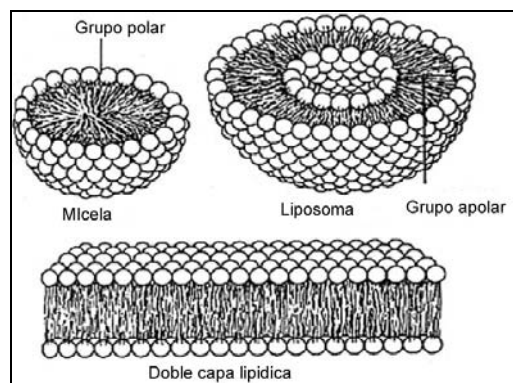


Figura 4.1 Estructura de Liposomas.

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 de opsonización, perfil de liberación de los activos y la vida media del liposoma [32, 43-45]. Entre sus aplicaciones terapéuticas se encuentran la aplicación de doxorubicina y citromicina en administración parenteral y el AZT por vía intravenosa. Entre sus aplicaciones cosméticas se encuentra en el mercado Capture® de Christian Dior.

4.1.2 NIOSOMAS

Son vesículas formadas principalmente por tensoactivos no iónicos y presentan una mayor estabilidad que los liposomas. Entre los tensoactivos utilizados para su fabricación se encuentran: poliglicerol alquiléteres y glucosil

alquil-éteres, entre otros. Para conferirles una mayor estabilidad se incluyen en su estructura otros tensoactivos cargados y un porcentaje de colesterol.

Su eficacia de encapsulación o atrapamiento depende del método de preparación (inyección de disolvente orgánico lleva a mayor eficacia que por agitación manual), composición de la bicapa (a más colesterol, mayor longitud de cadena y mayor carga, mayor atrapamiento).

Entre sus aplicaciones terapéuticas se pueden mencionar la administración intravenosa de doxorubicina, la administración oral de metotrexato y la administración transdérmica de estradiol.[43, 44, 46]

4.1.3 MICROPARTÍCULAS

Son partículas pequeñas, del orden de micras. Pueden ser preparadas a partir de diferentes materiales y sus características físicas dependerán del uso al que estén destinadas. La elección del material considera el principio activo que se desea utilizar, el sitio donde se requiere, la duración del efecto y la toxicidad del mismo. 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 polimérica.

El uso de micropartículas ha sido generalizado en los últimos años. Se pueden encontrar sistemas de liberación dirigidos prácticamente a cualquier vía de administración que involucren estas partículas microestructuradas. Sin embargo, debido a su tamaño existe el riesgo de activación del sistema inmunitario y la posibilidad de producir toxicidad.

Se han utilizado con antineoplásicos, broncodilatadores, antiinflamatorios, etc., suponiendo un gran auge en el ámbito farmacéutico. [43]

4.2 NANOPARTÍCULAS

4.2.1 DEFINICIÓN

Son partículas coloidales sólidas, que tienen un rango de tamaño de 10 nm a 1000 nm ($1\mu\text{m}$). (Fig. 4.2) Éstas consisten de materiales macromoleculares en el cual el principio activo (material biológicamente activo o fármaco) está disuelto, atrapado o encapsulado y/o el principio activo está adsorbido en la superficie de las partículas. Las cuales se pueden producir por medios mecánicos y físicos. El polímero puede ser natural o artificial y éste debe ser completamente biodegradable. La elección de éste, su tamaño y método de preparación dependerán de la bioaceptabilidad del mismo, las propiedades fisicoquímicas del fármaco, del polímero y de la meta terapéutica.[42, 43, 47]

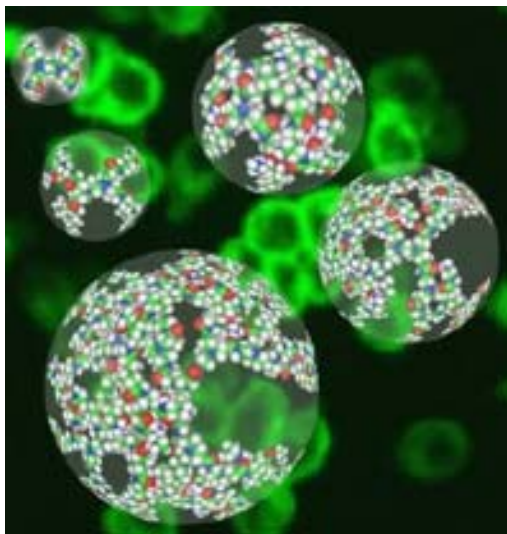


Figura 4.2 Nanopartículas.

Nanopartículas surgen como una interesante alternativa ya que no tienen problemas de estabilidad y tamaño. Una reducción en el tamaño de partícula habilita su uso en inyecciones intravenosas. El diámetro del capilar

sanguíneo más pequeño es de 4 μm ; en consecuencia, las partículas sólidas deben tener un diámetro menor que éstos para atravesar los capilares. Un pequeño tamaño de partícula de los sistemas coloidales minimiza las reacciones irritantes en la zona de aplicación.[43]

Las nanopartículas poseen una mejor estabilidad en fluidos biológicos así como durante su almacenamiento, además son más favorables para su escalamiento con respecto a los demás acarreadores.

En general los campos de estudio principales de las nanopartículas son: caracterización fisicoquímica, propiedades de liberación, métodos de preparación y sitio de acción del fármaco.

Los materiales usados para producir nanopartículas se pueden clasificar en general en dos grupos: polímeros sintéticos, y compuestos naturales tales como lípidos y proteínas.

Para producir nanopartículas se utilizan métodos como: calor o sonicación; pero estos tienen desventajas como son el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos o aceites, la toxicidad química de los agentes de entrecruzamiento (bioproductos que no son totalmente compatibles), y la producción de residuos tóxicos como monómeros, oligómeros o productos de degradación presentes.

Dentro de los polímeros preformados sintéticamente los más usados dentro de la industria son: Ácido Poliláctico (PLA), poli(β -hidroxibutirato) (PHB), Ácido poliláctico glicólico (PLGA) y Ácido poli(caprolactona) (PCL), los cuales han mostrado buena histocompatibilidad, biodegradabilidad y bioproductos no tóxicos. [47]

4.2.2 MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Los métodos para preparar nanopartículas, se dividen en aquellos que parten de polímeros preformados o los que parten de los monómeros.

Los primeros se pueden clasificar en cuatro categorías: emulsificación- evaporación, desplazamiento del disolvente, emulsificación-difusión y salting out.

4.2.2.1 EMULSIFICACIÓN-EVAPORACIÓN

El polímero preformado y el fármaco se disuelven en un medio orgánico inmisible con el agua y el cual es emulsificado en una solución acuosa. Para eliminar el exceso de solvente orgánico se hace mediante: vacío, calor o ambos, con el resultado de la producción de una fina dispersión acuosa de nanoesferas.[47]

4.2.2.2 DESPLAZAMIENTO DEL DISOLVENTE.

En este proceso se disuelve el polímero, el fármaco y en ocasiones el estabilizador, por ejemplo (fosfolípidos) en un medio semipolar, miscible con el agua como acetona o etanol. Se adiciona la mezcla a una disolución acuosa con estabilizante (alcohol polivinílico o poloxámero 188 bajo agitación constante). Las nanopartículas son formadas instantáneamente por la rápida difusión del solvente, que es eliminado de la suspensión mediante vacío.[47]

4.2.2.3 EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN

En este método se utiliza un solvente parcialmente soluble en agua, que ha sido previamente saturado de agua para asegurar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. El polímero se disuelve en el solvente saturado de agua, y esta fase orgánica se agrega a una disolución acuosa que contiene un estabilizador, lo que provoca que la fase orgánica se emulsione bajo

agitación vigorosa. La posterior adición de agua al sistema provoca que el solvente difunda a la fase externa, resultando así la formación de las nanopartículas. El disolvente orgánico, dependiendo de su punto de ebullición puede eliminarse mediante destilación o filtración.[47]

4.2.2.4 SALTING OUT

La solubilidad acuosa de una sustancia orgánica ligeramente soluble se ve afectada por la adición de un electrolito. El salting out se produce porque los iones del electrolito agregado interaccionan con moléculas de agua y en cierto modo reducen la cantidad de agua disponible para la disolución de la sustancia orgánica.[32] Este efecto se nota en especial cuando la concentración del electrolito alcanza una concentración de 0.5M o más. Si la solución acuosa de la sustancia orgánica tiene una constante dieléctrica menor que la del agua pura, su solubilidad disminuye y la sustancia precipita. Este efecto se conoce como *salting out*. [47]

El método de formación de nanopartículas se basa en la separación de un solvente miscible en agua de una solución acuosa mediante el efecto de salting out. El solvente orgánico usado en general es la acetona con base en su volatilidad, baja toxicidad y especialmente para aplicaciones farmacéuticas por los productos resultantes. (Fig. 4.3) La condición de completa miscibilidad entre el solvente (acetona) y agua no es esencial pero en este caso es de mucha ayuda para el proceso. [47, 48]

La mayor ventaja del método es la posibilidad de incorporar grandes cantidades de fármaco y polímero, generalmente con excelentes rendimientos además del fácil proceso de escalamiento, no obstante una vez encontrado el

sistema solvente/agente salting out/estabilizador no es necesario encontrar proporciones específicas para obtener nanopartículas con fármaco.

