



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**FORMACIÓN DE NANOCRISTALES EN FÁRMACOS POCO SOLUBLES EN AGUA
UTILIZANDO LAS TÉCNICAS DE HOMOGENIZACIÓN Y DEZPLAZAMIENTO DE
SOLVENTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

GEMMA MORELOS YÁÑEZ

ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO, DE MEX.

2008



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

FORMACIÓN DE NANOCRISTALES EN FÁRMACOS POCO SOLUBLES EN
AGUA UTILIZANDO LAS TÉCNICAS DE HOMOGENIZACIÓN Y
DEZPLAZAMIENTO DE SOLVENTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

GEMMA MORELOS YÁÑEZ

ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme enseñado a ser como soy ahora y por que sin su apoyo jamás hubiera logrado ser QFB.

A David Quintanar por ser parte fundamental de mi formación académica y profesional y por supuesto por ser mi asesor de tesis.

Al Técnico Rodolfo Robles por su colaboración en el uso del Microscopio Electrónico de Barrido y por enseñarme lo necesario para la obtención de las micrografías usadas en este trabajo.

A la UNAM, por ser parte de mi vida y formarme como profesional y como persona.

A Lupita, Elizabeth, Luis, Roberto, Mónica, Briza y David, chicos sin ustedes no hubiera sido tan divertido hacer este trabajo, gracias por compartirme no solo sus conocimientos sino su amistad.

A Cesar Adriana y Magali, amigos son parte importante de mi vida gracias por estar conmigo siempre.

A Santos Hernández por sus consejos y su apoyo desde que lo conocí.

A Alejandro Valdez, por darme siempre su apoyo y su amor incondicional en las buenas y en las malas y por que sin el este trabajo no se hubiera consolidado.

DEDICATORIAS

A mi esposo, Alex por ser parte fundamental de mi vida, por apoyarme en los momentos mas difíciles, por darme amor y sobre todo por ser mi media naranja, amor este trabajo es mitad tuyo así que ahora eres un veterinario y medio QFB. Te amo

A mis padres por haber aguantado todas mis locuras y rebeldias, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas y por que se que soy su consentida.

A mis hermanos Luis, Amada y Edmundo por que siempre han estado ahí para mi y porque los quiero tanto como se que ustedes me quieren a mi (aun con las bromas y los apodos).

A mis sobrinos Luis, Shamanta, Luis Aaron, Melisa, Luis Fernando, Miguel Angel, José David y Lizeth, mi vida no habría sido tan divertida y completa sin ustedes, espero que este trabajo les sirva de inspiración en su vida y que recuerden que yo siempre voy a estar ahí para ustedes.

INDICE

Lista de abreviaturas	I
Lista de figuras	II
Lista de tablas	V
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Biodisponibilidad de los principios activos poco solubles en agua.	3
2.1.1 Formulaciones de los principios activos poco solubles.	5
2.2 Partículas nanocrystalinas	5
2.2.1 Métodos de obtención de las partículas nanocrystalinas	6
2.2.1.1 Molino coloidal	6
2.2.1.2 Homogenización de alta presión	7
2.2.1.3 Irradiación de microondas y ultrasonificación	9
2.2.1.4 Nanocrystalización o nanoprecipitación	9
2.2.2 Propiedades fisicoquímicas de las suspensiones nanocrystalinas	9
2.3 Aplicación de los nanocrystalales	12
2.3.1 En formas farmacéuticas orales	12
2.3.2 En productos inyectables	12
2.4 Introducción a la cristalización en disolución	12
2.4.1 Mecanismo de formación de los cristales	12

2.4.1.1 Nucleación	13
2.4.1.2 Crecimiento cristalino	15
2.4.1.2.1 Factores que influyen en el crecimiento cristalino	19
2.4.2 Influencia de los aditivos en la cristalización	21
2.4.2.1 En la nucleación	22
2.4.2.2 En el crecimiento cristalino	23
2.4.2.3 En las características de los cristales	25
3. Objetivos	27
3.1 General	27
3.2 Particulares	27
4. Metodología	28
4.1 Materiales y Reactivos	28
4.2 Consumibles y equipos	29
4.3 Métodos	30
4.3.1 Métodos utilizados en la elaboración de la suspensión nanocrystalina por el método de homogenización	30
4.3.1.1 Preparación de la curva de calibración naproxeno/metanol	30
4.3.1.2 Preparación de la curva de calibración acetona-vainillina	31
4.3.1.3 Preparación de la solución estabilizante	31
4.3.1.4 Preparación de una suspensión nanocrystalina por el método de homogenización	32
4.3.1.5 Cuantificación del polvo seco nanocrystalizado	33

4.3.2.1 Preparación de una suspensión nanocrystalina por el método de precipitación-evaporación	33
4.3.2.2 Evaluación de los nanocrystalales	34
5. Resultados y discusión	36
5.1 Elaboración de la suspensión de nanocrystalales por homogeneización de alta velocidad (ultraturrax)	36
5.2 Optimización de la técnica de precipitación-evaporación	38
6. Conclusiones	52
7. Referencias	53
Anexo 1: Resultados de la suspensión nanocrystalina de naproxeno	58
Anexo 2: Resultados de la curva de calibración naproxeno/metanol	61
Anexo 3: Resultados de tamaño de partícula para los nanocrystalales elaborados con la técnica de evaporación-difusión	63

Lista de abreviaturas

PVAL	Polivinilalcohol
HPLC	Hight performance liquid chromatografy
C.V.	Coeficiente de variación
mg	Miligramos
ml	Mililitros
nm	nanometros
I.P.	Indice de polidispersidad
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minutos
d.e.	Desviación estándar
°C	Grados celsius
% p/v	Porcentaje peso volumen
P.A.	Principio activo
HR	Humedad relativa
mm	milímetros
μμ	micrometros
Cs	Solubilidad de saturación
fig.	Figura
ej.	ejemplo

Lista de figuras

Figura 1	Representación esquemática de un molino de medios.
Figura 2	Representación esquemática de un homogenizador de alta presión.
Figura 3	Incremento de la saturación de la solubilidad con el incremento del tamaño de partícula, ambos con un incremento de la presión de disolución y una reducción de la distancia difusional h es descrita en la ecuación de Prandtl.
Figura 4	Posibles mecanismos de la nucleación.
Figura 5	Red cristalina cúbica.
Figura 6	Hábito cúbico de un cristal.
Figura 7	Estructura del área de las superficies F (a), S (s) y K (c).
Figura 8	Partículas de aditivos adsorbidas sobre el cristal (a) en fracturas, (b) a lo largo de los escalones de crecimiento, (c) en la superficie entre escalones.
Figura 9	Preparación de nanocristales por el método de homogenización de alta velocidad
Figura 10	Preparación de nanocristales por el método de recristalización
Figura 11	Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 0.02% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.
Figura 12	Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 0.2% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.
Figura 13	Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 0.5% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.
Figura 14	Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 1.0% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo
Figura 15	Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 2.0% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo
Figura 16	Comportamiento de la talla de partícula para las suspensiones que presentaron un tamaño menor a una micra.
Figura 17	Comparación del comportamiento de la talla de partícula para los 3 P.A.
Figura 18	Estabilidad de los nanocristales de Carbamazepina
Figura 19	Micrografía de los cristales de Carbamazepina antes de ser sometidos al proceso de nanocristalización
Figura 20	Nanocristales de Carbamazepina en el tiempo inicial de la estabilidad.

Continuación de la lista de figuras

Figura 21	Forma de los nanocristales en su etapa inicial de estabilidad.
Figura 22	Micrografía de los nanocristales después de 90 días de estabilidad.
Figura 23	Termogramas de los estados polimórficos reportados para la Carbamazepina.
Figura 24	Termograma de la forma IV de la carbamazepina.
Figura 25	Termogramas de a) los cristales de carbamazepina antes del proceso de reducción de tamaño de partícula y b) nanocristales de carbamazepina después del proceso de reducción de tamaño de partícula.
Figura 26	Intensidad de pico PVAL 0.02% Concentración del activo 10mg/ml
Figura 27	Suspensión de nanocristales de naproxeno 10mg/ml con PVAL 0.2%
Figura 28	Suspensión de nanocristales de naproxeno 10mg/ml PVAL 0.5%
Figura 29	Curva de calibración naproxeno/metanol
Figura 30	Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 9)
Figura 31	Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 10)
Figura 32	Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 11)
Figura 33	Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 12).
Figura 34	Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 9)
Figura 35	Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 10)
Figura 36	Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 11)
Figura 37	Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 12)
Figura 38	Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 9)
Figura 39	Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 10)
Figura 40	Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 11)

Continuación de la lista de figuras

Figura 41	Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 12)
-----------	---

Lista de tablas

tabla 1	Curva de calibración naproxeno/metanol
tabla 2	Ciclos de dispersión para la elaboración de una nanosuspensión por el método de homogenización
Tabla 3	Resultados de tamaño de partícula para las suspensiones preparadas mediante el método de la homogenización de alta velocidad
tabla 4	Ciclos de centrifugación para las nanosuspensiones
tabla 5	Numeración de los lotes de nanocristales según los parámetros a estudiar
tabla 6	Tamaño de las suspensiones nanocristalinas de carbamazepina a través del tiempo
tabla 7	Tamaño de los nanocristales de naproxeno para la suspensión elaborada con la solución de (PVAL 0.02%)
tabla 8	Tamaño de los nanocristales de naproxeno para la suspensión elaborada con la solución 2 (PVAL 0.2%)
tabla 9	Tamaño de los nanocristales de naproxeno para la suspensión elaborada con la solución 3 (PVAL 0.5%)
tabla 10	Resultados de la curva de calibración naproxeno/metanol
tabla 11	Talla de partícula promedio para los nanocristales de naproxeno.
tabla 12	Talla de partícula promedio para los nanocristales de nifedipino.
tabla 13	Talla de partícula promedio para los nanocristales de carbamazepina.

1. Introducción^(3,4)

Los principios activos poco solubles a menudo representan un problema al momento de su formulación, especialmente cuando estos son poco solubles tanto en medios acuosos y en no acuosos.

Se estima que el 40% o más de las sustancias activas son poco solubles en agua; cuando estas moléculas son formuladas por métodos convencionales, su biodisponibilidad, la mayoría de las veces es errática y altamente variable.

Es cierto que existe un número limitado de formulaciones disponibles para compuestos que son poco solubles, la mas común es incrementar la solubilidad generando una sal a partir del compuesto en cuestión, sin embargo no todos los principios activos pueden convertirse en una sal y por ello, cuando este recurso falla, una solución es formularlos en emulsiones, microemulsiones o dispersiones sólidas. Algunas de estas formulaciones pueden ser utilizadas en fármacos potentes que requieren de una dosis mínima.

En el caso de que un principio activo sea soluble por lo menos en solventes orgánicos, se puede formular disolviéndolo en mezclas acuosas con un solvente orgánico (ej. agua/etanol). Otras tentativas de superar un problema de solubilidad es formando un complejo usando, por ejemplo, ciclodextrinas; sin embargo, estas soluciones tienen un éxito limitado como puede verse por el número relativamente bajo de productos en el mercado farmacéutico basados en estas tecnologías.

Debido a que el número de principios activos poco solubles en agua es muy alto se ha intentado mejorar el funcionamiento *in vivo* de los mismos reduciendo el tamaño de partícula del fármaco para, de esta manera, tener una mayor área superficial y por ende un incremento de la velocidad de disolución. Un método ya establecido es la micronización de la cual se obtienen polvos farmacéuticos con una distribución de tamaño desde 0,1 hasta 25 μm . En caso de que los polvos sean muy finamente molidos, los tamaños están por debajo de los 10 μm . Estos polvos micronizados se pueden utilizar para formulaciones vía de administración oral y parenteral. Sin embargo, para los compuestos con una solubilidad muy baja, especialmente aquellos en los que se requiere de una concentración mayor en sangre, la micronización no soluciona el problema. Para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos

poco solubles en agua se necesita obtener un incremento en la velocidad de disolución y esto es posible por medio de un incremento en el área superficial del polvo farmacéutico, es decir reduciendo el tamaño de las partículas al orden de nanómetros.

Existen varias metodologías para generar fármacos nanocristalizados; algunas de ellas se basan en métodos físicos, al hacer que las partículas choquen entre si o contra otros sólidos provocando una fractura del cristal de fármaco reduciendo así el tamaño particular inclusive al orden submicrónico, sin embargo uno de los principales problemas es que el tamaño de las partículas no es uniforme.

En el presente trabajo se estudió la optimización de las técnicas de dispersión a alta velocidad (rotor/estator) y la recristalización o reprecipitación por desplazamiento de solvente del principio activo, con el objetivo de disminuir el tamaño de las partículas de los principios activos (naproxeno, nifedipino y carbamazepina) mediante el control de las variables involucradas en el proceso. Lo anterior con la finalidad de lograr principios activos nanocristalizados con una talla de partícula mas pequeña y uniforme, lo cual mejora altamente su solubilidad y presenta una mejor solución al problema de la biodisponibilidad errática en principios activos poco solubles en agua.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biodisponibilidad de principios activos poco solubles en agua. ^(4, 31, 23)

Existen distintos aspectos que afectan el desarrollo de un medicamento, entre ellos se encuentran la biodisponibilidad, y la solubilidad.

Tradicionalmente, las estrategias implementadas para el mejoramiento de los tratamientos farmacoterapéuticos se han basado en la obtención de nuevos principios activos más potentes, selectivos y específicos. Sin embargo, en forma concurrente, el desarrollo de la moderna farmacotecnia, sustentada tanto en la tecnología farmacéutica como en las disciplinas farmacocinéticas/biofarmacéuticas están contribuyendo al mejor aprovechamiento de los principios activos mediante el diseño de formulaciones en las que se optimiza la efectividad, seguridad y confiabilidad, logrando aumentar el cociente beneficio/riesgo de los tratamientos.

Existen importantes grupos de fármacos que presentan propiedades físicoquímicas o biológicas desfavorables, las que comprometen su eficacia o seguridad y en consecuencia requieren nuevas estrategias de formulación para superar tales deficiencias; como ejemplos se pueden citar drogas poco solubles de biodisponibilidad errática.

La biodisponibilidad es la proporción de principio activo (fármaco o metabolito) que entra en la circulación general y que, por consiguiente, llega al lugar de acción, así como la velocidad con que ello sucede.

Mientras que las propiedades físicoquímicas de un fármaco condicionan su potencial de absorción, las propiedades de la forma farmacéutica (de su diseño y de su manufactura) son determinantes principales de su biodisponibilidad. Las diferencias en la

biodisponibilidad entre diferentes formulaciones de un mismo fármaco pueden ser clínicamente relevantes.

Cuando un fármaco se disuelve rápidamente de su formulación y traspasa las membranas con facilidad, la absorción tiende a ser completa en la mayoría de las vías de administración.

El análisis de la biodisponibilidad a partir de datos sobre la concentración plasmática respecto al tiempo suele requerir 3 medidas: la concentración plasmática máxima (pico) del fármaco, el tiempo en que aparece esta concentración máxima y el área bajo la curva concentración plasmática-tiempo.

La concentración plasmática aumenta al hacerlo la velocidad y el grado de absorción; cuando la velocidad de eliminación del fármaco equivale a la velocidad de absorción, se alcanza la concentración plasmática máxima. La biodisponibilidad errática es frecuente en formulaciones para administración oral de fármacos poco solubles en agua, que se absorben muy lentamente. Cuando la absorción es lenta o incompleta, los factores que pueden afectar la biodisponibilidad son más numerosos que cuando es rápida o completa.

Uno de los estudios de mayor interés en preformulación es el dedicado al conocimiento de la disolución del fármaco, etapa previa a su absorción. Tanto si el posible fármaco se va a incluir en una forma sólida como en una forma líquida, la disolución es un proceso que siempre se llevaría a cabo, bien después de la administración (formas sólidas), inmediatamente antes de esta (formas de disolución extemporánea) o en la etapa de fabricación (formas líquidas).

Se ha observado que los fármacos que presentan baja solubilidad en fluidos acuosos a menudo presentan una absorción baja o errática. Asimismo, las variaciones en niveles plasmáticos interindividuales e intraindividuales que se obtienen después de la administración oral suelen ser bastante frecuentes en el caso de fármacos poco

hidrosolubles. El polimorfismo, el grado de hidratación, la cristalinidad, así como el que el fármaco se presente como una u otra sal son factores que condicionan su solubilidad.

2.1.1. Formulaciones de los principios activos poco solubles. ⁽¹⁵⁾ ⁽¹²⁾ ⁽⁸⁾

Los principios activos poco solubles a menudo representan un problema en el momento de la formulación de los mismos, especialmente cuando estos son poco solubles simultáneamente en medios acuosos y en no acuosos. Los acercamientos para solucionar este problema son de éxito limitado como puede verse por el relativamente bajo número de productos en el mercado farmacéutico basados en esta tecnología. Hay por lo menos un número de productos basados en la mezcla de solventes (agua/etanol) incluyendo inyectables por ejemplo, Supertendin[®] 2000N (dexametazona/lidocaína), Adalat[®] Pro Infusione (nifedipino), Alteran[®] (mefalan), Novodigal[®] (digoxina), Dapotum[®] /-acutum (flufenazina). Los productos basados en ciclodextrinas (Cd) son, por ejemplo, Brexido[®] (piroxicam/ β -complejo Cd) tabletas o granulado, Stada[®] Reise-Pastillien (β -Cd por incorporación de 8-clorteofilina poco soluble en agua y por estabilización química de la incorporación de aceite de naranja) y Prostvasin[®] introducida en 1985, producto para la infusión intraarterial que contiene prostaglandina E1 como α -complejo Cd. Los productos basados en la mezcla micelar son muy limitados, el clásico ejemplo es el Valium MM que contiene diazepam solubilizado con lecitina (soya) y ácido glicólico.

