

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CAMPO I

**Desarrollo y Caracterización de
Nanopartículas de Doble Pared**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ MIGUEL VÁZQUEZ RAMÍREZ

ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTITLÁN IZCALLI EDO. DE MÉXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Desarrollo y caracterización de nanopartículas de
doble pared.

que presenta el pasante: José Miguel Vázquez Ramírez
con número de cuenta: 099337865 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de septiembre de 2009

PRESIDENTE DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez

VOCAL Dr. David Quintanar Guerrero

SECRETARIO Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

PRIMER SUPLENTE Dra. Elizabeth Piñón Segundo

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Adriana Gil García

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía.”

Mary Shelley

“Daría todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

“El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona”

Aristóteles

A mis padres por creer en mí, gracias por guiar mi camino y apoyarme en todo momento... ¡Mi triunfo es suyo!

A mi familia por ser un gran ejemplo, en especial a mi hermano, la cuñis, mi madrina y mi sobrino por darme su cariño.

A ti Pkeña por estar a mi lado todo este tiempo, brindarme tu apoyo y comprensión, gracias por ser parte de mi vida.

¿Sabes cuánto te amo? Sólo llévalo hasta el fin de los tiempos, multiplícalo por el infinito y apenas tendrás una ligera idea de cuánto TE AMO.

A todos mis amigos por compartir tantos momentos conmigo, ya sean las viejas amistades (Dulce, Emma, Lizbeth, Lilitiana, Lorena, Nelly, Omar) como las más recientes (Carlos, Dalila, Daniel, Fabiola, Gaby, Jenny, Paty, Tamara) significan algo muy importante en mi vida.

Gracias a mis compañeros amigos del laboratorio por compartir sus conocimientos y amistad (Citlalli, Clara, Eddy, Ely, Geras, Lupita, Marlen, Malvina, Néstor, Toño y Sergio).

Al Dr. David y a la Dra. Adriana por su aprecio y apoyo en la realización de esta tesis.

A la FESC y a todos los profesores por ser parte fundamental en mi formación como profesionista.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luis Miguel', written in a cursive style.

ÍNDICE

Lista de Tablas	I
Lista de Figuras	III
Lista de Abreviaturas.....	V
I. Justificación	1
II. Marco teórico	3
1. Introducción	3
2. Nanopartículas.....	4
2.1. Definición	5
2.2. Clasificación	6
3. Efecto de las características de las Nanopartículas	7
3.1. Tamaño de Partícula	7
3.2. Propiedades de Superficie	7
3.3. Carga de Fármaco.....	8
3.4. Liberación del Fármaco	9
3.4.1. Efecto <i>Burst</i>	10
4. Caracterización de las Nanopartículas	12
4.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	12
4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	13
5. Métodos de Liberación <i>in vitro</i>	14
6. Materiales para la elaboración de Nanopartículas.....	15
6.1. Nanopartículas poliméricas	16
6.1.1. Métodos de elaboración de nanopartículas poliméricas	17
6.1.1.1. Polimerización	17
6.1.1.2. Dispersión de polímeros preformados.....	17
a) Emulsificación – Evaporación.....	18
b) “ <i>Salting-out</i> ”	18
c) Emulsificación-Difusión.....	19

d) Desplazamiento de solvente	19
6.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN)	21
6.2.1. Métodos de elaboración de SLN	22
6.2.1.1. Homogenización a alta presión.....	22
a) Homogenización a alta presión en caliente	23
b) Homogenización a alta presión en frío.....	24
6.2.1.2. Emulsificación/evaporación de solvente	24
6.3. Estabilizantes	25
6.4. Solventes.....	26
6.4.1. Clasificación ICH de solventes	26
III. Hipótesis	28
IV. Objetivo General	28
V. Objetivos Particulares	28
VI. Desarrollo Experimental.....	29
7. Material y Equipos	30
7.1. Reactivos	30
7.2. Equipos	30
8. Elaboración de nanopartículas	31
8.1. Preparación de nanopartículas de acetato ftalato de celulosa (CAP) por el método de desplazamiento de solvente	31
8.2. Preparación de nanopartículas de Compritol ATO 888 [®] (CMP) por el método de Emulsificación – Evaporación.....	32
8.3. Preparación de nanopartículas de doble pared a base de CAP y CMP por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación- evaporación	33
8.4 Purificación de las dispersiones de nanopartículas.....	34
9. Caracterización de las nanopartículas	34
9.1. Determinación del tamaño de partícula	34
9.2. Potencial Z (carga superficial).....	34
9.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	34

9.4. Determinación de la densidad de las nanopartículas	35
9.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	35
10. Determinación de los perfiles de solubilidad	36
10.1. Curva de calibración.....	36
10.2. Liberación a partir de NP de CAP y de doble pared	37
VII. Resultados y Análisis	38
11. Pruebas de solubilidad.....	38
12. Elaboración de NP convencionales.....	39
12.1. Tamaño de partícula	39
12.2. Potencial Z.....	43
12.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	45
12.4. Determinación de la densidad experimental de las nanopartículas	48
12.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	51
13. Selección del fármaco modelo	53
14. Caracterización de las nanopartículas cargadas	53
14.1. Tamaño de Partícula	54
14.2. Potencial Z.....	55
14.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	56
15. Carga de fármaco y eficiencia de encapsulamiento	57
16. Liberación a partir de NP de CAP y de doble pared	58
VIII. Conclusiones	60
IX. Referencias	61
X. Anexos	64
A. Curva de Calibración Sulfameracina.....	64
B. Distancias de los marcadores de densidad.....	65
C. Propiedades Físicoquímicas	65
D. Análisis estadístico de los perfiles de liberación.....	70

Lista de Tablas

Tabla 1.- Estabilidad de suspensiones en base a su potencial Z.....	8
Tabla 2.- Ventajas y desventajas del efecto <i>burst</i>	10
Tabla 3.- Comportamientos térmicos observados por DSC	12
Tabla 4.- Comparación de nanopartículas poliméricas y nanopartículas lipídicas.....	15
Tabla 5.- Lípidos usados para la elaboración de SLN.....	22
Tabla 6.- Estabilizantes y coestabilizantes utilizados para elaborar nanopartículas	25
Tabla 7.- Ejemplos de solventes Clase 1 empleados en la industria farmacéutica.....	26
Tabla 8.- Ejemplos de solventes Clase 2 empleados en la industria farmacéutica.....	27
Tabla 9.- Ejemplos de solventes Clase 3 empleados en la industria farmacéutica.....	27
Tabla 10.- Solubilidad de materiales poliméricos y lipídicos para la elaboración de NP	38
Tabla 11.- Prueba de solubilidad para CAP y Compritol.....	39
Tabla 12.-Tamaño promedio de partícula de NP de CAP con dos estabilizantes diferentes. ..	40
Tabla 13.-Tamaño promedio de partícula de NP de Compritol con tres estabilizantes diferentes.	40
Tabla 14.-Tamaño promedio de partícula de NP CAP y NP de Compritol con tres concentraciones diferentes de PVA	41
Tabla 15.-Tamaño promedio de partícula de NP de doble pared con dos concentraciones diferentes de PVA.	42
Tabla 16.- Potencial Z obtenido para las NP de CAP, Compritol y de doble pared	43
Tabla 17.- Resultados de densidad para las nanopartículas.....	50
Tabla 18.- Pruebas de solubilidad de la sulfameracina	53
Tabla 19.-Tamaño promedio de partícula de NP de CAP y de doble pared cargadas con el 5 % de sulfameracina	54
Tabla 20.- Potencial Z de NP de CAP y de doble pared cargadas con el 5 % de sulfameracina	55

Tabla 21.- Carga de fármaco (CF) y eficiencia de encapsulamiento (EE).....	57
Tabla 22.- Porcentajes promedio de liberación de sulfameracina a partir de NP de CAP y NP de doble pared	59
Tabla 23.- Distancias obtenidas con los marcadores de densidad.....	65
Tabla 24. Ejemplos de solventes y mezclas de solventes en los que el CAP es soluble.....	66
Tabla 25.- Solubilidades del poloxámero 188 y el poloxámero 407	68

Lista de Figuras

Figura 1.- Representación de las NP de doble pared.....	2
Figura 2.- Representación de nanocápsulas y nanoesferas. a) Fármaco disuelto en el núcleo oleoso, b) Fármaco absorbido en la pared, c) Fármaco adsorbido en la pared, d) Fármaco absorbido o disperso molecularmente en la matriz.....	6
Figura 3.- Representación de la bicapa eléctrica (Potencial Z).....	7
Figura 4.- Efecto <i>burst</i> en un sistema de liberación controlada de orden cero.....	10
Figura 5.- Redistribución del fármaco durante el paso de secado. Tomado de X. Huang <i>et al.</i> 2001.....	11
Figura 6.- Termograma de sacarosa en donde se observan la temperatura de transición vítrea (T_g), el proceso exotérmico de recristalización (T_c), y los procesos endotérmicos de fusión (T_f) y degradación.....	12
Figura 7.- Esquema de la formación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente. Modificado de D. Quintanar-Guerrero <i>et al.</i> 1998a.....	20
Figura 8.- Métodos de homogenización a alta presión.....	23
Figura 9.- Desarrollo experimental para la elaboración de NP de doble pared.....	29
Figura 10.- Representación de la preparación de NP poliméricas por el método de desplazamiento de solvente.....	31
Figura 11.- Representación de la preparación de SLN por el método de Emulsificación / Evaporación.....	32
Figura 12.- Representación de la preparación NP de doble pared por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación - evaporación.....	33
Figura 13.- Método de diálisis para la determinación de la liberación de sulfameracina a partir de NP.....	37
Figura 14.- Tamaño de partícula promedio para las NP de CAP y de Compritol con concentraciones diferentes de PVA.....	41
Figura 15.- Estabilidad de las NP e base a su potencial Z.....	44

Figura 16.- Termogramas de a) CAP materia prima y b) NP de CAP	45
Figura 17.- Termogramas de c) Compritol materia prima y d) NP de Compritol.....	46
Figura 18.- Termogramas de e) Mezcla física de CAP y Compritol y f) NP de doble pared...	46
Figura 19.- Termogramas de g) NP de Compritol, h) NP de CAP y i) NP de doble pared.....	47
Figura 20.- Curva de calibración para la determinación de la densidad experimental.....	48
Figura 21.- Bandas obtenidas en la determinación de densidad.....	49
Figura 22.- Micrografías de: a) NP de CAP 10 000x y b) NP de CAP 10 000x (Barra = 1 µm)	51
Figura 23.- Micrografías de: c) NP de Compritol 10 000 x y d) NP de Compritol 10 000x (Barra = 1 µm)	51
Figura 24.- Micrografías de: e) NP de doble pared 10 000x y f) NP de doble pared 45 000x (Barra = 1 µm)	52
Figura 25.- Tamaño promedio de partícula para las NP de CAP y NP de doble pared con y sin fármaco	54
Figura 26.- Estabilidad de las NP cargadas con sulfameracina al 5 % p/p.....	55
Figura 27.- Termogramas de a) NP de doble pared y b) NP de CAP cargadas con sulfameracina al 5 % p/p; y c) sulfameracina pura	56
Figura 28.- Perfiles de liberación de sulfameracina [—●—], NP de CAP [—◆—] y NP de doble pared [—■—].....	58
Figura 29.- Curva de calibración de sulfameracina en HCl 0.1 M a 241 nm.....	64
Figura 30.- Espectro de absorción de la sulfameracina en medio ácido [---] y alcalino [. . .]..	69

I. Justificación

El principal problema en el desarrollo de sistemas de liberación inyectables a base de polímeros es la rápida liberación inicial del fármaco (efecto *burst*) la cual ocurre durante los primeros minutos de contacto con el medio externo. Esta rápida liberación puede emplearse para la penetración del fármaco en sistemas que sean de aplicación dérmica; pero es importante tener un control en la liberación para fármacos que son tóxicos a altas concentraciones o si se desea tener una concentración eficiente por un largo periodo. Los sistemas nanoparticulados exhiben este mismo problema debido a que presentan una gran área superficial por lo que más fármaco asociado se encuentra cerca de la superficie de la partícula facilitando una rápida liberación y debido a su talla es difícil el control de la liberación. Se han desarrollado sistemas más sofisticados para reducir la liberación inicial por medio de un entrelazamiento en la superficie de la nanopartícula con lo que se logra disminuir la difusión del fármaco al medio externo; también se han preparado micropartículas con una mezcla de polímeros con diferente peso molecular y propiedades de hinchamiento para modificar la liberación del fármaco [T. Lee *et al.* 2002; A. Hasan *et al.* 2007].

La importancia de este trabajo radica en la generación de una nueva forma farmacéutica a base de nanopartículas, que cumplan con las características básicas de éstas (proteger, disponer y modificar la liberación del principio activo) y que disminuyan las principales desventajas que presentan (efecto *burst*) logrando obtener un mayor control en la liberación del fármaco.

En el presente trabajo se propone la formación de nanopartículas de doble pared (Fig. 1) que posean un núcleo primario formado de un polímero en donde se pretende incorporar el fármaco y una pared alterna a base de un lípido, con la finalidad de disminuir la rápida liberación inicial ya que potencialmente retardarían la difusión del fármaco al medio al tener que atravesar el núcleo primario y al presentar una barrera adicional formada por la pared alterna.

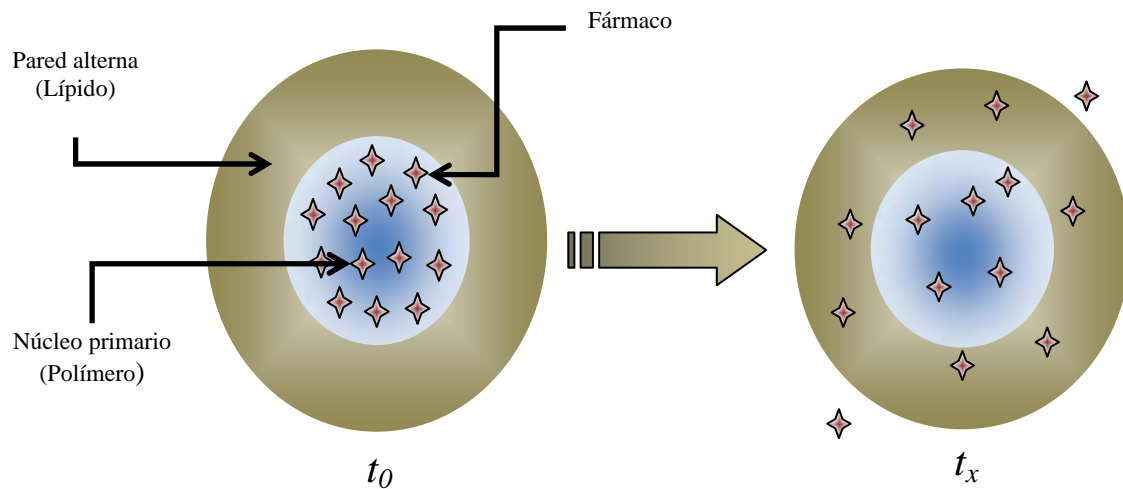


Figura 1.- Representación de las NP de doble pared

Se llevó a cabo la preparación de nanopartículas de doble pared empleando un material polimérico y uno lipídico por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación-evaporación. Además se atrapó un fármaco modelo (sulfameracina) en el núcleo primario polimérico para evaluar la liberación a partir de las nanopartículas de doble pared utilizando membranas de diálisis, siendo comparadas con nanopartículas convencionales cargadas con cantidades equivalentes de fármaco.

Se realizó la caracterización de las nanopartículas obtenidas, por medio de la determinación de su tamaño promedio, del potencial Z y empleando las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y la determinación de su densidad.

II. Marco teórico

1. Introducción

En los últimos años ha sido más evidente que el desarrollo de nuevos fármacos no es suficiente para el tratamiento de las enfermedades, dado que existen muchos factores para que una terapia no llegue a tener la eficacia esperada. Dentro de las razones que existen para que una terapia falle se encuentran:

- a) Una pobre solubilidad de los fármacos.
- b) Una concentración insuficiente debido a una pobre absorción, un rápido metabolismo o una rápida eliminación del principio activo.
- c) Una amplia distribución del fármaco en otros tejidos lo que podría ocasionar efectos secundarios no deseados.
- d) Una alta fluctuación de los niveles plasmáticos del fármaco lo que limitaría su acción.

En base a esto, en un principio se desarrollaron sistemas de liberación que ayudaran a mejorar las terapias existentes; las funciones de los sistemas de liberación pueden clasificarse generalmente en dos categorías: la primera es para mejorar la eficacia al tener un control sobre la liberación, y la segunda es para disminuir la toxicidad del fármaco al proporcionar especificidad [M. Breunig, *et al.* 2008].

Y dentro de las finalidades que se persiguen al desarrollar nuevos sistemas de liberación, se encuentran:

- a) Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química.
- b) Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios.
- c) Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.
- d) Incrementar la penetración y distribución intracelular cuando el sitio de acción del fármaco se encuentra en el interior de la célula [J. Vila-Jato, 2007].

Por lo anterior se le ha dado una mayor importancia al desarrollo de sistemas transportadores o acarreadores del fármaco, los cuales son capaces de controlar la liberación del fármaco y de dirigirlo hasta su lugar de acción (“*tejido diana*”). El destino del fármaco *in vivo* depende de las propiedades del fármaco lo que provoca una deficiente distribución de éste o que no se encuentre en concentraciones adecuadas en el sitio de acción, pero un sistema acarreador permite llevar a cabo una liberación en un sitio específico lo que garantizaría la acción del fármaco evitando efectos secundarios.

El tamaño de los acarreadores depende de la vía de administración, pero se ha demostrado que el uso de acarreadores con tallas submicrónicas pueden dar las características adecuadas para controlar la liberación de los fármacos y de dirigir esta liberación a un sitio específico [W. Mehnert y K. Mäder, 2001].

Por esta razón se han desarrollado actualmente nuevos sistemas de administración y liberación de fármacos a base de acarreadores coloidales los cuales incluyen liposomas, nanoemulsiones, micelas, micropartículas, y nanopartículas. Los sistemas acarreadores a base de materiales sólidos (polímeros y/o lípidos) como lo son las nanopartículas presentan mayores ventajas que los liposomas en cuanto a estabilidad y reproducibilidad, además de favorecer la penetración de los fármacos en zonas corporales de difícil acceso [D. Ramos *et al.* 2000].

2. Nanopartículas

Las nanopartículas han sido usadas como potenciales sistemas de liberación de fármacos debido a su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos, mejorando su biodisponibilidad y protegiéndolos de la degradación biológica, física o química; además de poder ser dirigido alrededor de un órgano en particular y, debido a su tamaño, atravesar barreras biológicas [A. Date *et al.* 2007].

2.1. Definición

Las nanopartículas con propósitos farmacéuticos son definidas por Kreuter en 1983 y esta definición fue adoptada por la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica la cual nos dice que éstas son partículas coloidales sólidas que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000 nm (1 μ m), las cuales consisten de materiales macromoleculares y pueden ser usadas terapéuticamente como acarreadores de fármacos, en las cuales el activo (fármaco o material biológicamente activo) está disuelto, entrampado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula [J. Kreuter, 2007].

Los mayores logros que poseen las nanopartículas como sistemas de liberación son el control del tamaño de partícula, las propiedades de superficie y la liberación de agentes farmacológicamente activos para alcanzar la dosis terapéutica óptima en un sitio específico de acción.

Las ventajas de usar nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos son:

- a) El tamaño de partícula y las características de la superficie son fácilmente manipulables.
- b) El control sobre la liberación del fármaco durante la transportación hasta llegar al sitio específico de acción, logrando una mayor eficacia del fármaco y la reducción de los efectos adversos.
- c) La liberación controlada y las características de degradación de las partículas pueden ser modificadas por cambios en los constituyentes de la matriz.
- d) La localización en un sitio específico puede ser alterada mediante la unión de ligandos en la superficie de las partículas o usando guías magnéticas.
- e) El sistema puede ser usado para varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc.
- f) La posibilidad de solubilizar activos hidrofóbicos.

2.2. Clasificación

Las nanopartículas se pueden dividir en dos grupos: Las nanoesferas (NE) y las nanocápsulas (NC) las cuales difieren en su constitución (Fig. 2). Las NE son sistemas matriciales en las cuales el fármaco está física y uniformemente dispersado, mientras que las NC son sistemas en los cuales el fármaco se encuentra en una cavidad rodeada por una membrana del material; desde el punto de vista farmacéutico las NC son atractivas porque su cavidad central, basada en aceite, permite un alto nivel de encapsulación para sustancias lipofílicas [S. Schaffazick *et al.* 2003].

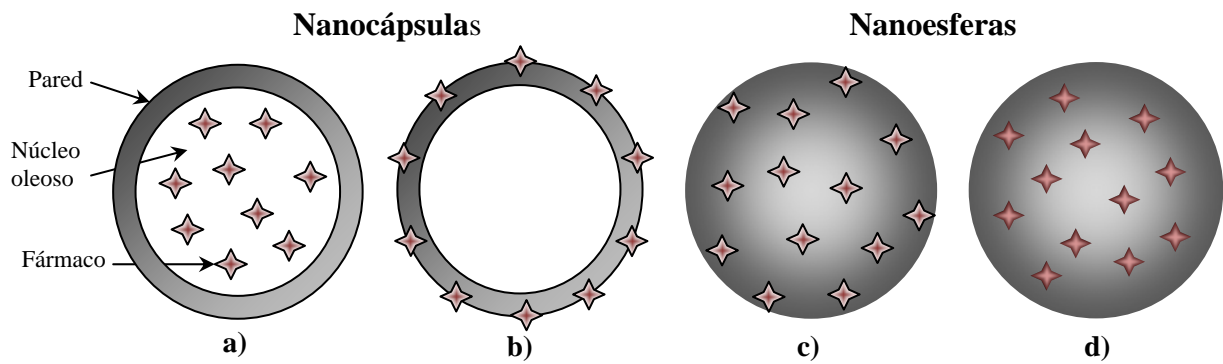


Figura 2.- Representación de nanocápsulas y nanoesferas. a) Fármaco disuelto en el núcleo oleoso, b) Fármaco absorbido en la pared, c) Fármaco adsorbido en la pared, d) Fármaco absorbido o disperso molecularmente en la matriz

3. Efecto de las características de las Nanopartículas

3.1. Tamaño de Partícula

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, además de influenciar en la carga de fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de partículas grandes que poseen un mayor núcleo por lo que la difusión del fármaco será lenta. Debido a su tamaño, las nanopartículas tienen un alto riesgo de agregación durante su almacenamiento y transportación [V. Mohanraj y Y. Chen, 2006].

3.2. Propiedades de Superficie

Las cargas superficiales influyen en la distribución de las cargas (iones) alrededor de la partícula desarrollando un campo eléctrico formado por una carga circundante formado por: a) una región interior donde los iones se encuentran fuertemente enlazados (capa de Stern) y b) una región donde los iones están menos enlazados (capa difusa) [L. Chiu Li y Y. Tian, 2002].