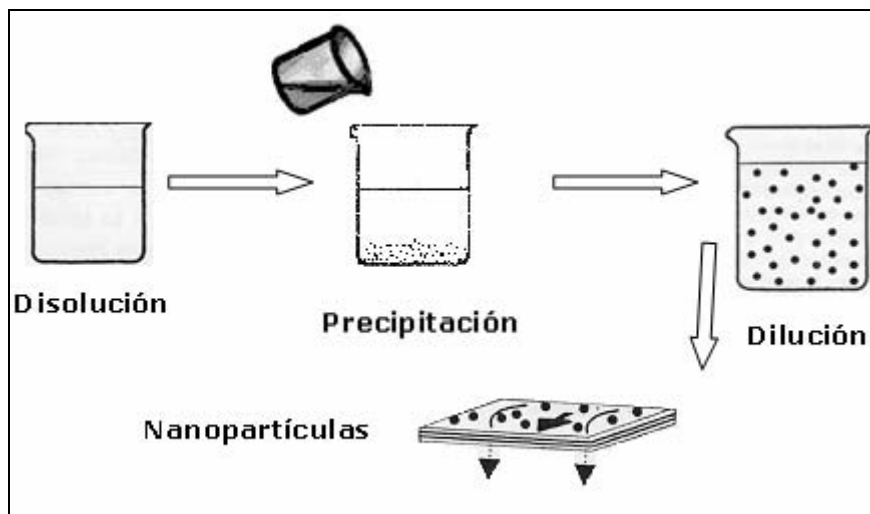


Figura 4.3 Fabricación por Salting Out

Por otro lado la técnica está limitada a fármacos lipofílicos y agentes salting out que favorezcan la separación de fases sin precipitación.

La selección del agente salting out es muy importante debido a su gran papel en la eficiencia en el atrapamiento del fármaco.[47]

Para tal efecto en un estudio con 18 diferentes sales se han clasificado en cuatro clases de acuerdo a su comportamiento al poner en contacto la solución acuosa saturada o muy concentrada con la acetona.[48]

Clase A: No hubo separación de fases líquido-líquido con precipitación del soluto en el medio acuoso-orgánico.

Clase B: No hay separación de fases líquido-líquido.

Clase C: Hay separación de fases líquido-líquido acompañada de una parcial precipitación del agente salting out en el medio.

Clase D: Separación de fases líquido-líquido sin formación de precipitado en el medio.[48]

En los compuestos de clase A la precipitación ocurre casi inmediatamente, principalmente por el cambio de la solubilidad de la sal en agua con respecto al medio acetona-agua.

En los compuestos de clase B. El soluto es soluble con la fase agua-acetona, pero no produce el efecto salting out de la acetona hacia el agua.

Compuestos de clase C. Se observa una fase superior de acetona y precipitado. Y algunos solutos como el cloruro de sodio se nota a bajas concentraciones una separación de fases sin precipitado, es por eso que algunos compuestos de clase C se pueden cambiar a clase D pero considerando bajas concentraciones de la sal.

Compuestos de clase D. Las sales catalogadas dentro de este grupo poseen la característica de favorecer la difusión de la acetona hacia el agua sin formar precipitado que es la característica principal del agente salting out.[48]

De acuerdo al autor hay cinco sales que poseen las características necesarias para producir el efecto salting out con acetona y son: cloruro de aluminio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio y cloruro de sodio.

Se ha informado que hay factores que influyen en el tamaño de partícula de las nanopartículas tales como: homogenización, tipo de agitación, concentración y tipo de polímero en la fase orgánica, tipo de agente salting out y tipo de estabilizador en la fase acuosa.[49]

Con respecto a la agitación el autor describe que a una velocidad de 1000 rpm y 2 minutos antes de agregar el agua para favorecer la difusión de la acetona hacia el agua logra reducir el tamaño de partícula hasta 427 nm, pero

con un incremento en la temperatura hasta 50°C, la homogenización después de adicionar el agua no muestra una disminución en el tamaño de partícula y esto debido probablemente a que antes de agregar el agua ya están parcialmente formadas. [49]

4.2.3 CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Una adecuada caracterización de las dispersiones obtenidas es un prerrequisito para el control de calidad de los productos. La caracterización de las nanopartículas es un serio desafío debido al pequeño tamaño de partícula y la complejidad de los sistemas que se forman, en los cuales también influyen fenómenos dinámicos. Los parámetros que se tienen que evaluar son aquellos que influyen directamente en la estabilidad y en la cinética de liberación. [38]

4.2.3.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se realiza mediante Espectroscopía de Correlación de Fotones (Fig. 4.4) Difracción Láser (Fig. 4.5).



Figura 4.4 Zetasizer.

Estas son las herramientas más poderosas para medir el tamaño de partícula. La primera técnica mide la fluctuación de la intensidad de la dispersión de la luz causada por el movimiento de las partículas. Este método aplica para partículas desde 5 nm hasta 6 μ m. Esto significa que es una buena herramienta para caracterizar las nanopartículas, pero no sirve para detectar

micropartículas que son más grandes. Estas se pueden visualizar mediante mediciones de Difracción Láser.

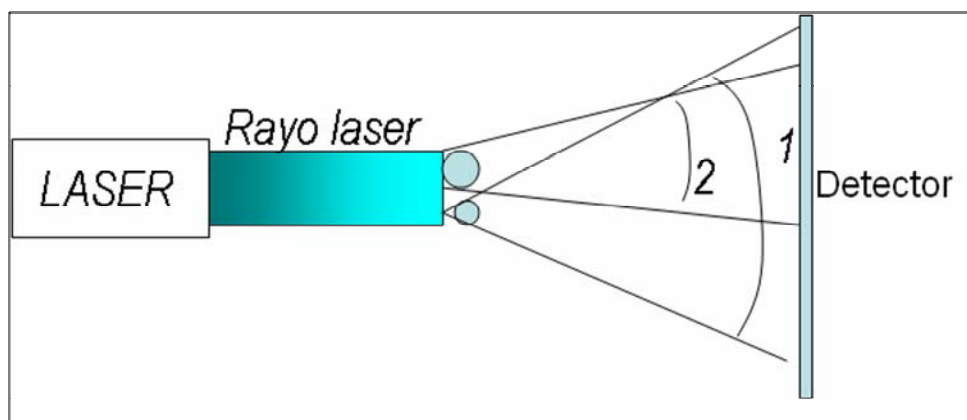


Figura 4.5 Esquema de Difracción Láser.

Éste se basa en el ángulo de difracción de la luz producido por el radio de las partículas: 1) ángulo de difracción grande para pequeñas partículas: 2) ángulo de difracción pequeño para partículas grandes.

Una clara ventaja de la Difracción Láser es la de cubrir un intervalo de medición desde $0.1 \mu\text{m}$ hasta $100 \mu\text{m}$. A pesar del gran avance que hay en este aspecto es muy recomendable utilizar ambas técnicas Espectroscopía de Correlación de Fotones y Difracción Láser en forma simultánea para hacer las mediciones. Además hay que mantener en cuenta que ambos métodos no están midiendo tamaño de partícula, si no que los efectos que causa la dispersión de la luz la utilizan para calcular el tamaño de partícula. Los equipos miden el tamaño de partícula de acuerdo a la intensidad, volumen y número.[35, 37-39, 47, 50, 51]

En el caso de los sistemas de liberación modificada que se administran vía parenteral es muy recomendable que sean de un tamaño de partícula por debajo de 220 nm ya que con un tamaño pequeño se garantiza que no habrá reacciones inmunológicas hacia el medicamento esto se puede deber a que el

sistema inmune no considera como una amenaza a partículas con tamaño nanométrico y por lo tanto no fagocitan a las nanopartículas.

4.2.3.2 POTENCIAL Z (ζ)

Una partícula (o líquido disperso) suspendido en un fluido es rodeado por una capa de iones con una carga específica. Esta capa es rodeada por otra capa, más difusa que la primera, y que también tiene su carga eléctrica. La diferencia de carga entre la primera capa y el bulto de la disolución es el Potencial Z. (Fig. 4.6)[52-54]

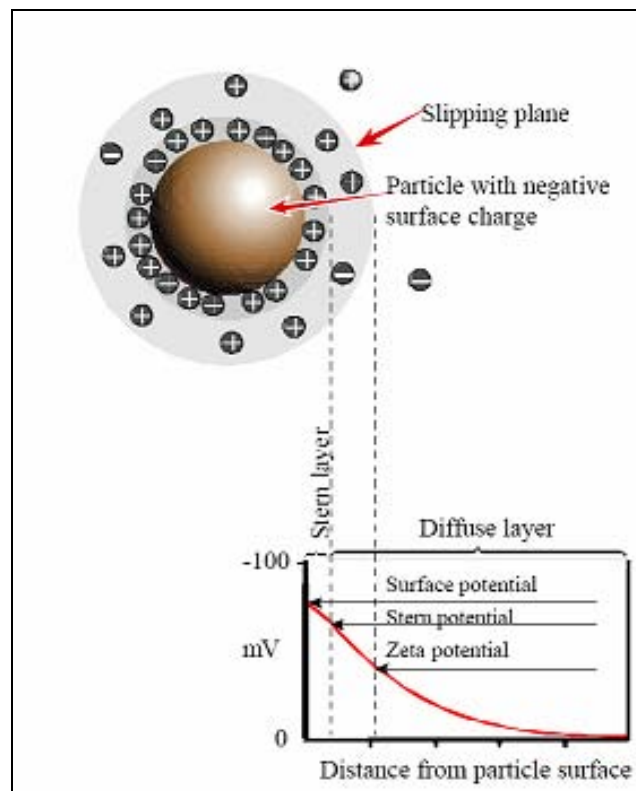


Figura 4.6 Diagrama de Potencial Z

El Potencial Z es una propiedad física que poseen todas las partículas en suspensión. La medición de este parámetro puede ser usado para optimizar la formulación de suspensiones, emulsiones y por supuesto sistemas coloidales. El conocer el Potencial Z puede reducir el tiempo necesario para obtener la

formulación, además de que ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales. La medición se basa en la movilidad electroforética. Si todas las partículas en suspensión tienen un alto potencial Z ya sea positivo o negativo entonces tendrán la tendencia a repelerse unas a otras y las partículas no se juntarán. Sin embargo si las partículas tienen un valor de potencial Z bajo entonces empezarán a juntarse y flocular. En general la línea que divide entre la estabilidad y la inestabilidad de las dispersiones está dada entre +30 y -30 mV. Partículas con potencial Z mayores a +30 mV y menores -30 mV se consideran normalmente estables.[35, 37-39, 47, 50-52]

El factor más importante que afecta al potencial Z es el pH. Un valor de potencial Z sin mencionar el pH es un valor sin sentido. Imaginen una partícula en suspensión con potencial Z negativo, si más álcalis son adicionadas a la suspensión entonces las partículas tenderán a adquirir más carga negativa. Y si más ácido es adicionado entonces el equilibrio podría cambiar la carga y neutralizarse.[53, 54]

4.2.3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microestructura de los sistemas coloidales se puede visualizar con la gran resolución de la microscopía electrónica. Sin embargo, solo se puede utilizar para muestras sólidas ya que muestras líquidas no mantienen su estructura debido al alto vacío en el microscopio electrónico. Las técnicas más utilizadas son la microscopía de Transmisión (MET) y la de barrido (MEB).[38]

4.2.3.4 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (Fig. 4.7) es una técnica muy usada para conocer las propiedades de cristalinidad de las partículas obtenidas, 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. DSC usa el principio de que diferentes modificaciones en la estructura poseen diferentes picos de fusión, por tanto también puede ser un identificador de estabilidad de las nanopartículas formadas a través del tiempo, ya que se pueden presentar la desaparición, disminución y corrimiento de los picos de fusión [32, 38, 51, 55] u otros fenómenos térmicos.