2.2. Partículas Nanocristalinas ⁽³⁾ ⁽²²⁾

Las partículas nanocristalinas son partículas de compuestos poco solubles en agua de talla nanométrica. Las dispersiones nanocristalinas consisten agua, fármaco y estabilizante. Si requiere de otros excipientes, tales como buffer, sales y azúcares, pueden ser adicionados a la dispersión. Para muchas formulaciones nanocristalinas, la concentración del activo es de 400mg/ml o menos. La elección y concentración del estabilizante es seleccionada para promover el proceso de reducción del tamaño de partícula y generar formulaciones físicamente estables. Para ser efectivo, el estabilizante

debe ser capaz de mojar la superficie de los cristales del fármaco y de proporcionar una barrera estérica o iónica.

En ausencia del estabilizante apropiado, la alta energía superficial de las partículas nanométricas puede hacer que estas tiendan a aglomerarse o agregarse.

Una formulación nanocrystalina físicamente estable se obtiene cuando el cociente en peso del compuesto y el estabilizador es de 20:1 a 2:1. Una cantidad muy pequeña de estabilizante induce aglomeración o agregación y mucho estabilizante promueve el efecto Ostwald. El proceso de identificación de un estabilizante apropiado para un fármaco candidato es empírico y puede complicarse usando cantidades de miligramos de principio activo. Muchos excipientes farmacéuticos comúnmente utilizados tales como las celulosas, pluronics, polisorbatos y povidonas son estabilizantes aceptables para generar dispersiones nanoparticuladas físicamente estables. Algunas veces la estabilidad puede lograrse utilizando una combinación de estabilizantes no-iónicos con iónicos.

Dichas partículas pueden ser preparadas por diversos métodos como los que se explican a continuación.

2.2.1. Métodos de obtención de las partículas nanocrystalinas.

2.2.1.1. Molino coloidal⁽⁴⁾ (12)

Una alternativa para obtener nanopartículas de fármacos es el uso de las eficientes técnicas de molienda para reducir el tamaño de partícula. Las dispersiones nanocrystalinas son preparadas utilizando un proceso de molienda. La cámara de molienda es cargada con medio para molienda, que por lo general son perlas de vidrio o de óxido de zirconio, agua, fármaco y estabilizante (figura 1). Las perlas se mueven mediante agitación, la alta energía generada por las fuerzas de corte y/o las fuerzas generadas durante la impactación del medio de molienda con el fármaco, generan la fractura de los cristales del fármaco, de esta manera las micropartículas de fármaco son

reducidas hasta nanopartículas. La concentración del principio activo utilizada para este proceso es generalmente de 1 a 400 mg/ml de suspensión.

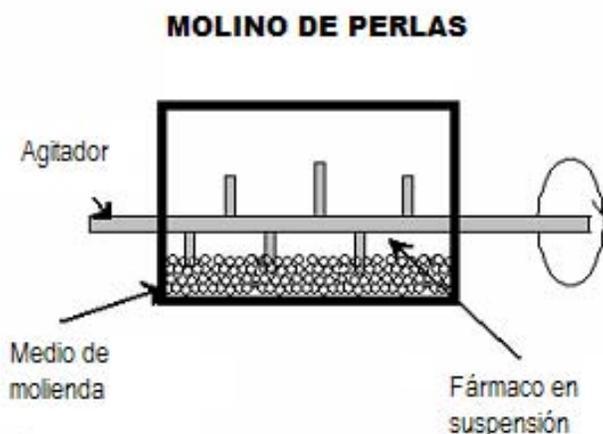


Figura 1 Representación esquemática de un molino de medios.

Este método tiene varias desventajas, por ejemplo, las perlas utilizadas por este sistema de producción de nanopartículas tienen un rango de tamaño aproximado de 0.4 mm a 3.0 mm y, como ya se había mencionado antes, son de vidrio o de óxido de zirconio, durante el proceso de molienda ocurre la erosión de las perlas provocando contaminación del producto con el material de las perlas. Desde el punto de vista químico la erosión de las partículas puede ser considerada como un proceso "no tóxico", la concentración máxima tolerada en el aire para compuestos de zirconio es de 5 mg/m³. Alternativamente las perlas de molienda pueden hacerse de un polímero duro y, dependiendo de la dureza de las partículas de fármaco y de la fineza de partícula requerida para el material, los tiempos de molienda pueden durar desde 4 horas hasta varios días.

2.2.1.2. Homogenización de alta presión.⁽¹¹⁾⁽¹⁸⁾

El tamaño inicial de los cristales del fármaco debe ser, de preferencia, lo más pequeño posible, el fármaco en suspensión es presionado a través de un pequeño hueco en un rango de tamaño de alrededor de 25 μm . El diámetro del cilindro que contiene la

suspensión del fármaco es de 3.0 cm, esto quiere decir que la suspensión es vertida de un cilindro de 3.0 cm hasta un hueco de 25 μm a una muy alta velocidad. De acuerdo con la ecuación de Bernoulli, las fuerzas de implosión (cavitación) son suficientemente altas como para desintegrar las micropartículas de fármaco hasta nanopartículas, adicionalmente existen a los efectos de desintegración hay una alta fuerza de corte y colisión de las partículas en el hueco de 25 μm . Ambos efectos de colisión son, por lo general, mas que suficientes para homogenizar suspensiones altamente concentradas (figura 2).

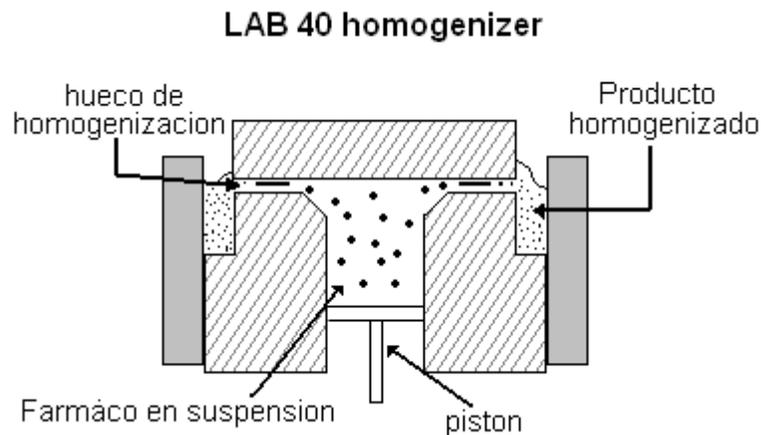


Figura 2. Representación esquemática de un homogenizador de alta presión.

Los cristales de fármaco son dispersados en una solución de surfactante mediante agitación a alta velocidad (generalmente utilizando un Ultra Turrax a 9500 rpm por un minuto) posteriormente la premezcla es "prehomogenizada" utilizando un homogenizador de alta presión (APV) aplicando presiones de 150 hasta 500 bars en por lo menos dos ciclos, y finalmente se aplican hasta 20 ciclos a 1500 bars.

La concentración de sólidos frecuentemente utilizada en suspensiones preparadas por este método es de 10 % aunque el límite de concentración de sólidos que pueden ser procesados es del 30%.

2.2.1.3. Irradiación de microondas y Ultrasonicación.⁽⁷⁾

La irradiación ultrasónica se ha vuelto una importante herramienta ya que provee de un mecanismo inusual para generar alta energía química con una extremadamente alta temperatura local y presión. Las nanopartículas se forman a partir de una suspensión o una microemulsión del fármaco que es sometida a irradiación ultrasónica, la reducción del tamaño de partícula esta dada principalmente por cavitación acústica, es decir la formación, crecimiento y colapso implosivo de burbujas en el líquido. Cuando las dispersiones son expuestas a una fuerte irradiación ultrasónica, las burbujas son implosivamente colapsadas mediante campos acústicos dentro de la dispersión, los campos de alta temperatura y alta presión son producidos en el centro de las burbujas.

2.2.1.4. Nanocrystalización o nanoprecipitación.

El método de nanoprecipitación representa una técnica fácil y reproducible, el método esta basado en la deposición interfacial de un polímero seguido del desplazamiento de un solvente semipolar miscible en agua.

El principio activo se disuelve en un solvente polar o semipolar y se controla la cristalización mediante el desplazamiento de solvente con una solución acuosa de algún estabilizante.

La cristalización y tamaño de los cristales depende de varios factores entre los cuales esta la velocidad de agitación, el tipo de solvente, la temperatura del proceso, el tiempo de desplazamiento del solvente y el tipo de estabilizante. Adicionalmente también depende de las propiedades intrínsecas del material que se quiere nanocrystalizar.

2.2.2. Propiedades fisicoquímicas de las suspensiones nanocrystalinas.⁽³³⁾

La reducción en el tamaño de partícula incrementa el área superficial y, en consecuencia la velocidad de disolución dc/dt de acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney. Sin embargo la transferencia de las micropartículas de fármaco a nanopartículas no solo incrementa la velocidad de solución sino también la solubilidad de saturación C_s .

De primera vista el incremento de la solubilidad de saturación suena sorprendente porque en los libros de texto la solubilidad de saturación es descrita como una constante dependiente de la temperatura. Sin embargo la solubilidad de saturación depende también del tamaño de partícula. Los principios activos normalmente procesados en farmacia tienen un rango de tamaño en el cual ocurre esta dependencia, las partículas necesitan estar por debajo de 1-2 μm para que se logre este efecto. Un paso para incrementar la velocidad de disolución intrínseca es reportado para partículas menores de 1 μm , esta se explica mediante la ecuación de Kelvin que describe la presión de vapor sobre la superficie de una gota líquida como una función del grado de la curvatura de la superficie. La presión de vapor aumenta con el grado creciente de curvatura. Esta situación de la interfase líquido/gas puede ser transferida a una interfase sólido/líquido, esto es, a la disolución de una partícula de fármaco. La presión del vapor se reemplaza entonces por la presión de disolución.

De acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney la velocidad de disolución depende de la diferencia de $C_s - C_x$ y también de la distancia difusional h (C_x – concentración presente en el volumen).

De acuerdo con la ecuación de Prandtl la distancia difusional es reducida con tamaños de partícula muy pequeños (fig. 3). Adicionalmente para el incremento en C_s , la depresión en h es un efecto extra sobre la velocidad de disolución.

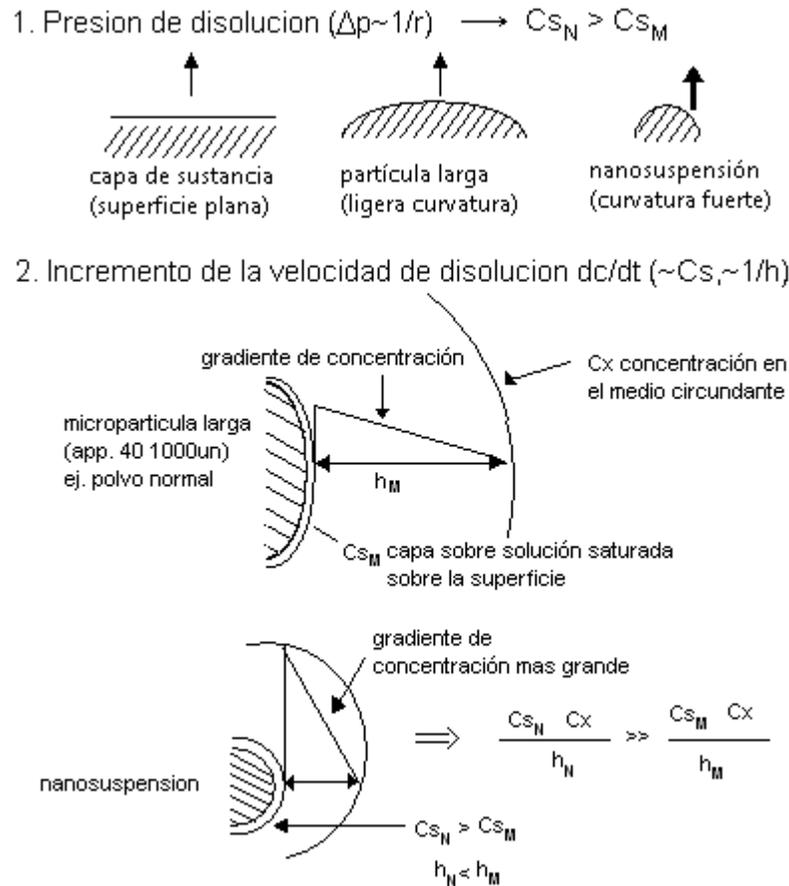


Figura 3. Incremento de la saturación de la solubilidad con el incremento del tamaño de partícula, ambos con un incremento de la presión de disolución (arriba) y una reducción de la distancia difusional h es descrita en la ecuación de Prandtl (abajo).

Las nanopartículas en general poseen una alta adhesividad a las superficies. Después de una administración oral de partículas poliméricas estas se encuentran adheridas a la mucosa del tracto gastrointestinal. Lo mismo pasa con las nanopartículas de fármaco, esto quiere decir que se incrementa la biodisponibilidad y se reduce la adsorción errática.

2.3. Aplicación de los nanocristales.

2.3.1. Aplicación en formas farmacéuticas orales.

Las nanosuspensiones acuosas pueden ser utilizadas directamente como formas farmacéuticas líquidas. En caso de insuficiente estabilidad física o por razones de conveniencia o de aceptación en el mercado, las nanosuspensiones pueden ser formuladas como formas farmacéuticas secas (polvos) en tabletas o en cápsulas de gelatina dura. También pueden ser utilizadas directamente en los procesos de granulación o como agente húmedo para la preparación de pellets o incorporando las nanopartículas dentro de estos, alternativamente los pellets pueden ser producidos rociando la nanosuspensión por toda la superficie "spray coating". Los granulados pueden ser producidos mediante spray-drying con la nanosuspensión aunque para este proceso es necesario disolver el material acarreador (ej. Azúcares como el manitol) en la fase acuosa de la nanosuspensión.

2.3.2. Aplicación para productos inyectables.

Las nanosuspensiones son especialmente útiles en la preparación de formas de administración parenterales. El tamaño de partícula permite administrar fármacos poco solubles en agua, vía intraarticular e intraperitoneal e incluso intravenosa si el contenido de micropartículas es suficientemente bajo especialmente aquellas que pudieran taponar los capilares sanguíneos (5-6 μm) aunque para evitarlo solo se tiene que pasar la nanosuspensión por un filtro de 5 μm .

2.4. Introducción a la cristalización en disolución.

2.4.1. Mecanismo de formación de los cristales.

La cristalización es un proceso en el que se realiza un cambio de fase, pasando de un sistema en estado de desequilibrio (desde disolución, estado fundido etc.) al estado de equilibrio. En este proceso, el sistema incrementa el orden ya que pasa de un sistema

relativamente desordenado (la disolución) a un sistema mucho más ordenado (el cristal).

La teoría actual sobre la formación de cristales admite que éstos se forman a través de dos etapas claramente diferenciadas, la nucleación y el crecimiento cristalino.

2.4.1.1. Nucleación.

Está reportado que en muchos sistemas el cambio de fase no empieza en el momento en que es termodinámicamente posible (cuando el sistema está sobresaturado), sino en condiciones que frecuentemente sobrepasan el equilibrio. Las disoluciones acuosas de casi todas las sales solubles son estables a concentraciones que superan significativamente las concentraciones correspondientes al equilibrio.

La estabilidad aparente del sistema en condiciones alejadas del equilibrio se debe a que el comienzo del cambio de fase viene condicionado por la formación de los clusters de la nueva fase en el sistema, es decir, por la llamada nucleación. Si por cualquier razón la nucleación no tiene lugar, aunque ello sea posible desde el punto de vista termodinámico, el sistema se comporta como estable.

La nucleación es la formación de amontonamientos de átomos, moléculas o iones que constituyen el paso de una fase cristalina en pequeñas zonas separadas en el interior de una fase líquida. Estos amontonamientos formados por distintas cantidades de partículas se llaman clusters. Posteriormente, algunos de los clusters formados crecen y aumentan su volumen, mientras que otros se desmoronan. Cuando un cluster alcanza una determinada dimensión crítica, entonces, inevitablemente aumenta su volumen en una solución sobresaturada, y con el tiempo alcanza una dimensión macroscópica. Puesto que solo una parte de los clusters alcanza una dimensión macroscópica (la otra parte se desmorona), la velocidad del cambio de fase depende del número de clusters capaces de crecer macroscópicamente que se forman por unidad de volumen por unidad de tiempo. Esta magnitud se llama "velocidad de nucleación". La finalidad de la teoría de la nucleación es encontrar una relación que exprese la velocidad de la

nucleación en función del tiempo, de las propiedades del sistema en cuestión y de las condiciones bajo las cuales ocurre el cambio de fase.