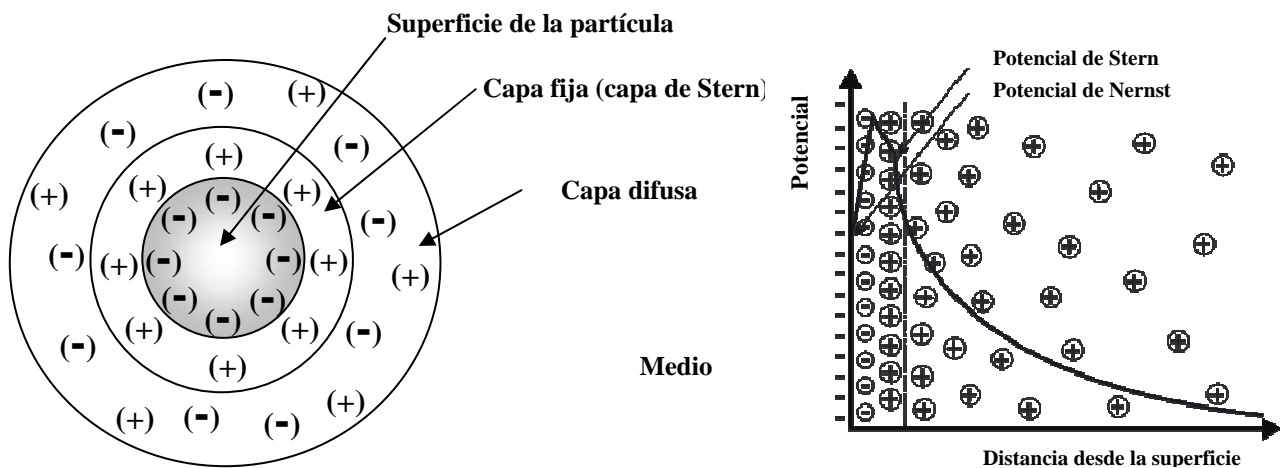


Figura 3.- Representación de la bicapa eléctrica

Las cargas eléctricas tienen un importante papel en la determinación de la interacción de las partículas resultando en la estabilidad física de la dispersión coloidal.

El potencial Z de una nanopartícula es utilizado para caracterizar la carga de la superficie; éste refleja el potencial eléctrico de las partículas y es influenciado por la composición de la matriz y por el medio en el que son dispersadas. Como se muestra en la tabla 1 las nanopartículas con potencial Z entre (+/-) 30 mV son estables en suspensión y la carga en la superficie previene la agregación de las partículas. El potencial Z puede ser usado para determinar si un material con carga activa se encuentra encapsulado en el centro de una nanopartícula o adsorbido en la superficie [T. Riddick, 1968].

Tabla 1.- Estabilidad de suspensiones en base a su potencial Z

Estabilidad	Potencial Z (mV)
Muy buena	-100 a -60
Buena	-60 a -40
Moderada	-40 a -30
Umbral de dispersión	-30 a -15
Umbral de aglomeración	-15 a -10
Fuerte aglomeración y precipitación	-5 a +5

3.3. Carga de Fármaco

Idealmente, un buen sistema nanoparticulado debe de poseer una alta capacidad de carga, con lo que se reduce la cantidad de material que forma la matriz en la administración. La carga y la eficiencia de entrapamiento del fármaco dependen de la solubilidad en el estado sólido de éste en la matriz, el cual se relaciona con la composición de polímero o lípido, el peso molecular y la interacción fármaco - matriz.

La carga del fármaco puede llevarse a cabo por dos métodos:

- a) Incorporación durante la elaboración de las nanopartículas (método de incorporación).
- b) Absorción del fármaco después de la formación de las nanopartículas por incubación con una solución concentrada del fármaco (método de adsorción/absorción).

3.4. Liberación del Fármaco

El mecanismo de liberación de principios activos a partir de nanopartículas puede verse en 3 etapas:

1. Una liberación inicial de fármaco enlazado a la superficie de la nanopartícula; seguida de
2. Una liberación difusional a través de la matriz de las nanopartículas y a través de los poros durante la degradación de la matriz; y por último,
3. Una liberación erosional debido a la desintegración de la matriz y disolución después que la matriz pierde su integridad y es degradada a un tamaño suficiente para ser solubilizada [D. Ramos *et al.* 2000].

Si bien, el mecanismo de liberación sigue las etapas antes mencionadas, también va a depender de varios factores entre los que se encuentran:

- a) La solubilidad del fármaco.
- b) Desorción del fármaco unido a la superficie y del absorbido.
- c) Difusión del fármaco desde la matriz de la nanopartícula.
- d) Difusión (en el caso de NC) a través de la pared de la nanopartícula.
- e) La erosión/degradación de la matriz.
- f) Combinación del proceso de erosión/degradación.

El proceso de liberación de los fármacos a partir de nanopartículas esta influenciado por el mecanismo de liberación, la solubilidad, el coeficiente de difusión y la velocidad de degradación de los materiales que conforman la matriz, pero también depende en gran parte de la distribución del principio activo el cual puede estar distribuido homogéneamente o heterogéneamente [V. Mohanraj y Y. Chen, 2006].

3.4.1. Efecto *Burst*

En muchos sistemas de liberación controlada ocurre una gran liberación inicial de fármaco inmediatamente después de estar en contacto con el medio de liberación antes de que se alcance un perfil estable, este fenómeno es denominado como efecto *burst*. Como se muestra en la figura 4 este efecto se caracteriza por una alta liberación inicial del fármaco en un tiempo muy corto comparado con el proceso completo de liberación, lo que reduce el tiempo de vida efectivo del sistema.

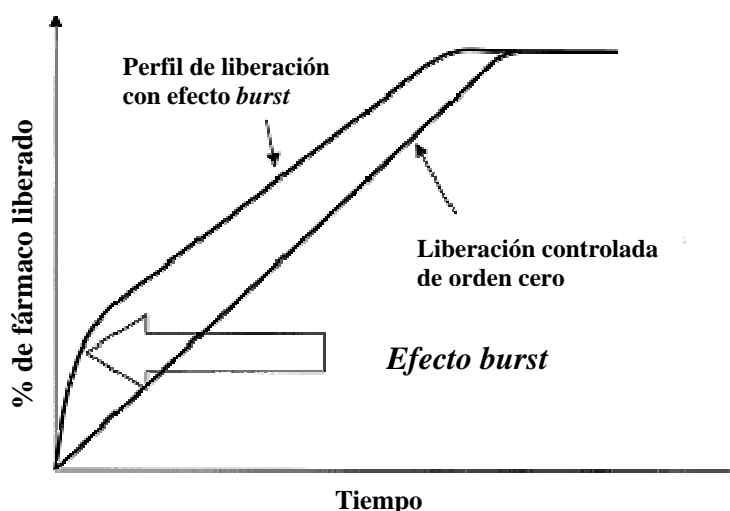


Figura 4.- Efecto *burst* en un sistema de liberación controlada de orden cero

El estudio del efecto *burst* es importante debido a las altas concentraciones que se pueden alcanzar después de la administración del sistema. Este efecto puede ser visto desde dos perspectivas: a) como consecuencia negativa al crear sistemas de liberación controlada o, en ciertos casos, b) una rápida liberación o altas concentraciones pueden ser deseables (Tabla 2).

Tabla 2.- Ventajas y desventajas del efecto *burst*

Ventajas del efecto <i>burst</i>	Efectos negativos del efecto <i>burst</i>
Tratamiento de heridas (liberación rápida en el sitio de acción)	Toxicidad local o sistémica (por las altas concentraciones de fármaco)
Encapsulación de saborizantes	Tiempo de vida corto de los fármacos <i>in vivo</i>
Liberación dirigida (efecto <i>burst</i> accionado)	Perfil de liberación corto requiriendo más dosificación
Liberación pulsátil	

En los sistemas matriciales como los son las NP, el efecto *burst* es atribuido principalmente a las condiciones de manufactura, a las propiedades del fármaco y al límite de percolación.

Una causa de que se presente este efecto es que el fármaco puede quedar atrapado o adsorbido en la superficie de la matriz durante el proceso de manufactura. El mecanismo por el cual se libera el fármaco requiere la disolución de éste seguido por la difusión a través de los poros hinchados de la matriz, de la misma forma la difusión y migración del principio activo ocurre durante el proceso de secado. El fármaco puede difundir por convección con el agua con lo que ocasionaría una distribución heterogénea en la matriz aumentando la concentración cerca de la superficie (Fig. 5).

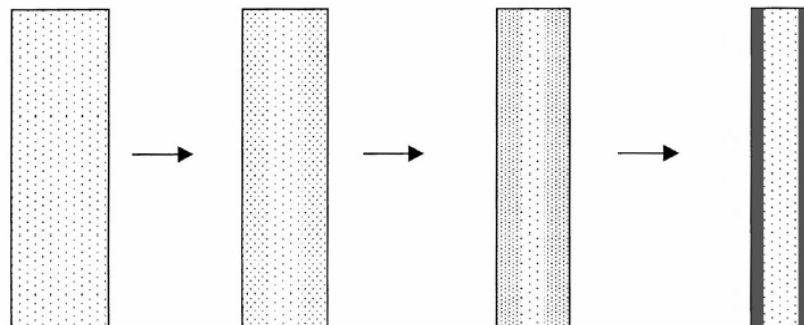


Figura 5.- Redistribución del fármaco durante el paso de secado.
Tomado de X. Huang *et al.* 2001

Las propiedades físicas y químicas de varios principios activos, así como su peso molecular tienen un efecto sobre su liberación; por ejemplo, la solubilidad y el coeficiente de partición pueden propiciar una mayor liberación debida a un desequilibrio termodinámico [X. Huang *et al.* 2001].

La teoría de percolación nos menciona que el principio activo absorbido se encuentra como fármaco móvil, el cual puede difundir libremente una vez que se ha hidratado la matriz; y fármaco inmóvil el cual difunde sólo después de que se ha incrementado el tamaño de los poros o de la degradación de la matriz; por lo que la rapidez de la liberación va a depender de la cantidad de fármaco móvil que se encuentre en la matriz [M. Millán *et al.* Submitted].

4. Caracterización de las Nanopartículas

4.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica analítica térmica que mide el flujo de calor intercambiado en una muestra al variar su temperatura con lo que se puede caracterizar las propiedades físicas y energéticas de una sustancia; y por medio de ésta es posible obtener información cuantitativa acerca de los cambios exotérmicos, endotérmicos y la capacidad calorífica en función de la temperatura y del tiempo.

Los componentes simples pueden exhibir los siguientes comportamientos térmicos: fusión, cristalización, ebullición, sublimación, transiciones vítreas y transiciones polimórficas, las cuales pueden ser exotérmicas o endotérmicas (Tabla 3) [S-D. Clas *et al.* 1999].

Tabla 3.- Comportamientos térmicos observados por DSC

Endotérmicas	Exotérmicas
Fusión	Cristalización
Vaporización	Condensación
Sublimación	Solidificación
Degradación	Oxidación
Transición vítrea	Descomposición

En la figura 6 se expone un termograma de sacarosa en donde se pueden observar los principales comportamientos térmicos como lo son transición vítrea, cristalización, fusión y degradación.

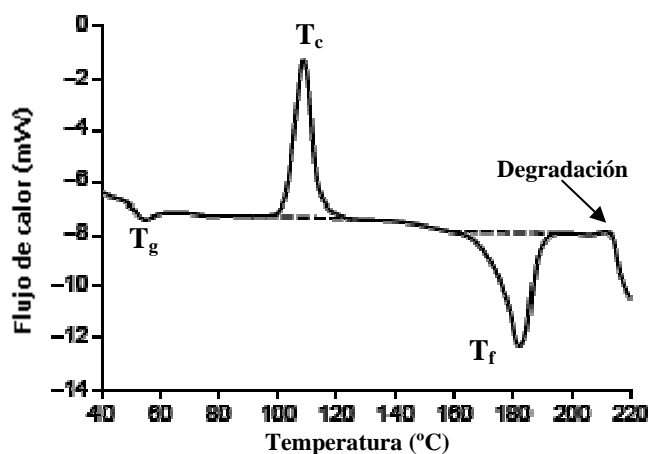


Figura 6.- Termograma de sacarosa en donde se observan la temperatura de transición vítrea (T_g), el proceso exotérmico de recristalización (T_c), y los procesos endotérmicos de fusión (T_f) y degradación.

4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales, proporcionando información morfológica del material analizado.

En la MEB la muestra es recubierta con una capa de metal delgado y después se hace incidir un haz delgado de electrones acelerados enviados desde un cañón. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de ésta; la señal emitida por los electrones y radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se amplifica. Este microscopio tiene una resolución de 3 y 20 nm y un rango de aumentos que varía desde 10 hasta 200 000 con una distancia focal de 35 mm [www.uned.es].

Las principales ventajas del MEB son la alta resolución ($\approx 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da la apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. [M. Grágeda y S. Montesinos, *Submitted*].

5. Métodos de Liberación *in vitro*

Para la determinación experimental de los perfiles de liberación *in vitro* de los fármacos se han propuesto varios métodos; entre los cuales se encuentran:

- a) Celdas de difusión con membranas artificiales o biológicas.
- b) Difusión por diálisis.
- c) Diálisis reversa.
- d) Agitación seguida de ultracentrifugación / centrifugación.

Debido a la pérdida de tiempo y a las dificultades técnicas encontradas en la separación de nanopartículas de los medios de liberación, generalmente se emplean las técnicas con membranas de difusión: celdas de difusión y membranas de diálisis [E. Piñón-Segundo, 2003].

Las celdas de difusión consisten en dos compartimentos, uno donador y el otro receptor, separados por una membrana artificial o biológica, en donde la suspensión de NP es colocada en el compartimento donador y al liberarse el fármaco pasará por difusión al compartimento receptor.

En la difusión por diálisis una suspensión de NP es añadida en una bolsa/tubo de diálisis previamente hidratada la cual es incubada en el medio de disolución en donde el fármaco, de bajo peso molecular, que se vaya liberando pasará por difusión a través de la membrana hasta que exista un equilibrio entre el interior de la bolsa y el medio externo. Es importante señalar que para lograr un equilibrio entre el contenido de las bolsas y el medio externo, la membrana debe ser sumergida en dicho medio unas horas antes de agregar la suspensión [K. Soppimath, *et al.*2001].

6. Materiales para la elaboración de Nanopartículas

Las nanopartículas pueden ser preparadas de diversos materiales como polímeros, lípidos, proteínas o polisacáridos. La selección de la matriz depende de muchos factores, incluyendo:

- a) Tamaño de partícula requerido.
- b) Propiedades inherentes del fármaco (ej. solubilidad, estabilidad, etc.).
- c) Características de superficie como carga y permeabilidad.
- d) Grado de biodegradabilidad, de biocompatibilidad y de toxicidad.
- e) Perfil de liberación del fármaco requerido.
- f) Antigenicidad del producto final [Mohanraj y Chen, 2006].

La elaboración de NP con fines farmacéuticos principalmente es a base de polímeros y lípidos debido a las características que le confieren estos materiales al sistema acarreador, éstas se enlistan y se comparan en la tabla 4.

Tabla 4.- Comparación de nanopartículas poliméricas y nanopartículas lipídicas

	<i>SLN</i>	<i>Nanopartículas poliméricas</i>
Liberación parenteral	Posible	Posible
Liberación oral	Posible	Posible
Liberación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos	Si	Si
Estabilidad física	+++	+++
Estabilidad biológica	++	+++
Biocompatibilidad	+++	++
Fácil esterilización	++	++
Vectorización	++	++
Carga de fármaco	De baja a moderada	++
Fácil comercialización	++	+
Aceptación de excipientes	+++	+

Tomado de A. Date *et al.* 2007 +++ Alta ++ Moderada + Baja

Otros materiales importantes para lograr elaborar nanopartículas por los diferentes métodos son los solventes y los estabilizantes; ya que de su óptima selección y de la proporción en que se empleen van a depender las características de las nanopartículas en cuanto a su tamaño y a

la facilidad de su formación; éstos van a elegirse según el método de elaboración y el material con el que se forme la matriz.

6.1. Nanopartículas poliméricas

Varios polímeros se han utilizado en la investigación para desarrollar sistemas de liberación de fármacos ya que pueden entregar con eficacia el fármaco en un sitio específico lo que minimiza los efectos secundarios; además de que presentan un buen control sobre la liberación del fármaco.

Los poliésteres son atractivos para desarrollar sistemas inyectables de liberación controlada por su disponibilidad, biodegradabilidad, nula toxicidad, biocompatibilidad y por ser combinables con una amplia gama de principios activos. Los poliésteres más empleados han sido el ácido poli-DL-láctico (PLA) y el ácido poli-D-láctico-co-glicólico (PLGA) por la ausencia total de toxicidad de los productos de degradación y su modulable velocidad de degradación. La poli-ε-caprolactona (PCL) presenta una mayor vida media biológica en el cuerpo y mayor permeabilidad que el PLA, y se ha empleado para el diseño de sistemas biodegradables para encapsular esteroides [D. Ramos *et al.* 2000].

6.1.1. Métodos de elaboración de nanopartículas poliméricas

6.1.1.1. Polimerización

La polimerización fue el primer método empleado para la elaboración de nanopartículas el cual fue desarrollado por Birrenbach y Speiser en 1976. En el cual el monómero es dispersado bajo agitación en una fase continua en la cual es inmisible. La polimerización comienza por reacción de los iniciadores con las moléculas del monómero para comenzar a formar la cadena de polímero hasta que ésta sea insoluble debido a su peso molecular; cuando la reacción se ha completado, las partículas formadas contienen un gran número de cadenas poliméricas y el tamaño de las partículas puede ser controlado por la concentración de estabilizante presente [J. Kreuter, 1994; E. Fatal y C. Vauthier, 2002].

6.1.1.2. Dispersión de polímeros preformados

Existen varias limitantes para el uso del método de polimerización para la elaboración de nanopartículas debido a que algunos de los polímeros empleados no son biodegradables, además de que los productos residuales de reacción como monómeros, oligómeros y catalizadores no son biocompatibles o pueden ser tóxicos; otra desventaja importante de esta técnica es el empleo de solventes tóxicos.

Considerando las limitaciones de las nanopartículas obtenidas por polimerización, en los últimos años se han empleado polímeros biodegradables preformados para la elaboración de nanopartículas ya que presentan buena histocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad.

Dentro de los métodos más actuales para preparar nanopartículas a partir de polímeros preformados se pueden mencionar:

- a) Emulsificación - evaporación
- b) “Salting-out”
- c) Emulsificación - difusión
- d) Desplazamiento de solvente

a) Emulsificación – Evaporación

Este método fue patentado por J. W. Vanderhoff en 1979, originalmente fue implementado para la preparación de pseudolátex. En este método el polímero preformado y el fármaco hidrofóbico son disueltos en un solvente orgánico inmiscible en agua el cual es emulsificado en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante para formar una emulsión O/W. Después de la formación de emulsión el solvente orgánico es evaporado bajo presión reducida con agitación continua, resultando una dispersión de nanopartículas. El paso de emulsificación es un factor determinante para obtener partículas de talla nanométrica [D. Quintanar-Guerrero *et al.* 1998a].

b) “*Salting-out*”

En este método las nanopartículas son preparadas empleando una fase acuosa saturada con un electrolito (agente *salting-out*); saturando la fase acuosa se reduce la miscibilidad del solvente en el agua por el proceso *salting-out* y permite la formación de una emulsión O/W a partir de las fases que de otra manera serían miscibles.

El polímero y el fármaco son disueltos en un solvente miscible en agua y esta solución es emulsificada bajo vigorosa agitación mecánica con una fase acuosa que contiene el agente *salting-out* y un estabilizador coloidal. Posteriormente la emulsión formada se diluye con un volumen suficiente de solución acuosa para que el solvente difunda en la fase acuosa y así inducir la formación de nanopartículas. El solvente y el agente *salting-out* son eliminados por filtración de flujo cruzado.

Los agentes *salting-out* empleados son electrolitos como cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y acetato de magnesio; y no electrolitos como la sacarosa.

c) Emulsificación-Difusión

Este método involucra el uso de solventes parcialmente miscibles en agua (como lo son alcohol bencílico y acetato de etilo), los cuales son previamente saturados con agua para asegurar un equilibrio termodinámico de ambos líquidos. El polímero es disuelto en el solvente saturado con agua el cual se emulsifica por agitación con el agua saturada con el solvente que ya contiene un estabilizante. Después de este paso se agrega agua sin saturar en el sistema con lo que el solvente difunde hacia la fase externa con lo que se forman las nanopartículas del polímero. [D. Quintanar-Guerrero *et al.* 1998b]

d) Desplazamiento de solvente

En este proceso el polímero, el fármaco y, opcionalmente, un estabilizante lipofílico (ej. fosfolípidos) son disueltos en un solvente semipolar miscible en agua (ej. acetona, etanol, etc.). Esta solución es inyectada en una solución acuosa que contiene un estabilizante bajo agitación magnética. Las nanopartículas son formadas instantáneamente por una difusión rápida del solvente para después ser eliminado bajo presión reducida.

Esta técnica fue descrita y patentada por H. Fessi en 1987 elucidando el mecanismo de formación al preparar nanocápsulas de ácido poli-DL-láctico; éste se debe a la turbulencia interfacial entre dos fases líquidas en desequilibrio generada durante la difusión del solvente, lo que ocasiona remolinos que favorecen la formación de gotas de tamaño nanométrico, las cuales son estabilizadas por acción del estabilizante, seguida de una difusión completa del solvente con lo que ocurre la agregación del polímero (Fig. 7) [H. Fessi *et al.* 1989; D. Quintanar-Guerrero *et al.* 1998a].

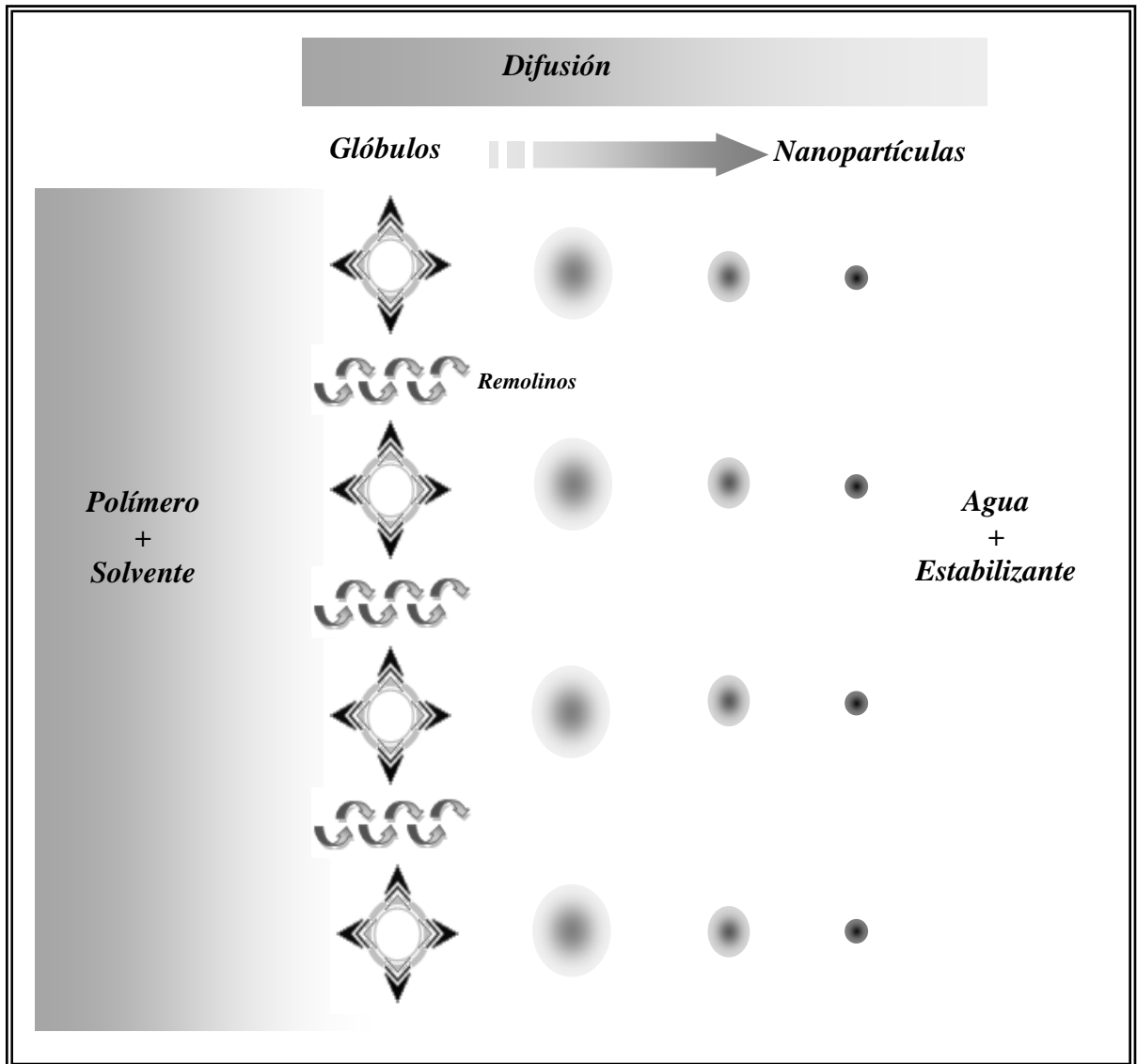


Figura 7.- Esquema de la formación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente. Modificado de D. Quintanar-Guerrero *et al.* 1998a

6.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN)

Existen dos razones principales para limitar el uso de polímeros: la citotoxicidad de dichos polímeros y la falta de un método adecuado para su producción a gran escala. Los polímeros son aceptados para su uso en implantes pero no necesariamente son bien tolerados en forma de nanopartículas. En un rango de tamaño nanométrico o de pocos micrómetros, el polímero puede internarse en las células y degradarse dentro de ellas lo que puede llevar a efectos citotóxicos [R. Müller *et al.* 2000].

