
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON
UN FÁRMACO HIDROFÍLICO MODELO (ÁCIDO
GLICIRRICÍNICO) POR LOS MÉTODOS
DESPLAZAMIENTO DE SOLVENTE Y DOBLE
EMULSIÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
RICARDO SANTINO HERNÁNDEZ CERÓN

ASESOR:
M. en C. MARÍA ZAIDA URBÁN MORLÁN

COASESOR:
Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con un fármaco hidrofílico modelo (ácido glicirricínico) por los métodos desplazamiento de solvente y doble emulsión

Que presenta el pasante: Ricardo Santino Hernández Cerón

Con número de cuenta: 302043345 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 ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
VOCAL	DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	M. en C. María Zaida Urbán Morlán	
1er. SUPLENTE	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero	
2do. SUPLENTE	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

Agradecimientos

A Dios:

*Por estar en todo momento conmigo guiándome y brindándome la fortaleza necesaria para la culminación de este proyecto. Te agradezco haber puesto en mi camino a personas maravillosas que me han brindado sus conocimientos, cariño, confianza, amistad y respeto. No me alcanzan las palabras para agradecer todas tus bondades y amor, sé que esto es el final de un ciclo, pero a su vez es el comienzo de uno nuevo donde tú eres parte fundamental. **GRACIAS.***

A mis padres: María Elena Cerón Cortés y Juan Ricardo Hernández Nava.

Por su apoyo, cariño y confianza demostrados a lo largo de toda mi vida y a los cuales dedico este trabajo, pues gracias a ellos ha sido posible la culminación de mis estudios profesionales. Gracias por compartir su experiencia y conocimiento a lo largo de mi formación personal y profesional. Gracias por hacer de mí la persona que soy. Los amo.

A mis hermanas: Mayra Elena Hernández Cerón y Virginia Hernández Cerón.

Por su apoyo incondicional, por esas palabras de aliento en los momentos indicados, pero sobre todo por ser mis hermanas y espero que este trabajo les sirva de ejemplo para seguir adelante día a día. Estoy orgulloso de ser su hermano. Las quiero.

A mis abuelitos paternos: María Nava Sánchez y Juan Hernández Pérez.

A mis abuelitos maternos: Refugio Cortés García y Evaristo Cerón Márquez.

Por sus sabios consejos, por quererme y creer en mí hasta el último momento. Siempre están en mi mente y en mi corazón, nunca los olvidare.

A mi novia: Genoveva Córdoba Romero.

Por ser una gran compañera, una excelente amiga y una novia maravillosa. Por compartir junto a mí hermosos momentos. Por permitirme compartir esta etapa a su lado, pero sobre todo por ser mi compañera de vida y una mujer admirable. Por todo lo vivido y lo que nos falta por vivir, gracias. Te amo.

A mi asesora: M. en C. María Zaida Urbán Morlán.

*Por estar ahí siempre, por su apoyo incondicional, por su disponibilidad para ayudarme a concluir este proyecto, por su paciencia, por su confianza, por su dedicación, por ser una amiga, una guía y un ejemplo a seguir. Por todo lo que me has enseñado y por todo lo que has hecho por mí. **GRACIAS POR SIEMPRE.***

A mi asesor: Dr. David Quintanar Guerrero.

*Por su apoyo y conocimientos compartidos durante mi estancia en el LIPTF, por darme las facilidades para realizar este trabajo y permitirme dar mis primeros pasos como profesional. **GRACIAS.***

A los titulares del LIPTF: Dra. Ganem Rondero y Dr. Quintanar Guerrero.

Por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes y permitirme lograr uno de mis sueños.

A la Dra. Elizabeth Piñón Segundo.

Por su apoyo y confianza, por ser un ejemplo como académico y por compartir sus conocimientos en mi formación profesional.

A mis amigos y amigas: Alan, Aldo, Gustavo, Iván, Xchel, Angélica, Denisse, Diana, Gabriela, Gabriela Elizabeth, Iris, Lashidua, Alejandro, Antonio, Emilio, Miguel, Pablo, Paul, Blanca, Montserrat, Susana, Ricardo, Karen, Marisol, Noé, Berenice, Nancy, Rocío y Viridiana.