La descripción teórica de la nucleación depende del mecanismo por el cual los clusters de la nueva fase se originan. Los posibles mecanismos de nucleación se pueden dividir en primaria y secundaria, y a la vez la primaria se subdivide en homogénea y heterogénea y la secundaria en falsa y verdadera (figura 4).

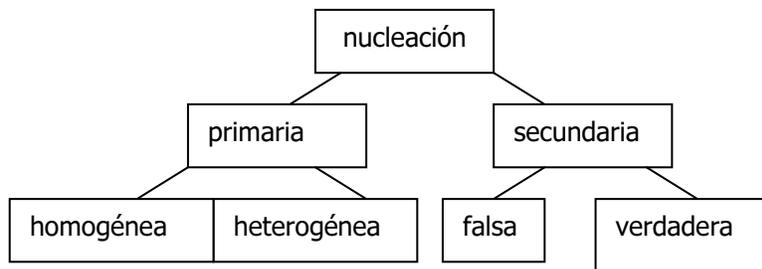


Figura 4. Posibles mecanismos de la nucleación.

a) Nucleación primaria.

La nucleación primaria es aquella en la que el origen de la nueva fase sólida no está condicionada ni influida por la presencia de la fase sólida que se origina. Se trata por ejemplo de la nucleación de una fase sólida en una disolución completamente limpia, esto es, una disolución libre de cualquier clase de partículas de la fase sólida, o bien en una disolución que contenga únicamente partículas extrañas a la fase que se forma. De acuerdo con esto, dependiendo si las partículas extrañas a la fase sólida influyen o no, se distinguen dos mecanismos de nucleación primaria: la homogénea (en la que no influyen las partículas de la fase en donde se lleva a cabo la nucleación) y la heterogénea (en donde dichas partículas juegan un papel fundamental al actuar como catalizadores).

Según el modelo de Farkas (1927), Becker y Döring (1935), y Volmer (1939)⁽⁵⁾, en una disolución sobresaturada se forman espontáneamente clusters de distinto tamaño y el amontonamiento de átomos o de moléculas de la nueva fase (cluster) se produce a través de choques graduales de los correspondientes átomos o moléculas individuales, primero entre ellos y mas tarde con los clusters ya formados. La unión y desunión de cada uno de los átomos ocurre como un proceso casual.

b) Nucleación secundaria.

La nucleación secundaria designa aquel proceso de formación de cristales de la nueva fase que esta condicionado por la presencia de partículas de la misma fase en el sistema sobresaturado y por cuya causa ocurre.

2.4.1.2. Crecimiento cristalino.

Los clusters de dimensiones críticas originados en el sistema por medio de la nucleación son demasiado pequeños para poder ser detectados por métodos experimentales. Sin embargo debido a que estas partículas se encuentran en un sistema sobresaturado, se pueden unir a ellas otras unidades constructivas, y con ello aumentan su volumen, o sea, crecen. Como consecuencia del crecimiento de los clusters, con el tiempo aparecen pequeños cristales en el sistema.

Los cristales más grandes que están en contacto con la disolución sobresaturada se comportan de forma similar. Las unidades constructivas que se unen al cristal aumentan el volumen de éste, salvo que el proceso se vea impedido por razones específicas, como la presencia de impurezas. Así un cristal en contacto sobre una fase sobresaturada crece.

Los cristales están formados por un medio periódico, esto es, los iones, átomos o moléculas que lo constituyen se encuentran en posiciones del espacio exactamente definidas y que se repiten periódicamente. Si tomamos una partícula elemental de la red y la unimos con los puntos idénticos más cercanos que se encuentran en tres

direcciones del espacio diferentes, obtenemos las aristas a_0 , b_0 y c_0 de la celda de la red cristalina (ver figura 5).

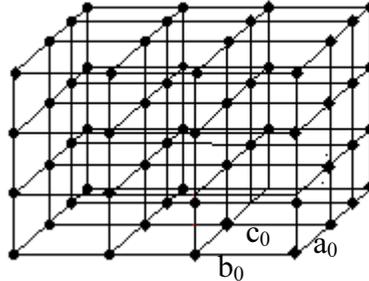


Figura 5. Red cristalina cúbica.

Los paralelepípedos de la celda básica unidos entre sí forman toda la red, en la que, en cualquier dirección para determinadas distancias, se van repitiendo periódicamente las mismas partículas elementales. Cuando un cristal crece libremente, está delimitado por caras, aristas y vértices.

Dependiendo de la relación de los parámetros $a_0:b_0:c_0$ y las dimensiones de los ángulos entre los ejes, podemos clasificar todos los cristales en seis sistemas cristalográficos: Triclínicos, Monoclínicos, Rómbico, Hexagonal, Tetragonal y Cúbico.

Una misma sustancia puede adquirir hábitos diferentes dependiendo de las condiciones de su formación. Durante el crecimiento del cristal, las caras se desplazan en dirección a la perpendicular que va desde el centro del cristal hacia la superficie. La velocidad de crecimiento de la cara depende sobre todo de la sobresaturación de la fase vecina con la que está en contacto.

Las caras de un cristal con igual dirección cristalográfica crecen a igual velocidad, mientras que las de dirección distinta pueden crecer a otra velocidad. El cristal está

limitado generalmente por las caras que crecen más lentamente, debido a que las que crecen rápidamente desaparecen durante el crecimiento. Según la ley de Bravais⁽⁵⁾, las superficies que crecen despacio son las de mayor densidad reticular, esto es, las superficies con mayor presencia de partículas elementales por unidad de superficie. Las caras con menor densidad reticular tienen tendencia a crecer más rápido.

La forma de equilibrio del cristal, que se forma a una velocidad de crecimiento muy lenta, es, de entre todas las formas posibles, la de menor energía. Las caras en equilibrio son, en su mayoría lisas, sin desigualdades superficiales. A diferencia de las caras en equilibrio, las llamadas superficies de crecimiento sí tienen imperfecciones. Las caras de crecimiento tienen una velocidad de crecimiento mayor que las caras en equilibrio, y desaparecen del cristal durante el crecimiento (ver fig. 6).

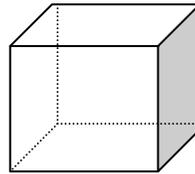


Figura 6. Hábito cúbico de un cristal.

Cada superficie del cristal puede incluirse según su estructura en alguna de las tres siguientes categorías: lisas (flat faces, F), escalonadas (stepped, S) o fragmentadas (kinked, K) (ver figura 7.).

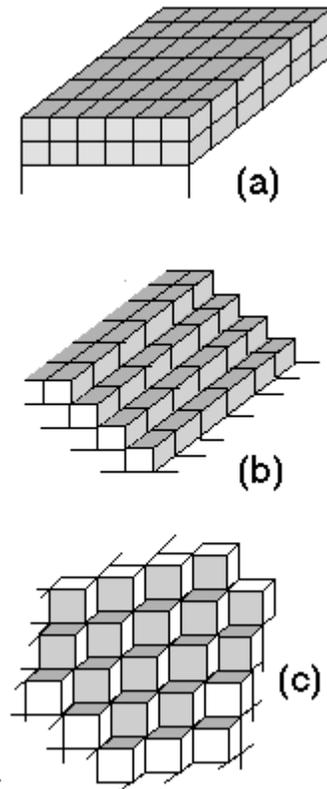


Figura 7. Estructura del área de las superficies F (a), S (s) y K (c).

Como las superficies S y K crecen rápidamente y desaparecen del cristal, la teoría del crecimiento de los cristales tiene que centrarse en el mecanismo de crecimiento de las superficies lisas, por las que en su mayoría están limitados.

c) Crecimiento por el mecanismo de nucleación bidimensional.

Durante el movimiento de las unidades constructivas en la capa de adsorción se producen choques con la superficie del cristal (suponemos una superficie F). Con la

sucesión de choque inelásticos, se originan amontonamientos de unidades constructivas que llamamos clusters bidimensionales, debido a que sus dos dimensiones, anchura y longitud, superan en mucho a la altura, por lo que esta última se puede despreciar.

Así, continuamente se forman y destruyen núcleos bidimensionales de distinto tamaño en la capa de adsorción. Esta capa contiene unidades de construcción (moléculas o átomos de soluto) en concentraciones que son iguales a la concentración de la disolución sobresaturada con la que el cristal está en contacto.

Los núcleos ven esta concentración ya sea como subsaturada o como sobresaturada, dependiendo de su tamaño. Los núcleos con un tamaño menor que cierto valor ven esta concentración como subsaturada, mientras que los mayores la ven como sobresaturada. El tamaño del núcleo al cual cambia esa impresión se denomina *tamaño crítico*.

El mecanismo de crecimiento descrito, llamado mecanismo mononuclear, puede aplicarse tanto a cristales muy pequeños como a cristales sin dislocación, principalmente a altas sobresaturaciones. La velocidad de crecimiento del cristal por medio del mecanismo mononuclear depende de su tamaño, y aumenta al hacerlo las dimensiones del cristal.

El germen crítico formado en la superficie del cristal no tiene porque crecer hasta formar una capa cristalina completa antes que se forme otro germen. Los nuevos clusters pueden formarse en la superficie de la capa aún no terminada, y originar otra capa en el tiempo en que la capa inferior no está terminada. Este mecanismo de crecimiento cristalino se llama *Mecanismo polinuclear*.

2.4.1.2.1. Factores que influyen en el crecimiento cristalino.

Las ecuaciones teóricas describen la velocidad de crecimiento de los cristales están basadas en la suposición de que el crecimiento ocurre en un sistema binario que no contiene impurezas, y que no actúa sobre el ninguna influencia externa. En tal caso la velocidad de crecimiento cristalino debería ser, según la teoría, una función bien

definida de la sobresaturación. Los cristales de la misma sustancia en contacto con una disolución sobresaturada deberían crecer, en idénticas condiciones, a igual velocidad. Esta es la afirmación de la esencia de la llamada "ley ΔL ", formulada por Mc-Cabe en el año 1929⁽⁵⁾.

Sin embargo, en cristales reales, la validez de la ley de Mc Cabe es discutible, la misma cara de distintos cristales de la misma sustancia puede crecer en idénticas condiciones (temperatura, sobresaturación etc.) a velocidades diferentes. Queda así claro que dicha ley no tiene validez general, y que por tanto, no se trata de una ley, sino más bien de una regla.

Las superficies cristalinas en crecimiento se comportan de forma parecida, variando su velocidad instantánea de crecimiento con el tiempo.

La dispersión de las velocidades medias, y también las variaciones de la velocidad instantánea de crecimiento, no se detectan para los cristales de cualquier sustancia en cualquier condición. Sin embargo, estos fenómenos son tan frecuentes que en ningún caso se trata de excepciones. La variación de la velocidad de crecimiento de una misma cara en diferentes cristales es una consecuencia de la diferencia de estructura de la dislocación de cada una de las superficies. Un número grande de dislocaciones activas en la superficie produce un crecimiento más rápido que el de una superficie donde el número de dislocaciones es menor. Análogamente, las principales causas de las variaciones de la velocidad instantánea de crecimiento de la superficie son los cambios de la estructura de la dislocación durante el crecimiento.

La aparición de nuevas dislocaciones conduce al aumento de la velocidad de crecimiento, mientras que su desaparición da lugar al descenso de dicha velocidad, llegando a veces incluso a la paralización completa del crecimiento. La dispersión y las variaciones de la velocidad de crecimiento ocurren por lo tanto en cristales cuyo crecimiento está dirigido, para condiciones dadas, por el mecanismo de crecimiento a través de dislocación helicoidal. Si el crecimiento de los cristales está dirigido por

procesos de difusión, sólo se puede producir una variación poco importante de la velocidad como consecuencia de una perturbación de la capa de difusión en los alrededores del cristal, debida por ejemplo a colisiones entre los cristales.

La presencia de impurezas, los factores hidrodinámicos y la temperatura del sistema influyen apreciablemente en el crecimiento de los cristales.

Así, entre los factores hidrodinámicos se observa que al aumentar la sobresaturación, aumenta también la influencia de la velocidad de flujo de la disolución sobre la velocidad del crecimiento del cristal. Sin embargo, esta influencia se manifiesta de tal forma que a partir de un determinado valor de la velocidad de flujo, aún cuando ésta aumente, la velocidad de crecimiento cristalino ya no cambia, alcanzando así la llamada velocidad límite de crecimiento del cristal.

2.4.2. Influencia de los aditivos en la cristalización.

Entre los muchos factores que afectan al proceso de cristalización, el más importante es quizás la presencia de aditivos. Frecuentemente, aditivos en concentraciones insignificantes cambian la velocidad de nucleación y de crecimiento, el tamaño y la morfología de los cristales formados, así como las propiedades físicas del producto.

Hasta ahora no se ha estudiado suficientemente de forma teórica la influencia de los aditivos en la cristalización. De forma general, se supone que aditivos distintos pueden actuar a través de mecanismos diferentes. Algunos aditivos se adsorben selectivamente en determinadas superficies cristalinas y bloquean los lugares activos de crecimiento (escalón y fractura), mientras que otros pueden cambiar la solubilidad de la sustancia, las propiedades de la disolución o las capas de adsorción en la superficie del cristal en crecimiento. Los aditivos con un determinado grado de semejanza con la sustancia que cristaliza se incorporan al volumen del cristal en crecimiento. En otros casos, pueden producirse interacciones químicas entre la sustancia que cristaliza y los aditivos.

La concentración de aditivo necesaria para alcanzar un determinado grado de influencia en la cristalización es, en cada uno de los casos muy diferente. Como macroaditivo consideramos el compuesto cuya concentración más alta es comparable a la concentración de la sustancia que cristaliza, o es un orden menor que ella.

El microaditivo causa el mismo efecto a una concentración menor en dos o más órdenes que la concentración de la sustancia que cristaliza.

Los aditivos se pueden dividir a grandes rasgos en los siguientes grupos:

- a) ácidos o bases libres que cambian el pH de la disolución que cristaliza.
- b) aditivos inorgánicos que se pueden dividir, de acuerdo con su acción, en altamente y poco activos. Entre los altamente activos se encuentran los cationes multivalentes de metales y algunos aniones (Fe^{3+} Cr^{3+} Pb^{2+} WO_4^{2-} y PO_4^{3-}), que son efectivos en cantidades en peso de 0,001 a 0,1%. Los aditivos poco activos requieren una concentración en peso que va desde 1 hasta un 10%.
- c) aditivos orgánicos, entre ellos sustancias superficialmente activas y colorantes orgánicos que son efectivos en cantidades de 10^{-4} hasta 10^{-6} moles por mol de la sustancia que cristaliza.

2.4.2.1. Influencia de los aditivos en la nucleación.

La velocidad de nucleación puede estar influida por la presencia de aditivos, como lo demuestra, por ejemplo la ampliación del área metaestable de las disoluciones acuosas en presencia de algunas sustancias. Cuando la nucleación ocurre por el mecanismo homogéneo, debido a que el aditivo se adsorbe en la superficie de los clusters en formación con una dimensión por debajo de la crítica, se retrasa el crecimiento de estos clusters. Si los clusters con una dimensión por debajo de la crítica (que no son estables) no pueden alcanzar la dimensión crítica a una velocidad suficientemente rápida, entonces se incrementa la probabilidad de su desintegración. La inhibición del crecimiento hace descender al mismo tiempo el número de clusters que llegan por

unidad de tiempo a la dimensión crítica. Ambos procesos tienen como consecuencia el descenso de la velocidad de nucleación.

En la nucleación heterogénea, se produce una interacción entre el aditivo y la fase sólida ajena que sirve como nucleante heterogéneo para la formación del germen de la nueva fase. El aditivo disminuye la concentración de moléculas de la sustancia que está en nucleación en la superficie del nucleante heterogénea y al mismo tiempo hace cambiar la tensión superficial entre una de las fases. Con esto, el efecto catalítico de la fase sólida extraña en la nucleación disminuye, y se produce un descenso de la velocidad de formación de los clusters de la nueva fase en la superficie del nucleante heterogéneo. Esto queda reflejado por la disminución de la velocidad total de nucleación heterogénea. Sin embargo algunos aditivos específicos, como por ejemplo los polímeros orgánicos, pueden también servir como soporte para el origen de los clusters de la nueva fase sólida. En tal caso, se produce un incremento de la nucleación heterogénea.

La presencia de aditivos puede igualmente influir, en la mayoría de los casos, disminuyendo la velocidad de nucleación secundaria. Un aditivo efectivo retarda el crecimiento. Por ello, los clusters secundarios originados alcanzan la dimensión de los cristales en un tiempo más largo que en un sistema sin impurezas, lo cual tiene como consecuencia una disminución de la velocidad de nucleación.

2.4.2.2. Influencia de los aditivos en el crecimiento cristalino.

Debido a la diferencia de estructuras y a aspectos energéticos propios de cada uno de los tipos de superficies del cristal, las velocidades de crecimiento de éstas en una disolución pura son diferentes. Por ello, el aditivo también afecta la velocidad de crecimiento de cada una de las caras de forma diferente. Los aditivos generalmente reducen la velocidad de crecimiento del cristal, debido a que se adsorben en la superficie del mismo. Las moléculas (átomos) del aditivo por lo general se pueden adsorber en la fractura del escalón de crecimiento, a lo largo del mismo, o en la superficie entre escalones (ver figura 8).