A principios de los 90's la investigación se enfocó en la búsqueda de una alternativa para las nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) resultaron una adecuada opción para ser empleadas como acarreadores de fármacos. Una ventaja clara de las nanopartículas lipídicas sobre las poliméricas es el hecho de que la matriz del lípido está formada de lípidos fisiológicos o de lípidos biodegradables / biocompatibles, con lo que se disminuye el riesgo de que se presente una toxicidad crónica [A. Date, *et al.* 2007; M. Trotta *et al.* 2003].

Las nanopartículas lipídicas sólidas combinan las ventajas de otros sistemas acarreadores como lo son: a) incrementar la estabilidad del fármaco, b) la posibilidad de controlar la liberación del fármaco, c) la incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, d) la vectorización del fármaco y e) la nula biotoxicidad de los acarreadores [S. Wissing *et al.* 2004].

Los ingredientes empleados para la elaboración de SLN incluyen los lípidos, emulsificadores, agua y, dependiendo del método, solventes. La matriz de las SLN incluye lípidos naturales o sintéticos los cuales pueden ser degradados, incluyendo triglicéridos (ácido triesteárico, ácido tripalmítico, ácido triláurico), esteroides (colesterol) y ceras; algunos ejemplos se muestran en la tabla 5 [H. Jun y Z. Shi-wen, 2007].

Tabla 5.- Lípidos usados para la elaboración de SLN

<i>Lípidos</i>
Triglicéridos
Tricaprin
Trilaurin
Tripalmitina
Tristearina
Lípidos sólidos
Witepsol®
Gliceril monoesterato (Imwitor®)
Gliceril behenato (Compritol® 888 ATO)
Gliceril palmitoesterato (Precirol® ATO 5)
Cetil palmitato
Ácido esteárico
Ácido palmítico
Ácido behénico

6.2.1. Métodos de elaboración de SLN

6.2.1.1. Homogenización a alta presión

La homogenización a alta presión ha surgido como una buena técnica para la producción de SLN. Los homogenizadores empleados empujan un líquido a altas presiones (100 – 2000 bar) a través de un espacio estrecho (en un rango de pocos micrones). El fluido es acelerado a altas velocidades (1000 km/h) a cortas distancias lo que provoca la división de las partículas a un rango submicrónico.

La producción de SLN por homogenización puede llevarse a cabo por homogenización en caliente y homogenización en frío. En ambos casos, un primer paso es la incorporación del fármaco en el lípido por disolución o dispersión del fármaco en el lípido fundido (Fig. 8) [W. Mehnert y K. Mäder, 2001].

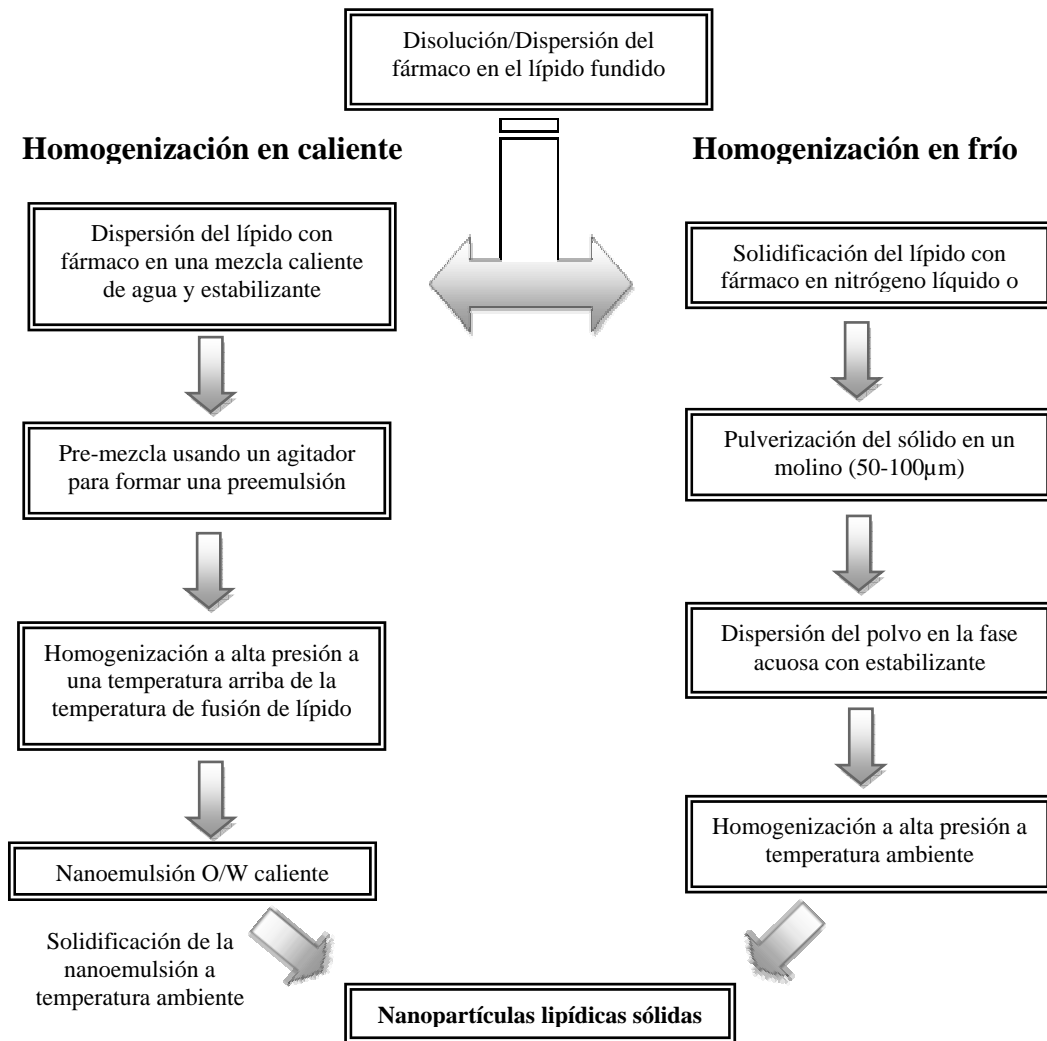


Figura 8.- Métodos de homogenización a alta presión

a) Homogenización a alta presión en caliente

La homogenización en caliente se lleva a cabo a temperaturas por arriba del punto de fusión del lípido (aproximadamente 5 °C por arriba del punto de fusión). Primero se realiza una preemulsión del lípido fundido que contiene el fármaco con la fase acuosa conteniendo estabilizante a la misma temperatura. Esta preemulsión es sometida a una homogenización a alta presión de la cual resulta una nanoemulsión ya que el lípido se encuentra en estado líquido. Las partículas sólidas son formadas por un enfriamiento de la muestra a temperatura ambiente.

b) Homogenización a alta presión en frío

La homogenización en frío ha sido desarrollada debido a los siguientes problemas de la homogenización en caliente:

- a) La alta temperatura produce la degradación del fármaco (fármacos termolábiles).
- b) La distribución del fármaco en la fase acuosa durante la homogenización (fármacos hidrofílicos).
- c) La complejidad del paso de cristalización de la nanoemulsión provoca modificaciones en el lípido.

El primer paso es igual al de la homogenización en caliente en donde se solubiliza o se dispersa el fármaco en el lípido fundido seguido de un rápido enfriamiento, altos rangos de enfriamiento favorecen una distribución homogénea del fármaco en la matriz lipídica e incrementan la fragilidad del lípido. El sólido es molido para generar micropartículas, las cuales son dispersadas en la fase acuosa con estabilizante para formar una preemulsión la cual se someterá a una homogenización a alta presión a temperatura ambiente [W. Mehnert y K. Mäder, 2001].

6.2.1.2. Emulsificación/evaporación de solvente

En el método de emulsificación/evaporación se obtiene una dispersión de nanopartículas por precipitación de una emulsión O/W. El lípido es disuelto en un solvente orgánico inmiscible en agua (cloroformo, ciclohexano) el cual es emulsificado en una fase acuosa que contiene el estabilizante; después se lleva a cabo la evaporación del solvente a presión reducida para formar una dispersión de nanopartículas sólidas del lípido en el medio acuoso. Una ventaja de este método es que se evitan altas temperaturas durante la preparación por lo que se pueden incorporar fármacos termolábiles, siendo una desventaja los solventes residuales [S. Wissing *et. al.* 2004].

6.3. Estabilizantes

El estabilizante nos ayuda a la formación de las nanopartículas, al actuar como un agente activo de superficie, y a su estabilización al evitar que se formen agregados en el momento de su creación o durante el proceso de la eliminación del solvente. Los estabilizantes pueden actuar por protección estérica o por repulsión electrostática dependiendo de la naturaleza de éste [V. Mosqueira *et al.* 2000].

El tipo de estabilizante y su concentración son de gran impacto en la calidad de la dispersión, al realizar varios experimentos se encontró que altas concentraciones de estabilizante reducen la tensión superficial y facilitan la partición de las partículas durante la homogenización y el tipo de estabilizante va a depender de la naturaleza del material a emplear para la elaboración de las nanopartículas; algunos ejemplos de estabilizantes y coestabilizantes empleados en el desarrollo de nanopartículas lipídicas se enlistan en la tabla 6 [W. Mehnert y K. Mäder, 2001].

Tabla 6.- Estabilizantes y coestabilizantes utilizados para elaborar nanopartículas

<i>Estabilizantes</i>	<i>Coestabilizantes</i>
Poloxámero 188	Ácido taurocólico, sal sódica
Poloxámero 182	Ácido taurodeoxicólico, sal sódica
Poloxámero 407	Butanol
Lecitina de soya (Lipoid® S 75, Lipoid® S 100)	Ácido butírico
Lecitina (Lipoid® E 80)	Dioctil sulfosuccinato de sodio
Fosfatidilcolina (Epikuron® 170, 200)	Ácido monoctil fosfórico de sodio
Poloxamina 908	
Tyloxapol	
Polisorbato 20	
Polisorbato 60	
Polisorbato 80	
Alcohol polivinílico	

Un estabilizante muy usado en la preparación de nanopartículas es el alcohol polivinílico (PVA), el cual funciona como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanopartículas. Las moléculas de PVA se encuentran adsorbidas

formando una capa estable en la superficie de las nanopartículas lo cual permite una fácil redispersión cuando las nanopartículas han sido liofilizadas.

6.4. Solventes

El empleo de solventes va a depender del método para la elaboración de nanopartículas; ya que en algunos métodos es necesario emplear solventes miscibles en agua y en otras ocasiones se va a necesitar un solvente inmisible en agua; además de que su uso está limitado a aquellos solventes que no representen algún nivel tóxico elevado para su uso en humanos.

6.4.1. Clasificación ICH de solventes

Los residuos de solventes en la industria farmacéutica son definidos como químicos orgánicos volátiles que son usados o producidos en la manufactura de fármacos o excipientes y en la preparación de productos farmacéuticos. Los solventes empleados son removidos pero no son completamente eliminados.

Los solventes han sido clasificados en base a su toxicidad en tres clases:

Clase 1: Son solventes conocidos como agentes carcinogénicos en humanos y peligrosos para el medio ambiente por lo que serán evitados en la producción de fármacos y excipientes (Tabla 7).

Tabla 7.- Ejemplos de solventes Clase 1 empleados en la industria farmacéutica

<i>Solvente</i>	<i>Concentración límite (ppm)</i>	<i>Riesgo</i>
Benceno	2	Carcinogénico
Tetracloruro de carbono	4	Tóxico y peligro ambiental
1,2-dicloroetano	5	Tóxico
1,1,1-tricloroetano	1500	Peligro ambiental

Clase 2: En esta clase se encuentran solventes que son agentes carcinógenos en animales no genotóxicos o posibles causantes de una toxicidad irreversible como neurotoxicidad o teratogenicidad siendo también solventes sospechosos de otras toxicidades significativas pero reversibles. Se limitará el uso de estos solventes y se cuantificarán al final del proceso de

manufactura para determinar si los residuos se encuentran dentro de los límites establecidos para cada uno de ellos (Tabla 8).

Tabla 8.- Ejemplos de solventes Clase 2 empleados en la industria farmacéutica

<i>Solvente</i>	<i>PDE (mg/día)</i>	<i>Concentración límite (ppm)</i>
Acetonitrilo	4.1	410
Clorobenceno	3.6	360
Cloroformo	0.6	60
Ciclohexano	38.8	3880
Diclorometano	6.0	600
Etilenglicol	6.2	620
Hexano	2.9	290
Metanol	30.0	3000
Metil butil cetona	0.5	50
Piridina	2.0	200
Tolueno	8.9	890

Clase 3: En esta clase se encuentran los solventes con baja toxicidad para los humanos; no hay límite de exposición necesario. Los solventes de clase 3 tienen una exposición diaria permitida (PDE) de 50 mg por día o más. [ICH: Guideline for residual solvents, 2005]

Tabla 9.- Ejemplos de solventes Clase 3 empleados en la industria farmacéutica

<i>Solventes</i>		
Ácido acético	Ácido fórmico	Metiletilcetona
Acetona	Heptano	Metilisobutilcetona
Butanol	Acetato de isobutilo	Pentano
Etanol	Acetato de isopropilo	Propanol
Acetato de etilo	Acetato de metilo	Tetrahidrofurano

III. Hipótesis

Si se logra la formación de nanopartículas que posean un núcleo primario y una pared alterna se obtendrá un sistema de liberación controlada que disminuya potencialmente la rápida liberación inicial que se presenta en las nanopartículas convencionales de un sólo material.

IV. Objetivo General

Obtener nanopartículas de doble pared por medio de los métodos de emulsificación-evaporación y desplazamiento de solvente, empleando polímeros preformados y materiales lipídicos; con la finalidad de disminuir la rápida liberación inicial característica en las nanopartículas convencionales.

V. Objetivos Particulares

- a) Desarrollar un método factible para la elaboración de nanopartículas de doble pared combinando dos métodos para la obtención de sistemas nanoparticulados.
- b) Caracterizar las nanopartículas de doble pared, por medio de la determinación de su tamaño promedio, del potencial Z y empleando las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido, Microscopía Electrónica de Barrido y la determinación de su densidad.
- c) Encapsular un fármaco modelo (sulfameracina) en el núcleo polimérico para evaluar la liberación a partir de las nanopartículas de doble pared utilizando membranas de diálisis.
- d) Determinar si las nanopartículas de doble pared disminuyen la rápida liberación inicial (efecto *burst*) al comparar los perfiles de liberación *in vitro*, entre éstas y nanopartículas convencionales.

VI. Desarrollo Experimental

En el siguiente diagrama (Fig. 9) se resume el protocolo experimental del desarrollo de las nanopartículas de doble pared.

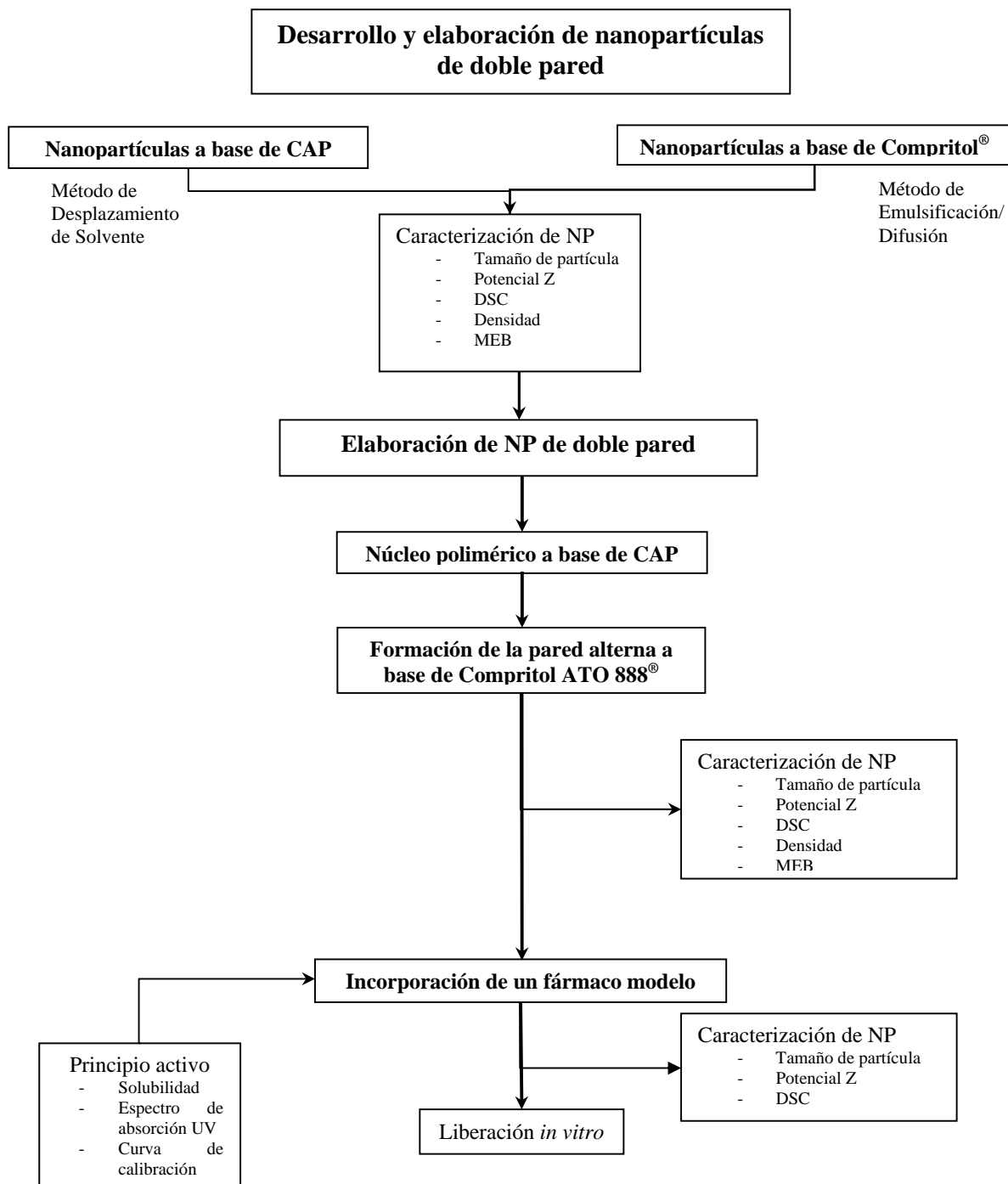


Figura 9.- Desarrollo experimental para la elaboración de NP de doble pared

7. Material y Equipos

7.1. Reactivos

Ácido clorhídrico GR (J.T. Baker, México)
Acetato ftalato de celulosa (Vita Drug[®], México)
Compritol ATO 888[®] (Gattefossé[®], Francia)
Alcohol polivinílico, Mowiol[®] 4-88 (Glomarza, México)
Pluronic[®] F-127 – Poloxámero 407 (BASF, México)
Pluronic[®] F- 68 – Poloxámero 188 (BASF, México)
Sulfameracina
Sílica coloidal Percoll[®] (Fluka, Suiza)
Cloruro de sodio GR (Productos Químicos Monterrey, México)
Marcadores de densidad (Pharmacia Biotech AB, Suecia)
Acetona (Fermont, México)
Cloroformo RA (Tecsiquim, México)
Agua desionizada GA (Mili-Q[®], Francia)

7.2. Equipos

Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC Q10 TA Instruments[®], USA)
Dispersador (Ultraturrax[®] T-25 Basic, IKA[®])
Espectrofotómetro UV-Vis (Varian, Cary IE95031003, Australia)
Liofilizadora de mesa (Labconco[®], USA)
Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)
MilliQ (Millipore[®], USA)
Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec[®], Thermoline, USA)
Rotavapor (Laborota[®] 4000, Heidolph, Alemania)
Ultracentrífuga Optima[®] LE-80K (Beckman, USA)
Ultrasonicador (Branson[®], USA)
Vórtex (Mixer, Mod. M 16715, USA)
Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd. UK)
Material de cristalería en general

8. Elaboración de nanopartículas

8.1. Preparación de nanopartículas de acetato ftalato de celulosa (CAP) por el método de desplazamiento de solvente

Las nanopartículas poliméricas se prepararon por el método descrito por Fessi *et al.* basado en la agregación del polímero después de la difusión del solvente. Primero se disuelven 150 mg de CAP en un solvente orgánico miscible en agua (acetona) el cual se inyecta en una solución de alcohol polivinílico (PVA) al 3 % p/v bajo agitación para la formación de las nanopartículas, en este punto el solvente comienza a difundir provocando la formación de gotas nanométricas las cuales son estabilizadas por el PVA, se deja en agitación por 10 min más para favorecer la agregación del polímero y posteriormente se pasa al rotavapor (-5 °C baño de recirculación / 30 °C evaporador) bajo presión reducida hasta eliminar el exceso de solvente (Fig. 10) [V. Mosqueira *et al.* 2000].