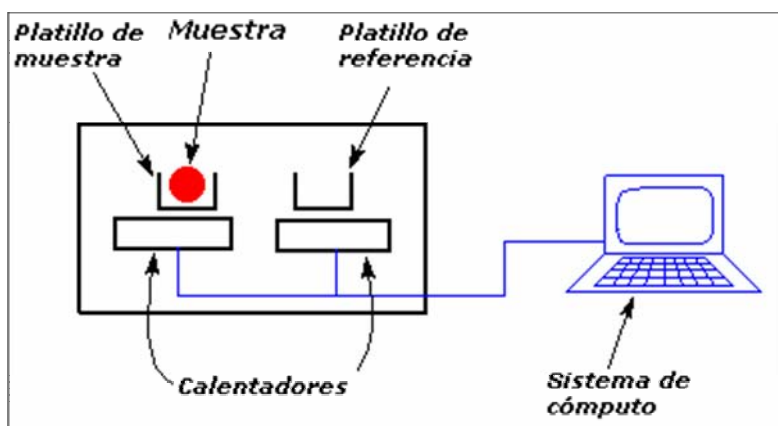


Figura 4.7 Calorímetro Diferencial de Barrido

4.2.3.5 CAPACIDAD DE ENCAPSULACIÓN

Un sistema de nanopartículas que tenga una gran capacidad de encapsulación así como una alta eficiencia en el atrapamiento del fármaco puede reducir la cantidad de acarreador necesaria para administrar la cantidad suficiente de fármaco para llegar al sitio de acción y en consecuencia reducir pérdidas de fármaco. Por lo anterior es muy importante a la hora de fabricar nanopartículas conocer este parámetro.

La capacidad de encapsulación es expresada en % con respecto a la fase lipídica o polimérica (matriz lipídica y fármaco total) (*Ec. 4.1*). Los factores

que determinan dicha capacidad son: la solubilidad del fármaco en el lípido o polímero fundido, la miscibilidad del fármaco y el lípido fundido, la estructura química y física de la matriz del lípido y el estado polimórfico del lípido.[41, 51, 52, 55, 56]

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{(\text{peso del fármaco en las nanopartículas} \times 100)}{\text{Peso de fármaco usado en la formulación}} \quad \text{Ec.4.1}$$

4.2.3.6 LIBERACIÓN IN VITRO

Los diferentes sistemas para determinar el paso de un fármaco a través de una membrana constan generalmente de dos compartimientos, un donador y un receptor separados por una membrana (Fig. 4.8). El perfil de liberación se obtiene mediante la cuantificación de fármaco en muestras obtenidas de la cámara receptora de donde se extrae un volumen conocido de medio y se renueva con medio nuevo con el fin de mantener el contacto entre la membrana y el medio receptor y condiciones sink. El análisis se puede realizar con HPLC o espectrofotometría entre otros. Uno de los sistemas más utilizados con esta finalidad son las celdas de difusión de Franz (*Ec. 4.2*)

$$\% \text{ Liberado} = (\text{masa acumulada} / \text{masa total}) (100) \quad (\text{Ec. 4.2})$$

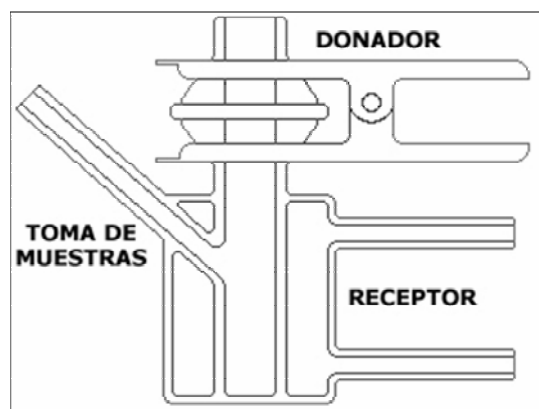


Figura 4.8 Celda de difusión de Franz

4.3 ACARREADORES MOLECULARES

4.3.1 CICLODEXTRINAS

Son sistemas potenciales de liberación de fármacos, ya que tienen la capacidad de alterar algunas de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la molécula huésped por medio de la formación de complejos de inclusión y es por esta propiedad que se pueden usar. Se sabe que las ciclodextrinas están constituidas por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces α 1 \rightarrow 4 glucosídicos, las más comunes, α -, β -, γ - ciclodextrinas, están constituidas por 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente y tienen una cavidad hidrofóbica con los bordes exteriores hidrofílicos, presentan forma de cono truncado y sus estructuras son las mostradas en la Figura 4.9. [43, 57-60]. Las ciclodextrinas se utilizan en la industria farmacéutica para aumentar la solubilidad de algunos fármacos en agua. Las moléculas del principio activo se incluyen en la cavidad y pueden ser transportadas por la ciclodextrina hasta el lugar de su actuación siempre y cuando no se modifique su estructura. Además las protegen del oxígeno y de la irradiación UV y las liberan uniformemente sobre un tiempo prolongado.

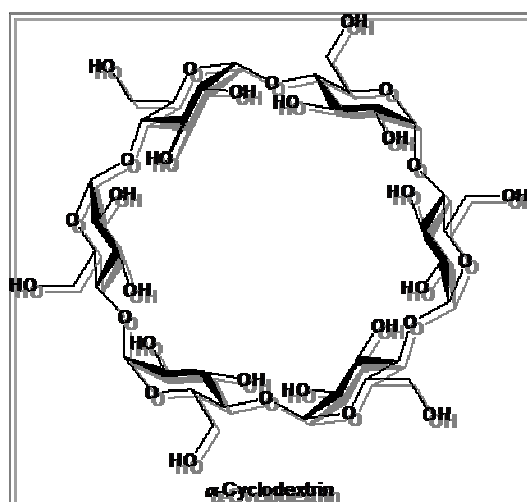


Figura 4.9 Estructura de las Ciclodextrinas.

4.3.2 DENDRÍMEROS

Son una clase relativamente nueva de macromoléculas. Son moléculas sintéticas tridimensionales ampliamente ramificadas, polímeros tipo árbol, que poseen un tamaño y forma precisos, así como grupos superficiales, que son sintetizadas mediante polimerización por pasos a partir de monómeros ramificados cuya naturaleza y funcionalidad puede ser fácilmente controlada y variada (Figura 4.10).[43, 61, 62]

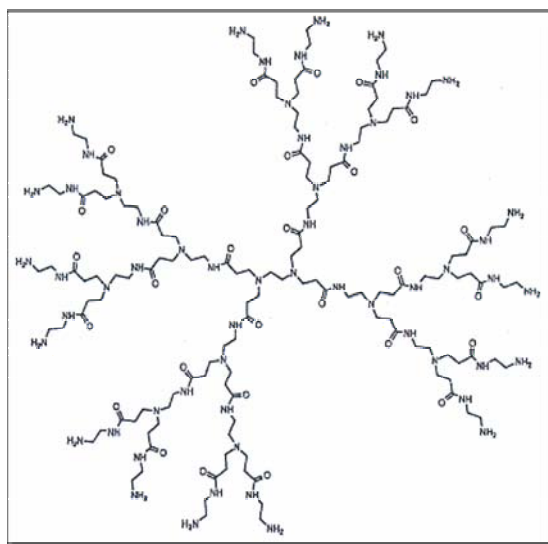


Figura 4.10 Dendrímtero PAMAM (poliamidodiamido) de tercera generación

4.4 ACARREADORES CELULARES

4.4.1 ERITROCITOS RESELLADOS

Se pueden utilizar como acarreadores debido a su capacidad para ser abiertos y resellados y poderse introducir moléculas en su interior sin sufrir variaciones en su estructura, presentando un comportamiento en circulación idéntico al del glóbulo rojo (GR) sin modificar.