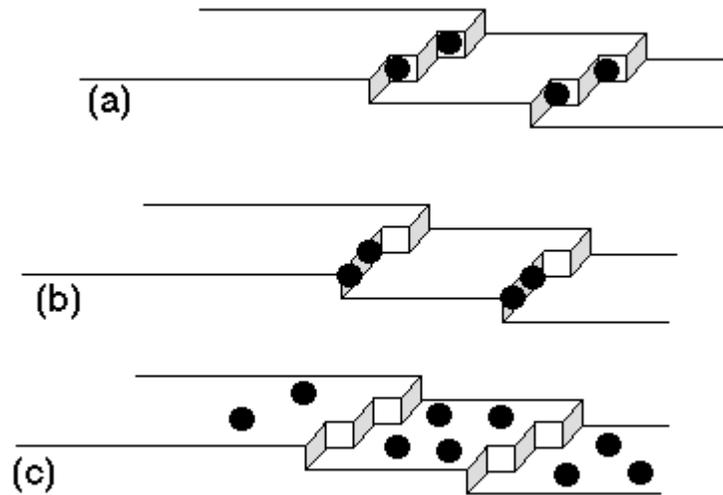


Figura 8. Partículas de aditivos adsorbidas sobre el cristal (a) en fracturas, (b) a lo largo de los escalones de crecimiento, (c) en la superficie entre escalones.

Los aditivos se pueden clasificar en fuerte y débilmente adsorbibles. Los aditivos débilmente adsorbibles se enlazan a la superficie del cristal mediante fuerzas físicas, mientras que los aditivos fuertemente adsorbibles se enlazan mediante adsorción química.

Las moléculas o los átomos de los aditivos fuertemente adsorbibles se hallan sólidamente enlazadas en la superficie de cristal, y son por ello inmóviles. Si un escalón de crecimiento que se mueve choca con un aditivo de este tipo, el frente del escalón se deforma, y después de cierto avance, durante el cual se conserva la deformación, el frente acaba englobando a la partícula y sigue avanzando igual que antes. Si el escalón choca al mismo tiempo con varias unidades de aditivo, su comportamiento posterior depende de la distancia entre cada una de las unidades de aditivo. Si esta distancia es mayor que el diámetro del germen crítico bidimensional en las concentraciones dadas, el escalón originalmente plano se convierte en una serie de fragmentos curvados, que a continuación crecerán independientemente. De esta forma el crecimiento del escalón se ve retrasado, aunque después de cierto avance también acabará englobando a todas las partículas, y el frente avanzará igual que al principio. Así las unidades de aditivo se

incorporan al cristal como consecuencia del movimiento continuo del escalón. Sin embargo a la superficie del cristal llegan desde el volumen de la disolución otras unidades de aditivo, y el proceso se repite nuevamente. Cuando la distancia entre las unidades de aditivo es menor que el germen crítico bidimensional el movimiento del escalón se detiene completamente. Sin embargo, después de cierto tiempo, también las unidades de aditivo fuertemente adsorbible se desadsorben, y el movimiento del escalón puede proseguir.

Las unidades de aditivo débilmente adsorbidas en la superficie del cristal permanecen en este estado solo durante corto tiempo, hasta que se desadsorben. Los aditivos bloquean parte de los lugares de crecimiento del cristal (fracturas en el escalón), a consecuencia de lo cual se produce una disminución de la velocidad de movimiento del escalón así como de la velocidad total de crecimiento de la superficie del cristal. Si el crecimiento es lo suficientemente lento y la concentración del aditivo no es demasiado grande, se establece el equilibrio de adsorción en la superficie en crecimiento (las velocidades de adsorción y de desadsorción de las unidades de aditivo son iguales), lo cual significa que la cantidad de aditivo adsorbido por unidad de superficie no cambia con el tiempo.

2.4.2.3. Influencia de los aditivos en las características de los cristales.

Además de los cambios hasta ahora discutidos de la cinética de nucleación y de crecimiento de los cristales, la presencia de aditivos puede también variar la forma de los cristales, la fase cristalina que se origina y el grado de aglomeración de los cristales.

La forma de los cristales originados puede variar notablemente por la acción de los aditivos activos. Puesto que la forma de los cristales está condicionada por la velocidad de crecimiento de cada una de las caras, el cambio de hábito es únicamente posible si cambia la velocidad relativa de crecimiento de una cara respecto a otra. Debido a la adsorción selectiva de los aditivos en algunos tipos de caras, se produce una modificación de su velocidad de crecimiento, y con ello también del hábito del cristal.

La presencia de aditivos puede cambiar también la fase cristalina que se origina. El grado de agregación de los cristales formados puede depender igualmente de la concentración y del tipo de aditivo presente.

Uno de los mecanismos de acción del aditivo sobre la agregación consiste, por supuesto, en el cambio del potencial de la doble capa eléctrica del cristal. El cambio de potencial puede causar el descenso o el aumento de las fuerzas de repulsión entre los cristales, que tienen después una tendencia más fuerte, ya sea a amontonarse o a permanecer como partículas separadas.

Los aditivos pueden por tanto afectar a las propiedades tecnológicas de la suspensión cristalina preparada, propiedades como las reológicas, la capacidad para ser filtrada, la capacidad de ser bombeada, etc.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Uso potencial de las técnicas dispersión de alta velocidad (rotor/estator) y de desplazamiento de solvente para la obtención de suspensiones nanocristalinas de diferentes fármacos poco solubles en agua, evaluando las variables que intervienen en el proceso.

Objetivos particulares.

- a. Preparar suspensiones nanocristalinas utilizando, diferentes fármacos y estabilizantes mediante el método de recristalización por desplazamiento de solvente.
- b. Determinar y evaluar las variables que intervienen en el proceso de formación de nanocristales por los métodos en estudio.
- c. Caracterizar los nanocristales obtenidos con base en su morfología y tamaño de partícula.
- d. Evaluar la estabilidad de las suspensiones elaboradas por ambas técnicas.

4. Metodología

En este proyecto se utilizan dos técnicas para lograr una nanocrystalización estable de fármacos poco solubles en agua.

La primera parte consiste en utilizar la energía interparticular generada por homogenización a alta velocidad, mediante el uso de una propela de corte de tal manera que se conjunten la fuerza de corte y la energía generada por el choque de los cristales en la suspensión.

La segunda parte consiste en generar los nanocristales por medio de la nanocrystalización o nanoprecipitación utilizando la técnica desplazamiento de solvente que consiste en solubilizar el fármaco en un solvente orgánico miscible en agua para posteriormente sustituir dicho solvente desplazándolo mediante la evaporación en un medio acuoso con el objetivo de controlar la formación de cristales en un tamaño nanométrico, los puntos críticos de este proceso es el control de la evaporación por medio de la temperatura y la agitación para lograr una nanosuspensión estable.

En ambos procesos es de vital importancia que la solución acuosa contenga un agente estabilizante que por medio de la modificación y control de la tensión superficial evite la aglomeración de los nanocristales logrando que la dispersión de los cristales sea estable por mas tiempo.

4.1 Materiales y reactivos

Principios activos.

- a) Naproxeno base
- b) Nifedipino
- c) Carbamazepina

Estabilizantes

- a) Alcohol polivinílico (PVAL)
- b) Tween 80 (ICI surfactants, Estados Unidos)

Reactivos en general

- a) Acetona, grado HPLC, Aldrich; Estados Unidos)
- b) Agua destilada obtenida de un equipo Rios Millipore
- c) Vainillina
- d) Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M

4.2 Consumibles y equipo

- a) Filtros Millex GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.22 μm (Millipore)
- b) Membranas de Nitrato de Celulosa de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.1 μm (Advantec MFS)
- c) Membranas de Policarbonato de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.1 μm (Millipore)
- d) Manguera Master Flex Norprene 6402-13
- e) Potafiltros de teflón Millipore de 2.5 cm de diámetro con adaptador para jeringa
- f) Potafiltros de teflón Millipore de 1 cm de diámetro con adaptador para jeringa
- g) Termómetro de vidrio Brannan de -20 a 110°C
- h) Agitador de velocidad variable RZR-1 (Caframo, Canada)
- i) Ultra Turrax T-50 (IKA, Alemania)
- j) Ultra Turrax T-25 (IKA, Alemania)
- k) Rotavapor Loborota 4000 (Heidolph, Alemania)
- l) Liofilizadora de mesa (Labconco, E.U)
- m) Ultracentrífuga Optima LE-80K (Beckman, E.U)
- n) Ultrasonicador (Branson 3200, Estados Unidos)
- o) Recirculador de líquidos con termostato (VWR Scientific, E.U)
- p) Nanosizer Coulter N4 Plus (Beckman, E.U)
- q) Espectrofotómetro DU -64 (Varian, Australia)
- r) Balanza analítica BBC32 (Boeco, Alemania)
- s) Parrilla Eléctrica con agitación Cimarec (Thermoline, E.U)
- t) Agitador Magnético Magnestir (Lab-line Instruments, Italia)
- u) Microscopio electrónico de barrido JSM-25 S II (JEOL JMS-25SII, Japón)

- v) Campana para recubrimiento con Oro JFC-1100 (JEOL, Japón)
- w) Bomba peristáltica Master Flex L/S modelo 7518, 6-600 rpm (Cole Palmer, E.U)
- x) Calorímetro Diferencial de Barrido DSC Q10 (TA Instruments, Canada)
- y) Material de cristalería

4.3 Métodos

4.3.1 Metodos utilizados en la elaboración de la suspensión nanocrystalina por el método de homogenización

4.3.1.1 Preparación de la curva de calibración naproxen/metanol

1. Se preparó una solución stock de concentración 52 μ /ml.
2. Con una pipeta volumétrica se tomaron los mililitros indicados en la tabla 1 y se llevaron a 10ml en un matraz de aforo.

Volumen de solución stock. (ml)	Concentración teórica. (μ g/ml).
1.0	5.32
0.8	4.26
0.6	3.19
0.4	2.13
0.2	1.06

Tabla 1. Curva de calibración naproxen/metanol

3. Se tomó una alícuota de la solución mas concentrada (5.32 μ g/ml) y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 200nm a 400nm.

4. Una vez obtenida la longitud de onda óptima, se tomó una alícuota de cada una de las soluciones y se leyó en el espectrofotómetro.
5. Con los datos obtenidos se realizaron los cálculos estadísticos y matemáticos correspondientes para obtener la curva de calibración.

4.3.1.2 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN ACETONA-VAINILLINA

Espectros de Absorción:

Se determina longitud de onda (λ) de máxima absorción para el Acetona mediante una reacción con una solución alcalina de vainillina al 1% p/v. Se realizó un barrido de 300 a 500 nm, obteniéndose el pico de absorción máxima a los 430 nm. El valor calculado de la ley de Beer se encontró en un rango de 0.5 a 5 ppm de acetona en agua. La absorptividad molar y la sensibilidad de Sandell's fue encontrada de $11 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $0.005 \mu\text{g cm}^{-2}$ respectivamente.

Curva de Calibración:

Una alícuota de una solución conteniendo 5-50 μg de acetona fue colocada en un matraz volumétrico de 10ml, a esta solución de vainillina seguido de 1ml de NaOH 1M. El matraz es llevado al volumen de aforo con agua destilada y se coloca en baño María a 40°C por 10 min.

La curva de calibración para el complejo acetona-vainillina, se preparó por sextuplicado, con 6 diferentes concentraciones leyéndose a $\lambda=430 \text{ nm}$.

4.3.1.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTABILIZANTE

Se pesó la cantidad requerida de surfactante para 100 ml se solución, se agregó agua destilada y se sometió a agitación mecánica hasta disolución total, finalmente se pasó la solución por un papel filtro y se guardó en un recipiente con cierre hermético.

4.3.1.4 Preparación de una suspensión nanocrystalina por el método de homogenización

Se adicionó 1 gramo de Naproxeno base a 100 ml de solución estabilizante y se sometió a una agitación de alta velocidad con un Ultra Turrax T50 con rotor/estator ultrafino con los siguientes ciclos de dispersión:

Tiempo	velocidad
10	4000
10	5200
10	6400
10	7600
10	8800
20	10000

Tabla 2. Ciclos de dispersión para la elaboración de una nanosuspensión por el método de homogenización.

posteriormente la dispersión obtenida se centrifuga a 20,000 rpm durante 60 min. La pastilla se resuspende en agua destilada y se centrifuga nuevamente a 20,000 rpm durante 60 min. Se llevaron a cabo dos procesos de lavado-centrifugado. La pastilla de la última centrifugación se resuspendió en agua. Esta suspensión se congeló a -40°C en un enfriador de inmersión con solución metanol-agua 50:50 y posteriormente fue liofilizada.

En la figura 9 se muestra una representación esquemática del método empleado para la preparación de nanocrystalales.

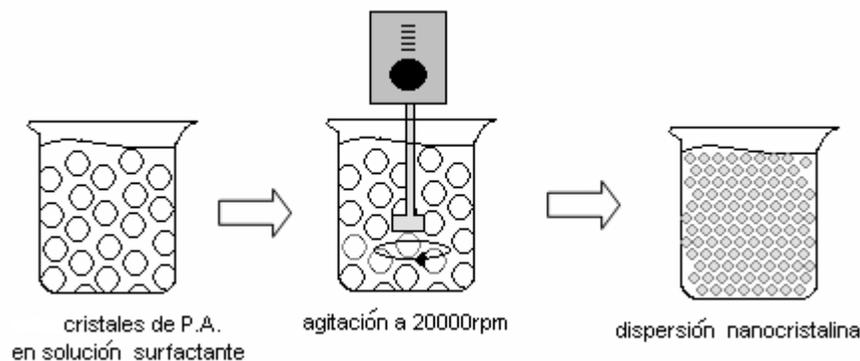


Figura 9. Preparación de nanocristales por el método de homogenización de alta velocidad

4.3.1.5 Cuantificación del polvo seco nanocrystalizado.

Se pesó la cantidad total del polvo, posteriormente se tomó una muestra representativa y se disolvió en metanol y se cuantificó en un espectrofotómetro a 230nm.

La concentración de naproxeno se calculó por interpolación en la curva de calibración.

4.3.2 Métodos utilizados en la elaboración de la suspensión nanocrystalina por el método de precipitación-evaporación

4.3.2.1 Preparación de una nanodispersión mediante la técnica de precipitación-evaporación

Se prepara una solución de surfactante (a la concentración deseada de acuerdo al lote correspondiente) en agua destilada, se agita con un agitador de velocidad variable y se le adiciona lentamente el principio activo disuelto en acetona (0.5 mg/ml). Se agita durante otros 10 min, posteriormente se coloca en baño maría a 40°C con agitación magnética durante 1h para eliminar el solvente orgánico (acetona). La dispersión obtenida se filtra en un portafiltros de teflón con una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 0.1 μm y, por último, se deja secar en un desecador de vacío con material secante (sílica).

En la figura 10 se muestra una representación esquemática del método empleado para la preparación de nanocrisales.

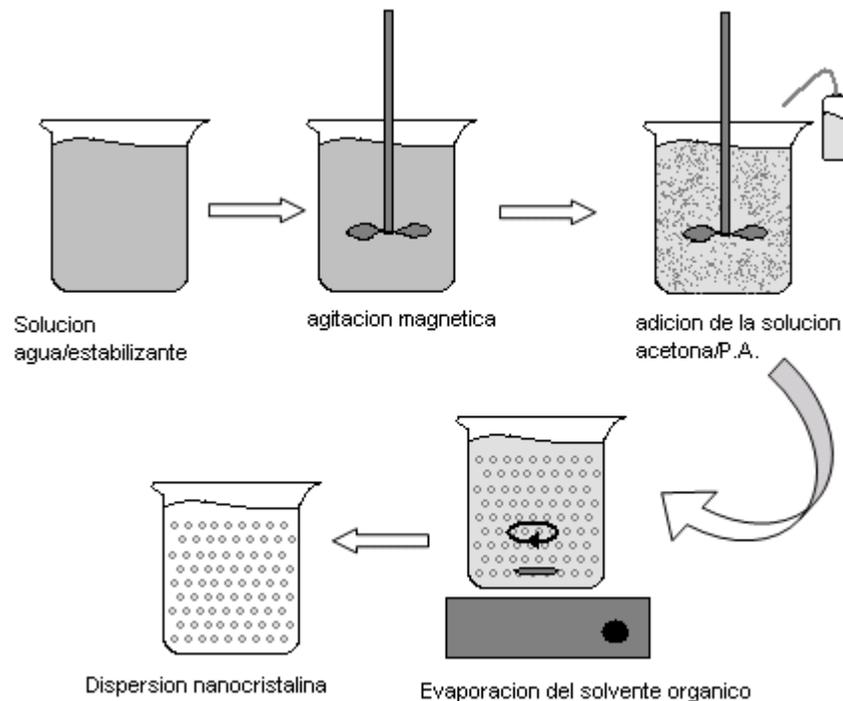


Figura 10. Preparación de nanocrisales por el método de recristalización

4.3.2.2 Evaluación de los nanocrisales

a. Tamaño de partícula:

Se determinó la talla de partícula promedio y la distribución del tamaño de partícula con un contador Nanosizer[®]. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

b. Morfología:

La nanosuspensión de nanocrisales se filtro sobre membranas de policarbonato, se dejo secar la membrana para que se formara una capa fina de polvo seco la cual se recubrió

con una película fina de oro (≈ 20 nm) y la superficie se evaluó por microscopía electrónica de barrido a 12.5 kV.

c. Calorimetría Diferencial de barrido:

Muestras de nanocristales secos y/o liofilizados de los lotes preparados se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los termogramas para los nanocristales se corrieron utilizando una rampa de 30 a 250°C .