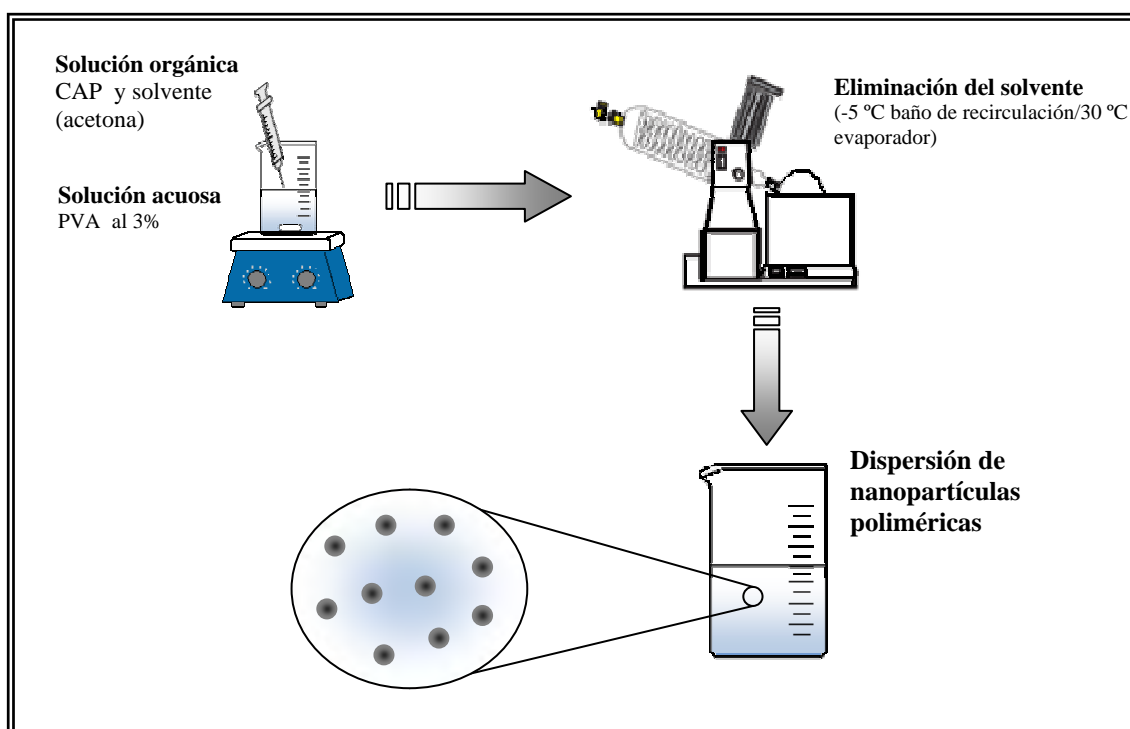


Figura 10.- Representación de la preparación de NP poliméricas por el método de desplazamiento de solvente

8.2. Preparación de nanopartículas de Compritol ATO 888[®] (CMP) por el método de Emulsificación – Evaporación

Las SLN se prepararon por el método de emulsificación – evaporación. Sjöström y Bergenstal [1992], fueron los primeros en preparar dispersiones de nanopartículas lipídicas por precipitación de emulsiones o/w. Para elaborar las SLN primero se pesan 150 mg de *Compritol ATO 888[®]* y se disuelven en un solvente orgánico inmisible en agua (cloroformo) el cual es emulsificado con una solución de PVA al 3 % usando un homogenizador (Ultraturrax[®] T-25) por 5 min a 11000 rpm y 5 min a 16000 rpm, bajo estas condiciones se forma una nanoemulsión. El solvente orgánico es eliminado bajo presión reducida en un rotavapor (-5 °C baño de recirculación / 30 °C evaporador) lo que ocasiona la formación de nanopartículas sólidas a base de behenato de glicerilo (Fig. 11) [W. Mehnert y K. Mäder, 2001].

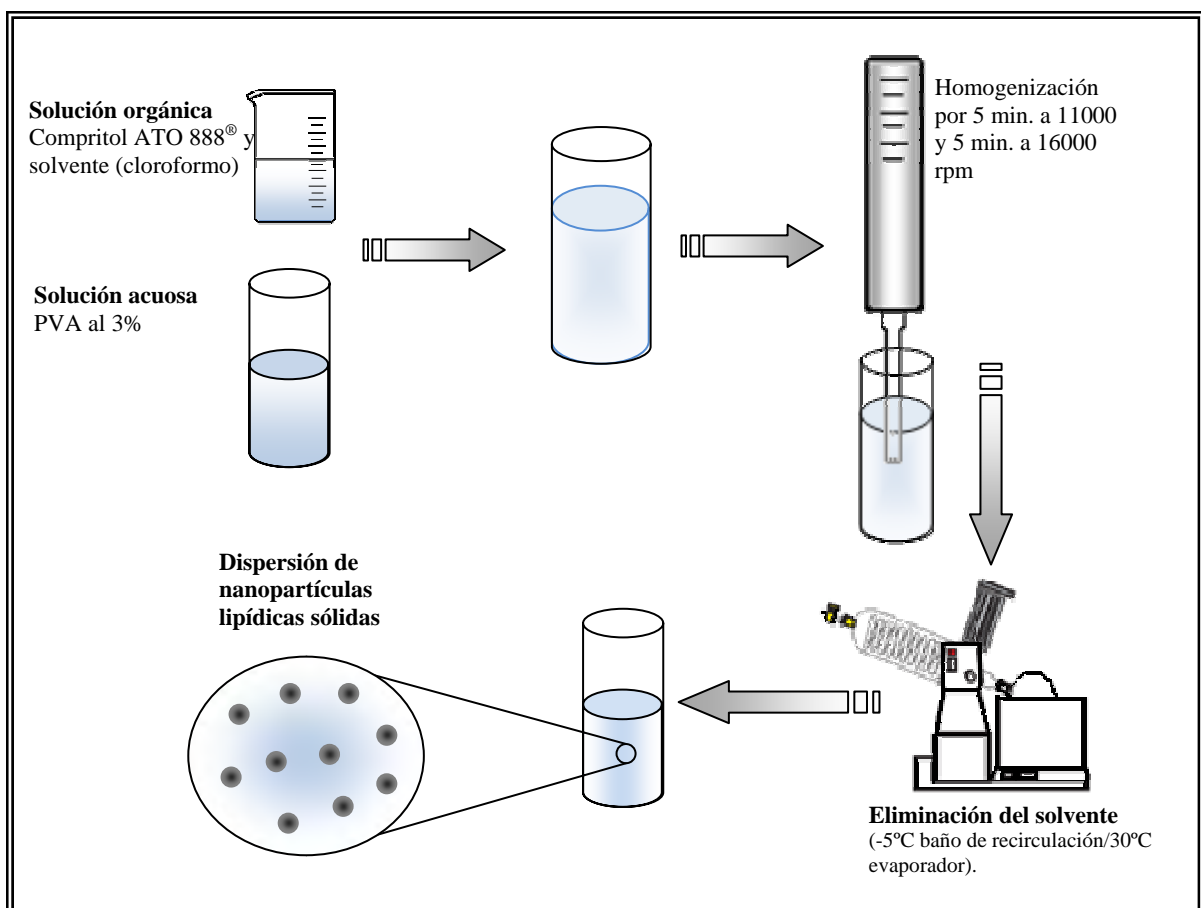


Figura 11.- Representación de la preparación de SLN por el método de Emulsificación – Evaporación

8.3. Preparación de nanopartículas de doble pared a base de CAP y CMP por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación- evaporación

El núcleo polimérico de las nanopartículas de doble pared se preparó por el método de desplazamiento de solvente. Primero se disuelven 150 mg de CAP en 12.5 ml de acetona el cual se inyecta en una solución de PVA al 3 % p/v bajo agitación para la formación del núcleo. El solvente orgánico es eliminado bajo presión reducida en un rotavapor. Posteriormente; se lleva a cabo la formación de la doble pared lipídica por el método de emulsificación- evaporación. Se disuelven 150 mg de CMP en 10 ml de cloroformo el cual se emulsifica con la dispersión de NP de CAP con PVA al 3 % p/v usando un homogenizador en dos ciclos de 5 min a 11000 rpm y a 16000 rpm. Finalmente se pasa al rotavapor bajo presión reducida hasta eliminar el exceso de solvente (Fig. 12).

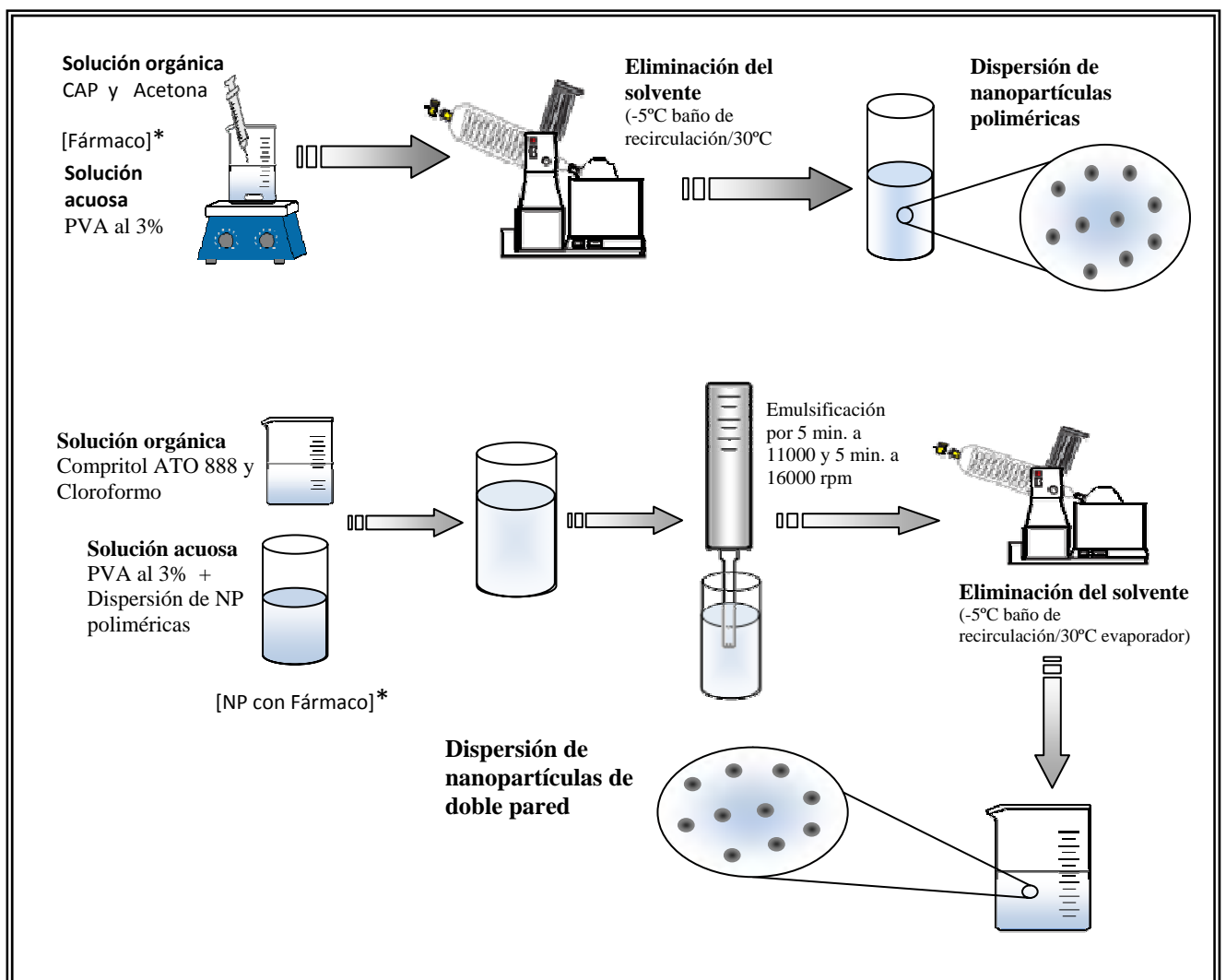


Figura 12.- Representación de la preparación NP de doble pared por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación- evaporación.

Para eliminar el estabilizante (PVA), una vez evaporado el solvente se centrifuga la dispersión de nanopartículas a 25 000 rpm por 1 hora en ultracentrífuga, se retira el sobrenadante y se lava con agua destilada para después resuspender la pastilla formada por agitación constante

por 20 horas y por sonicación durante 1 hora. Después las nanopartículas se liofilizaron para eliminar el agua. Las muestras se congelaron por 2 horas y posteriormente se colocan en la liofilizadora de mesa (Labconco[®]) por 24 horas bajo las siguientes condiciones de temperatura y vacío: -50 °C y 0.1 μbar.

9. Caracterización de las nanopartículas

9.1. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula de las nanopartículas se determina empleando el Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd.), cada dispersión de nanopartículas es diluida con agua desionizada del MilliQ (Millipore[®], USA) hasta alcanzar la concentración adecuada para las mediciones.

9.2. Potencial Z (carga superficial)

Se determina utilizando el Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd.) empleando una celda de capilar doblado con 150 v de corriente eléctrica; cada dispersión de nanopartículas es diluida con agua desionizada del MilliQ (Millipore[®], USA) hasta alcanzar la concentración adecuada para las mediciones.

9.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se determina el comportamiento térmico de las nanopartículas y sus constituyentes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Primero se realiza una calibración con un estándar de indio y después cada una de las muestras liofilizadas se pesan (3-5 mg) directamente en charolas de aluminio no herméticas y se escanean entre 0 °C y 300 °C con un calentamiento de 10 °C/min y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min utilizando el DSC Q10 (TA Instruments[®], USA).

9.4. Determinación de la densidad de las nanopartículas

Se realiza la determinación de la densidad de las NP mediante la separación de éstas en un gradiente de sílica coloidal (Percoll[®]) formado *in situ* durante la ultracentrifugación empleando marcadores de densidad como estándar externo a base de micropartículas de dextran.

Se colocan en un tubo 7.5 ml de Percoll[®] al 45% v/v en solución de NaCl 0.15M al cual se le agregan 400 µl de la dispersión de cada una de las NP; posteriormente se centrifugan en un rotor modelo 90Ti Beckman a 4 °C a 10000 rpm durante 3 hrs. Después del tiempo necesario se obtienen las distancias entre la parte superior del menisco y las bandas empleando un vernier. En un tubo por separado se agregan a la sílica coloidal los marcadores de densidad formados por micropartículas de diferentes densidades conocidas los cuales se someten a las mismas condiciones que las muestras y usados para la calibración externa con las bandas formadas. La densidad de las NP se determina gráficamente mediante interpolación en la curva obtenida con los datos de distancia y densidad de los marcadores.

9.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se observaron las muestras de NP de CAP, NP de Compritol y de NP de doble pared para realizar una comparación de la morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas.

Las muestras se preparan realizando una dilución de la dispersión de NP. Se colocan unas gotas sobre un cubreobjetos y se dejan secar para después colocarles un recubrimiento de oro (≈ 20 nm). Se observaron con un microscopio electrónico de barrido (MEB, JSM-25SII; JEOL, Japón).

10. Determinación de los perfiles de solubilidad

Se realizó una revisión de las propiedades de solubilidad a diversos fármacos seleccionando un fármaco que fuera soluble en el solvente empleado en la elaboración del núcleo polimérico (acetona) y que fuera insoluble en el solvente que se utiliza en la formación de la doble pared (cloroformo).

Para poder evaluar la liberación a partir de las nanopartículas de doble pared y saber si se disminuye el efecto *burst* se incorporó un fármaco modelo en el núcleo polimérico de las NP de doble pared y se compararon los perfiles con los obtenidos de la liberación de NP convencionales de CAP.

La incorporación del fármaco se llevó a cabo en la primera etapa para la elaboración de las NP poliméricas, disolviendo tanto el CAP como el fármaco elegido en la fase orgánica para después seguir con proceso normal para la formación de estas NP; la incorporación del fármaco en este punto nos asegura que el principio activo queda dispersado en la matriz polimérica (Fig. 11).

10.1. Curva de calibración

El primer paso para obtener un perfil de liberación es realizar una curva de calibración para poder cuantificar la cantidad liberada de sulfameracina durante la experimentación. El medio a emplear fue HCl 0.1M debido a que a pH bajos la sulfameracina es completamente soluble.

10.2. Liberación a partir de NP de CAP y de doble pared

El método que se seleccionó para analizar la liberación de las NP fue el de difusión por diálisis. Se pesan 30 mg de la muestra de NP liofilizadas y se añaden en una bolsa de diálisis previamente hidratada en medio de HCl 0.1 M (2-3 hrs), resuspendiéndolas en 4 ml de medio y se colocan en un vaso con 26 ml de HCl 0.1 M que se encuentra con agitación magnética constante a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 4 ml a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 min) hasta completar 8 hrs, los cuales son sustituidos con medio fresco para conservar el volumen inicial. Las muestras son leídas en el espectrofotómetro a 241 nm e interpoladas en la curva de calibración. La prueba se efectúa durante 72 hrs para establecer la máxima cantidad liberada de fármaco (Fig. 13) [K. Soppimath, *et al.*2001].

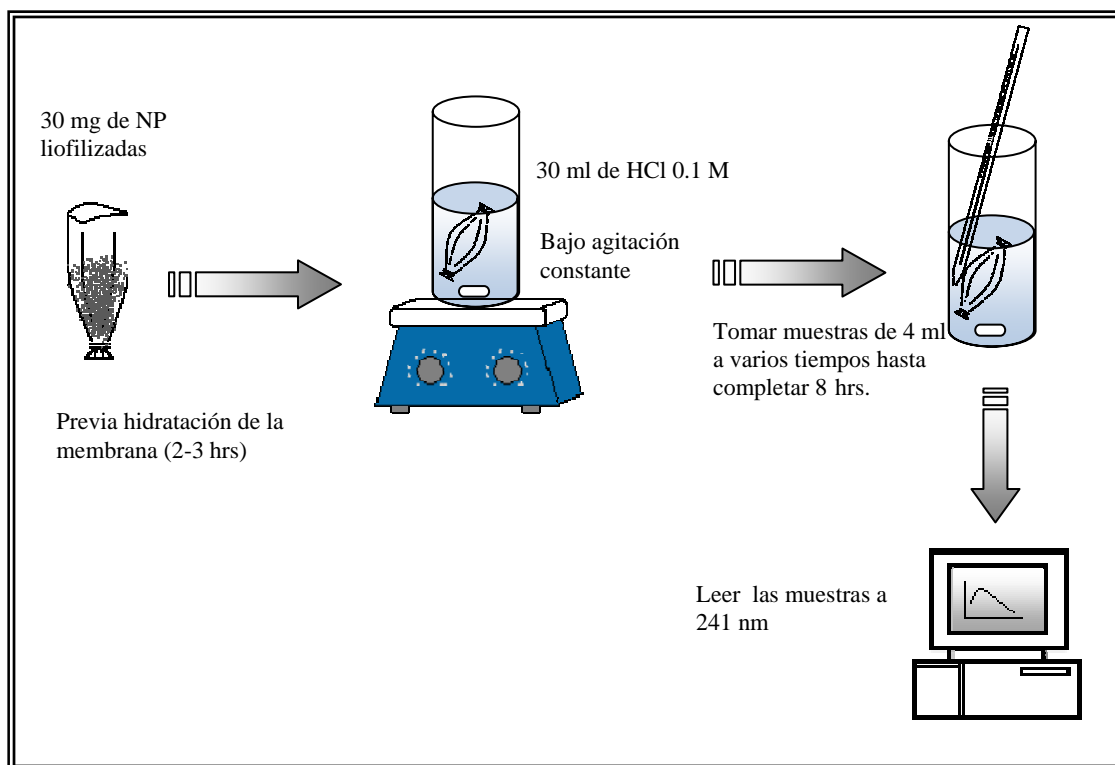


Figura 13.- Método de diálisis para la determinación de la liberación de sulfameracina a partir de NP

VI. Desarrollo Experimental

En el siguiente diagrama (Fig. 9) se resume el protocolo experimental del desarrollo de las nanopartículas de doble pared.

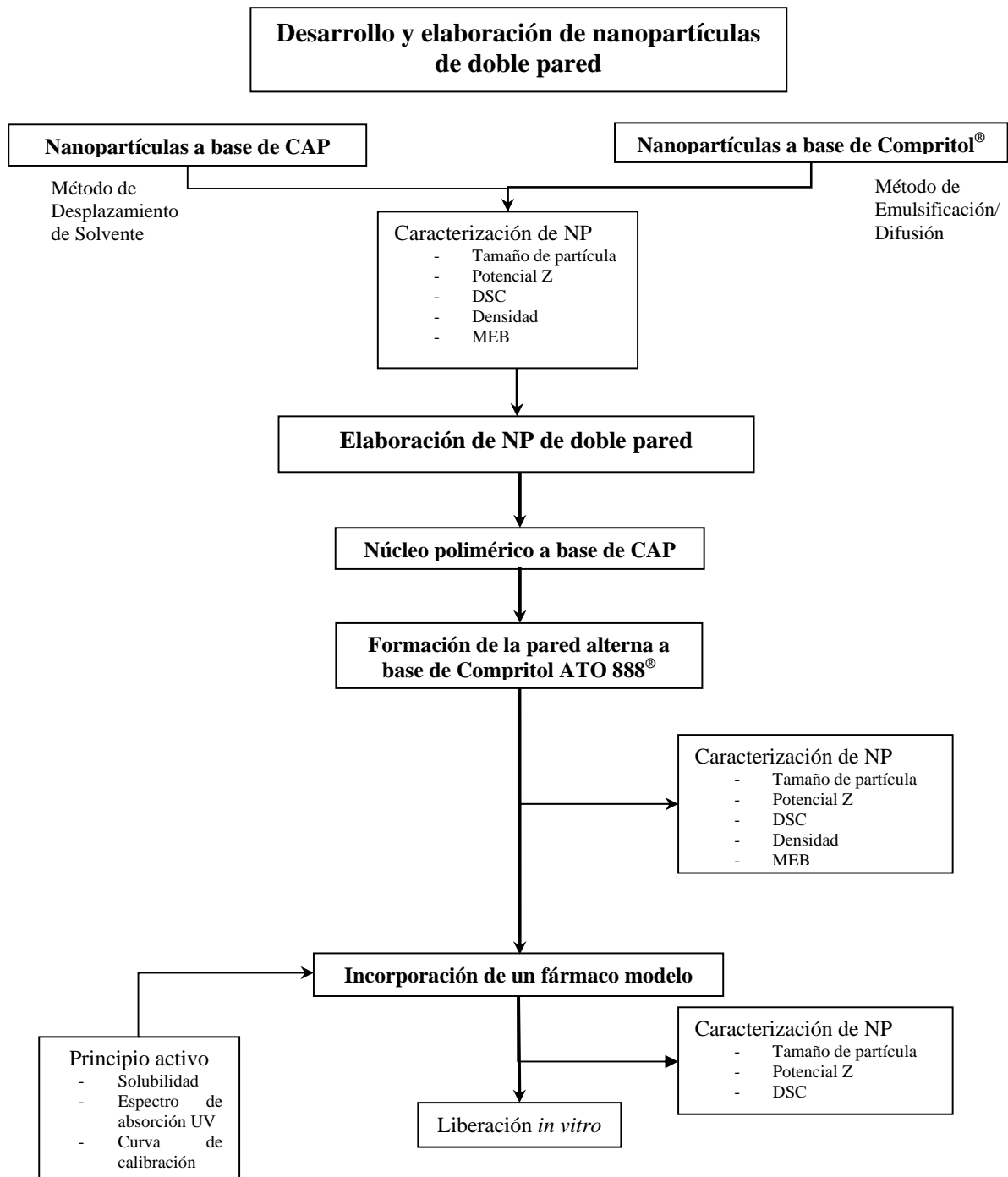


Figura 9.- Desarrollo experimental para la elaboración de NP de doble pared

7. Material y Equipos

7.1. Reactivos

Ácido clorhídrico GR (J.T. Baker, México)
Acetato ftalato de celulosa (Vita Drug[®], México)
Compritol ATO 888[®] (Gattefossé[®], Francia)
Alcohol polivinílico, Mowiol[®] 4-88 (Glomarza, México)
Pluronic[®] F-127 – Poloxámero 407 (BASF, México)
Pluronic[®] F- 68 – Poloxámero 188 (BASF, México)
Sulfameracina
Sílica coloidal Percoll[®] (Fluka, Suiza)
Cloruro de sodio GR (Productos Químicos Monterrey, México)
Marcadores de densidad (Pharmacia Biotech AB, Suecia)
Acetona (Fermont, México)
Cloroformo RA (Tecsiquim, México)
Agua desionizada GA (Mili-Q[®], Francia)

7.2. Equipos

Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC Q10 TA Instruments[®], USA)
Dispersador (Ultraturrax[®] T-25 Basic, IKA[®])
Espectrofotómetro UV-Vis (Varian, Cary IE95031003, Australia)
Liofilizadora de mesa (Labconco[®], USA)
Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)
MilliQ (Millipore[®], USA)
Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec[®], Thermoline, USA)
Rotavapor (Laborota[®] 4000, Heidolph, Alemania)
Ultracentrífuga Optima[®] LE-80K (Beckman, USA)
Ultrasonicador (Branson[®], USA)
Vórtex (Mixer, Mod. M 16715, USA)
Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd. UK)
Material de cristalería en general

8. Elaboración de nanopartículas

8.1. Preparación de nanopartículas de acetato ftalato de celulosa (CAP) por el método de desplazamiento de solvente

Las nanopartículas poliméricas se prepararon por el método descrito por Fessi *et al.* basado en la agregación del polímero después de la difusión del solvente. Primero se disuelven 150 mg de CAP en un solvente orgánico miscible en agua (acetona) el cual se inyecta en una solución de alcohol polivinílico (PVA) al 3 % p/v bajo agitación para la formación de las nanopartículas, en este punto el solvente comienza a difundir provocando la formación de gotas nanométricas las cuales son estabilizadas por el PVA, se deja en agitación por 10 min más para favorecer la agregación del polímero y posteriormente se pasa al rotavapor (-5 °C baño de recirculación / 30 °C evaporador) bajo presión reducida hasta eliminar el exceso de solvente (Fig. 10) [V. Mosqueira *et al.* 2000].