Como cabe esperar es específica para células eritrofagocitarias, como por ejemplo la enfermedad de Gaucher (glucocerebrósidos). [32, 43]

4.5 REVISIÓN DE PIRETROIDES Y LIBERACIÓN MODIFICADA

Dentro de las diferentes técnicas de microencapsulación, la que *a priori* presenta mayores ventajas para la obtención de microcápsulas de insecticidas es la polimerización interfacial. Esta técnica da lugar a rendimientos de encapsulación muy elevados (de más de 90%) y origina microcápsulas con cubiertas no biodegradables, aumentando así la persistencia en el ambiente del insecticida, lo que evita la necesidad de aplicaciones repetidas; mientras que la toxicidad asociada al insecticida se encuentra ligeramente disminuido al encontrarse éste confinado en el interior de una cubierta resistente al agua, a los jugos digestivos, etc., que impide el contacto directo con la piel y mucosas así como su disolución en agua. La eficacia del insecticida estaría garantizada al romper los insectos con sus mandíbulas las microcápsulas y quedar libre el tóxico.[63]

Piretroides como gama-cianotrin (GCH) es un insecticida que tiene una alta e indeseada toxicidad para organismos acuáticos. El propósito del artículo fue evaluar la capacidad de las nanopartículas sólidas lipídicas para reducir la toxicidad en el agua y mantener la actividad insecticida de GCH. [64]

III OBJETIVOS

General:

- Obtener nanopartículas de Cipermetrina y ácido esteárico, por el método de salting out para evaluar el efecto del cambio en el tipo y la concentración de las sales, en las características de las nanopartículas.

Particulares:

- Estudiar el efecto del tipo de sal sobre el tamaño y el potencial zeta.
- Evaluar el efecto de la concentración de sal sobre el tamaño y el potencial zeta.
- Determinar a qué propiedades de las sales se deben los cambios observados.
- Caracterizar las nanopartículas formadas mediante estudios de Dispersión Luminosa y Movilidad Electroforética.

IV METODOLOGÍA Y REACTIVOS.

EQUIPO UTILIZADO:

- ▲ Espectrofotómetro UV-Visible, Ocean optics S-2000.
- ▲ Parrilla de agitación magnética, Fisher Scientific.
- ▲ Rotaevaporador Heindolph Modelo Laborota 3000 (90 rpm y 50° C).
- ▲ Zetasizer Malvern Instrument Modelo ZS3600.
- ▲ Microscopio óptico, Lieder.
- ▲ Baño ultrasónico, Cole Parmer.
- ▲ Balanza analítica, Explorer Ohaus.

MATERIALES UTILIZADOS

- ▲ Acetona (J.T. Baker)**.
- ▲ Tween 20(Riedel-de Haën).
- ▲ Cipermetrina (donado amablemente por Laboratorios Aranda).
- ▲ Ácido esteárico, (donado por Parfarm).
- ▲ Cloruro de magnesio, Reactivo Analítico. Baker®.
- ▲ Cloruro de potasio, Reactivo Analítico. Baker®.
- ▲ Cloruro de sodio, Reactivo Analítico. Baker®.
- ▲ Cloruro de calcio, Reactivo Analítico. Baker®.

** Todos los reactivos fueron utilizados como se recibieron, sin llevar a cabo ninguna técnica de purificación.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Solubilidad de las sales

El primer estudio que se realizó para este trabajo fue la prueba de solubilidad de cada una de las sales de estudio, la prueba se hizo de la siguiente forma:

Colocar una cantidad conocida de sal en un vaso de precipitado y agregar agua destilada gota a gota hasta que se disuelva la sal.

Solubilidad de Cipermetrina y ácido esteárico

Esta prueba se hizo pesando una cantidad de Cipermetrina, posteriormente se agrega acetona gota a gota hasta conseguir la disolución de la Cipermetrina en este solvente.

La misma prueba se hace pero ahora con el ácido esteárico para conocer la solubilidad de éste en acetona.

Todos los estudios de solubilidad tanto de las sales, así como del fármaco y el lípido se hicieron con agitación magnética a una velocidad de 600 rpm y a una temperatura de 20 °C.

Los resultados de los estudios de solubilidad se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Solubilidad de las sales

Sales	Formula	Solubilidad en H ₂ O a 20°C (g/100mL)
Cloruro de calcio	CaCl ₂	42
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	54.6
Cloruro de potasio	KCl	34.2
Cloruro de sodio	NaCl	35.9

De los resultados obtenidos se parte para elegir las concentraciones de estudio de las diferentes sales y la concentración mayor en cada caso estará dada por la solubilidad en agua a 20°C, la concentración de 2M y de 0.1M se toma para tener una concentración intermedia y una mínima. En la tabla 4.2 se muestran los gramos necesarios de cada sal para llegar a la concentración deseada.

Tabla 4.2 Peso de sal para cada concentración.

Sales	Peso en g para Mayor concentración	Peso en g para [2M] en 10 mL	Peso en g para [0.1 M] en 10 mL
Cloruro de calcio	4.1063 [3.7 M]	2.2196	0.1109
Cloruro de magnesio	5.4269 [5.7 M]	1.9042	0.0952
Cloruro de potasio	3.3547 [4.5 M]	1.491	0.0746
Cloruro de sodio	3.48 [6 M]	2.6668	0.058

La concentración más alta de cada sal se tomo en base a la solubilidad de cada sal en agua para las condiciones de estudio en el laboratorio.

En la tabla 4.3 se muestran los resultados de la prueba de solubilidad de la Cipermetrina y el ácido esteárico con los resultados obtenidos se hizo la relación molar de 10 a 1 de Cipermetrina y ácido esteárico para tener un exceso de Cipermetrina en la solución.

Tabla 4.3 Solubilidad de Cipermetrina y Ácido Esteárico

Producto	Solubilidad mg/mL
Cipermetrina	0.3397
Ácido esteárico	0.0241

En la tabla 4.4 se muestra la cantidad en gramos de la Cipermetrina y el ácido esteárico con las concentraciones molares de cada uno, a las cuales se hizo toda la parte experimental.

Tabla 4.4 Concentración de fármaco y polímero

Compuesto	Concentración (M)	Peso (g)
Cipermetrina	0.14	0.2914
Ácido esteárico	0.014	0.0199

Preparación de la solución con el agente salting out [47].

1. Pesar 0.25 g de Tween 20 en un vaso de pp de 50 mL, colocar un agitador magnético pequeño para favorecer la disolución de la sal y el tensoactivo.
2. Agregar la cantidad de NaCl (o la sal correspondiente) poco a poco hasta disolución total.
3. Completar un volumen total de 10mL de agua destilada para llegar a la concentración deseada.

Preparación de la fase orgánica.

1. Colocar 3 mL de acetona en un vaso de pp de 30 mL.
2. Adicionar 0.0199g de ácido esteárico poco a poco, hasta conseguir disolución total del ácido con la ayuda de un agitador magnético pequeño.
3. Disolver 0.2914g de cipermetrina a la disolución del paso 2.
4. Adicionar acetona hasta completar volumen total de 5 mL acetona.

Formación de las nanoparticulas.

1. Agregar gota a gota el agente salting out a la disolución que contiene la Cipermetrina y el ácido esteárico, manteniendo agitación constante a 600 rpm con parrilla de agitación y temperatura constante a 20 °C.

2. Continuar la adición de la solución hasta completar un volumen total de 9 mL.
3. Añadir 10 mL de agua destilada para inducir la difusión de la acetona al agua y la consecuente formación de las nanopartículas.
4. Después de terminada la adición del agua se mantiene la agitación durante 5 minutos más.
5. Antes de filtrar se someten los frascos que contienen la suspensión a sonicación durante 10 min. Esto se hace para favorecer la formación de nanopartículas de menor tamaño tal y como se dice en la bibliografía [56].
6. Se procede a filtrar con membrana de $0.45\mu\text{m}$, utilizando un matraz kitasato a presión reducida.
7. Posteriormente el filtrado resultante se filtra nuevamente con membrana de $0.22\mu\text{m}$, a presión reducida.
8. El filtrado se coloca en el rotaevaporador y con presión negativa se elimina el solvente orgánico que aún queda. Se mantiene la velocidad de 90 rpm y 50°C . A la dispersión de nanopartículas en el agua se hace la caracterización.
9. Las membranas que contienen los sólidos, se secan a 37°C durante 24 hrs. y se pesan.

V RESULTADOS

5.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Las pruebas de solubilidad de las sales se hacen para conocer la solubilidad de cada sal a las condiciones de trabajo. Para decidir cuál es la concentración más alta a la que se harán los estudios con las diferentes sales, antes de que se precipiten en la solución. Los resultados se muestran en la tabla 4.1.

5.2 ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Previo a medir el tamaño de partícula, es necesario introducir en el equipo a utilizar el índice de refracción de lo que se desea medir. Para ello se midió el índice de refracción de la acetona, que sirve como blanco, el del principio activo en disolución. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.1

Tabla 5.1 Resultados de índice de refracción

Compuesto	Índice de refracción
Acetona	1.358
Mezcla ácido-Esteárico Cipermetrina	1.389

El índice de refracción es la razón de la velocidad de la luz en el vacío a la velocidad de la luz de una longitud de onda determinada en una cierta sustancia.[65] El índice de refracción se midió bajo una luz amarilla de longitud de onda de 589 nm. Los resultados mostrados en la tabla 5.1 indican que el índice de refracción de la acetona y la mezcla de ácido esteárico y Cipermetrina son diferentes por lo que hay que introducir este dato en el equipo, con el fin de que las lecturas de tamaño de partícula y potencial Z no tuvieran

errores, debido a que el equipo funciona con un rayo láser el cual choca con las partículas que se encuentran en la muestra, dando una señal al equipo la cual nos da una lectura. Así, cada material dispersa la luz de manera distinta y esto da como resultado un algoritmo diferente para cada sustancia. Este algoritmo es utilizado por el equipo para hacer el cálculo de tamaño de partícula y potencial Z, por lo que si no se introduce índice de refracción de la sustancia con la cual se está trabajando, puede llevar a errores de medición y por lo tanto los resultados no serían confiables.

5.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN Y TIPO DE SAL SOBRE EL TAMAÑO DE PARTÍCULA Φ

El tamaño de partícula es un parámetro que depende de las variables del proceso de formación de nanopartículas. Numerosos factores intervienen en la promedia final de tamaño de partícula tales como la composición de los excipientes, la composición del principio activo, el proceso de formación, los factores que intervienen en el proceso como temperatura, presión, el equipo de homogenización, el medio de dispersión, entre otros, tal y como lo menciona Alleman[50]. Para este caso el tamaño de partícula está en función del tipo y la concentración de sal, puesto que es el único factor que se está modificando.