5. Resultados y discusión

5.1 Elaboración de la suspensión de nanocristales por homogeneización de alta velocidad (rotor/estator)

El procedimiento a seguir para lograr los objetivos del proyecto se dividió en dos partes, la primera de ellas fue lograr la creación de los nanocristales por medios físicos es decir utilizando fuerza de corte para lograr la ruptura de los cristales

El fundamento de esta técnica se basa en que la energía generada por la alta velocidad y el choque interparticular provoca la ruptura de los cristales, sin embargo la energía generada por esta técnica es tan alta que los cristales se aglomeran al tiempo que se van rompiendo por lo que se utilizó un estabilizante que modificara la tensión superficial para evitar la aglomeración de nanocristales durante los choques interparticulares.

Se eligió como primera opción el PVAL por sus propiedades como tensoactivo iónico. Se prepararon soluciones a 0.02%, 0.2% y 0.5% de concentración de PVAL con el objetivo de encontrar la más adecuada para el proceso.

Los resultados se presentaron como sigue:

# de solución	Concentración de PVAL (%)	Tamaño de partícula (nm)	desviación estándar	Observaciones
1	0.02	477.5	317.7	Coloración ligeramente grisácea
2	0.20	160.0	241.0	Coloración grisácea con formación ligera de espuma durante el proceso
3	0.50	10000	1457.4	Excesiva generación de espuma por lo que se detiene el proceso a las 5400 rpm.

Tabla 3. Resultados de tamaño de partícula para la suspensión preparada por el método de homogeneización de alta velocidad (ver detalles en anexo 1)

Se tomo la suspensión 2 por tener el menor tamaño de partícula y presentar una menor desviación estándar y se sometió a ultracentrifugación con la finalidad de obtener el polvo seco y lavar el PVAL utilizado en la estabilización para

posteriormente resuspender y observar si el tamaño de los cristales se mantenía estable.

Se utilizaron varios ciclos de centrifugación hasta obtener una pastilla firme (tabla 3):

ciclo	RPM	Tiempo	Observaciones
1	20000	20 min	Se obtiene una pastilla poco firme y se observan impurezas de color gris oscuro y un sobrenadante turbio
2	20000	20 min	El sobrenadante es claro, pero la pastilla sigue siendo poco firme.
3	20000	20 min	Se realiza el primer lavado con agua destilada.
4	20000	20 min	El sobrenadante es claro. Se obtiene una pastilla firme sin embargo presenta muchas impurezas de color oscuro. Se realizan otros 2 lavados bajo las mismas condiciones.

Tabla 4. Ciclos de centrifugación para las nanosuspensiones

La pastilla obtenida se secó en una estufa de vacío a 37°C durante 24 horas; el polvo seco obtenido presentó una coloración gris con blanco; posteriormente la pastilla se resuspendió, se cuantificó la concentración de activo y se cuantificó el % de naproxeno en la muestra.

El tamaño de partícula resultó ser tan grande que el contador de partículas no pudo leerlo, mientras que al cuantificar el contenido de naproxeno en la muestra (Ver resultados en el anexo 2), se encontró que el 55% pertenecía a impurezas causadas probablemente a que la energía generada por la homogeneización y el choque de las partículas provoca un aumento considerable en la temperatura dentro del sistema, que puede "quemar" parte del activo.

5.2 Optimización de la técnica de precipitación- evaporación.

Esta técnica se basa en que una cantidad específica de fármaco sea previamente pesada y disuelta en un solvente orgánico (fase orgánica); esta fase es adicionada con agitación constante dentro de una fase acuosa (solución de polivinilalcohol PVAL en agua) y es agitado magnéticamente a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del solvente orgánico.

Los principios activos utilizados para la nanocrystalización fueron naproxeno, nifedipino y carbamazepina. Cabe recordar que los compuestos que son susceptibles de una nanocrystalización deben ser insolubles en agua.

Existe una gran variedad de estabilizantes que se han utilizado con anterioridad para la formación de nanocrystalos, se ha reportado el uso de surfactantes tanto iónicos (aniónicos y catiónicos) como no iónicos, ya sea por separado o mezcla de dos o mas de éstos. El principal motivo para utilizar PVAL es que presenta baja toxicidad en el organismo además de que forma cadenas que se unen fuertemente a la superficie de las partículas formando una capa estable.

Para la determinación de la talla de las partículas obtenidas se utilizó un contador NanoSizer[®]N4 Plus, la determinación del tamaño de las partículas en este equipo, se basa en la medición y las fluctuaciones de la luz dispersada después de que un rayo láser incide sobre una celda con la dispersión de la muestra en estudio. La velocidad de difusión de las partículas en un medio líquido depende de la temperatura, viscosidad del líquido y tamaño de las partículas por lo que se requiere que todas las muestras sean analizadas bajo las mismas condiciones.

Para todas las muestras analizadas se utilizó como medio de dispersión agua destilada obtenida a través de un equipo de filtración MilliQ[®], todas las lecturas se realizaron a 25°C y el ángulo de incidencia del rayo láser fue de 90°. Los datos obtenidos con este análisis son la talla promedio de las partículas, la distribución del tamaño de partícula y la desviación estándar de la misma, además del índice de polidispersidad de la muestra. La desviación estándar (d.e.) de la distribución del tamaño de partícula proporciona una indicación cualitativa de polidispersidad en la

muestra. El índice de polidispersidad (I.P.) esta relacionado con el coeficiente de variación (C.V.) de la distribución del tamaño de partícula por la expresión:

$$CV = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{2 \times IP} + 4}}$$

Los parámetros críticos ha considerar para la elaboración de nanocristales por medio de esta técnica son los siguientes:

1. Tipo de solvente orgánico a utilizar durante el procedimiento.
2. Velocidad de agitación durante la dispersión de ambas fases.
3. Velocidad de inyección de la fase orgánica.
4. Temperatura de evaporación de la fase orgánica.
5. Cantidad de fármaco (carga de activo en la suspensión).
6. Concentración y tipo de estabilizante.

Estos parámetros se tuvieron que controlar para lograr la reproducibilidad en la elaboración de las suspensiones de tal manera que todos debían ser fijos.

Con respecto al tipo de solvente orgánico se eligió como primera opción acetona por ser soluble en agua y evaporarse fácilmente características que permitieron eliminar el solvente a baja temperatura, es importante mencionar que se cuantificaron los residuos de acetona en la suspensión para asegurar la eliminación de la misma, sin embargo, aún cuando quedaran residuos del solvente en los cristales la cantidad sería tan pequeña que el hígado la degradaría a compuestos que no son perjudiciales y que el organismo usa para producir energía para diferentes funciones.

En cuanto a la velocidad de agitación se fijo en una velocidad media que permitiera la agitación constante de las fases sin la formación de espuma, cabe mencionar que el tipo de agitación fue mecánica por medio de un agitador magnético.

La velocidad de inyección de la fase orgánica se fijo aleatoriamente a 1 ml/min con agitación constante e independiente de la concentración de la solución.

Para evaporar la fase orgánica se utilizo temperatura ambiente debido a que el punto de inflamación de la acetona es de -18°C.

Para la cantidad de fármaco (carga de activo en la suspensión) y la concentración del estabilizante el primer paso fue escoger el fármaco adecuado para este estudio por lo que se realizó un análisis experimental tipo factorial tomando en cuenta a los tres principios activos a diferentes concentraciones y variando la cantidad de estabilizante tal como se presenta a continuación (tabla 5):

[P.A.] mg/ml \ [PVAL] % p/v	0.125	0.25	0.5	1.0
0.02	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
0.2	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8
0.5	Lote 9	Lote 10	Lote 11	Lote 12
1.0	Lote 13	Lote 14	Lote 15	Lote 16
2.0	Lote 17	Lote 18	Lote 19	Lote 20

Tabla 5. Numeración de los lotes de nanocristales según los parámetros a estudiar.

Los resultados individuales se graficaron y se presentan como sigue (figura 11):

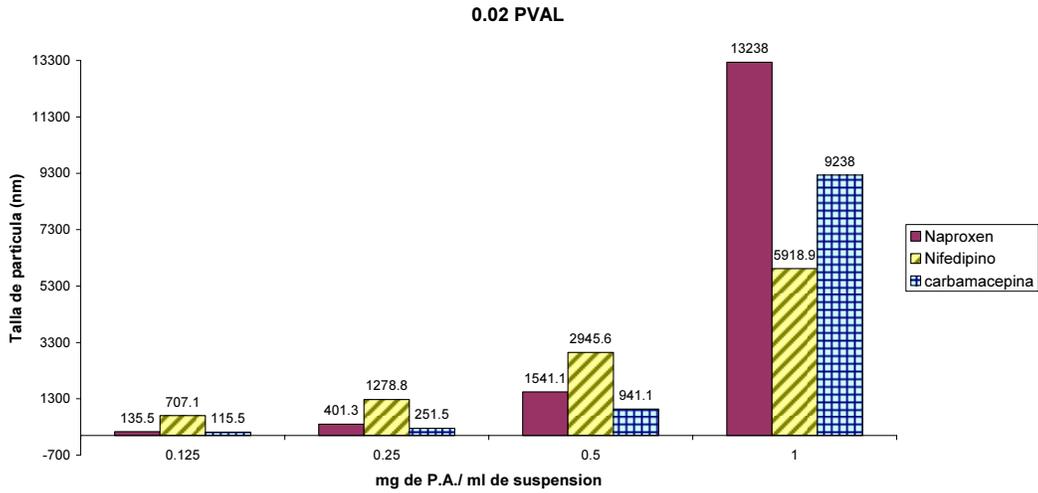


Figura 11. Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 0.02% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.

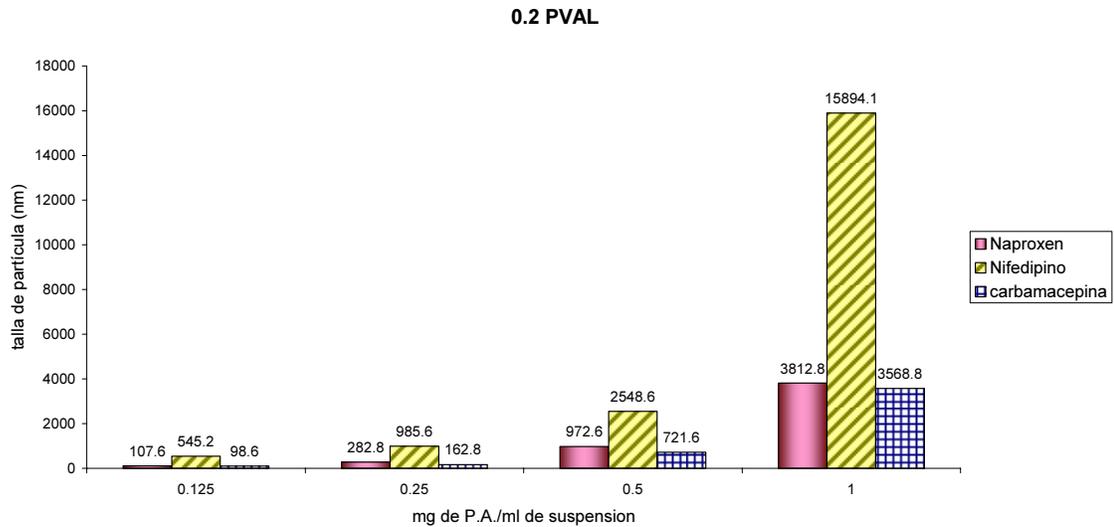


Figura 12. Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 0.2% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.

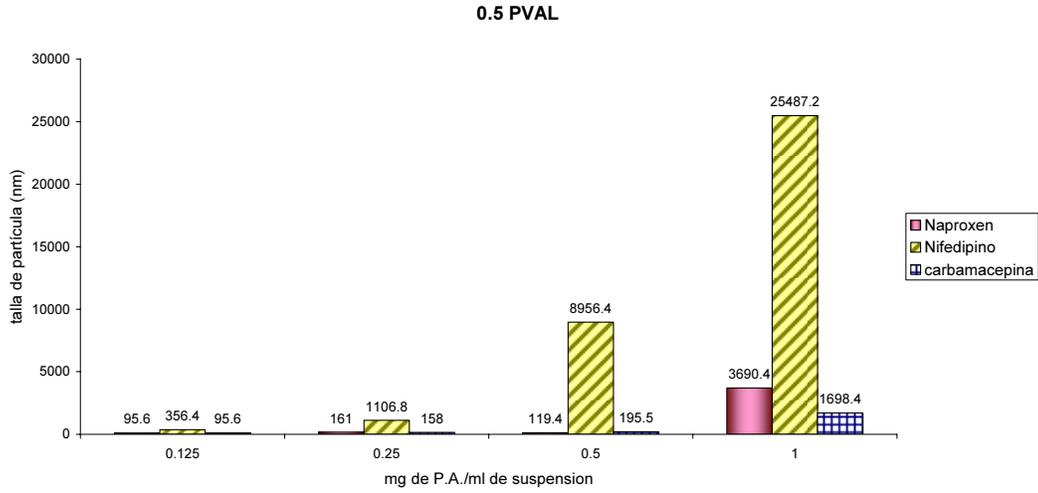


Figura 13. Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 0.5% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.

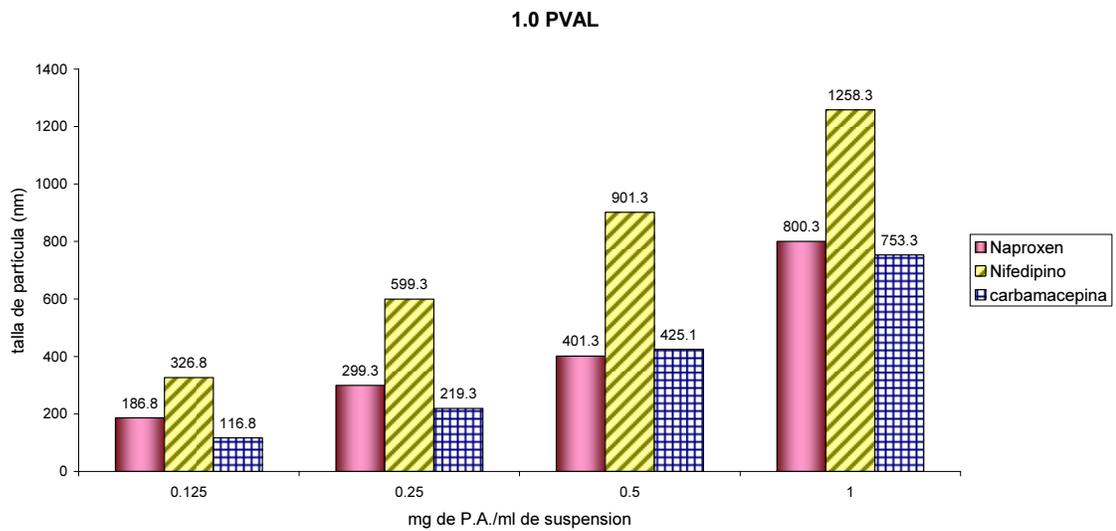


Figura 14. Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 1.0% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.

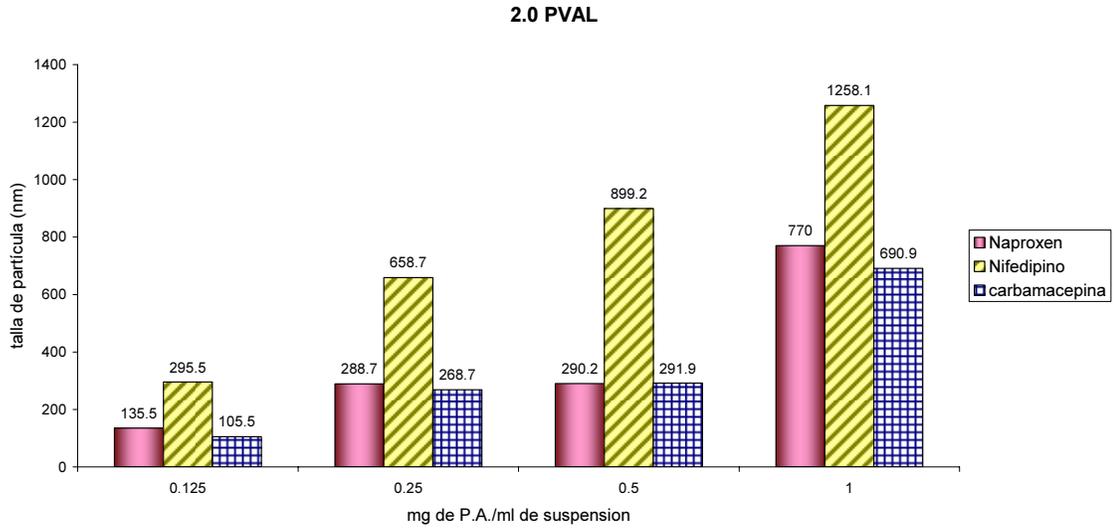


Figura 15. Comportamiento del tamaño de partícula para una suspensión con 2.0% de PVAL con diferentes cantidades de principio activo.