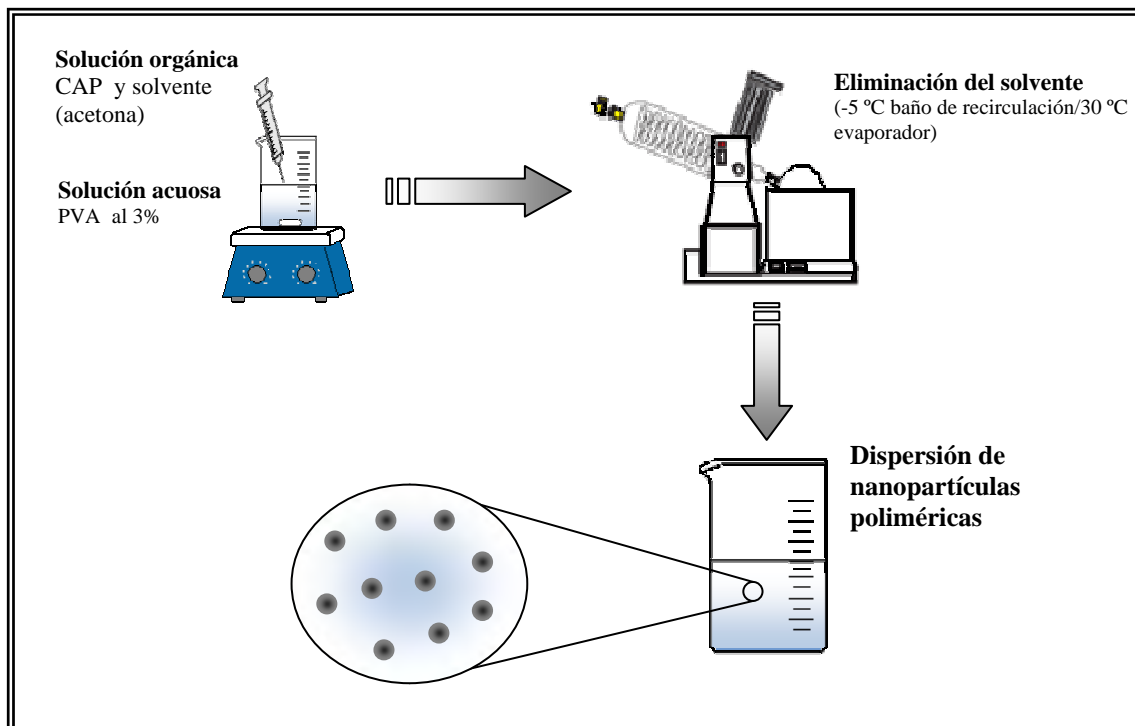


Figura 10.- Representación de la preparación de NP poliméricas por el método de desplazamiento de solvente

8.2. Preparación de nanopartículas de Compritol ATO 888® (CMP) por el método de Emulsificación – Evaporación

Las SLN se prepararon por el método de emulsificación – evaporación. Sjöström y Bergenstal [1992], fueron los primeros en preparar dispersiones de nanopartículas lipídicas por precipitación de emulsiones o/w. Para elaborar las SLN primero se pesan 150 mg de *Compritol ATO 888®* y se disuelven en un solvente orgánico inmisible en agua (cloroformo) el cual es emulsificado con una solución de PVA al 3 % usando un homogenizador (*Ultraturrax® T-25*) por 5 min a 11000 rpm y 5 min a 16000 rpm, bajo estas condiciones se forma una nanoemulsión. El solvente orgánico es eliminado bajo presión reducida en un rotavapor (-5 °C baño de recirculación / 30 °C evaporador) lo que ocasiona la formación de nanopartículas sólidas a base de behenato de glicerilo (Fig. 11) [W. Mehnert y K. Mäder, 2001].

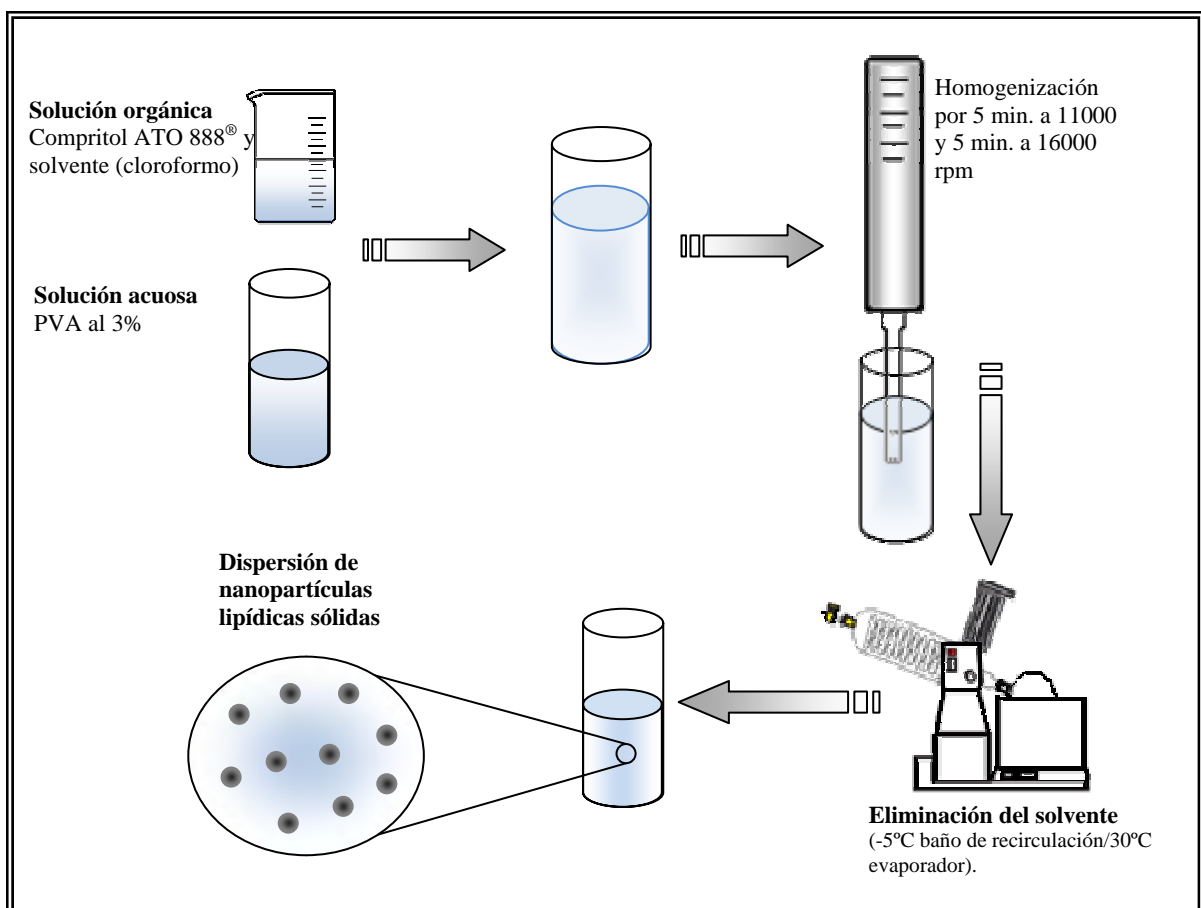


Figura 11.- Representación de la preparación de SLN por el método de Emulsificación – Evaporación

8.3. Preparación de nanopartículas de doble pared a base de CAP y CMP por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación- evaporación

El núcleo polimérico de las nanopartículas de doble pared se preparó por el método de desplazamiento de solvente. Primero se disuelven 150 mg de CAP en 12.5 ml de acetona el cual se inyecta en una solución de PVA al 3 % p/v bajo agitación para la formación del núcleo. El solvente orgánico es eliminado bajo presión reducida en un rotavapor. Posteriormente; se lleva a cabo la formación de la doble pared lipídica por el método de emulsificación-evaporación. Se disuelven 150 mg de CMP en 10 ml de cloroformo el cual se emulsifica con la dispersión de NP de CAP con PVA al 3 % p/v usando un homogenizador en dos ciclos de 5 min a 11000 rpm y a 16000 rpm. Finalmente se pasa al rotavapor bajo presión reducida hasta eliminar el exceso de solvente (Fig. 12).

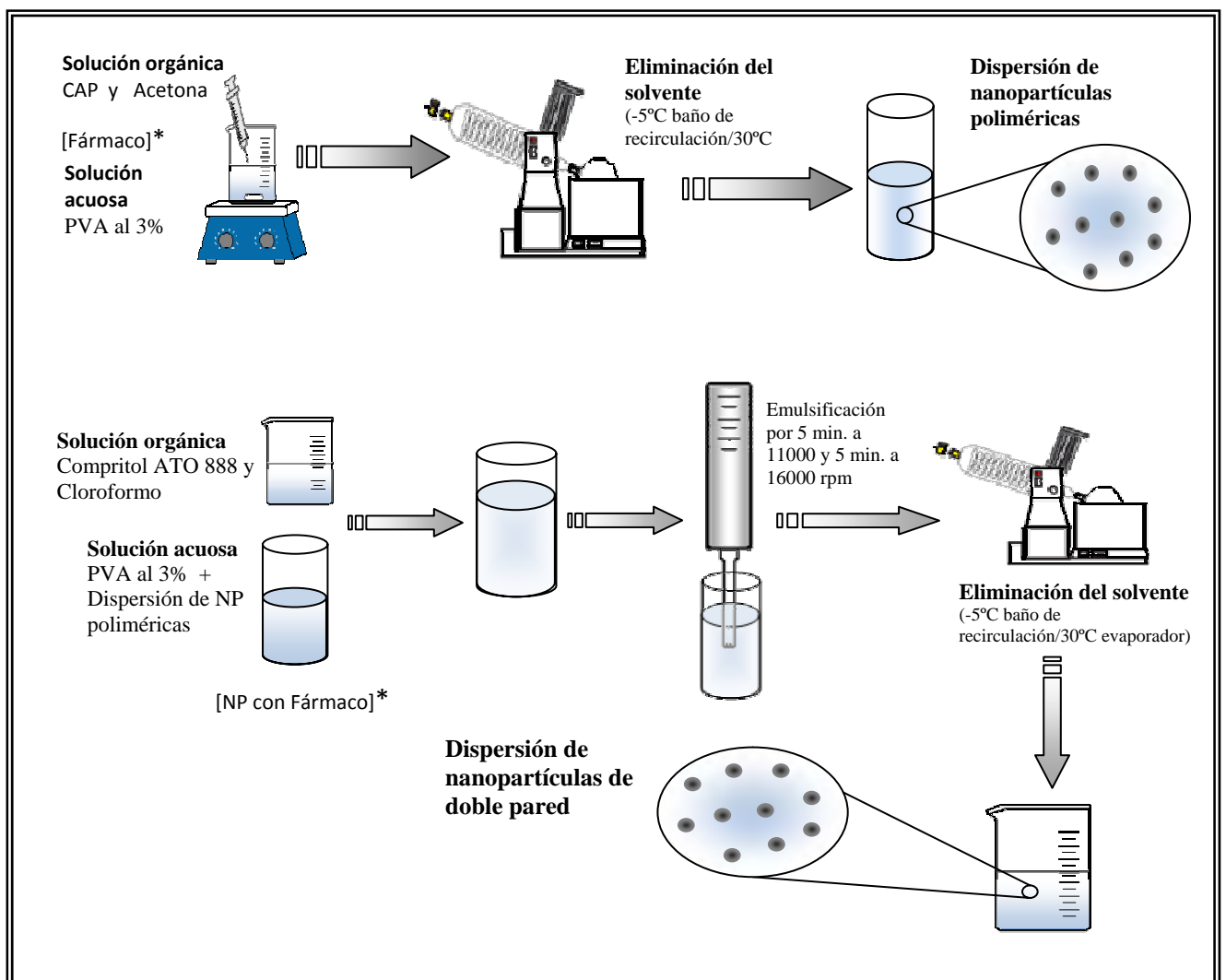


Figura 12.- Representación de la preparación NP de doble pared por los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación-evaporación.

Para eliminar el estabilizante (PVA), una vez evaporado el solvente se centrifuga la dispersión de nanopartículas a 25 000 rpm por 1 hora en ultracentrífuga, se retira el sobrenadante y se lava con agua destilada para después resuspender la pastilla formada por agitación constante

por 20 horas y por sonicación durante 1 hora. Después las nanopartículas se liofilizaron para eliminar el agua. Las muestras se congelaron por 2 horas y posteriormente se colocan en la liofilizadora de mesa (Labconco[®]) por 24 horas bajo las siguientes condiciones de temperatura y vacío: -50 °C y 0.1 μbar.

9. Caracterización de las nanopartículas

9.1. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula de las nanopartículas se determina empleando el Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd.), cada dispersión de nanopartículas es diluida con agua desionizada del MilliQ (Millipore[®], USA) hasta alcanzar la concentración adecuada para las mediciones.

9.2. Potencial Z (carga superficial)

Se determina utilizando el Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd.) empleando una celda de capilar doblado con 150 v de corriente eléctrica; cada dispersión de nanopartículas es diluida con agua desionizada del MilliQ (Millipore[®], USA) hasta alcanzar la concentración adecuada para las mediciones.

9.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se determina el comportamiento térmico de las nanopartículas y sus constituyentes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Primero se realiza una calibración con un estándar de indio y después cada una de las muestras liofilizadas se pesan (3-5 mg) directamente en charolas de aluminio no herméticas y se escanean entre 0 °C y 300 °C con un calentamiento de 10 °C/min y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min utilizando el DSC Q10 (TA Instruments[®], USA).

9.4. Determinación de la densidad de las nanopartículas

Se realiza la determinación de la densidad de las NP mediante la separación de éstas en un gradiente de sílica coloidal (Percoll[®]) formado *in situ* durante la ultracentrifugación empleando marcadores de densidad como estándar externo a base de micropartículas de dextran.

Se colocan en un tubo 7.5 ml de Percoll[®] al 45% v/v en solución de NaCl 0.15M al cual se le agregan 400 µl de la dispersión de cada una de las NP; posteriormente se centrifugan en un rotor modelo 90Ti Beckman a 4 °C a 10000 rpm durante 3 hrs. Después del tiempo necesario se obtienen las distancias entre la parte superior del menisco y las bandas empleando un vernier. En un tubo por separado se agregan a la sílica coloidal los marcadores de densidad formados por micropartículas de diferentes densidades conocidas los cuales se someten a las mismas condiciones que las muestras y usados para la calibración externa con las bandas formadas. La densidad de las NP se determina gráficamente mediante interpolación en la curva obtenida con los datos de distancia y densidad de los marcadores.

9.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se observaron las muestras de NP de CAP, NP de Compritol y de NP de doble pared para realizar una comparación de la morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas.

Las muestras se preparan realizando una dilución de la dispersión de NP. Se colocan unas gotas sobre un cubreobjetos y se dejan secar para después colocarles un recubrimiento de oro (≈ 20 nm). Se observaron con un microscopio electrónico de barrido (MEB, JSM-25SII; JEOL, Japón).

10. Determinación de los perfiles de solubilidad

Se realizó una revisión de las propiedades de solubilidad a diversos fármacos seleccionando un fármaco que fuera soluble en el solvente empleado en la elaboración del núcleo polimérico (acetona) y que fuera insoluble en el solvente que se utiliza en la formación de la doble pared (cloroformo).

Para poder evaluar la liberación a partir de las nanopartículas de doble pared y saber si se disminuye el efecto *burst* se incorporó un fármaco modelo en el núcleo polimérico de las NP de doble pared y se compararon los perfiles con los obtenidos de la liberación de NP convencionales de CAP.

La incorporación del fármaco se llevó a cabo en la primera etapa para la elaboración de las NP poliméricas, disolviendo tanto el CAP como el fármaco elegido en la fase orgánica para después seguir con proceso normal para la formación de estas NP; la incorporación del fármaco en este punto nos asegura que el principio activo queda dispersado en la matriz polimérica (Fig. 11).

10.1. Curva de calibración

El primer paso para obtener un perfil de liberación es realizar una curva de calibración para poder cuantificar la cantidad liberada de sulfameracina durante la experimentación. El medio a emplear fue HCl 0.1M debido a que a pH bajos la sulfameracina es completamente soluble.

10.2. Liberación a partir de NP de CAP y de doble pared

El método que se seleccionó para analizar la liberación de las NP fue el de difusión por diálisis. Se pesan 30 mg de la muestra de NP liofilizadas y se añaden en una bolsa de diálisis previamente hidratada en medio de HCl 0.1 M (2-3 hrs), resuspendiéndolas en 4 ml de medio y se colocan en un vaso con 26 ml de HCl 0.1 M que se encuentra con agitación magnética constante a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 4 ml a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 min) hasta completar 8 hrs, los cuales son sustituidos con medio fresco para conservar el volumen inicial. Las muestras son leídas en el espectrofotómetro a 241 nm e interpoladas en la curva de calibración. La prueba se efectúa durante 72 hrs para establecer la máxima cantidad liberada de fármaco (Fig. 13) [K. Soppimath, *et al.*2001].

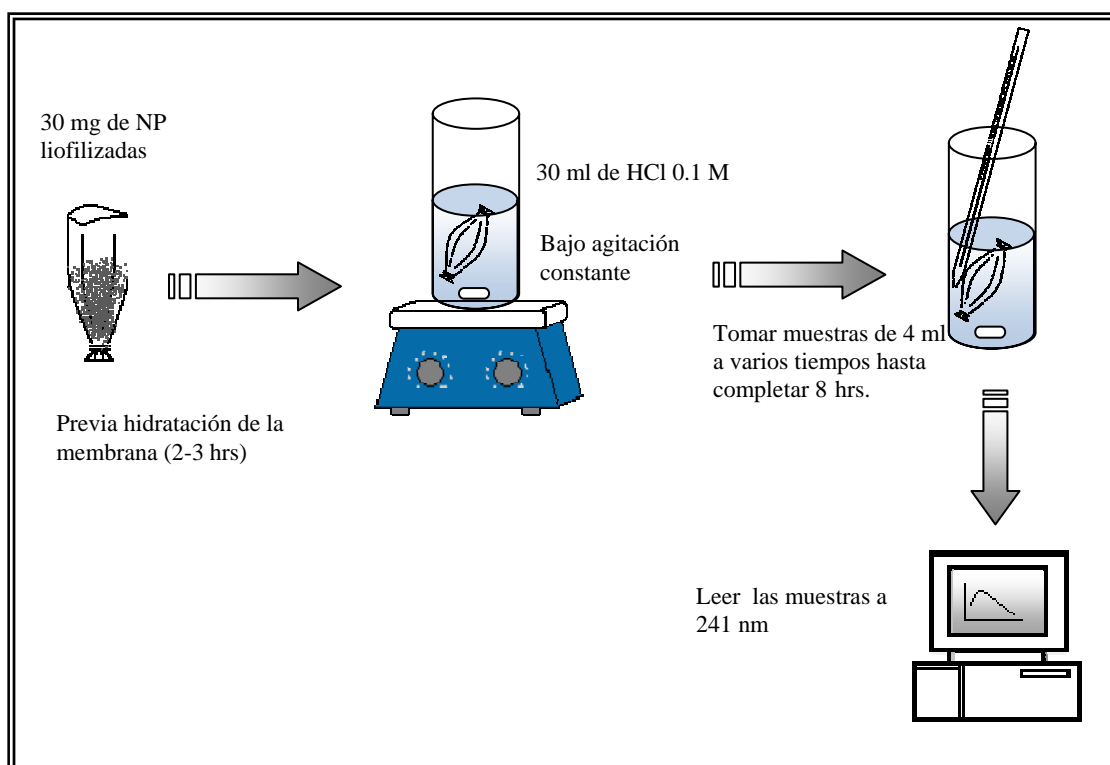


Figura 13.- Método de diálisis para la determinación de la liberación de sulfameracina a partir de NP

VII. Resultados y Análisis

11. Pruebas de solubilidad

Debido a que las solubilidades del polímero y del lípido deben ser diferentes, se realizaron pruebas de solubilidad a los polímeros y a los lípidos de mayor uso en la elaboración de nanopartículas y que, en base a una revisión bibliográfica (Tabla 10), sean opciones viables para la realización de NP de doble pared.

Tabla 10.- Solubilidad de materiales poliméricos y lipídicos para la elaboración de NP

Material	Soluble	Insoluble
Polímeros		
PLA	Diclorometano Cloroformo Acetato de etilo Acetona	Agua
PCL	Diclorometano Cloroformo Acetona	Agua
PLG	Diclorometano Acetato de etilo Cloroformo Acetona	Agua
PLGA	Diclorometano Acetona	Agua
CAP	Acetona Metil etil cetona Dioxano	Agua Cloroformo Alcoholes
Lípidos		
Monooleato de glicerilo	Cloroformo Éter Aceite mineral Etanol	Agua
Ácido esteárico	Benceno Tetracloruro de carbono Cloroformo Éter	Agua
Monoesterato glicerilo (Imwitor [®])	Etanol ↑°C Cloroformo Acetona ↑°C Aceite mineral	Agua
Palmitoesterato de glicerilo (Precirol [®])	Cloroformo Diclorometano	Agua Etanol ↑°C
Behenato de glicerilo (Compritrol 888 ATO [®])	Cloroformo Diclorometano ↑°C	Agua Acetona Etanol ↑°C n-hexano

[Pharmaceutical Excipients, 2005]

En base a la tabla 10 se observa que el CAP y el behenato de glicerilo presentan propiedades de solubilidad que los colocan como posibles candidatos a ser empleados para la elaboración de NP de doble pared por lo que se realizaron pruebas de solubilidad para conocer la cantidad que se podría emplear en la preparación de NP.