El equipo Zetasizer que se utilizó para medir el tamaño de partícula, reporta resultados en % de intensidad, % en volumen y % en número. En este caso se trabajaron los datos de % en número porque son los más representativos con respecto a la cantidad de nanopartículas presentes en las muestras y su tamaño correspondiente. Lo importante es contar con los datos que pide el equipo para la ecuación que hace puesto que si no se saben, se puede hacer un mal análisis. En este caso se tienen los datos de viscosidad y

del índice de refracción, basándose en lo anterior el dato que se usa es el de promedio de % de número. En la tabla 5.2 se muestran los resultados de tamaño de partícula para cada una de las concentraciones trabajadas con cada sal.

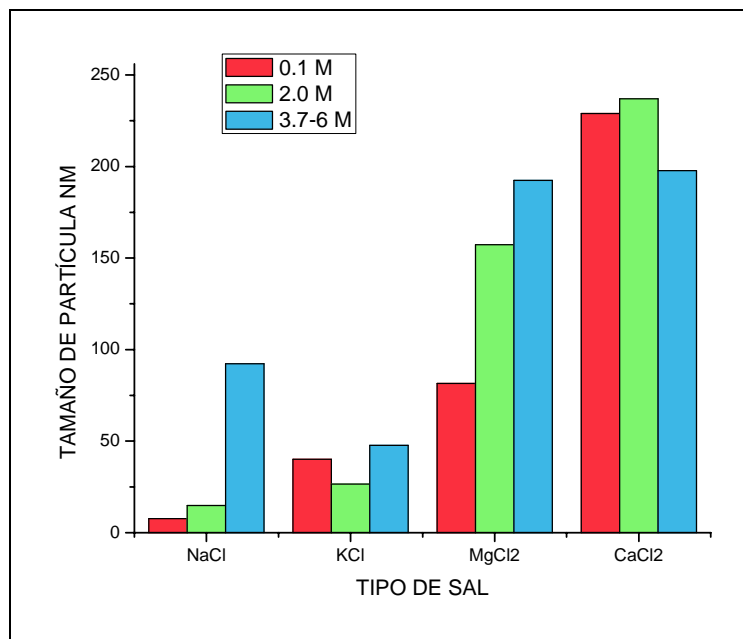
Tabla 5.2 Tamaño de partícula. ϕ (nm)

Sal	0.1M	2.0M	(3.7-6M)
NaCl	7.74	14.76	92.27
KCl	40.17	26.54	47.75
MgCl ₂	81.5	157.27	192.42
CaCl ₂	228.89	237.07	197.75

Los datos de la tabla 5.2 corresponden a los resultados de tamaño de partícula del filtrado después de hacerlo pasar por una membrana millipore de 0.22 micras los cuales se midieron en el equipo Zetasizer.

Un problema que se tuvo para medir el tamaño de partícula en los sólidos obtenidos en las membranas de los diámetros de 0.22 Y 0.45 micras fue que después de secar las membranas en la estufa, las partículas obtenidas estaban tan pegadas que no se pudieron resuspender por ningún método mecánico, esto se debe posiblemente a que el ácido esteárico con las nanopartículas de Cipermetrina y ácido esteárico formaron una unión tan fuerte que no se puede separar; por lo que en el caso de tamaño de partícula solo tenemos los datos del filtrado.

Gráfica 5.1 Tamaño de partícula.



En la Gráfica 5.1 observa que en todas las muestras obtenidas el tamaño de partícula es menor a 220 nm lo que indica que están dentro del rango permitido para éste sistema. Para el caso de las nanopartículas producidas con Cipermetrina decidimos que el tamaño deseado es por debajo de 220 nm, esto es porque como se quiere que las nanopartículas se administren por vía parenteral, por lo tanto el que las partículas sean de este tamaño asegura la posibilidad de poder esterilizarlas por filtración, lo que da una ventaja mas a dicho sistema ya que no se necesitará un proceso de esterilización más complicado y por ende más costoso. Otra ventaja de tener un tamaño de partícula menor a 220 es porque mejora la reacción del sistema inmune hacia ellas, ya que no son reconocidas como agentes extraños y no son fagocitadas.

De manera general se observa que el tamaño de partícula en presencia de las sales monovalentes es menor que para las sales divalentes de estudio. Esto se puede deber a que las sales monovalentes rompen la estructura del

agua con mayor efectividad que las divalentes, lo que repercute en la solubilidad del lípido y del activo. Así, a mayor sea el efecto salting out más rápido tendrá lugar la precipitación y por lo tanto la formación de nanopartículas. Es sabido que en procesos rápidos no hay tiempo para darse la agregación o el crecimiento y por lo tanto se generan especies de menor tamaño que en aquellos que tienen lugar a baja velocidad.

Al analizar las sales monovalentes por un lado y las divalentes por otro, se ve la tendencia de un mayor tamaño para el Potasio y el Calcio, esto se puede deber que a medida que se aumenta el radio iónico se ve disminuida la capacidad de hidratación del catión y por tanto se disminuye el efecto salting out (32), favoreciendo un mayor tamaño.

En el caso de las sales divalentes ocurre una tendencia similar que con el Sodio y el Potasio, para este caso la capacidad para romper la estructura del agua está íntimamente relacionada con la facilidad para hidratarse de los iones y por tanto disminuyen el efecto salting out.

Considerando que todos los estudios se hicieron en función de diferentes sales y con la finalidad de discutir los resultados en base a las propiedades de las mismas, se muestran éstas en la figura 5.3

Tabla 5.3. Propiedades Químicas de las Sales

Nombre	Sodio	Potasio	Magnesio	Calcio
Número atómico	11	19	12	20
Valencia	1	1	2	2
Estado de oxidación	(+1)	(+1)	(+2)	(+2)
Electronegatividad	0,9	0,8	1,2	1,0
Radio covalente (Å)	1,54	1,96	1,30	1,74
Radio iónico (Å)	0,95	1,33	0,65	0,99
Radio atómico (Å)	1,90	2,35	1,6	1,97
Configuración electrónica	[Ne]3s ¹	[Ar]4s ¹	[Ne]3s ²	[Ar]4s ²
Primer potencial de ionización (eV)	5,14	4,37	7,65	6,15
Masa atómica (g/mol)	229,898	39,098	24,305	40,08
Densidad (g/ml)	0,97	0,97	1,74	1,55
Punto de ebullición (°C)	892	760	1107	1440
Punto de fusión (°C)	97,8	97,8	650	838

En la tabla 5.4 se observan los resultados del porcentaje de peso para cada concentración de las diferentes sales, obtenidas después del proceso de filtración mencionado en la sección de formación de nanopartículas de la parte experimental.

Para obtener los porcentajes de los sólidos obtenidos se consideró que el 100% corresponde a la cantidad inicial de Cipermetrina y Ácido esteárico que se colocó en el matraz, tomando en cuenta lo anterior y que los datos de peso que se tienen son los de las membranas de 0.45 y 0.22 micras, el dato faltante que es el del filtrado se obtiene por diferencia.

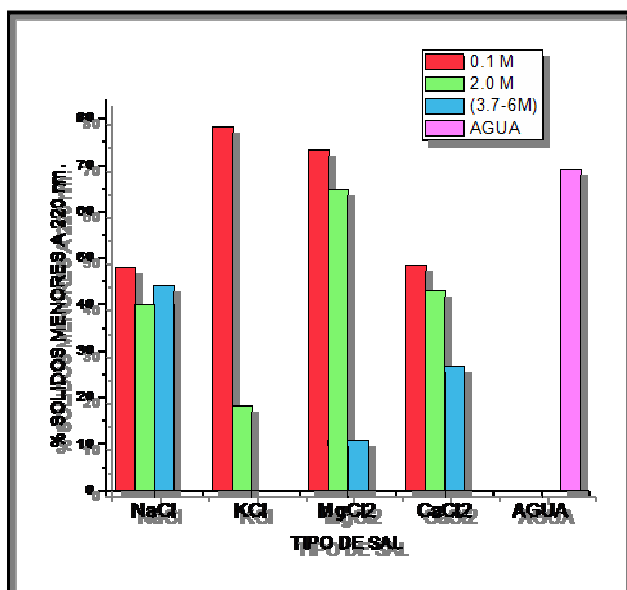
Un posible problema con esta técnica es que la precipitación de las sales puede ocurrir y esto haría que los resultados no fueran confiables, sin embargo, y tomando en cuenta la solubilidad de cada una de las sales se puede concluir que esto no sucede, a excepción del KCl a 4.5M donde si hay

precipitación y es por eso que el porcentaje obtenido es mayor al 100%, que según Imbrahim (54) el KCl la consideran como una sal de clase A que no produce una separación de fases y en cambio provoca la precipitación de la sal en el medio, tal y como ocurrió a esta concentración.

Tabla 5.4 Resultados de porcentaje de sólidos obtenidos

Sal	% sólidos menores a 0.22 μm
NaCl [6 M]	44.04
NaCl [2 M]	39.90
NaCl [0.1 M]	47.99
KCl [4.5 M]	-185.19
KCl [2M]	18.02
KCl [0.1M]	78.06
MgCl ₂ [5.7M]	10.76
MgCl ₂ [2M]	64.73
MgCl ₂ [0.1M]	73.31
CaCl ₂ [3.7M]	26.50
CaCl ₂ [2M]	42.95
CaCl ₂ [0.1M]	48.35
Solo agua.	68.97

Tabla 5.2 Porcentaje de sólidos menores a 220 nm



La gráfica 5.2 y la tabla 5.4 muestran los resultados de los sólidos obtenidos con un tamaño menor a 220 nm. Se observa que para el KCl falta el dato de tamaño para la concentración mayor, la explicación es mencionada en párrafos anteriores.