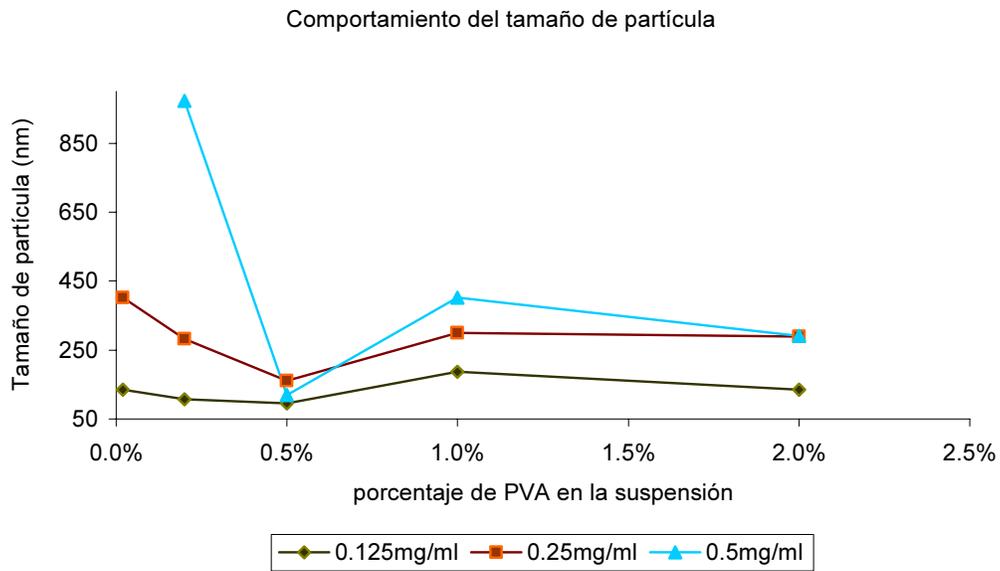


Figura 16. Comportamiento de la talla de partícula para las suspensiones que presentaron un tamaño menor a una micra.

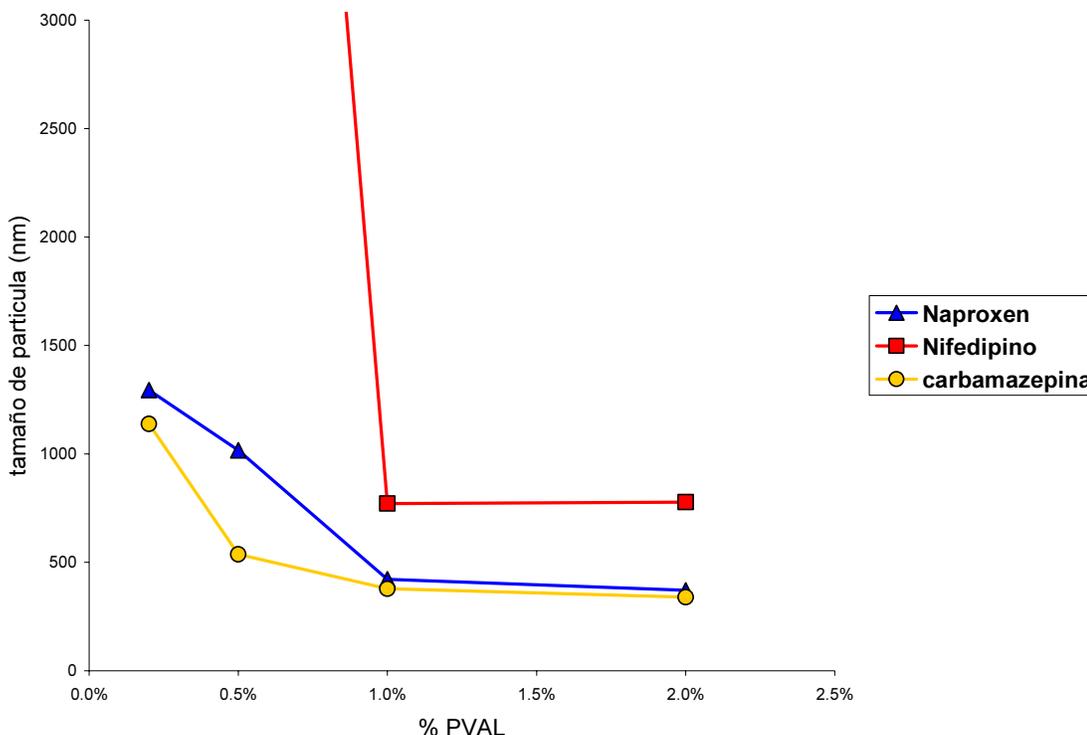


Figura 17. Comparación del comportamiento en promedio de la talla de partícula para los 3 P.A.

En todos los lotes se puede apreciar que conforme se aumenta la cantidad de P.A. en las suspensiones, la talla de las mismas se ve incrementada. Esta tendencia se puede observar en las figuras 11 a 15, sobre todo es notorio que en los lotes preparados con 1.0mg/ml de P.A. el tamaño de los cristales es mucho mayor que en los lotes con menor carga de activo y aún cuando se aumenta la concentración de PVAL en estas suspensiones el tamaño de las partículas nunca es menor a los 500 nm; si analizamos la figura 16 podemos ver claramente que el punto en que se obtienen los menores tamaños de partícula es cuando se utiliza 0.5% de estabilizante y, aunque en mayores cantidades de PVAL no se aprecia un incremento notable en la talla de partícula, se puede decir que resulta innecesario utilizar una cantidad mayor del mismo. Por otro lado, la mayor carga de activo a la cual obtenemos una talla de partícula apropiada (menor a 500 nm) en una suspensión es de 0.5 mg/ml.

Como se puede observar en la figura 17, la carbamazepina presenta en todos los lotes un tamaño de partícula menor comparado con los otros dos principios activos, esto puede deberse quizá a que la estructura molecular de la carbamazepina es mucho más simple que la de los otros dos compuestos. Por esta razón resultó ser el fármaco ideal para ser utilizado como modelo para la caracterización morfológica, el cambio de forma cristalina y la estabilidad de las nanopartículas.

Una vez obtenidos los nanocristales y con el fin de conocer el comportamiento de los cristales a través del tiempo se elaboraron 3 lotes de nanocristales de carbamazepina y se estudió su comportamiento durante 3 meses.

Las nanosuspensiones se mantuvieron en frascos ambar cerrados a temperatura ambiente.

Los resultados se presentaron como sigue (tabla 6):

Lote	inicial	primer mes	segundo mes	tercer mes
a	108.5	107.6	125.6	256.3
b	98.7	95.6	165.2	241.2
c	110.4	119.4	112.3	195.5

Tabla 6. Tamaño de las suspensiones nanocristalinas de carbamazepina a través del tiempo.

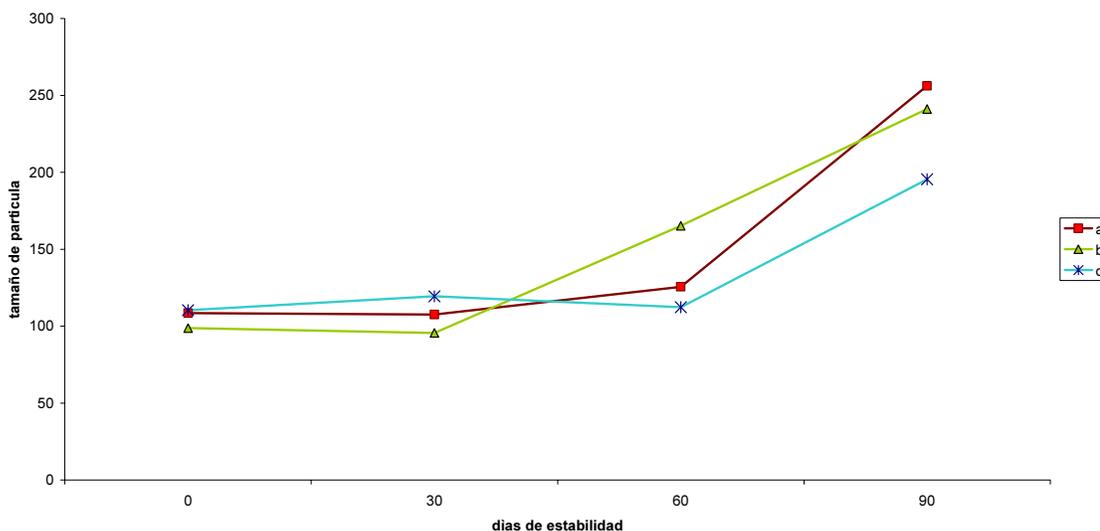


Figura 18. Estabilidad de los nanocristales de carbamazepina (a=lote 1, b=lote 2 y c=lote 3).

Como se puede observar en la figura 18 los nanocristales tienden a aumentar de tamaño, sin embargo los tres lotes de nanosuspensiones mantuvieron su tamaño durante el primer mes, durante los siguientes 30 días se comenzó a notar un ligero incremento en la talla de partícula y solo al final de los 90 días se comenzó a notar un incremento considerable sin embargo, debemos tomar en cuenta que un sólido en suspensión siempre tiende a ser menos estable que un polvo seco por lo que podemos predecir que los nanocristales estando secos son muy estables. Con esta información se puede decir que los nanocristales aún en suspensión tienen una estabilidad relativamente corta ya que los cristales duplicaron su tamaño en 3 meses; aunque se debe considerar que las condiciones de almacenamiento de las nanosuspensiones debe mantenerse por debajo de las condiciones ambientales (25°C, 60% HR) ya que el incremento de éstas puede causar envejecimiento prematuro de la nanosuspensión y con ello el incremento del tamaño de partícula.

Para conocer el comportamiento de los nanocristales estando secos se liofilizaron y se les realizó un estudio morfológico por microscopia electrónica de barrido. En las micrografías presentadas a continuación se puede observar al fármaco en su tamaño normal antes de ser nanocristalizado y las características morfológicas que presentan los nanocristales en la suspensión inicial y después de 90 días donde se nota claramente que después de tres meses los cristales comienzan a aglomerarse produciendo un incremento en la talla de partícula, esto se debe a las fuerzas intermoleculares del choque de las partículas en solución.

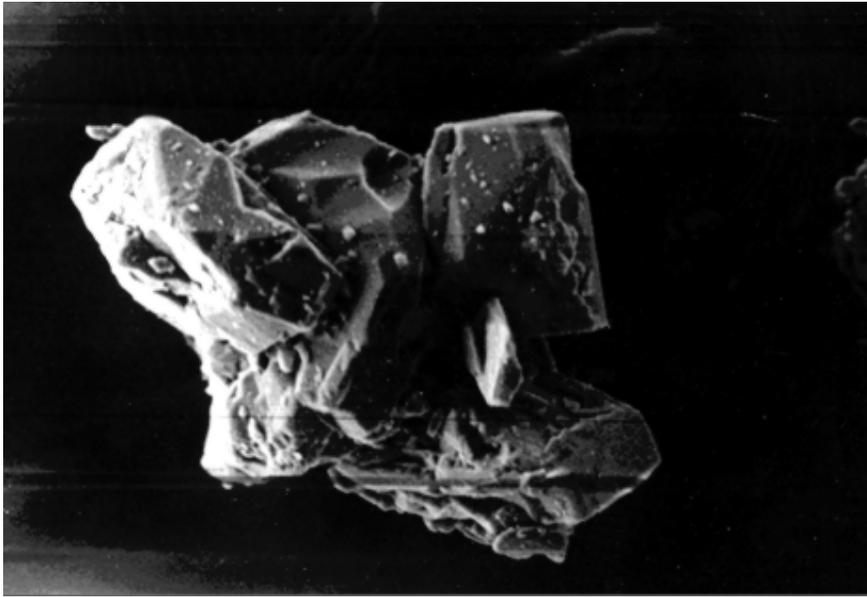


Figura 19. Micrografía de los cristales de carbamazepina antes de ser sometidos al proceso de Nanocrystalización

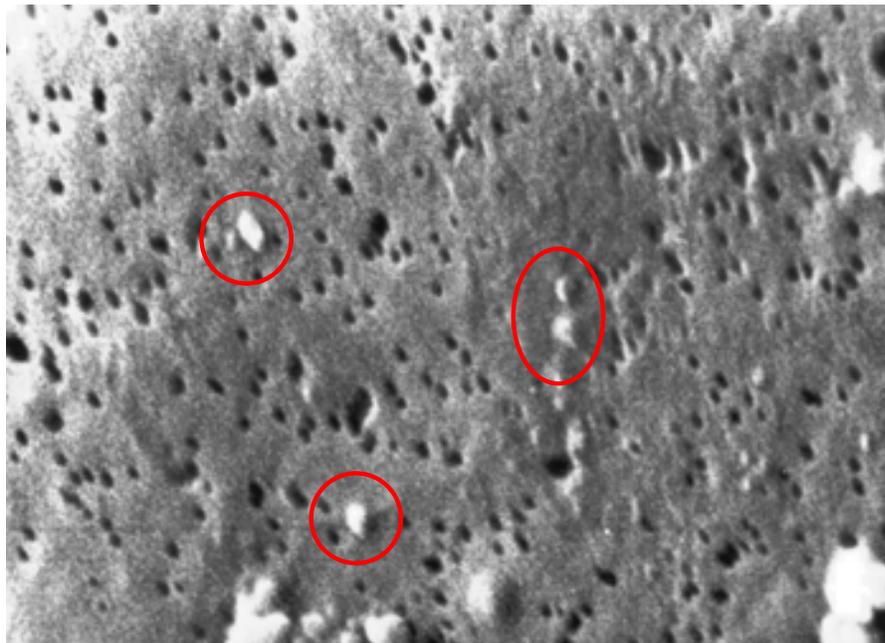


Figura 20. Nanocrisales de carbamazepina en el tiempo inicial de la estabilidad. (El tamaño de poro de la membrana del fondo es de 100 nm por lo que se observa el tamaño real de los nanocrisales).

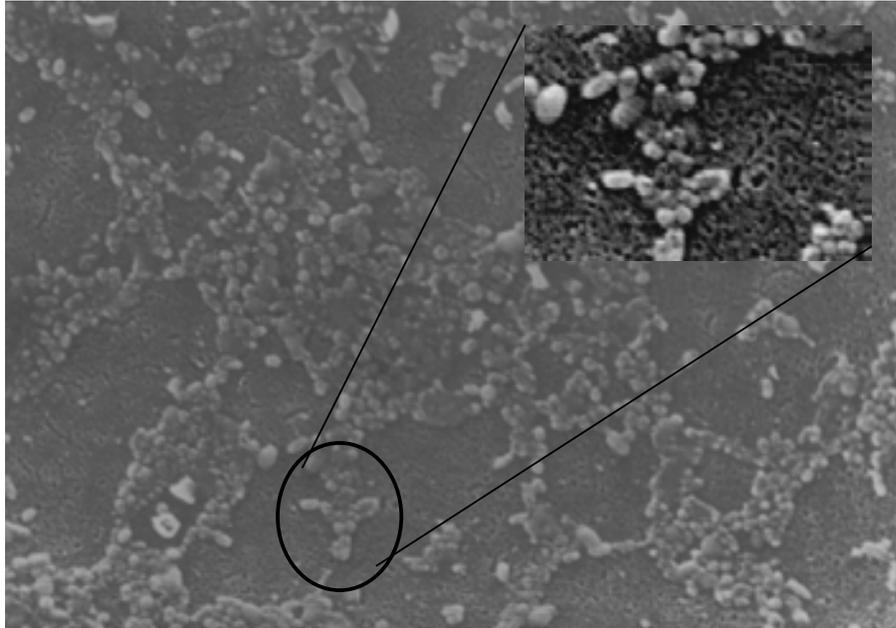


Figura 21. Forma de los nanocristales en su etapa inicial de estabilidad.