En la tabla 11 se presentan los resultados de las pruebas de solubilidad en donde se toman 100 mg de cada uno de los materiales (CAP y behenato de glicerilo) y se agregaron en 20 ml de cada solvente observando que el polímero es libremente soluble en acetona e insoluble en la misma cantidad de cloroformo agregando 150 mg de CAP, mientras que el lípido es soluble en cloroformo e insoluble en acetona con lo que es factible llevar a cabo la formación de la pared alterna sin que la dispersión de NP poliméricas sea solubilizada.

Tabla 11.- Prueba de solubilidad para CAP y Compritol

Material	Solvente	Solubilidad
CAP	Acetona	+
	Metiletilcetona	+
	Cloroformo	---
Compritol ATO 888 [®]	Acetona	---
	Metiletilcetona	---
	Cloroformo	+

+ Soluble --- Insoluble

12. Elaboración de NP convencionales

En un principio se llevó a cabo la elaboración de las NP convencionales de cada una de los materiales que se ocuparon para la elaboración de las nanopartículas de doble pared para encontrar las condiciones óptimas para la concentración y tipo de estabilizante a emplear.

12.1. Tamaño de partícula

Para la medición del tamaño de partícula se utilizó el sistema de caracterización de partículas Zetasizer[®] basado en la dispersión de luz dinámica, en donde las partículas son iluminadas con un láser; la intensidad de las fluctuaciones de la dispersión de luz y su rango van a depender del tamaño de las partículas obteniendo así el llamado diámetro hidrodinámico y se refiere a cómo difunde una partícula en un fluido [http://malvern.com, 2009].

Uno de los principales factores que influyen en el tamaño de partícula de las nanopartículas es el estabilizante utilizado, por lo que se decidió emplear diversos estabilizantes para determinar cual se emplearía, además de encontrar la concentración óptima del estabilizante a elegir.

Para la elaboración de las nanopartículas de CAP se usaron dos diferentes estabilizantes (Pluronic[®] F-127 y PVA) a una concentración de 5 % p/v; las condiciones para la elaboración de las nanopartículas se mantuvieron constantes resultando que con ambos estabilizantes se obtenían nanopartículas con un tamaño alrededor de 200 nm (Tabla 12).

Tabla 12.-Tamaño promedio de partícula de NP de CAP con dos estabilizantes diferentes.

Estabilizante (5 % p/v)	Tamaño (nm)	D. E.
Pluronic F-127	184.8	3.6
PVA	209.5	9.4

En el caso de las NP de Compritol[®] se utilizaron tres diferentes estabilizantes (Pluronic[®] F-127, Pluronic[®] F-68 y PVA) a una concentración de 5 % p/v bajo las mismas condiciones logrando obtener mejores resultados con el PVA (Tabla 13).

Tabla 13.-Tamaño promedio de partícula de NP de Compritol con tres estabilizantes diferentes.

Estabilizante (5 % p/v)	Tamaño (nm)	D. E.
Pluronic F-127	1452.5	291.5
Pluronic F-68	3261.3	460.9
PVA	824.6	13.9

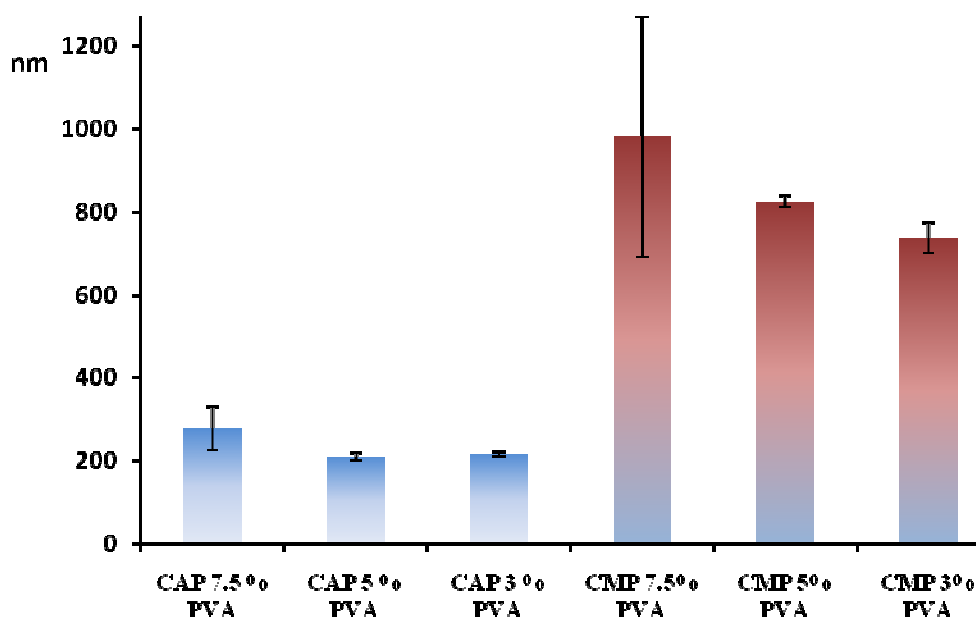
Para determinar la concentración óptima para llevar a cabo la elaboración de las NP convencionales se establecieron tres concentraciones de PVA (7.5 %, 5 % y 3% p/v), los resultados se resumen en la tabla 14.

Tabla 14.-Tamaño promedio de partícula de NP CAP y NP de Compritol con tres concentraciones diferentes de PVA

NP	Concentración de Estabilizante (% p/v)	Tamaño (nm)	D. E.
CAP	7.5	277.2	51.5

	5	209.5	9.4
	3	215.8	6.0
Compritol ATO 888 [®]	7.5	980.6	289.2
	5	824.6	13.9
	3	737.9	37.0

La elección del estabilizante a emplear y su concentración para la elaboración de ambos tipos de nanopartículas se hizo con el material lipídico, debido a que es necesario tener el mismo medio para lograr formar la segunda pared de las nanopartículas de doble pared. Y al comparar el tamaño promedio de partícula (Fig. 14) se distingue que a las concentraciones de 3 y 5 % p/v de PVA se presenta un menor tamaño de partícula con una menor variación.



Se decidió emplear PVA al 5 y al 3 % p/v para la elaboración de las nanopartículas de doble pared encontrando los siguientes resultados (Tabla 15):

Tabla 15.-Tamaño promedio de partícula de NP de doble pared con dos concentraciones diferentes de PVA.

Concentración de Estabilizante (%)	Tamaño (nm)	D. E.
5	644.3	46.8
3	556.9	15.2

En base a los resultados se puede observar que se presenta un menor tamaño promedio de partícula y una menor desviación estándar al emplear PVA al 3 %, además de que disminuye considerablemente la viscosidad del medio en el que se producen las NP lo que facilita su manejo y evita una mayor pérdida de producto.

12.2. Potencial Z

El potencial Z es medido en un Zetasizer[®] empleando una celda capilar doblado y mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de la dispersión, las partículas con carga migran hacia el electrodo de carga opuesta, con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z [http://malver.com, 2009].

Una dispersión de nanopartículas con un potencial Z por arriba de (+/-) 30 mV ha demostrado ser estable, en gran parte debido a que la carga de la superficie impide la agregación de las partículas al provocar la repulsión entre éstas [V. Mohanraj y Y. Chen, 2006].

La determinación del potencial Z tuvo dos finalidades: 1) conocer la estabilidad que presentan las NP y, si es posible, 2) determinar la composición de la pared de las nanopartículas. Los resultados obtenidos para las NP se muestran en la tabla 16 observando que todas presentan un potencial Z mayor a -30 mV.

Tabla 16.- Potencial Z obtenido para las NP de CAP, Compritol y de doble pared

NP	Potencial Z (mV)	D. E.
CAP	-7.50	1.9
Compritol ATO 888 [®]	-15.7	2.1
Doble pared	-18	1.0

Como se observa en la figura 15 las NP de CAP, en base a su potencial Z, se encuentran en un rango de fuerte aglomeración por lo que podrían precipitar; sin embargo, la dispersión de sólidos en líquidos puede ser estabilizada tanto por ausencia o presencia de barreras eléctricas o por barreras estéricas y en este caso el mecanismo de acción del estabilizante (PVA) no es por repulsión de cargas sino por protección estérica debida a las cadenas de estabilizante que se encuentran adsorbidas en la superficie de las NP lo que impide su aglomeración y aunado a su talla nanométrica se obtiene una adecuada dispersión de NP de CAP [M. Rosen, 2004].

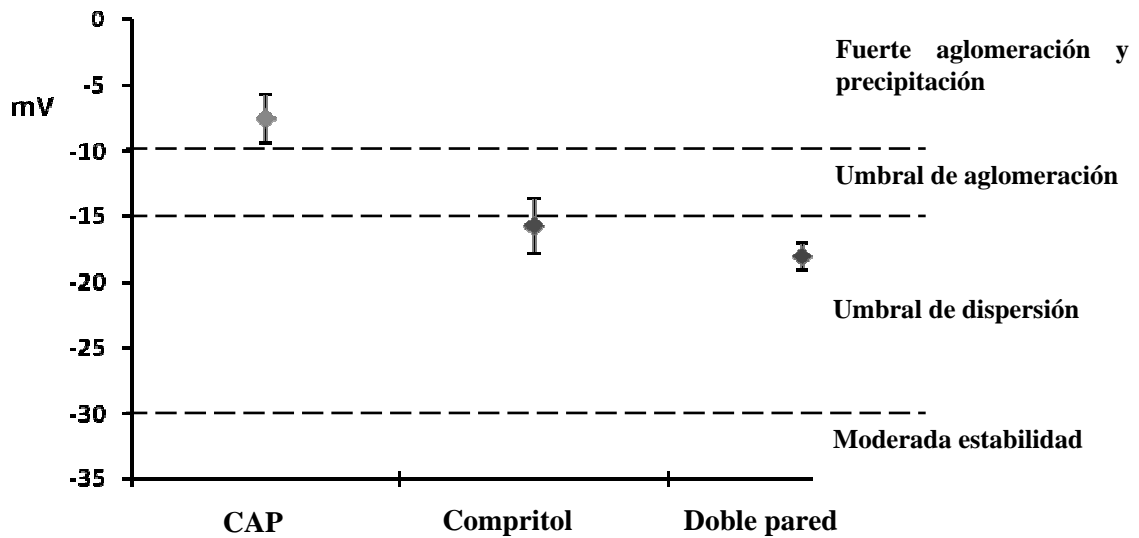


Figura 15.- Estabilidad de las NP e base a su potencial Z

Las NP de Compritol presentan un potencial Z que nos indica que están en el límite entre el umbral de aglomeración y el de dispersión, mientras que las NP de doble pared se encuentran en el umbral de dispersión; en ambos casos se presenta la protección estérica proporcionada por el estabilizante con lo que se obtiene una dispersión estable.

Con lo que respecta a la composición de la pared externa de las NP se puede apreciar que se obtienen valores similares en las NP de Compritol y de doble pared esto puede deberse a que el material presente en la pared externa es el Compritol lo que resulta en propiedades superficiales semejantes lo cual influye en los valores de potencial Z.

12.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se realizó la caracterización por calorimetría diferencial de barrido de los diferentes materiales empleados en la producción de las nanopartículas. Se llevó a cabo la identificación de las materias primas y del acarreador ya formado.

En el caso de los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes que pueden presentarse en un termograma son la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de fusión (T_f) y la temperatura de cristalización (T_c) [http://upcommons.upc.edu (2009)].

En la figura 16 se presentan los termogramas de CAP observando en la materia prima una región inicial que representa una pérdida de humedad seguida de una T_f a 187.38 °C seguida su degradación, mientras que en las NP de CAP se aprecia la T_g característica del polímero alrededor de 160 °C sin apreciar un pico que corresponda al punto de fusión. Este comportamiento se ha observado en otros trabajos en donde también se elaboran NP de CAP [E. Piñón-Segundo *et al.* 2005].

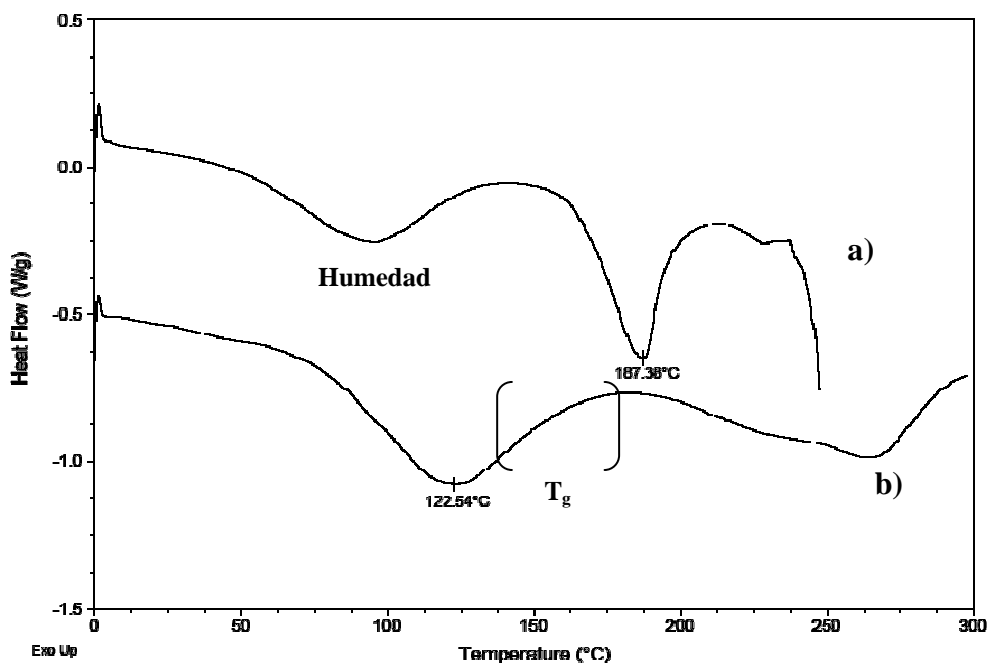


Figura 16.- Termogramas de a) CAP materia prima y b) NP de CAP

También se realizó esta prueba al CMP como materia prima y en forma de NP (Fig. 17) mostrando un comportamiento similar al presentar una endoterma de fusión característica de 72.77 °C y de 78.42 °C respectivamente.

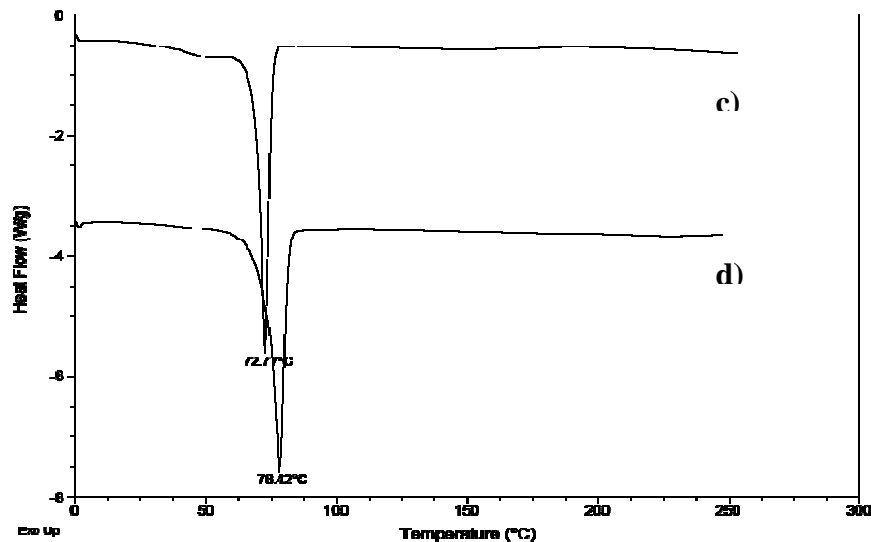


Figura 17.- Termogramas de c) Compritol materia prima y d) NP de Compritol

Al realizar una mezcla física del polímero y del lípido [50:50] (Fig. 18) se observa una T_f del CMP a los 70 °C, y una segunda señal en el termograma que se le atribuye a las propiedades del CAP, mientras que en el análisis térmico de las NP de doble pared no se observa una señal que se deba a la presencia del polímero, lo que puede deberse a que no está en las concentraciones adecuadas para detectarse pero se hace evidente su presencia al modificar la T_f de las NP de CMP.

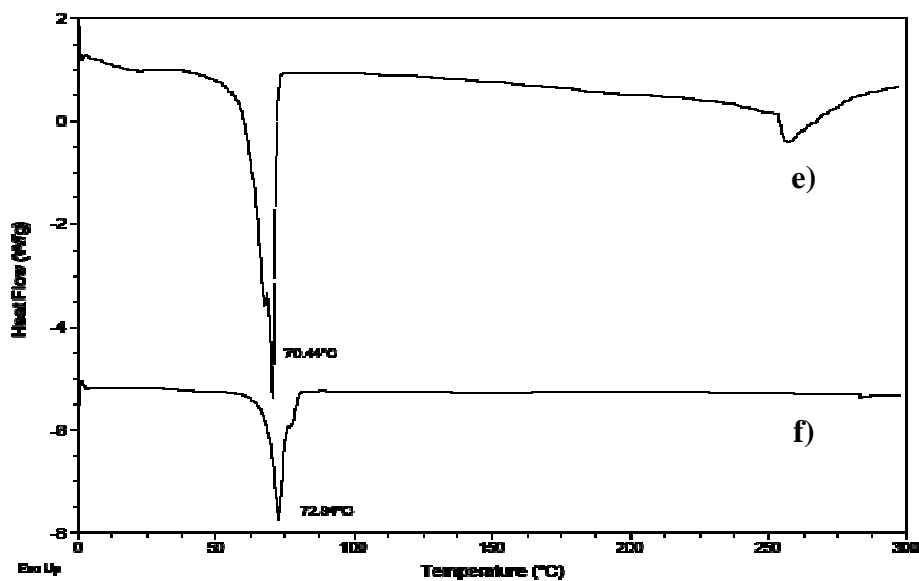


Figura 18.- Termogramas de e) Mezcla física de CAP y Compritol y f) NP de doble pared

Se realizó una comparación de las NP convencionales a base de CAP y de Compritol, y las NP de doble pared para determinar el tipo de interacción que presentan estas últimas (Fig. 19), apreciando en las NP de doble pared el pico de fusión característico del Compritol a 72.84 °C el cual se encuentra desviado del pico que se observa en las NP convencionales de Compritol que se encuentra a 78.42 °C mostrando una variación que puede deberse a que el CAP actúa como impureza lo que disminuye esta propiedad. En el termograma de las NP de doble pared no se percibe la señal que correspondería al polímero lo que puede atribuirse a que al formar las NP la estructura se pierda y el material se encuentre en estado amorfo, por lo que no se registraría alguna señal; aunque si el polímero se encuentra atrapado en el lípido se ocultarían sus propiedades por lo que es probable la formación de nanopartículas de doble pared [S-D Clas *et al.* 1999].

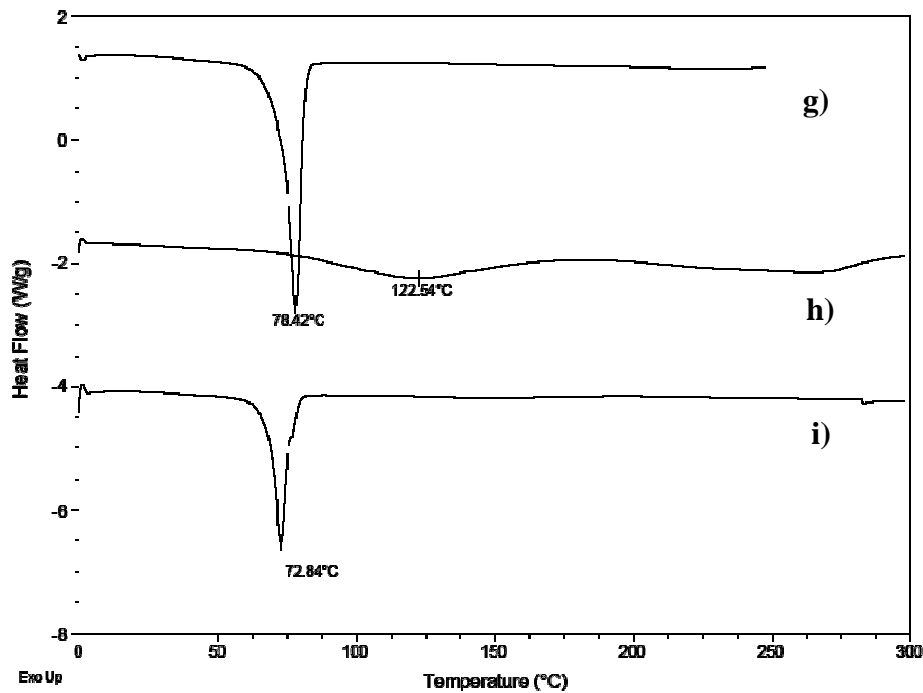


Figura 19.- Termogramas de g) NP de Compritol, h) NP de CAP y i) NP de doble pared

12.4. Determinación de la densidad experimental de las nanopartículas

La determinación de la densidad se basa en la formación de un gradiente de densidad formado *in situ* con sílica coloidal (Percoll[®]) con las condiciones de centrifugación empleando como estándar externo micropartículas de densidad conocida.

Esta prueba se llevó a cabo con la finalidad de establecer si las nanopartículas de doble pared están formadas por una mezcla de material polimérico y lipídico en su matriz. Quintanar-Guerrero *et al.* usó este método para la caracterización de las NC obtenidas por la técnica de emulsificación-difusión en donde encontró una diferencia de densidad entre éstas y las NE; así mismo, si se obtiene una densidad diferente al ser comparadas con nanopartículas convencionales de un solo material se puede deducir que la formación de las nanopartículas de doble pared se lleva a cabo [D. Quintanar-Guerrero *et al.* 1998b].

La curva de calibración se obtuvo con el promedio de las distancias de las bandas formadas en la sílica después de ser centrifugadas durante 3 hrs a 4 °C y a 10000 rpm con lo que se realizó el gráfico de la curva de calibración (Fig. 20).

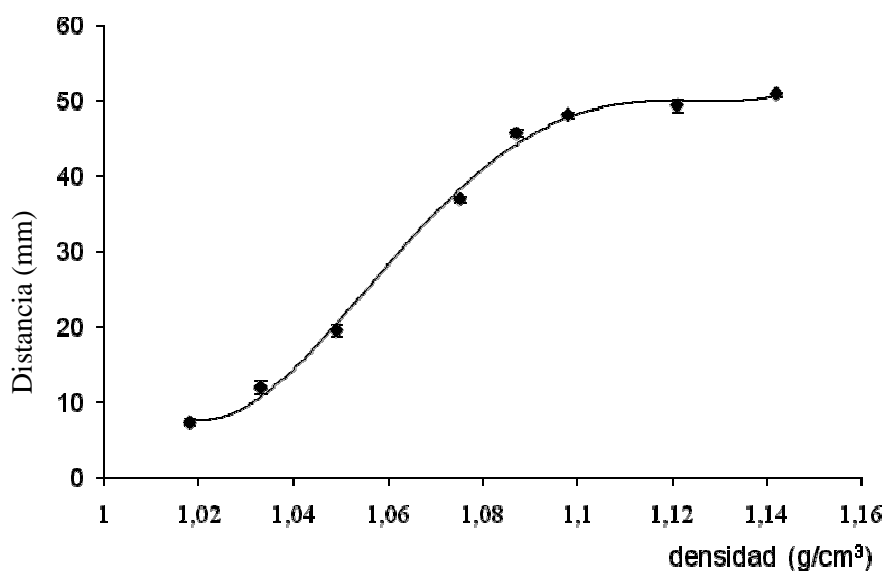


Figura 20.- Curva de calibración para la determinación de la densidad experimental

El gráfico anterior fue ajustado a la ecuación polinomial de cuarto orden (Ec. 1) obteniendo un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.9970$.

$$y = 1061441.124x^4 - 4629551.504x^3 + 7564225.346x^2 - 5486925.386x + 1490830.597 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde: $y = distancia$ $x = densidad$

Además, se obtuvieron las distancias entre la banda formada y el menisco para cada una de las muestras de NP bajo las mismas condiciones (Fig. 21).