Para el NaCl se observa que para las diferentes concentraciones de estudio de dicha sal hay un mayor porcentaje de sólidos con un tamaño menor a 0.22 micras lo cual indica que esta sal favorece la formación de nanopartículas de este tamaño, esto podría ser debido a que el ion sodio al ser pequeño está muy hidratado y por tanto disminuye la solubilidad de las nanopartículas de Cipermetrina y ácido esteárico en mayor grado favoreciendo el efecto salting out con menor cantidad de iones y por eso se tiene una mayor proporción de nanopartículas finas a cualquiera de las concentraciones de estudio de esta sal.

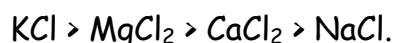
En el caso del KCl, se puede advertir que a 0.1 M hay mucho mayor proporción de partículas inferiores a 0.22 micras que para 2 M, esto se podría deber a que al tener una menor cantidad de iones K^+ disponibles para formar las nanopartículas el tamaño de éstas es más chico y hay mayor cantidad en el filtrado, sin embargo al adicionar más iones potasio al medio hay disponibles más iones en el medio que se pueden pegar a superficie y por eso el tamaño es mayor y la proporción de partículas con tamaño menor a 0.22 micras disminuye.

Para el $MgCl_2$ se observa que al aumentar la concentración de la sal van aumentando las cantidades de partículas más grandes y viceversa van disminuyendo las partículas de interés, aquellas inferiores a 0.22 micras, probablemente esto se pueda deber a que al tener un ion muy hidratado la formación de nanopartículas ocurre con menos presencia de magnesio en el medio y es por eso a que a menor concentración la proporción de nanopartículas menores a 0.22 micras es mayor y al tener más iones magnesio en el medio

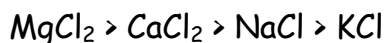
éstos se siguen pegando a la superficie de la partícula, por lo que se incrementa el tamaño y la proporción de nanopartículas con este rango disminuyen; este fenómeno se hace más evidente al agregar más iones ya que la proporción disminuye vertiginosamente de un 73.31% a 2.0 M hasta 10.76% con la solución de concentración de 5.7 M.

Para el caso específico del CaCl_2 la proporción de partículas de interés disminuye a medida que se incrementa la concentración de CaCl_2 podemos inferir que al tener el catión Ca^{2+} con un valor de electronegatividad de 1.0 "tabla 5.3" tiene una capacidad de hidratación moderada y por tanto su capacidad de favorecer el efecto salting out no es tan efectivo, es por eso que al haber más cationes en el medio éstos se pegan a la superficie con más intensidad y el tamaño aumenta considerablemente en todos los casos y la proporción de partículas en el rango de interés disminuye a medida que se aumenta la cantidad de iones en el medio.

Al hacer un comparativo de la cantidad de sólidos obtenidos con un tamaño menor a 220 micras con las sales de estudio a la concentración mínima se observa el siguiente orden:



Para la concentración intermedia en el tamaño de 220 micras vemos el orden siguiente.



Y para la concentración mayor el orden es el siguiente:



En este caso falta el dato de KCl lo cual se explicó en el apartado correspondiente a esta sal y por tanto este comparativo no es del todo válido ya que hace falta este dato.

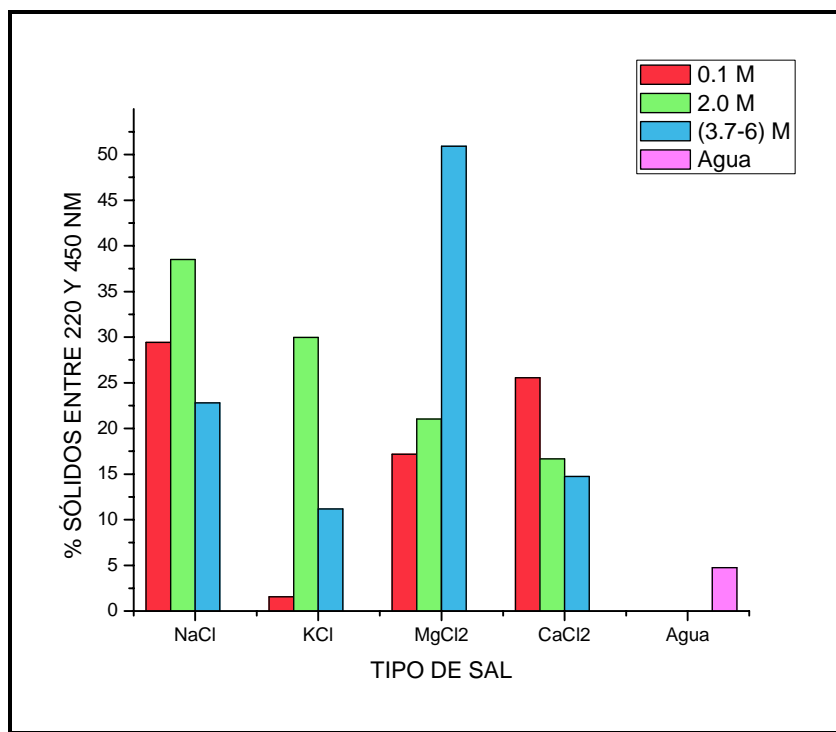
El hecho de que no haya un comportamiento semejante con todas las sales es probablemente debido a que el tamaño de las nanopartículas depende de dos factores principalmente; por una parte la capacidad de destruir la estructura del agua y por otra la afinidad de los iones por la superficie del coloide. Así, los efectos finales en dimensiones son debidos a la suma de ambos factores dando como resultado datos no predecibles de manera sencilla.

TABLA 5.5 SÓLIDOS OBTENIDOS ENTRE 220 Y 450 nm

Sal	% de sólidos obtenidos 220 nm a 450 nm
NaCl [6 M]	22.8076
NaCl [2 M]	38.5159
NaCl [0.1 M]	29.4250
KCl [4.5 M]	11.1789
KCl [2M]	29.9711
KCl [0.1M]	1.574
MgCl ₂ [5.7M]	50.9155
MgCl ₂ [2M]	21.0087
MgCl ₂ [0.1M]	17.186
CaCl ₂ [3.7M]	14.7446
CaCl ₂ [2M]	16.672
CaCl ₂ [0.1M]	25.5702
Solo agua.	4.7543

Los datos de la tabla 5.5 corresponden a los pesos que se obtuvieron de la membrana de 0.22 μm después de seguir las indicaciones descritas en la sección de metodología.

Gráfica 5.3 PORCENTAJE DE SÓLIDOS ENTRE 220 Y 450 nm



En la gráfica 5.3 se observan los datos obtenidos de porcentaje de los sólidos que tienen un tamaño de partícula entre 220 y 450 nm.

Para el caso del NaCl vemos que al incrementar la concentración de NaCl del 0.1 al 2.0 M también se incrementa el porcentaje de partículas en este intervalo de tamaño, por otro lado al agregar más NaCl al medio se observa que la cantidad de partículas de este tamaño disminuye a 22% esto se puede deber a que esta sal a concentraciones bajas favorece la formación de nanopartículas con tamaño pequeño, y al contener la solución más NaCl se favorece la formación de partículas con un tamaño por encima de 450 nm.

Para el KCl se observa que a la concentración de estudio inferior tenemos pocas partículas con lo que sugerimos que esta sal favorece la formación de nanopartículas de menor tamaño puesto que a esta concentración más del 70% tiene un tamaño menor a 220nm. Al incrementar la concentración de KCl se incrementa también la cantidad de partículas en este rango de

tamaño, lo que indica que al haber iones potasio en el medio éstos se pegan a la superficie de la partícula e incrementan el tamaño y al continuar agregando iones al medio el tamaño de las partículas crecen demasiado y con la solución más concentrada la proporción con este tamaño disminuye drásticamente hasta 11.18%, probablemente por efecto de carga en superficie.

La situación del $MgCl_2$ a la concentración baja de 0.1 M tenemos solo el 17.18% de los sólidos totales y para la solución 2.0 M se eleva al 20% sin embargo a la concentración alta se eleva hasta 50.9%, lo que podemos decir de estos datos es que esta sal posee las características de electronegatividad e hidratación para favorecer la formación de nanopartículas con el tamaño de interés.

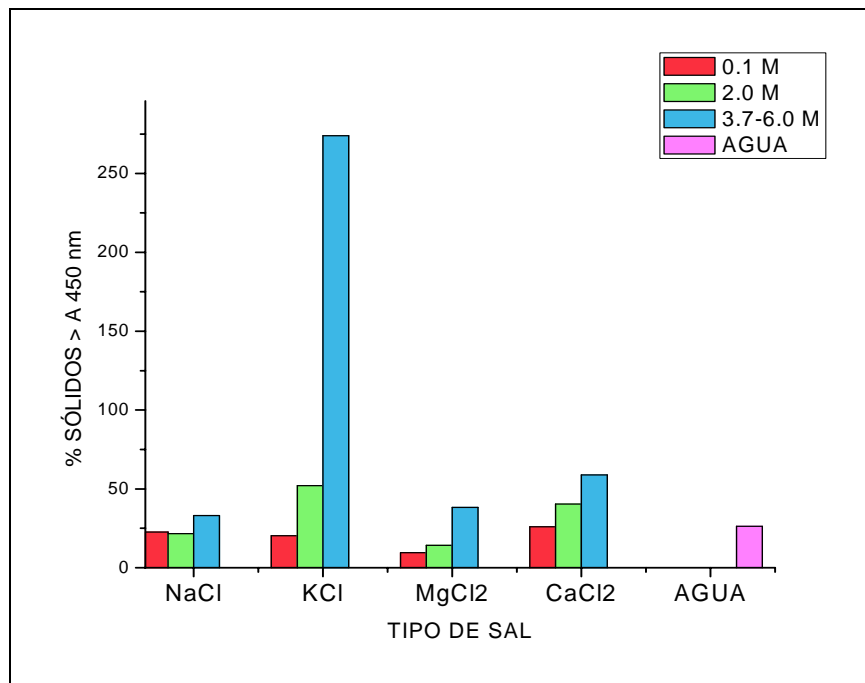
Para el $CaCl_2$ la cantidad de partículas en este tamaño es menor al 25% para todos los casos esto se debe a que el tamaño de partícula que tienen las nanopartículas con esta sal son de un tamaño mayor al deseado.