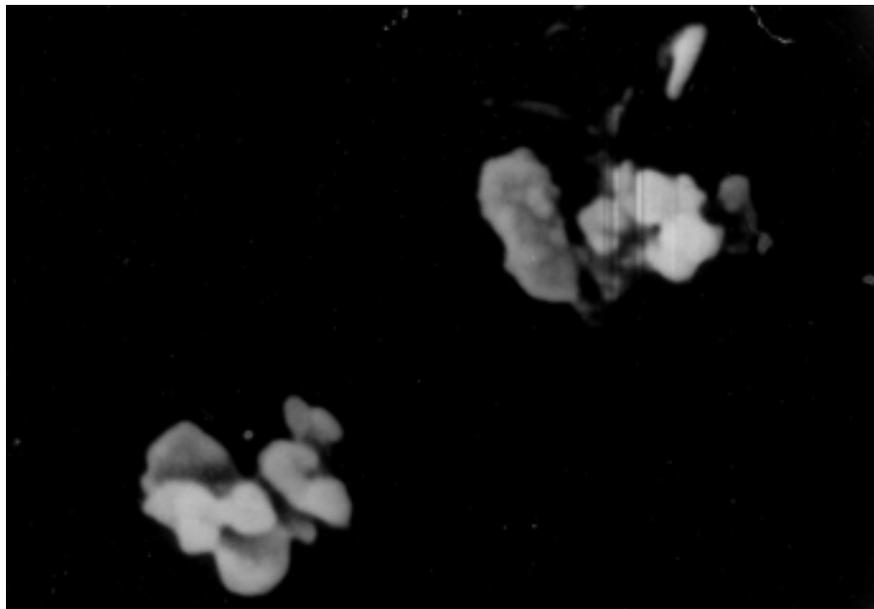
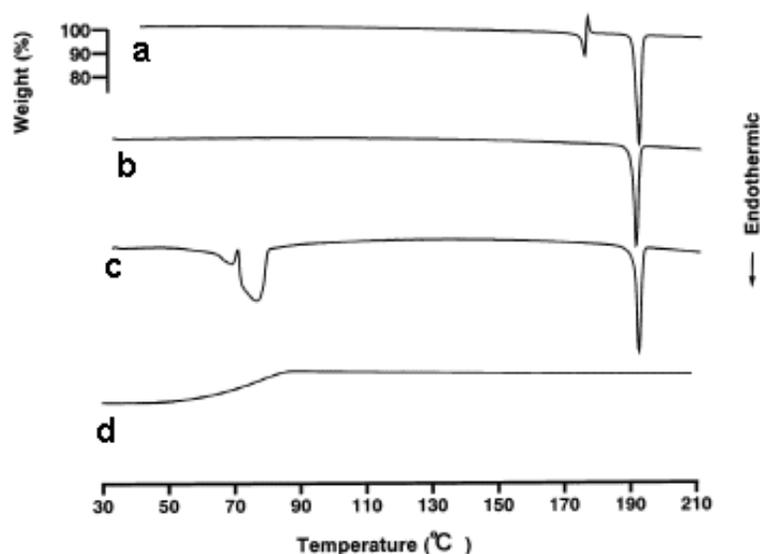


Figura 22. Micrografía de los nanocristales después de 90 días de estabilidad.

En los nanocristales obtenidos de carbamazepina que fueron analizados con el microscopio electrónico de barrido para el análisis de morfología, se pudo determinar que poseían una estructura sólida de forma definida. En las micrografías se puede observar que los microcristales del fármaco antes del proceso de reducción de tamaño presentan una forma fragmentada, y, después de ser sometidas al proceso de recristalización su forma cristalina cambia y se observa lisa. Como se mencionó con anterioridad en los antecedentes, la forma lisa de los cristales se debe a que fueron elaborados con un sistema de recristalización lenta, lo que permite a los núcleos tomar una forma definida.

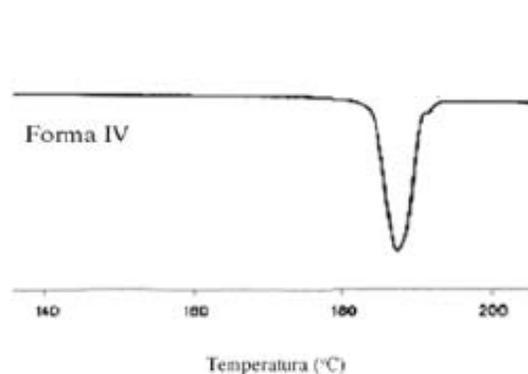
Esta reportado que la carbamazepina posee 4 estados polimórficos⁽³²⁾. Las micrografías observadas sugieren que al reducir el tamaño de partícula el activo pasa de un estado polimórfico a otro, por esta razón se realizó el análisis de calorimetría diferencial de barrido sobre el polvo seco utilizando una rampa de 10°C/min. En las figuras 23 y 24 se observan los estados polimórficos de la carbamazepina⁽³²⁾, lo que nos sirve para hacer la comparación con los termogramas que se obtuvieron durante el estudio de los cristales.



Y. Kobayashi et al. / International Journal of Pharmaceutics 193 (2000) 137–146

Figura 23. Termogramas de los estados polimórficos reportados para la carbamazepina.

(a: DSC de la forma III, b: DSC de la forma I, c: DSC de la forma II, d: TG de la forma II)



E. Sanchez et al./Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas 002 (2007) 57-76

Figura 24. Termograma de la forma IV de la carbamazepina.

Como se puede observar en la figura 25 las curvas de calorimetría diferencial de barrido en el termograma "a" se exhibe una endoterma a los 170.8°C y una endoterma afilado a los 190°C. Al comparar este termograma con los reportados en la figura 23 observamos que corresponde al forma III de la carbamazepina, con respecto a la pequeña endoterma a 170.8 °C bien se puede atribuir a una contaminación de los cristales. Al analizar el termograma "b" de los cristales después del proceso de recristalización se observa una pequeña endoterma a 56.5°C seguida de una exoterma afilada a 70.50°C otra endoterma mas a los 75-90 °C y por ultimo una endoterma afilada a 190°C, estos valores coinciden con la forma II de la carbamazepina por lo que comprobamos que existe un cambio en el estado polimórfico del compuesto pasando de una forma III que es mas estable a una forma mas inestable como lo es la forma II.

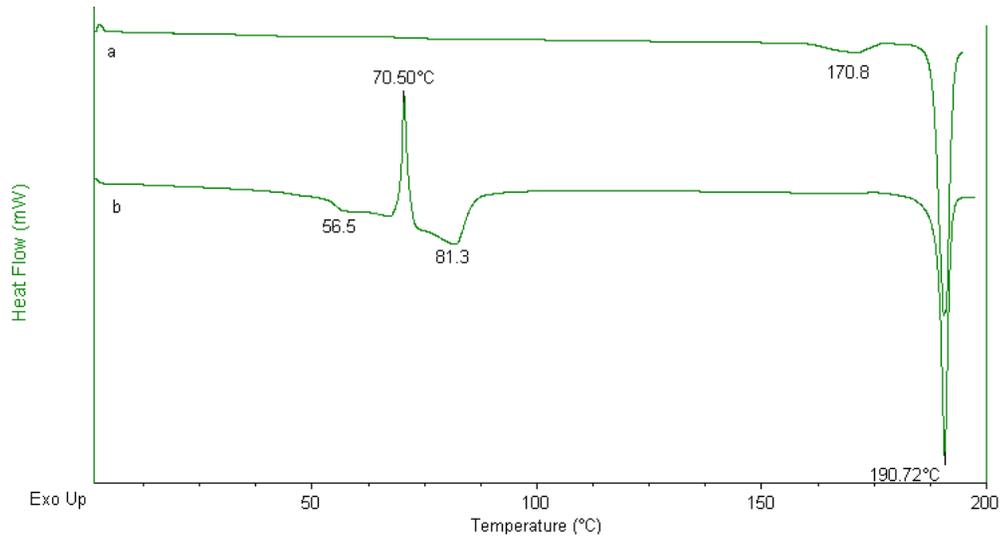


Figura 24. Termogramas de a) los cristales de carbamazepina antes del proceso de reducción de tamaño de partícula y b) nanocristales de carbamazepina después del proceso de reducción de tamaño de partícula.

6. Conclusiones

1. Se obtuvieron suspensiones nanocristalinas de principios activos poco solubles en agua por medio de la técnica de homogenización de alta velocidad y de recristalización.
2. La técnica de homogenización de alta velocidad resultó no ser adecuada para la elaboración de nanocristales debido a que la energía generada durante el proceso provoca un desgaste del rotor estator del equipo utilizado lo que contamina los cristales. Adicionalmente la técnica no es reproducible como se pudo observar en los diferentes cambios de tamaño de partícula.
3. Con la técnica de recristalización se lograron suspensiones de talla nanométrica, que si bien presentaron una estabilidad regular en dispersión, si tienen una buena estabilidad en seco por lo que podrían utilizarse en formulaciones sólidas que mejorarían notablemente la velocidad de disolución del fármaco.
4. Se determinaron las variables de ambos métodos y se encontró lo siguiente:
 - Para el proceso de nanocristalización por el método de alta velocidad (rotor /estator) las variables son la velocidad y el tiempo de agitación y, la cantidad de estabilizante.
 - Para el método de desplazamiento de solvente, las variables son el tipo de solvente orgánico, la velocidad de dispersión, la velocidad de inyección de la fase orgánica y la temperatura de evaporación de la fase orgánica.
5. Mediante los estudios de calorimetría diferencial de barrido pudo determinarse que la carbamacepina cambia de estado cristalino al ser sometida al proceso de reducción de tamaño de partícula, por el método de nanocristalización por desplazamiento de solvente.

Referencias

1. Akkar, R.H. Müller. 2003. "Formulation of intravenous carbamacepine emulsions by SolEmuls[®] technology". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 55:305-312.
2. Bernhard H.L. Böhm and Rainer H. Müller. 1999. "Lab-scale production unit desing for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs". Reviews. Research focus PSTT 2:336-339.
3. Böhm, B.H.L., Grau, M.J., Hildebrand, G.E., Thünemann, A.F., Müller R.H. 1998. "Preparation and physical properties of nanosuspensions (Dissocubes[™]) of poorly soluble drugs. International Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 25:956-957.
4. Durrer, C., Irache, J.M., Puisieux, F., Duchene, D., Ponchel, G. Mucoadhesion of latexes. I analitycal methods and kinetics studies, Pharm. Researchs, Vol. 11, 1994, 674-679.
5. Elaine Merisko-Liversidge, Gary G, Liversidge, Eugene R. Cooper. 2003. "Nanosizing: a formulación approach for poorly-water-soluble compounds". European Journal of Pharmaceutical Sciences. 18:113-120.
6. F. Grases Freixedas, A. Costa Bauzá, O. Söhnel. "Cristalización en disolución: Conceptos básicos". Edición en español; Editorial Reverté; España 2000. p.p. 106.
7. Gad Keren, Kiriati Ono. 2002. "Topical carbamazepine formulations". United States Patent Appl. 10/187,974.

8. Hui Wang, Jian-Rong Zhang, Jun-Jie Zhu. 2002. "Sonochemical preparation of lead sulfide nanocrystals in an oil-in-water microemulsion". *Journal of Crystal Growth*. 246:161-168.
9. Jain; Rajeev A.; Wei; Linden; Swanson; Jon. 2000. "Solid dose form of nanoparticulate naproxen". *United State Patent Appl.* 14 83 32.
10. Kipp; James E.; Wong; Joseph hung Tak; Doty; Mark J.; Rebbeck; Christine L. 2001. "Microprecipitation method for preparing submicron suspensions". *United States Patent. Appl.* 87 47 99.
11. Koichi Baba, Hitishi Kasai, Shuji Okada, Hidetoshi Oikawa, Hachiro Nakanishi. 2001. "Fabrication of organic nanocrystals using microwave irradiation and their optical properties". *Optical Materials*. 21:591-594.
12. K.P. Krause, R.H. Müller. 2001. "Production and characterization of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenization". *International Journal of Pharmaceutics*. 214:21-24.
13. Liversidge, G.G. 1996. *Drug Nanocrystals for improved drug delivery at CRS workshop particulate drug delivery systems*.
14. Liversidge G.G., Cundy, K.C. 1995. *International Journal of Pharmaceutics*. 125, 91.
15. M.J. Grau, O. Kayser, R.H. Müller. 2000. "Nanosuspensions of poorly soluble drugs – reproducibility of small scale production". *International Journal of Pharmaceutics*. 196:155-157.
16. Müller R. H., Benita, S., Böhm, B. (eds). 1998. "Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs". *Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart*.

17. Müller R. H., Böhm, B.H.L., Grau, M.J. 1999. "Nanosuspensions – Formulierungen für schwerlösliche arzneistoffe mit geringer bioverfügbarkeit: I Herstellung und eigenschaften. Pharm. Ind., 74-78.
18. Müller R. H., Peters, K., Becker, R., Kruss, B. 1995. "Nanosuspensions for the i.v. Administration of poorly soluble drugs – Stability During Sterilization and Long – term Storage, proceed". Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 22:574-575.
19. Müller R. H., Peters, K., Becker, R., Kruss, B. 1995. "Nanosuspensions – a novel formulation for the i.v. administration of poorly soluble drugs". Proc. 1st World Meeting APGI-APV.
20. Müller R. H., Peters, K., Craig, D. "Electron microscopic studies of nanosuspensions–particle shapes as a fuction of drug and surfactant". Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 23:925-926.
21. Nyström, C., Saers, S. 1996. "Solid Dispersions for fast release and dissolution of drug with low aqueous solubility in: Formulations of poorly-available drugs for oral administration". European Symposium Paris, Swedish Academy of Pharmaceutical Sciences, 94-103.
22. Nyström, C. 1998. "Dissolution properties of soluble drugs: Theoretical background and possibilities to improve the dissolution behaviour, in Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs". Medpharm Scientific Publishers Sttutgart.
23. Parikh; Indu; Selvaraj; Ulagaraj. 1997. "Composition and method of preparing microparticles of water-insoluble substances". United States Patent. Appl. 93 96 99.

24. Parikh; Indu; Selvaraj; Ulagaraj. 1998. "Composition and method of preparing microparticles of water-insoluble substances". United States Patent. Appl. 21 80 80.
25. Rebeca J. Hintz, Kevin C. Jonson. 1989. "The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption". International Journal of pharmaceutics. Vol. 51 Issue1, 1-17.
26. R.H. Muller, S. Benita, B. Bohm, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart. 1998. "Emulsions and nanosuspensions for the formulations of poorly soluble drugs". Book Review. International Journal of Pharmaceutics. 212:143-144.
27. Rong He, Xue-feng Qian, Jie Yin, Hong-an Xi, Li-juan Bian, Zi-kang Zhu. 2003. "Formation of monodispersed PVP-capped ZnS and CdS nanocrystals under microwave irradiation". Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 220:151-157.
28. Sudha R. Vippagunta, Karin A. Maul, Siva Tallavajhala, David J.W. Grant. 2002. "Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions". International Journal of Pharmaceutics. 236:111-123.
29. Sulbha Amlathe and V.K. Gupta. 1990. "Spectrophotometric determination of acetone using vanillin". Analyst. 115:1385-1387.
30. Thirumala Govender, Snjezana Stolnik, Martin C. Garnett, Lisbeth Illum, Stanley S. Davis. 1999. "PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug". Journal of Controlled Release 57:171-185.
31. V. Švrček, A. Slaoui, J.C. Muller, J.L. Rehspringer, B. Hönerlage, R. Tomasiunas, I. Pelant. 2002. "Studies of silicon nanocrystals in phosphorus rich SiO₂ matrices". Physica E.

32. Vila Jato, José Luis. Tecnología Farmacéutica. (Vol I). Cáp. 1 "preformulación". Editorial Síntesis. España 2001.
33. Yumiko Kobayashi, Shusei Ito, Shigeru Itai, Keiji Yamamoto. 2000. "Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate". International Journal of Pharmaceutics 193:137–146.

Anexo 1. Resultados de la suspensión nanocrystalina de naproxeno.