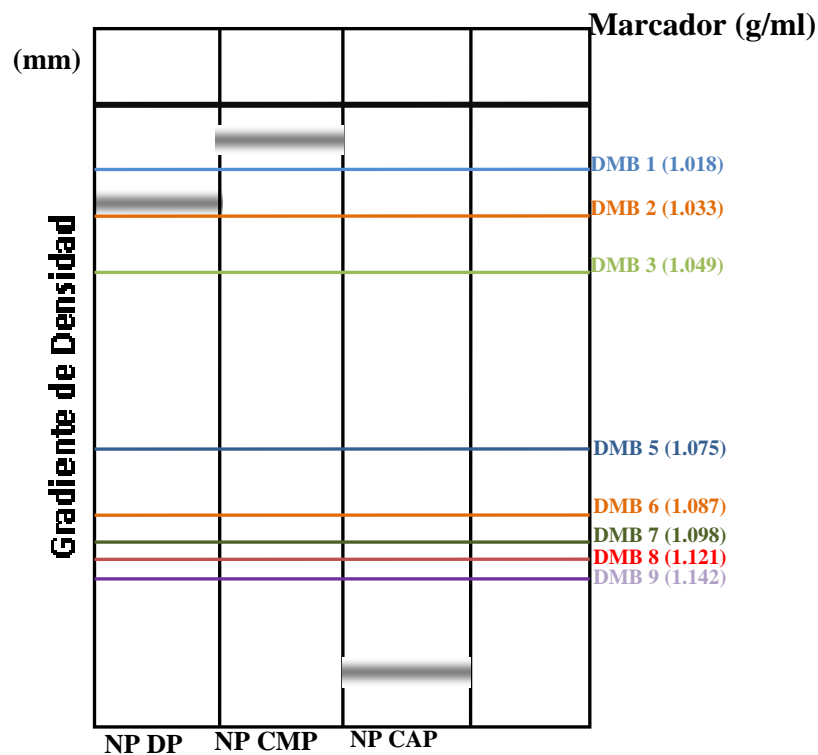


Figura 21.- Bandas obtenidas en la determinación de densidad

Con lo anterior se determinaron las densidades para las NP de CAP, de Compritol y de doble pared (Tabla 17).

Tabla 17.- Resultados de densidad para las nanopartículas

Nanopartículas	Promedio Distancia (mm)	Espesor (mm)	Densidad (g/cm³)	D. E.
CAP	55.42	0.93	>1.142	--
Compritol ATO 888 [®]	6.89	1.68	<1.018	--
Doble pared	7.64	1.68	1.0251	0.0016

Examinando los resultados podemos observar que las NP convencionales de CAP y de Compritol se encuentran, respectivamente, por arriba y por debajo de la densidad de los marcadores bajo las condiciones del estudio por lo que no se puede determinar con exactitud la densidad experimental que presentan como dispersión de NP. Las NP de doble pared al presentar una densidad de 1.0251 g/cm³, que se encuentra entre las densidades de las NP convencionales, nos indica que es probable que la matriz de dichas NP este formada por una mezcla de polímero y de lípido.

12.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La observación de las NP mediante MEB se realizó para corroborar el tamaño obtenido con la ayuda del Zetasizer[®] y para comparar la superficie de las NP convencionales con las NP de doble pared esperando apreciar alguna diferencia en la pared de las NP debido al material que forma la matriz.

Las micrografías obtenidas de cada una de las muestras de NP se presentan a continuación (Fig. 22 – 24).

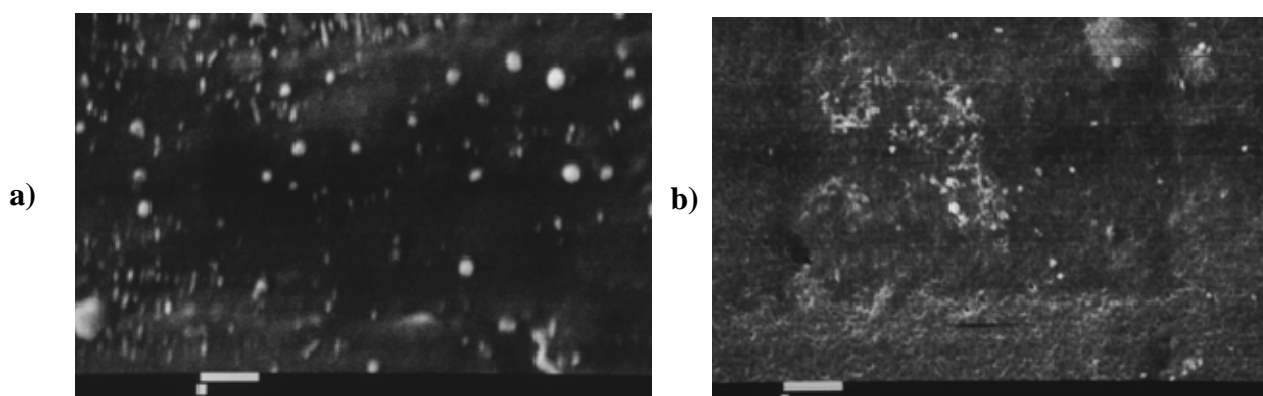


Figura 22.- Micrografías de: a) NP de CAP 10 000x y b) NP de CAP 10 000x (Barra = 1 μ m)

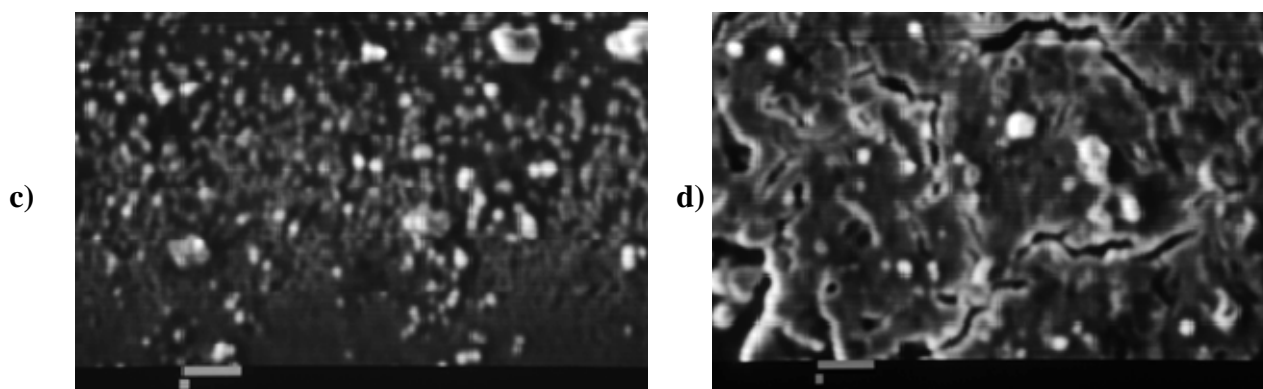


Figura 23.- Micrografías de: c) NP de Compritol 10 000 x y d) NP de Compritol 10 000x (Barra = 1 μ m)

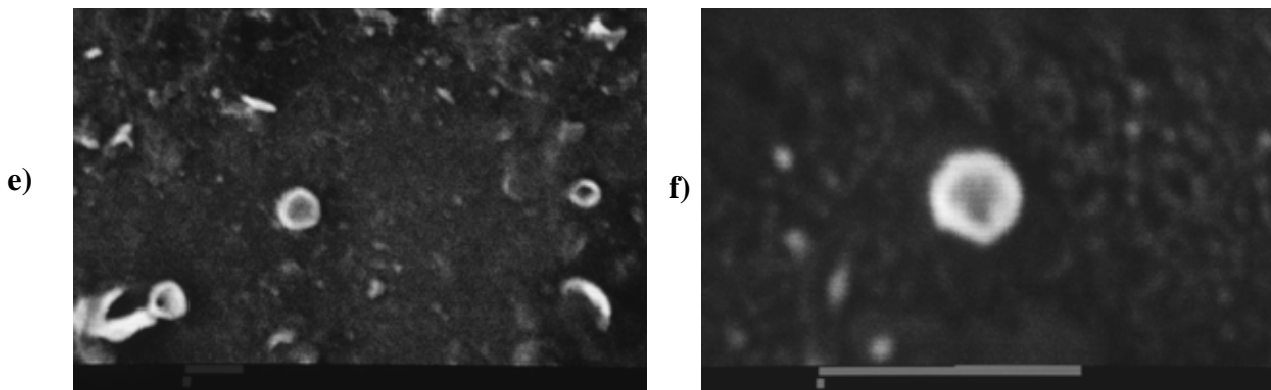


Figura 24.- Micrografías de: e) NP de doble pared 10 000x y f) NP de doble pared 45 000x (Barra = 1 μ m)

Mediante la observación de las NP se confirmó el tamaño que presentan las NP de CAP resultando en un tamaño aproximado de 200 - 300 nm y la forma de las NP es esférica, mientras que las NP de Compritol presentan una estructura amorfa con una mayor variabilidad en su tamaño. Las NP de doble pared presentan un tamaño alrededor de 500 nm con forma esférica.

Sin embargo, el objetivo principal de esta observación no pudo concretarse ya que no se obtuvo una observación detallada de la pared de las NP por lo que no se pudo apreciar alguna diferencia propia de la pared debida al material que compone la matriz de las NP.

*Agradecimientos al Técnico Rodolfo Rodríguez Robles por el apoyo en la obtención de las imágenes de MEB.

13. Selección del fármaco modelo

Después de la elaboración y caracterización de las NP de doble pared se continuó con la encapsulación de un fármaco modelo que tuviera las propiedades adecuadas para ser atrapado en el núcleo polimérico y que no sea liberado excesivamente durante la formación de la pared.

La selección del fármaco modelo se realizó por sus propiedades de solubilidad ya que para quedar atrapado en el núcleo polimérico es necesario que sea soluble en el solvente que se emplea para la elaboración de dicho núcleo (acetona); mientras que sea insoluble en el solvente con el que se forma la pared alterna (cloroformo) y que también sea insoluble en el medio de dispersión (agua). Debido a estas limitantes se realizó una revisión de las propiedades de solubilidad de diversos fármacos, obteniendo como candidato a ser empleado la sulfameracina realizándole pruebas de solubilidad, las cuales se muestran en la tabla 18.

Tabla 18.- Pruebas de solubilidad de la sulfameracina

Solvente	Cantidad de sulfameracina	Solubilidad
Acetona	30 mg	Soluble
	50 mg	Soluble
Cloroformo	30 mg	Insoluble
	50 mg	Insoluble
Agua	30 mg	Insoluble
	50 mg	Insoluble

14. Caracterización de las nanopartículas cargadas

La carga de fármaco se realizó al 5 % p/p con respecto de la cantidad de polímero tanto para las NP convencionales como para las NP de doble pared realizando la caracterización para cada una de ellas de el tamaño de partícula, potencial Z y calorimetría diferencial de barrido para saber si la presencia del fármaco modificaba alguna de las características de las NP y si es posible incorporar el fármaco en la matriz polimérica.

14.1. Tamaño de Partícula

En la tabla 19 se observa el efecto de la incorporación de la sulfameracina sobre el tamaño promedio de las NP.

Tabla 19.-Tamaño promedio de partícula de NP de CAP y de doble pared cargadas con el 5 % de sulfameracina

NP	Tamaño (nm)	D. E.
CAP	215.77	6.03
CAP - Sulfameracina	245.85	15.22
Doble pared	556.97	15.18
Doble pared – Sulfameracina	557.02	46.39

Observando la comparación de las NP obtenidas (Fig. 25) se aprecia que debido a la presencia del fármaco se incrementa el tamaño promedio de las NP de CAP; mientras que en las NP de doble pared se presenta una mayor variación pero el tamaño promedio de partícula es muy semejante ya que al ser sujetas al proceso de formación de la pared alterna, este último proceso proporciona el tamaño final de las NP.

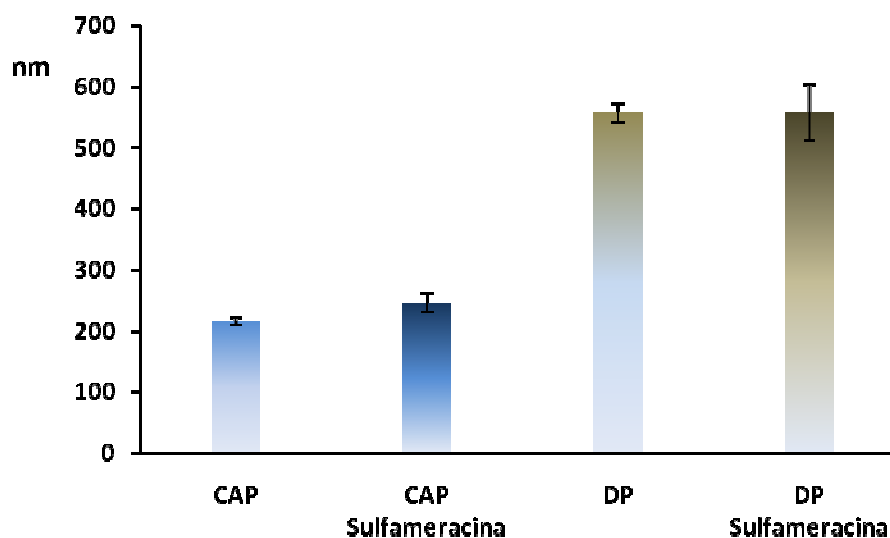


Figura 25.- Tamaño promedio de partícula para las NP de CAP y NP de doble pared con y sin fármaco

14.2. Potencial Z

Se determinó el potencial Z para establecer si la presencia del fármaco modifica la estabilidad de las NP mostrando los resultados en la tabla 20, siendo comparadas con las NP sin fármaco.

Tabla 20.- Potencial Z de NP de CAP y de doble pared cargadas con el 5 % de sulfameracina

NP	Potencial Z	D. E.
CAP	-7.50	7.85
CAP – Sulfameracina	-10.17	1.40
Doble pared	-18	1.02
Doble pared – Sulfameracina	-10.59	0.98

Si ordenamos los valores de potencial Z en base a su estabilidad como se representa en la figura 26 se puede apreciar más claramente como se modificó el potencial Z en cada una de las NP obteniendo que en las NP de CAP la estabilidad aumento al disminuir el valor de su potencial Z a diferencia de las NP de doble pared que disminuyeron su estabilidad debido a la presencia del fármaco, encontrando que ambas NP se encuentran en el umbral de aglomeración pero que debido a la acción del estabilizante dicha aglomeración se ve disminuida [V. Mosqueira *et al.* 2000].

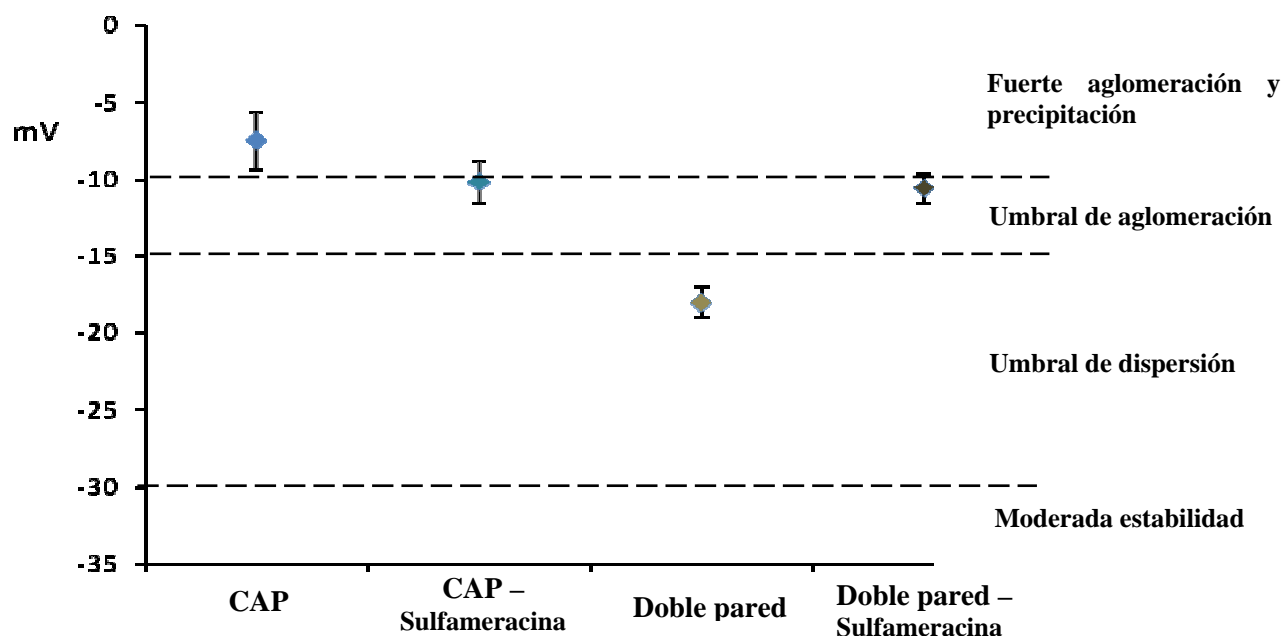


Figura 26.- Estabilidad de las NP cargadas con sulfameracina al 5 % p/p

14.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Mediante la DSC se puede establecer la relación que existe entre la matriz de la NP y el fármaco para saber si éste se encuentra disperso molecularmente en la matriz o en forma de cristales. Cuando existe una dispersión molecular del fármaco en las NP no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del principio activo, por lo que se caracterizaron las NP cargadas con sulfameracina mediante esta técnica [E. Piñón-Segundo, 2003].

En la figura 27 se presentan los termogramas correspondientes a las NP de CAP y de doble pared cargadas con sulfameracina, también se presenta un endoterma de fusión de la sulfameracina pura a 237.44 °C seguido de su degradación. En el caso de las NP no se observa el pico endotérmico característico de la fusión de la sulfameracina, y en las NP de CAP se observa una disminución en la transición vítrea del polímero lo que nos indica que el fármaco se encuentra disperso molecularmente o formando una solución sólida dentro de la matriz polimérica de las NP [S-D. Clas *et al.* 1999; E. Piñón-Segundo *et al.*, 2005].

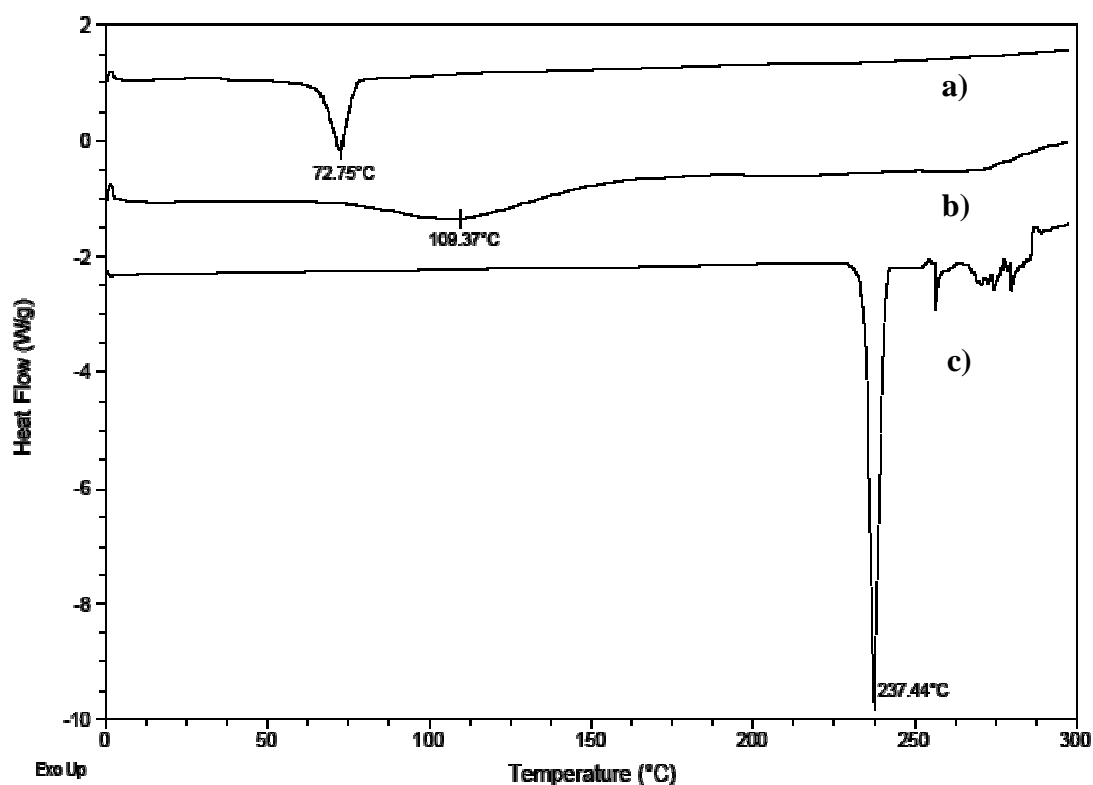


Figura 27.- Termogramas de a) NP de doble pared y b) NP de CAP cargadas con sulfameracina al 5 % p/p; y c) sulfameracina pura

15. Carga de fármaco y eficiencia de encapsulamiento

Para establecer la cantidad de sulfameracina atrapada en la matriz de las NP se evalúan la carga de fármaco y la eficiencia de encapsulamiento lo cual nos ayuda a determinar la eficiencia del proceso.

La carga de fármaco (CF) y la eficiencia de encapsulamiento (EE) se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3 respectivamente:

$$\%CF = \frac{\text{Cantidad de Sulfameracina en las NP's}}{\text{Cantidad de NP's}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

La EE es definida como la cantidad de fármaco atrapado en la NP con respecto a la cantidad teórica colocada.

$$\%EE = \frac{\%CF}{\% \text{ inicial de Sulfameracina}} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

La carga de fármaco y la eficiencia de encapsulamiento (Tabla 21) nos indican que la cantidad de sulfameracina atrapada se encuentra alrededor del 50 % con respecto a la cantidad teórica de sulfameracina colocada que en el caso de las NP de doble pared se encuentra en un rango razonable debido a que éstas son sometidas a dos procesos de elaboración lo que facilitaría la liberación del fármaco al medio.

Tabla 21.- Carga de fármaco (CF) y eficiencia de encapsulamiento (EE)

NP	% CF	% EE
CAP	2.01 ± 0.50	40.29 ± 1.00
Doble pared	1.38 ± 0.10	55.04 ± 3.90

16. Liberación a partir de NP de CAP y de doble pared

Como se mencionó anteriormente el método de difusión por diálisis es una de las mejores técnicas para evaluar la liberación a partir de sistemas dispersos, antes de realizar la difusión con las NP cargadas se comprobó que la membrana de diálisis no afectara la liberación por lo que se realizó una prueba con sulfameracina pura.

Se colocaron 14 mg de sulfameracina pura en la membrana de diálisis y se disolvieron con 4 ml de HCl 0.1 M, se cerró la membrana y se puso en agitación en 46 ml de HCl 0.1 M, se tomaron 2 ml de muestra cada 5, 10, 15, 30, 60 y 180 min siendo sustituidas con medio hasta que existiera un equilibrio en el sistema.