TABLA 5.6 SÓLIDOS MAYORES A 450 nm

Sal	% de sólidos Obtenidos mayores a 0.45 μm
NaCl [6 M]	33.1513
NaCl [2 M]	21.5869
NaCl [0.1 M]	22.5827
KCl [4.5 M]	274.0122
KCl [2M]	52.0077
KCl [0.1M]	20.3662
$MgCl_2$ [5.7M]	38.3232
$MgCl_2$ [2M]	14.2628
$MgCl_2$ [0.1M]	9.5085
$CaCl_2$ [3.7M]	58.7536
$CaCl_2$ [2M]	40.3791
$CaCl_2$ [0.1M]	26.0842
Solo agua.	26.2769

Los resultados de la tabla 5.6 y de la gráfica 5.4 corresponden al peso obtenido de los sólidos con un tamaño mayor a 450 nm.

Gráfica 5.4 % SÓLIDOS MAYORES A 450 nm



En general se observa que al incrementar la concentración de cada sal en particular se incrementa la proporción de partículas con un tamaño mayor a 450 nm. Esto podemos decir se debe a que al tener más cationes disponibles en solución se siguen agregando los coloides y aumentan de tamaño.

El NaCl solo tiene una pequeña proporción de partículas con estas dimensiones. Lo que implica que con esta sal se forma mayor cantidad de partículas con tamaño menor a 450 nm.

El KCl va incrementado la cantidad de nanopartículas con el tamaño mayor a 450 nm hasta llegar al punto de que con la concentración de 4.5M se precipita la sal, el incremento gradual de la cantidad de sólidos presentes se

puede deber a que esta sal al incrementar la cantidad de iones potasio libre se pegan a la superficie de la partícula hasta el punto en que la sal se precipita a la concentración de 4.5 M.

El $MgCl_2$ tiene una fracción de partículas con este tamaño, y sobre todo en las concentraciones inferiores, esto se puede deber a que éste ion al ser más electronegativo y más hidratado el efecto salting out se favorece y por tanto se forman partículas pequeñas con estas concentraciones y al llegar a la concentración de 5.7 M los iones libres se unen a la superficie de la partícula y por ende aumenta el tamaño.

Para $CaCl_2$ el porcentaje de sólidos con dicho tamaño aumenta al agregar iones a la solución, debido a que se continúan pegando iones a la partícula inicial.

Algo muy importante que se debe mencionar es que la sal provoca un efecto del salting out sobre la acetona y esta al separarse del medio es que provoca la formación de las nanopartículas. Sin embargo no se observa la separación del disolvente orgánico, así que lo que genera en este caso la formación de las nanopartículas es un efecto combinado del salting out sobre los componentes de las nanopartículas y el efecto de eliminación del disolvente con rotavapor.

5.4 INFLUENCIA DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE SAL SOBRE EL POTENCIAL Z (ζ)

El Potencial Z es una propiedad física que poseen todas las partículas en suspensión. La medición de este parámetro puede ser usado para optimizar la formulación de suspensiones y emulsiones. El conocer el Potencial Z puede

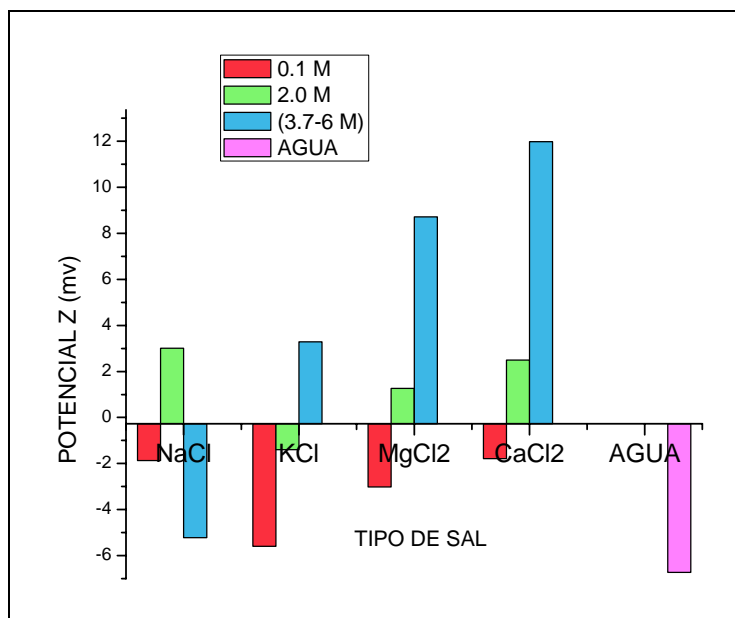
reducir el tiempo necesario para obtener la formulación, además de que ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales.

En general la línea que divide entre la estabilidad y la inestabilidad de las suspensiones está dada entre +30 y -30mV. Partículas con potencial Z mayores a +30 mV y menores -30 mV se consideran normalmente estables.[35, 37-39, 47, 50-52]. En la tabla 5.7 se muestran los valores de potencial Z promedio de las muestras realizadas.

Tabla 5.7 Potencial Z

Sal	Agua	0.1 M	2.0 M	(3.7-6) M
NaCl	--	-1.87407	3.01	-5.22075
KCl	--	-5.60175	-1.39925	3.2825
MgCl ₂	--	-3.01975	1.2607	8.7095
CaCl ₂	--	-1.7815	2.50075	11.9825
Agua	-6.7325	--	--	--

Gráfica 5.3 Potencial Z



La gráfica 5.3 se muestran los resultados obtenidos para todos los lotes de estudio.

Se observa que los valores de potencial Z para todas las sales son muy cercanos a 0 lo que quiere decir que las formulaciones tenderán a formar agregados en suspensión con el paso del tiempo. El valor para la muestra solo con agua es de -6.73 mV y los valores más altos son para la muestra más concentrada de $MgCl_2$ y $CaCl_2$ sin llegar a estar dentro del rango ideal de valores de Potencial Z ($> +30$ mV y < -30 mV).

En el caso de NaCl vemos que a la concentración de 0.1 M tenemos un valor cercano a 0 lo cual se puede deber a que para esta concentración los iones que se encuentran en superficie pueden ser de la parte aniónica del ácido esteárico y por eso tenemos un valor negativo, al agregar más sal al medio observamos un salto en el valor, lo que podría decir que como hay cationes de Na^+ disponibles en el medio, éstos se pegan a la superficie y por eso tenemos valores positivos, al continuar agregando NaCl se satura la superficie de contacto con los cationes de Na^+ y entonces ahora en superficie tenemos aniones, que pueden ser de Cl^- o del ácido esteárico.

Para el KCl tenemos un valor negativo que se puede deber a los aniones del ácido esteárico-Cipermetrina si es que la nanopartícula formada es del tipo de "Fármaco en la capa" término mencionado en los antecedentes, o serían de Cl^- si es que la nanopartícula formada es del tipo de reservorio en el cual el fármaco está en el centro. Al agregar KCl al medio se observa un incremento de 4 mV sin lograr un valor positivo en el potencial Z, lo que implica que los iones positivos no son suficientes para neutralizar la carga en superficie, en cambio al agregar más iones libres el ion K^+ se agrega a la partícula y se incrementa el potencial Z, y esto lo corroboramos al observar la gráfica 5.1 de tamaño de partícula en la cual se ve que al aumentar la concentración de KCl también se incrementa el valor de tamaño de partícula.

El $MgCl_2$ observamos un valor de -3.02 mV al continuar con la adición de sal se da un salto en el potencial a un valor positivo y el salto es mayor en la solución más concentrada. Para esta sal se ve que con la concentración mínima tenemos una carga en superficie negativa, la cual es neutralizada con los iones Mg^+ , por eso es que con la concentración intermedia tenemos un valor positivo, después de la adición de iones en la concentración de 4.5 M tenemos que todas las cargas negativas que había en superficie se neutralizaron y ahora solo queda cargas positivas en superficie y por eso el valor del potencial Z se incrementó.

Para el caso del $CaCl_2$ se observa la misma tendencia que para el $MgCl_2$ solo que los brincos de magnitud entre cada concentración son mayores y de hecho a la concentración de 3.7 M se observa el valor de potencial Z más alto, pero sin llegar al necesario para evitar la formación de flóculos en suspensión que es de -30 mv a $+30$ mv.

Es evidente el efecto neutralizador de las sales divalentes, ya que con concentraciones similares que las monovalentes modifican el potencial zeta de manera más significativa.

VI CONCLUSIONES

A bajas concentraciones de sal (0.1 M), todos los agentes mantienen un mismo comportamiento, obteniéndose mayor cantidad de sólidos en el intervalo menor a 220 nm.

Para obtener partículas de menor diámetro en mayor cantidad, la mejor opción es el $MgCl_2$. No obstante, si el interés es producir partículas más pequeñas aun con menor rendimiento, la mejor opción es el $NaCl$.

A medida que se incrementa la concentración de sal, la cantidad de sólidos obtenidos menores 220 nm disminuye.

El tamaño de partícula aumenta proporcionalmente con la concentración correspondiente de la sal en estudio.

El potencial Z incrementa su valor absoluto al aumentar la cantidad de sal presente.

Se observa que los valores más altos para potencial Z se obtienen con la solución más concentrada de $MgCl_2$ y $CaCl_2$.

Es evidente el efecto neutralizador de las sales divalentes, ya que con concentraciones similares que las monovalentes modifican el potencial zeta de manera más significativa.