Resultados de tamaño de partícula para la suspensión elaborada con la solución de (PVAL 0.02%)

Angle	Run Time (sec)	Min	Max	Number of Bins	SDP Mean (nm)	SDP S.D. (nm)	SDP Peak Amount	SDP Peak Mean (nm)	SDP Peak S.D. (nm)
90.0°	60	1 nm	10000 nm	17	477.5	317.7	89.2%	528.6	255.3
							10.8%	55.6	28.5
	60	1 nm	10000 nm	17	154.2	128.8	64.3%	84.2	50.6
							35.7%	280.3	66.5

Tabla 7. Tamaño de los nanocristales de naproxeno para la suspensión elaborada con la solución de (PVAL 0.02%)

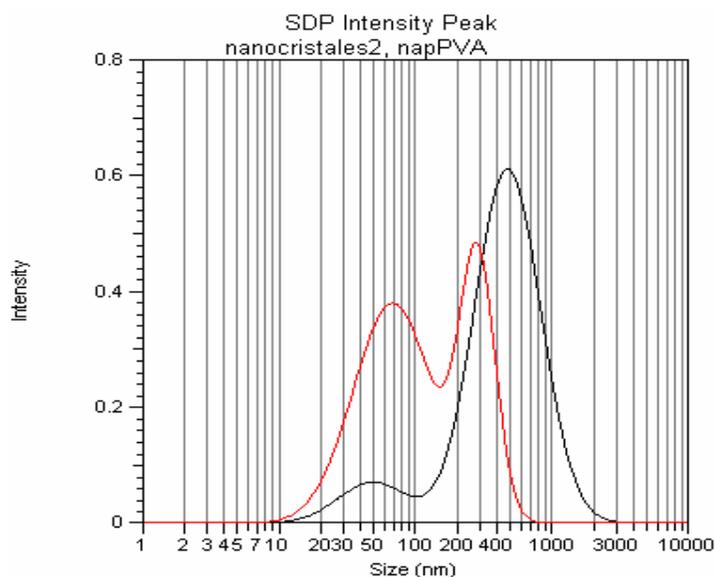


Figura 26. Intensidad de pico PVAL 0.02%. Concentración del activo 10 mg/ml

Resultados de tamaño de partícula para la suspensión elaborada con la solución de (PVAL 0.2%)

Angle	Run Time (sec)	Min	Max	Number of Bins	SDP Mean (nm)	SDP S.D. (nm)	SDP Peak Amount	SDP Peak Mean (nm)	SDP Peak S.D. (nm)
90.0°	60	1 nm	10000 nm	17	160.0	241.0	93.5%	110.0	50.4
							6.5%	876.4	215.8
	60	1 nm	10000 nm	17	121.3	69.8	n/a	n/a	n/a
							n/a	n/a	n/a

Tabla 8. Tamaño de los nanocristales de naproxeno para la suspensión elaborada con la solución 2 (PVAL 0.2%)

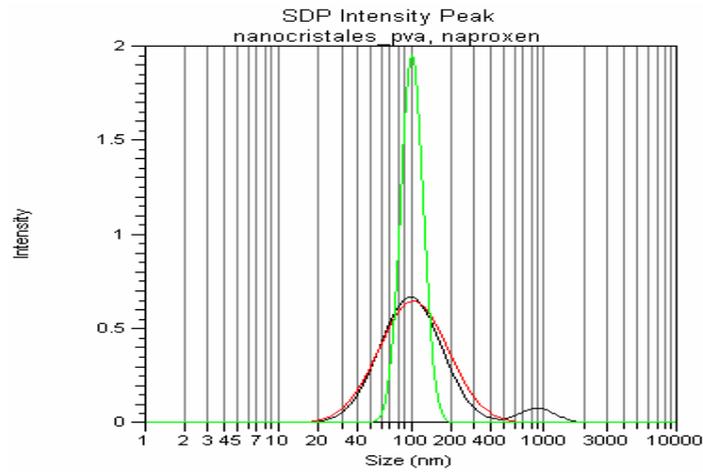


Figura 27. Suspensión de nanocristales de naproxeno 10mg/ml con PVAL 0.2%

Resultados de tamaño de partícula para la suspensión elaborada con la solución de (PVAL 0.5%)

Angle	Run Time (sec)	Min	Max	Number of Bins	SDP Mean (nm)	SDP S.D. (nm)	SDP Peak Amount	SDP Peak Mean (nm)	SDP Peak S.D. (nm)
90.0°	60	1 nm	10000 nm	17	10000.0	1457.4	n/a	n/a	n/a
	60	1 nm	10000 nm	17	10000.0	1457.4	n/a	n/a	n/a
	60	1 nm	10000 nm	17	10000.0	1457.4	n/a	n/a	n/a

Tabla 9. Tamaño de los nanocristales de naproxeno para la suspensión elaborada con la solución 3 (PVAL 0.5%)

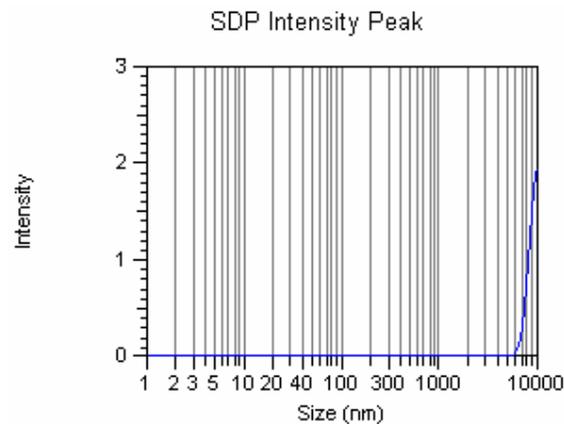


Figura 28. Suspensión de nanocristales de naproxeno 10mg/ml PVAL 0.5%

Durante la preparación de las suspensiones se observó que entre mayor es la cantidad de PVAL es mayor la espuma generada durante el proceso de tal manera que en la suspensión de 0.5% no se pudieron completar los ciclos de dispersión

- Para la suspensión con PVAL 0.02% se observa una coloración ligeramente grisácea.
- Para la suspensión con PVAL 0.2% se observa una coloración grisácea y se genera un poco de espuma durante el proceso a partir de las 7600 rpm, sin embargo esta es controlable y no interfiere con el método.
- Para la suspensión con PVAL 0.5% se genera mucha espuma a partir de las 5400 rpm y al aumentar la velocidad no se puede controlar. Debido a que no se pudo aumentar la velocidad de dispersión, el tamaño de las partículas resultó ser muy grande y estas se sedimentaban rápidamente por lo que no se realizó la medición a las siguientes semanas.

Anexo 2. Resultados de la curva de calibración naproxeno/metanol

Concentración	Absorbancia	Abs/Conc
5.32	1.9101	0.3590
4.26	1.545	0.3627
3.19	1.155	0.3621
2.13	0.762	0.3577
1.06	0.3654	0.3447
5.32	1.9103	0.3591
4.26	1.5477	0.3633
3.19	1.1539	0.3617
2.13	0.765	0.3592
1.06	0.3784	0.3570
5.32	1.91	0.3590
4.26	1.5479	0.3634
3.19	1.1548	0.3620
2.13	0.7466	0.3505
1.06	0.379	0.3575

Tabla 10. Resultados de la curva de calibración naproxeno/metanol

Cálculos para la curva de calibración a partir de los datos obtenidos

promedio	0.3586
desv. Estandar	0.0050587
C.V.	1.41

$$b = -8.3996 \times 10^{-3}$$

$$m = 0.3625$$

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9997$$

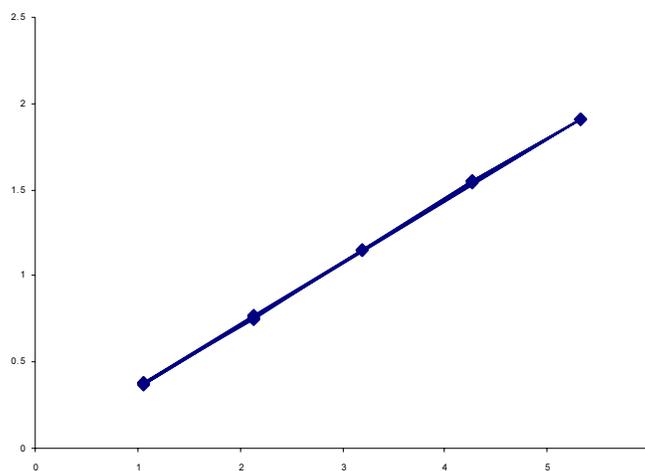


Figura 29. Curva de calibración naproxeno/metanol

Anexo 3. Resultados de tamaño de partícula para los nanocristales elaborados con la técnica de desplazamiento de solvente

Resultados de tamaño de partícula para el análisis experimental tipo factorial para Naproxeno.

Lote	Talla (nm)	d.e. (nm)	I.P.	C.V.
1	135.5	34.3	0.129	0.36
2	401.3	83.7	0.028	0.21
3	1541.1	136.1	0.026	0.21
4	13238	6115.1	0.047	0.26
5	107.6	50.3	0.075	0.31
6	282.8	125.9	0.097	0.33
7	972.6	459.2	0.756	0.46
8	3812.8	1827	0.813	0.47
9	95.6	44.5	0.062	0.29
10	161	75	0.066	0.29
11	119.4	56.3	0.606	0.46
12	3690.4	182.5	-1.106	0.53
13	186.8	84.9	0.097	0.33
14	299.3	136.5	0.083	0.32
15	401.3	183.7	0.029	0.22
16	800.3	374.4	0.057	0.28
17	135.5	64.3	0.259	0.41
18	288.7	73.5	0.087	0.32
19	290.2	136.2	-0.865	0.54
20	770	331.6	-0.836	0.54

Tabla 11. Talla de partícula promedio para los nanocristales de naproxeno.

Resultados de tamaño de partícula para el análisis experimental tipo factorial para Nifedipino.

Lote	Talla (nm)	d.e. (nm)	I.P.	C.V.
1	707.1	6115.1	0.59	1.35
2	1278.8	83.7	0.23	0.25
3	2945.6	136.1	0.058	089
4	5918.9	1827	0.023	1.25
5	545.2	44.5	0.654	1.56
6	985.6	136.1	0.065	0.36
7	2548.6	58.1	0.658	0.125
8	15894.1	1827	1.25	1.48
9	356.4	58.1	0.059	0.36
10	1106.8	65.9	0.066	0.29
11	8956.4	45.9	0.606	0.46
12	25487.2	182.5	-1.106	0.53
13	326.8	84.9	0.097	0.33
14	599.3	83.7	0.083	0.32
15	901.3	163.7	0.029	0.22
16	1258.3	374.4	0.057	0.28
17	295.5	89.6	0.259	0.41
18	658.7	25.5	0.087	0.32
19	899.2	142.1	-0.865	0.54
20	1258.1	331.6	-0.836	0.54

Tabla 12. Talla de partícula promedio para los nanocristales de nifedipino.

Resultados de tamaño de partícula para el análisis experimental tipo factorial para Carbamazepina.

Lote	Talla (nm)	d.e. (nm)	I.P.	C.V.
1	115.5	34.3	0.129	0.36
2	251.5	83.7	0.028	0.21
3	941.1	136.1	0.026	0.21
4	9238	6115.1	0.047	0.26
5	98.6	50.3	0.075	0.31
6	162.8	125.9	0.097	0.33
7	721.6	459.2	0.756	0.46
8	3568.8	1827	0.813	0.47
9	95.6	44.5	0.062	0.29
10	158	75	0.066	0.29
11	195.5	56.3	0.606	0.46
12	1698.4	182.5	-1.106	0.53
13	116.8	84.9	0.097	0.33
14	219.3	136.5	0.083	0.32
15	425.1	183.7	0.029	0.22
16	753.3	374.4	0.057	0.28
17	105.5	64.3	0.259	0.41
18	268.7	73.5	0.087	0.32
19	291.9	136.2	-0.865	0.54
20	690.9	331.6	-0.836	0.54

Tabla 13. Talla de partícula promedio para los nanocristales de carbamazepina.

Distribución de tamaño de partícula para naproxeno utilizando la concentración de 0.5 de estabilizante.

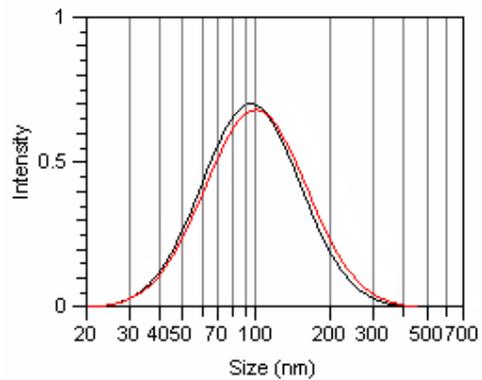


Figura 30. Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 9)

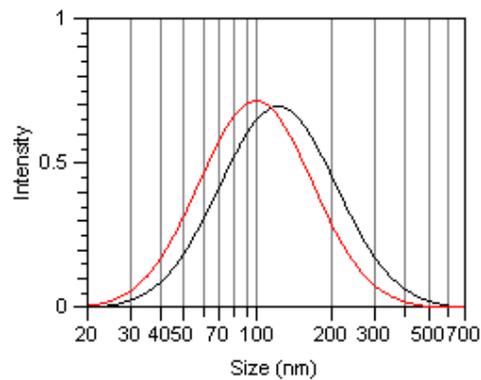


Figura 31. Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 10)

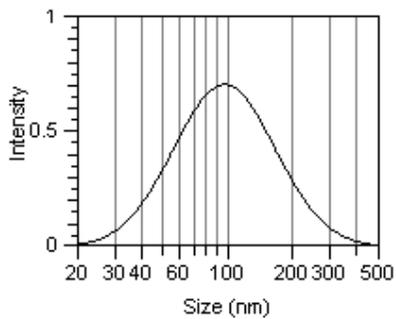


Figura 32. Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 11)

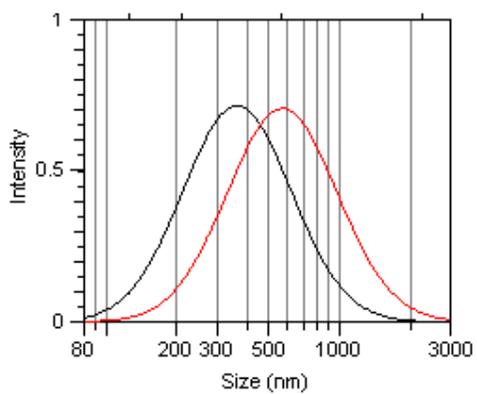


Figura 33. Distribución del tamaño de nanocristales de naproxeno (lote 12).

Distribución de tamaño de partícula para nifedipino utilizando la concentración de 0.5 de estabilizante.

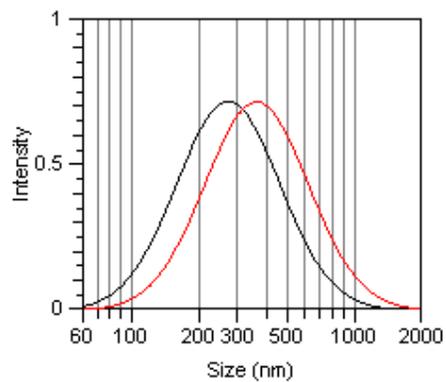


Figura 34. Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 9)

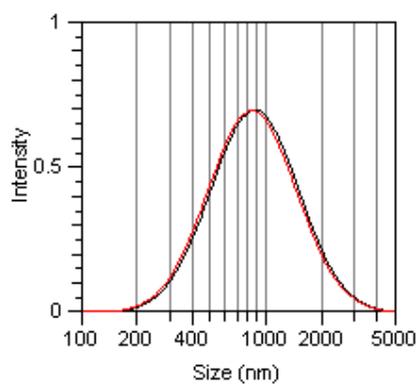


Figura 35. Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 10)

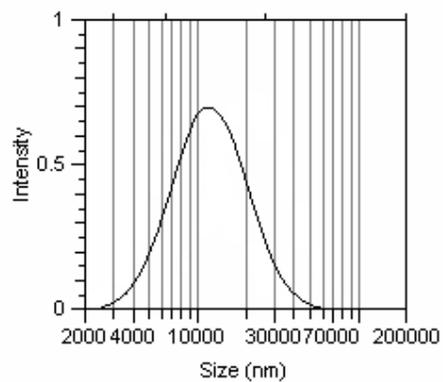


Figura 36. Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 11)

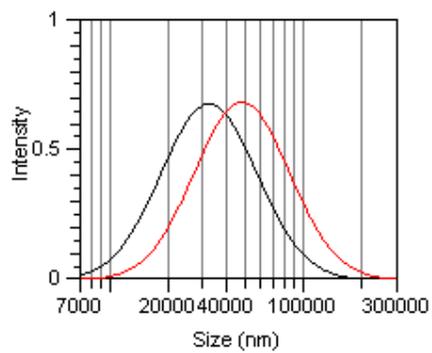


Figura 37. Distribución del tamaño de nanocristales de nifedipino (lote 12)

Distribución de tamaño de partícula para carbamazepina utilizando la concentración de 0.5 de estabilizante.

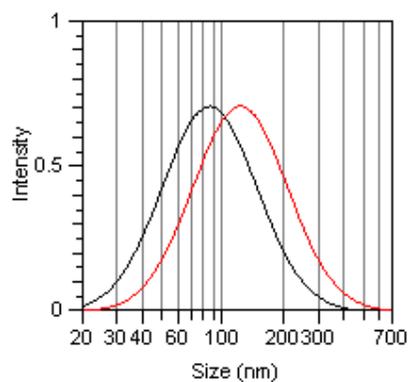


Figura 38. Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 9)

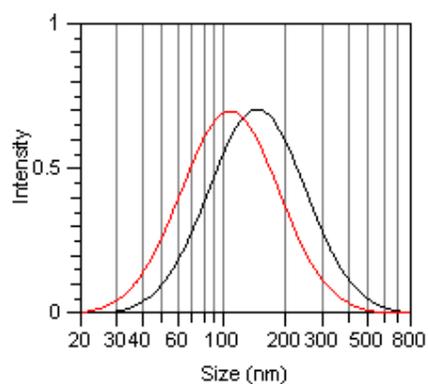


Figura 39. Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 10)

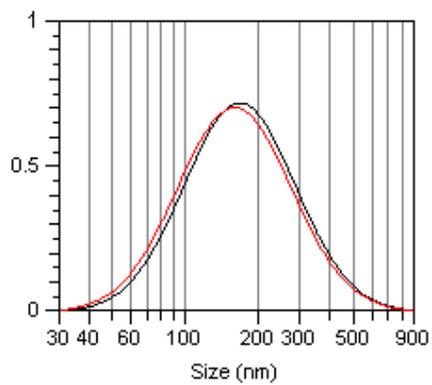


Figura 40. Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 11)

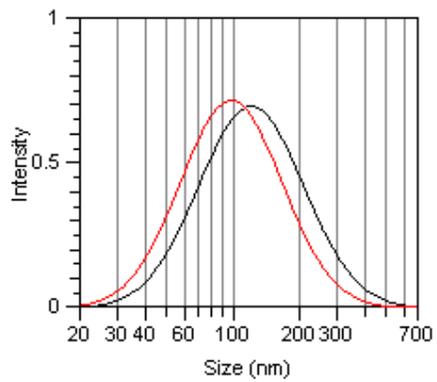


Figura 41. Distribución del tamaño de nanocristales de carbamazepina (lote 12)