En el perfil de liberación para la sulfameracina pura (Fig. 27) se observa claramente la rápida liberación que existe dentro de los primeros 30 min liberando cerca del 80 % de sulfameracina y casi a la primera hora ya se observa un equilibrio en el sistema.

Como ya se sabe, el objetivo de este trabajo es disminuir la velocidad de liberación que existe en las NP poliméricas convencionales mediante la formación de una pared alterna que retarde la difusión del fármaco por lo que se realizó la comparación de los perfiles de liberación de ambas NP bajo las mismas condiciones de liberación.

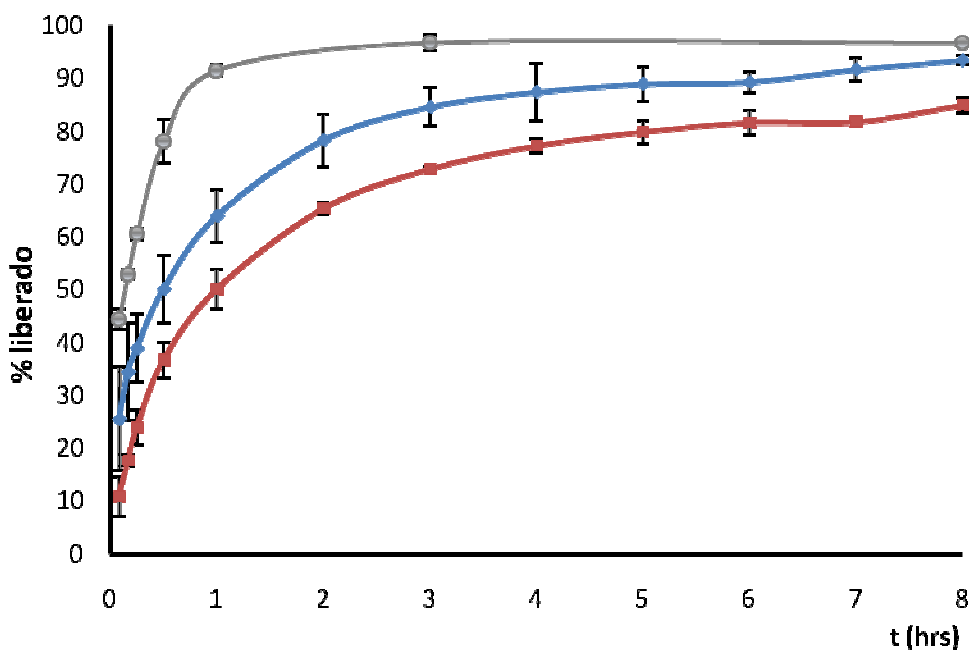


Figura 28.- Perfiles de liberación de sulfameracina [—●—], NP de CAP [—◆—] y NP de doble pared [—■—]

En los perfiles de liberación para ambas NP (Fig. 27) se observa un control en la liberación del fármaco al ser comparadas con el perfil para la sulfameracina pura, las NP de CAP presentan una mayor liberación de fármaco con respecto al tiempo que las NP de doble pared mostrando una liberación del 50 % de fármaco a las 0.5 hrs a diferencia de las NP de doble pared que hasta la primer hora se alcanza el 50 % de sulfameracina liberada lo que nos indica que una mayor parte del fármaco se encuentra cerca de la superficie de las NP poliméricas convencionales a diferencia que en las de doble pared que presentan una barrera adicional por la cual el fármaco tiene que difundir (Tabla 22).

Tabla 22.- Porcentajes promedio de liberación de sulfameracina a partir de NP de CAP y NP de doble pared

NP	15 min	30 min	1 h	8 h	24 h
Sulfameracina	60.6 ± 1.1	78.0 ± 4.1	91.5 ± 1.1	96.8	96.1 ± 1.0
CAP	38.9 ± 6.4	50.2 ± 6.5	64.0 ± 5.0	93.3 ± 0.9	96.3 ± 2.5
Doble pared	23.8 ± 3.3	36.6 ± 3.5	50.1 ± 3.8	84.9 ± 1.4	92.8 ± 1.2

Se realizó la prueba de Duncan a un 95 % de confianza para realizar la comparación de los porcentajes de SM liberada a partir de las NP de CAP y de doble pared, determinando que existe diferencia significativa (Anexo D).

VIII. Conclusiones

Se encapsularon NP poliméricas en SLN empleando los métodos de desplazamiento de solvente y emulsificación difusión encontrando las condiciones óptimas para los procesos independientes, además de encontrar los materiales y solventes orgánicos apropiados para prevenir la disolución de la dispersión de nanopartículas poliméricas usadas como núcleo.

Se caracterizaron las NP de doble pared obteniendo un tamaño promedio de partícula de 556.9 ± 15.2 nm y un potencial Z de -18 ± 1.0 mV, con la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se determinó que el material polimérico se encuentra embebido en la NP lipídica al no ser detectables las endotermas propias del CAP (transición vítrea, punto de fusión, degradación), al observarlas bajo Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se vio la morfología de las NP, verificando su tamaño promedio y su forma esférica. La densidad fue de 1.025 g/cm^3 encontrándose en un rango intermedio entre las NP convencionales a base de CAP y de Compritol®.

Por medio de estas técnicas de caracterización podemos decir que es posible la formación de nanopartículas que posean un núcleo polimérico y una pared alterna formada por un lípido al compararlas con nanopartículas convencionales.

Se encapsuló un fármaco modelo (sulfameracina) en el núcleo polimérico de las NP, lo anterior fue confirmado al obtener los termogramas de las NP cargadas; obteniendo una eficiencia de encapsulamiento (EE) del 55.04 % de sulfameracina en las NP de doble pared.

Se evaluaron los perfiles de liberación de las nanopartículas de doble pared presentando una disminución en la liberación del principio activo en comparación con nanopartículas convencionales de CAP y sulfameracina pura, evitando una rápida liberación inicial lo cual es atribuido a la posible formación de NP de doble pared.

IX. Referencias

1. A. Sheikh Hasan, M. Socha, A. Lamprecht, F. El Ghazouani, A. Sapin, M. Hoffmana, P. Maincent, N. Ubrich. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics* 344, (2007) 53–61.
2. Abhijit A. Date, Medha D. Joshi, V. B. Patravale. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, (2007) 505–521.
3. A. Zur Mühlen, Cora Schwarz, Wolfgang Mehnert. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—Drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, (1998) 149–155.
4. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker. Preparati3n techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 (12), (1998a) 1113-1128.
5. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, , E. Doelker, H. Fessi. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process base don emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*. 15 (7), (1998b) 1056-1062.
6. D. Ramos, M. G3mez, D. Fern3ndez y L. N3nuez. Microesferas biodegradables de liberaci3n controlada para la administraci3n parenteral. *Rev. Cubana Farm.* 34 (1), (2000) 70-7.
7. E. Piñ3n Segundo, Desarrollo y caracterizaci3n de part3culas submicr3nicas polim3ricas como vectores terap3uticos para el tratamiento de enfermedades periodontales. Tesis de Maestr3a, Facultad de Estudios Superiores Cuautitl3n, UNAM (2003)
8. E. Piñ3n-Segundo, A. Ganem-Quintanar, V. Alonso-P3rez, D. Quintanar-Guerrero. Preparation and characterization of triclos3n nanoparticles for periodontal treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 294, (2005) 217–232.
9. E. Fattal and C. Vauthier. Nanoparticles as drug delivery systems. En: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel-Dekker, New York. 2002
10. H. Fessi, F. Puisieux, J. Ph Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55 (1), (1989) R1-R4 [Abstract]
11. H. Jun, Z. Shi-wen. New research on development of solid lipid nanoparticles. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 22 (6), (2007) 385-390.
12. ICH Impurities: Guideline for residual solvents Q3C (R3), November 2005.
13. J. L. Vila-Jato Nuevos aspectos Biofarmac3uticos en nanotecnolog3a farmac3utica. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73 (4), (2007) 813-832.
14. J3rg Kreuter, Nanoparticles. En: *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel-Dekker, New York. 1994

15. Jörg Kreuter. Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* 331, (2007) 1–10.
16. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinsk. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 70, (2001) 1–20.
17. L. Chiu Li y Y. Tian, Zeta Potential. En: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2^{da} Ed. Vol. 3, Marcel Dekker, New York, 2002
18. M. Breunig, S. Bauer, A. Goepferich. Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting?. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, (2008) 112–128.
19. M. Millán, A. Boza, A. Miranda, I. Fuertes, T. Gonçalves, J. Castaño, I. Caraballo. Aplicación de la teoría de la percolación al estudio de matrices hidrófilas de Lobenzarit disódico y Dextrana. *Submitted*
20. M. Trotta, F. Debernardi, O. Caputo. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 257, (2003) 153–160.
21. M. J. Rosen. Surfactants and interfacial phenomena. Dispersion and aggregation of solids in liquid media by surfactants 3^a Ed. Wiley & Sons 2004 344-364
22. M. Grágeda y S. Montesinos. Aplicaciones de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de fractura de una aleación de Cu-10 Al. *Submitted*
23. R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, (2000) 161–177.
24. S. Schaffazick, S. Stanisçuaski, L. Freitas, A. Raffin. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, 26 (5), (2003) 426-737
25. S. A. Wissing, O. Kayser, R.H. Müller. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, (2004) 1257– 1272.
26. S-D. Clas, C. R. Dalton and B. C. Hancock, Differential Scanning Calorimetry: Applications in Drug Development. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2 (1999) 311-320
27. T. Huar Lee, J. Wang, Chi-Hwa Wang. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization an irradiation studies. *Journal of Controlled Release* 83, (2002) 437–452
28. T. M. Riddick. Control of Colloid Stability trough Zeta Potential. Zeta-Meter Inc., New York, 1968
29. V. Mosqueira, P. Legrand, H. Pinto-Alphandary, F. Puisieux, G. Barratt. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by solvent displacement process: Influence of the composition on

- physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 89 (5), (2000) 614-626.
30. V.J. Mohanraj and Y. Chen. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (1), (2006) 561-573.
31. W. Mehnert, K. Mäder. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, (2001) 165–196.
32. X. Huang and C. S. Braze. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 73, (2001) 121–136.
33. MedicinesCompleteBrowser® (version 2.0.2116.16587) Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, USA, 2005.
34. <http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4014/2/ANEXO%20POLIMEROS%20Y%20SUTURAS.pdf> (2009)
35. <http://malvern.com> (2009)
36. <http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/sem.htm> (2009)

X. Anexos

A. Curva de Calibración Sulfameracina

Primero se realizó un barrido de una solución de sulfameracina con una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$ en HCl 0.1 M con lo que se obtuvo la longitud de onda óptima para realizar las lecturas de los sistemas que comprenden la curva de calibración ($\lambda = 200$ a 350 nm).

Posteriormente se realizó la curva de calibración para la cuantificación de sulfameracina por triplicado obteniendo la ecuación de la curva (Ec. 4) y un coeficiente de correlación igual a $r^2 = 0.999$ con un rango de cuantificación de 6 a 36 $\mu\text{g/ml}$ y un coeficiente de variación de 2.19 (Fig. 29).

Ecuación 4

$$y = 0,060x + 0,006$$

Donde: $y = \text{Absorbancia}$ $x = \text{Concentración}$

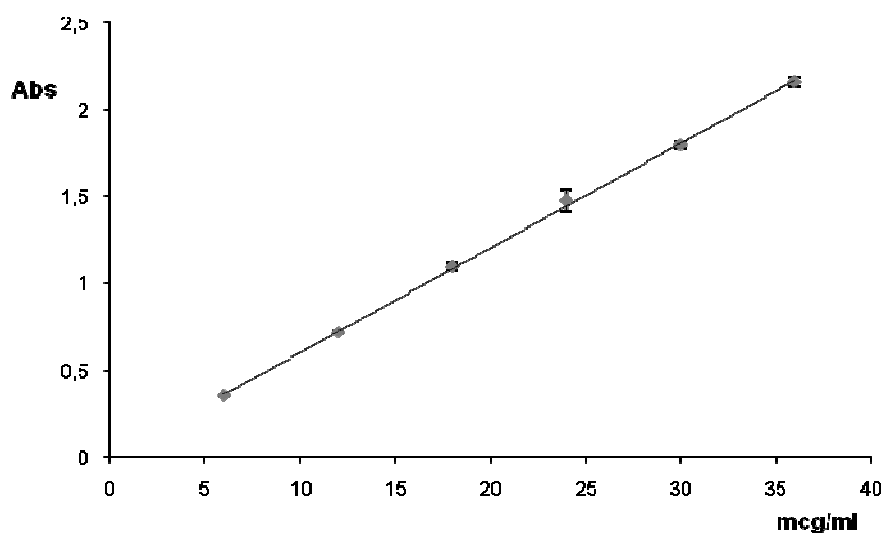


Figura 29.- Curva de calibración de sulfameracina en HCl 0.1 M a 241 nm

B. Distancias de los marcadores de densidad

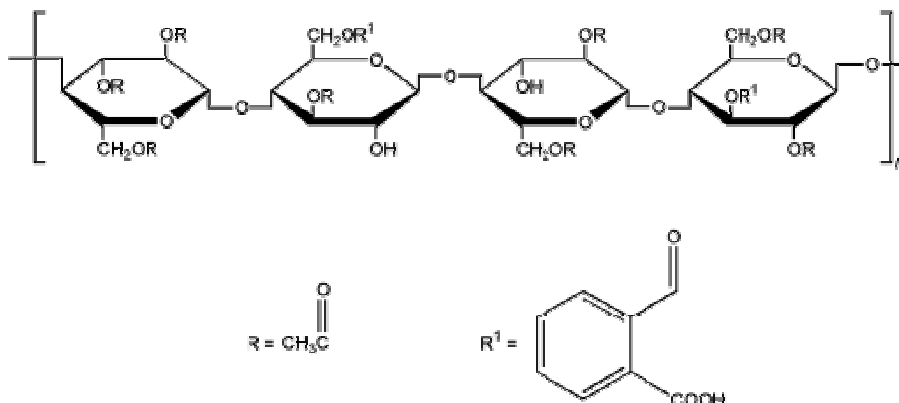
Tabla 23.- Distancias obtenidas con los marcadores de densidad

Marcadores de densidad	Densidad (g/cm ³)	Promedio Distancia (mm)	D. E.
DMB 1	1.018	7.38	0.3768
DMB 2	1.033	12.02	0.8074
DMB 3	1.049	19.56	0.7292
DMB 5	1.075	37	0.4062
DMB 6	1.087	45.69	0.4762
DMB 7	1.098	48.1	0.3808
DMB 8	1.121	49.34	0.8173
DMB 9	1.142	50.87	0.3488

C. Propiedades Fisicoquímicas

Acetato ftalato de celulosa (CAP)

El acetato ftalato de celulosa es un polvo o granulado higroscópico, de blanco a grisáceo, insípido e inodoro o con un ligero aroma a ácido acético. Presenta la siguiente estructura química:



Propiedades

Densidad

Aparente 0.260 g/cm³Absoluta 0.266 g/cm³

Punto de fusión 192 °C

Transición vítrea 160 – 170 °C

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, alcoholes e hidrocarburos clorados o no clorados. Soluble en cetonas, ésteres, éteres cíclicos y en mezclas de solventes. Puede ser soluble en soluciones acuosas a pH menor a 6.

Tabla 24. Ejemplos de solventes y mezclas de solventes en los que el CAP es soluble

Solventes	Mezclas de solventes
Acetona	Acetona : Etanol (1:1)
Acetato de metilo	Acetona : Agua (97:3)
Dioxano	Acetato de etilo : Etanol (1:1)
Metiletilcetona	Benceno : Metanol (1:1)

Compritol ATO 888[®]

El Compritol ATO 888[®] es conocido como behenato de glicerilo el cual es una mezcla de diacilglicéridos, dibehenoilglicerol y algunas cantidades de mono y triacilgliceroles. Este compuesto se presenta como un polvo blanco fino.

Propiedades

Punto de fusión: 65 – 77 °C

Punto de ebullición 200 °C

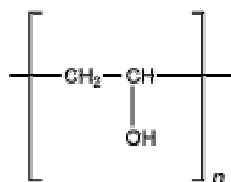
Densidad

Aparente 0.75 g/cm³Absoluta 0.83 g/cm³

Solubilidad: Soluble en cloroformo y diclorometano, prácticamente insoluble en etanol (95 %), hexano, aceite mineral y agua.

Alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico es un polímero sintético hidrosoluble representado por la fórmula $(C_2H_4O)_n$.



El valor de n se encuentra entre 500 y 5000, resultando en un peso molecular de 20 000 – 200 000 aproximadamente.

Propiedades

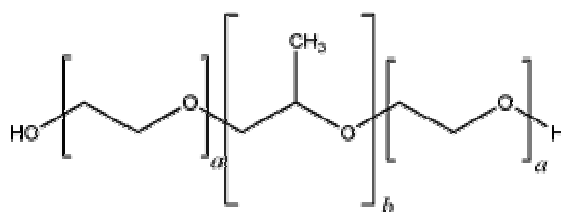
Punto de fusión: 228 °C hidrolizado

180 – 190 °C parcialmente hidrolizado

Solubilidad: Soluble en agua, ligeramente soluble en etanol (95 %), insoluble en solventes orgánicos.

Poloxámeros

Los poloxámeros son una serie de copolímeros del óxido de etileno y óxido de propileno los cuales presentan la siguiente estructura en general:



Poloxámero 188 $a: 80$ $b: 27$ Peso molecular: 608 – 9510

Poloxámero 407 $a: 101$ $b: 56$ Peso molecular: 9 840 – 14 600

Los poloxámero empleados en este trabajo fueron el poloxámero 188 (Pluronic[®] F-68) y el poloxámero 407 (Pluronic[®] F-127) los cuales se encuentran en estado sólido.

Propiedades

Punto de fusión:

Poloxámero 188 52 – 57 °C

Poloxámero 407 52 – 57 °C

Densidad: 1.06 g/cm³ a 25 °C

Solubilidad: La solubilidad se da en base al tipo de poloxámero.

Tabla 25.- Solubilidades del poloxámero 188 y el poloxámero 407

Poloxámero	Solvente			
	Etanol (95 %)	Propan-2-ol	Propilenglicol	Agua
Poloxámero 188	Libremente soluble	----	----	Libremente soluble
Poloxámero 407	Libremente soluble	Libremente soluble	----	Libremente soluble

Sulfameracina (C₁₁H₁₂N₄O₂S), 264.3 g/mol

La sulfameracina es un polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento el cual se oscurece ligeramente cuando se expone a la luz.

Propiedades

Punto de fusión: 234 – 239 °C con descomposición.

Solubilidad: Es soluble 1 en 6250 de agua, 1 en 550 de etanol y 1 en 60 de acetona; muy ligeramente soluble en cloroformo, soluble en soluciones alcalinas, de hidróxidos y carbonatos.

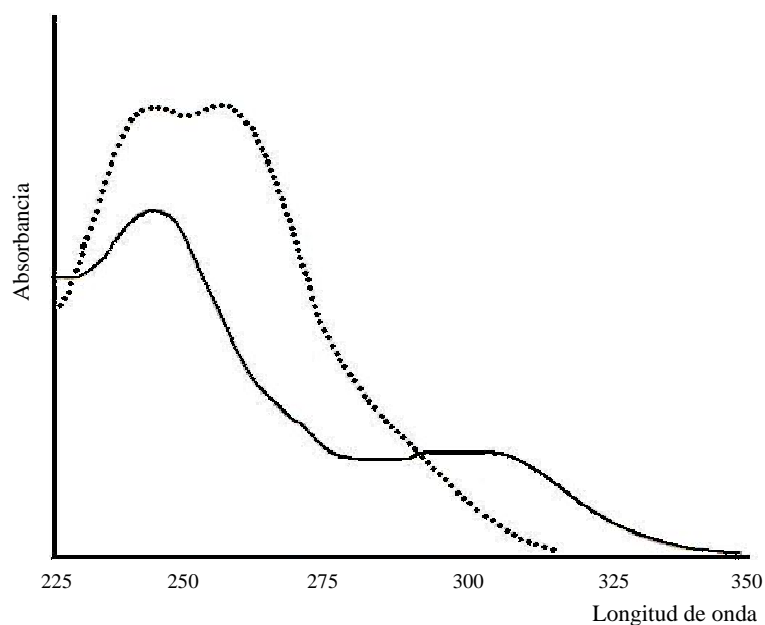


Figura 30.- Espectro de absorción de la sulfameracina en medio ácido [---] y alcalino [..]

Acetona (CH_3COCH_3), 58.08 g/mol

La acetona es un líquido incoloro, de olor característico volátil, altamente inflamable.

Propiedades físicas

Punto de ebullición: 56.5 °C

Punto de fusión: -94 °C

Densidad: 0.788 g/ml (a 25 °C); 0.7972 g/ml (a 15 °C)

Solubilidad: Miscible con agua, alcoholes, cloroformo, aceites y éteres

Cloroformo (CHCl_3), 119.39 g/mol

El cloroformo es un líquido incoloro de olor dulce característico, muy volátil

Propiedades físicas

Punto de ebullición: 61.26 °C (760 mmHg)

Punto de fusión: - 63.5 °C

Densidad: 1.498 g/ ml (a 15 °C); 1.484 g/ml (a 20 °C)

Solubilidad: Miscible con etanol, benceno, éter dietílico, éter de petróleo, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono y acetona.

Solubilidad de agua en cloroformo: 0.806 g/kg de cloroformo (a 22 °C)

D. Análisis estadístico de los perfiles de liberación

La prueba de Duncan se emplea para realizar una comparación entre medias para determinar si las diferencias entre éstas son significativas.

Prueba de Duncan para los porcentajes de SM obtenidos a los 15 min.

Multiple Range Tests for Quince min by Tipo de NP's

```
-----
Method: 95.0 percent Duncan
Tipo de NP's  Count      Mean                Homogeneous Groups
-----
NP de DP      3          23.866              X
NP de CAP     3          38.9849             X
-----
```

```
-----
Contrast                Difference
-----
NP de CAP - NP de DP    *15.1189
-----
```

* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Duncan para los porcentajes de SM obtenidos a los 30 min.

Multiple Range Tests for treinta min by Tipo de NP's

```
-----
Method: 95.0 percent Duncan
Tipo de NP's  Count      Mean                Homogeneous Groups
-----
NP de DP      3          36.6487             X
NP de CAP     3          50.1539             X
-----
```

```
-----
Contrast                Difference
-----
NP de CAP - NP de DP    *13.5052
-----
```

* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Duncan para los porcentajes de SM obtenidos a 1 hr.

Multiple Range Tests for una hr by Tipo de NP's

```
-----
Method: 95.0 percent Duncan
Tipo de NP's   Count   Mean           Homogeneous Groups
-----
NP de DP      3         50.0863        X
NP de CAP     3         63.9994        X
-----
```

```
-----
Contrast                               Difference
-----
NP de CAP - NP de DP                   *13.913
-----
```

* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Duncan para los porcentajes de SM obtenidos a los 8 hrs.

Multiple Range Tests for ocho hrs by Tipo de NP's

```
-----
Method: 95.0 percent Duncan
Tipo de NP's   Count   Mean           Homogeneous Groups
-----
NP de DP      3         84.8735        X
NP de CAP     3         93.4175        X
-----
```

```
-----
Contrast                               Difference
-----
NP de CAP - NP de DP                   *8.54409
-----
```

* Indica una diferencia estadísticamente significativa.