Tomando en cuenta el potencial Z no se recomienda utilizar estas formulaciones en una suspensión puesto que se formarían agregados, pero sí se pueden utilizar las nanopartículas obtenidas en una formulación sólida.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. Bowman Dwigth, L.C.R., *Parasitology For Veterinarians*. 1995, Usa: Wb Sanders Company. 40-55.
2. Mathews, P.J., *Ticks of Veterinary Importance*, A.a.P.H.I. Services, Editor. 1999, USDA, Agriculture.
3. H., Q.R., *Parasitología y Enfermedades Parásitas de Animales Domesticos*. 1988, México: Limusa.
4. Mullen Gary, D.L., *Medical and veterinary entomology*. 5 ed. 2002, USA: ACADEMIC PRESS. 517,518,520,534,554.
5. www.zoetecnocampo.com/Documentos/garrapata.htm.
6. Daniel E. Sonenshine, R.S.L., *Veterinary Entomology*. 2 Ed. 1997, Usa: Elsevier Science. 181-186.
7. Mauricio, H., *Ganaderia Tropical*. 3 ed. 1990, Argentina: Ateneo. 330-335.
8. DANIEL E. S, R.S.L., *Veterinary Entomology*. 2 ed. 1997, USA: Elsevier Science. 181-186.
9. SAGAR, *Manual de Identificación de las Especies de Garrapatas de Importancia en México*. 1996, México.
10. Bowman Dwight, C.L.R., *Parasitology for Veterinarians*. 1995, USA: WB Sanders Company. 40-55.
11. Pinto, H., *Análisis Estadístico De Casos En Hospital Hermina Martin (Chillán) Entre 1996 Y 2001, in medicina*. 1991, Universidad Catolica de la Santisima Concepcion: Chile. p. 50.
12. Network, N.P.T., *Pirethrins & Pyrethroids* 1998.
13. Woodburn, A., *Cotton:the crop and its agrochemicals market*. 1995, Edimburgh.
14. Caliskan, M., B. Erkmen, and S.V. Yerli, *The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003. **14**(3): p. 117-120.
15. Smith, P.A., M.J. Thompson, and J.W. Edwards, *Estimating occupational exposure to the pyrethroid termiticide bifenthrin by measuring metabolites in urine*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002. **778**(1-2): p. 113-120.
16. Yanez, L., et al., *Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of Mexico*. *Environmental Research*, 2002. **88**(3): p. 174-181.
17. Yang, P.Y., et al., *Acute ingestion poisoning with insecticide formulations containing the pyrethroid permethrin, xylene, and surfactant: A review of 48 cases*. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 2002. **40**(2): p. 107-113.
18. Bloomquist, J.R. *Insecticides: Chemistries and Characteristics*. 1996 [cited; 5]. Available from: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>.
19. Altug Yavasaglu, F.S., Yigit Uyanikgil, *The Pyrethoid Cypermethrin-Induced Biochemical and Histological Alterations in Rat Liver*. *Journal of Health Science*, 2006. **52**(6): p. 774-780.
20. WHO/FAO, *Data sheets on pesticides No.58, Cypermethrin*, WHO/FAO, Editor. 1984.

21. Network, E.T. *Pesticide Information Profiles*. 1996 June 1996 [cited 11/04/07]; Available from: <http://extoxnet.orst.edu/pips/cypermet.htm>.
22. Leahey, J.P., *The Pyrethroid Insecticides*. 1985, London: Taylor & Francis,.
23. Ministry of Agriculture, F.a.F., *Pesticide Usage Survey Reports* F.a.F. Ministry of Agriculture, Editor. 1995.
24. *Agrow*. Vol. 212. 1994. 17.
25. WHO, *Recommended Classification of Pesticides of Hazard* WHO, Editor. 1995.
26. He, F., *Synthetic pyrethroids*. *Toxicology*, 1994. **91**: p. 43.
27. Criteria, E.h. *Cypermethrin*. 1989 [cited].
28. **Moya, L.d.G.**, *Toxicología médica clínica y laboral*. 1995, Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
29. García, J.L.L., *Nuevos Sistemas Orales de Liberación Modificada*, in *Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica*. 2002, Universidad Complutense de Madrid: Madrid, España.
30. Luz Maria Melgoza, L.C., *Sistemas Matriaciales de Liberación Controlada*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2002. **33**(4): p. 58-67.
31. Joseph R. Robinson, V.H.L.L., *Controlled Drug Delivery. Fundamentals and applications*. 2 ed. 1987, New York: Marcel Dekker Inc.,. 716.
32. Gennaro, A.R., *Remington Farmacia*. 19 ed. Vol. 2. 1998: Editorial Médica Panamericana, .
33. *Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros*. *Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra*, 2005. **13**(1): p. 1-9.
34. Chien., Y.W., *Drug and the Pharmaceutical Science. A series of textbooks and monographs.*, in *Novel Drug Delivery Systems*. . 1992, Marcel Dekker: New York.Basel.Hong Kong.
35. M.J. Rathbone, R.G., *Controlled release veterinary drug delivery: Biological and Pharmaceuticals Considerations*. . 2000: Elsevier.
36. Joseph R. Robinson, V.H.L.L., *Controlled Drug Delivery. Fundamentals and applications*. 2a ed. 1987: Marcel Dekker Inc.
37. Aminabhavi., K.S.S.T.M., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. *Journal of Controlled Release*, 2000. **70**: p. 1-20.
38. Rainer H. Müller, D.M., Sven Gohla. , *Solid Lipid Nanoparticles (NSL) for controlled drug delivery-a review of the state of the art*. . *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. **50**: p. 161-177.
39. S.A. Wissing, O.K., R.H. Müller, *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**: p. 1257-1272.
40. García, J.L.L., *Nuevos Sistemas de Liberación Modificada*, D.d.F.y.T. Farmacéutica, Editor. 2002, Universidad Complutense de Madrid. p. 63-71.
41. Majeti N.V., R.K., Neraj Kumar., *Polymeric Controlled Drug Delivery System: Perspective issue and opportunities*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2001. **27**(1): p. 1-30.
42. Maria Josefa Bernard Bernad, A.G.R., David Quintanar Guerrero., *Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos*. Primera Edición ed, ed. A.F. Mexicana. 2003, México. 150.
43. Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery System*. 1st ed. Vol. 1. 1994, New York: Marcel Dekker, INC. 353.

44. Kaur, I.P., Garg, A., Singla, A. K. & Aggarwal, D. , *Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **269**: p. 1-14.
45. Lasic, D.D., *Novel applications of liposomes*. Trends in Biotechnology., 1998. **16**: p. 307-321.
46. Uchegbu, I.F.V., S. P., *Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics 1998. **172**: p. 33-70.
47. David Quintanar-Guerrero, E.A., Hatem Fessi, and Erick Doelker, *Preparation Techniques and Mechanisms of Formulation of Biodegradable Nanoparticles from Performed Polymers*. Drug Development and Industry Pharmacy, 1998. **24**(12): p. 1113-1128.
48. H. Ibrahim, C.B., E. Doelker, P. Buri and R. Gurny, *Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process*. International Journal of Pharmaceutics 1992. **87**(1-3): p. 239-246.
49. E. Allémann, R.G.a.E.D., *Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size* International Journal of Pharmaceutics, 1992. **87**(1-3): p. 247-253.
50. E. Alléman, R.G.a.E.D., *Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size*. . International Journal of Pharmaceutics 1992. **87**(1-3): p. 247-253.
51. Müller-Goymann, C.C., *Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2005. **58**: p. 343-356.
52. Müller, R.H., *Colloidal Carriers For Controlled Drug Delivery and Targeting*, ed. CRC. 1991, Stuttgar.
53. Note, M.T. *Zeta Potential An Introduccion in 30 Minutes*. 2007 [cited 15 marzo 07]; Available from: [http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000734/\\$file/MRK654-01%20An%20Introduction%20to%20Zeta%20Potential%20v3.pdf](http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000734/$file/MRK654-01%20An%20Introduction%20to%20Zeta%20Potential%20v3.pdf).
54. Note, M.T. *Colloids & Zeta Potential*. 2006 [cited Marzo 2006].
55. Eric Alémann, E.D.a.R.G., *Drug Loaded Poly(Lactic Acid) Nanoparticles produced by a Reversible Salting-out Process: Purification of an Injectable Dosage Form*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1993. **39**(1): p. 13-18.
56. Govender, T., et al., *PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug*. Journal of Controlled Release, 1999. **57**(2): p. 171-185.
57. Bibby, D.C., Davies, N. M. & Tucker, I. G., *Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems*. . International Journal of Pharmaceutics, 2000. **197**: p. 1-11.
58. Duchene, D., Wouessidjewe, D. & Ponchel, G. , *Cyclodextrins and carrier systems*. . Journal of Controlled Release, 1999. **62**: p. 263-268.
59. Loftsson, T.M., M., *Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **225**: p. 15-30.
60. Singh, M., Sharma, R. & Banerjee, U. C., *Biotechnological applications of cyclodextrins*. . Biotechnology Advances, 2002. **20**: p. 341-359.

-
-
61. Duncan, R.I., L. , *Dendrimer biocompatibility and toxicity*. . Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**: p. 2215-2237.
 62. Patri, A.K., Kukowska-Latallo, J. F. & Baker, J. J. R. , *Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**: p. 2203-2214.
 63. Isabel P. Rivas Esteban, M.E.G.A., Ana I. Torres Suárez, *Influencia del Emulgente en las Características de Microcápsulas Obtenidas por Polimerización Interfacial*. Tecnología Farmacéutica.
 64. Henrik K. Frederiksen, H.G.K., Morten Pedersen, *Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalothrin—incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations*. Journal of Controlled Release, 2002. **86**: p. 243-252.
 65. Sears, Z., *Física general*. 1981, México: Editorial Aguilar.