Por todas esas inolvidables experiencias, risas, anécdotas, clases y tantas cosas que vivimos juntos a lo largo de estos años en la carrera. Que nuestra amistad perdure por muchos años más.

A mis amigos y amigas del LIPTF: Aldo, Ángel, Clara, Cynthia, Gilberto, Gustavo, Irene, Lupita, Marco, María Elena, Néstor, Pablo, Perla, Rocío, Sergio, Toño, Viridiana y Zaida.

Por hacer de esta experiencia una de las más enriquecedoras e inolvidables de mi vida, por su apoyo, por sus consejos, pero sobre todo por su compañía durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por todos los buenos deseos que recibí de cada uno de ustedes. Los estimo y respeto mucho. Nunca los olvidaré.

Al técnico Rodolfo Robles: miembro del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la FES-C.

Por su apoyo en la obtención de las micrografías que se exponen en este trabajo.

Al Ing. Draucin Jiménez: encargado del Taller de soplado de vidrio de la FES-C.

Por su asistencia para la fabricación de algunas piezas utilizadas en este trabajo.

A Colorcon de México, S. de R. L. de C. V.

Por la donación de los polímeros Ethocel[®] standard 4 Premium y Ethocel[®] standard 10 FP Premium.

A mi padrino: Roberto Mejía.

Por ser un amigo y un guía. Le agradezco su apoyo, disponibilidad, dedicación y cuidado para mí y mi familia. Gracias por enseñarnos y dejarnos aprender... y como siempre nos ha dicho: ¡tu cabeza te mata y tu cabeza te levanta!

*Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1**, a la **generación 33** y a los **profesores** de cada asignatura que cursé durante esta etapa por su gran contribución para mi formación académica y personal, lo que me permitirá desenvolver en el ámbito profesional retribuyendo toda esta experiencia adquirida en beneficio de la sociedad.*

Índice

Agradecimientos 3

Índice 7

Índice de figuras 10

Índice de tablas 12

Abreviaturas 13

I. Introducción 16

II. Marco teórico 20

 1. Nanopartículas 20

 1.1 Definición 20

 1.2 Clasificación 21

 1.3 Efecto de las características de las nanopartículas 22

 1.4 Caracterización de las nanopartículas 24

 1.5 Nanopartículas poliméricas (NPP) 28

 1.6 Métodos para la elaboración de NPP 37

 2. Regaliz 45

 2.1 Nombre científico: *Glycyrrhiza glabra*. 45

 2.2 Nombre común: Regaliz, Licorice y Gan Cao. 45

 2.3 Descripción botánica 45

 2.4 Historia 46

 2.5 Actividad farmacológica 46

 2.6 Componente principal 50

III. Hipótesis 55

IV. Objetivo general 55

V. Objetivos particulares 55

VI. Metodología 57

VII. Reactivos y equipos 58

 7.1 Reactivos 58

7.2	Equipos.....	58
VIII.	Evaluaciones previas.....	59
8.1	Solubilidad del AG	59
8.2	Curva de calibración para la cuantificación de AG por Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC)	60
8.3	Optimización del método desplazamiento de solvente para obtener NPP	60
8.4	Preparación de NPP de Ethocel [®] por el método desplazamiento de solvente	61
8.4.1	Incorporación del AG en las NPP	63
8.4.2	Determinación del tamaño de partícula promedio (TPP)	63
8.4.3	Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler (Ψ_z).....	63
8.4.4	Microscopia Electrónica de Barrido	64
8.4.5	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	64
8.4.6	Metodología para la cuantificación de AG en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y Eficiencia de encapsulamiento (%)] por HPTLC.....	64
8.5	Optimización del método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) para obtener NPP	65
8.6	Preparación de NPP de PLGA por el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$)	66
8.6.1	Incorporación del GNH ₄ en las NPP	67
8.6.2	Determinación del TPP	68
8.6.3	Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler (Ψ_z).....	68
8.6.4	Microscopia Electrónica de Barrido	68
8.6.5	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	69
8.6.6	Metodología para la cuantificación de GNH ₄ en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y Eficiencia de encapsulamiento (%)] por HPTLC.....	69
IX.	Resultados y análisis.....	71
9.1	Solubilidad del AG	71
9.2	Curva de calibración para la cuantificación de AG mediante HPTLC	73
9.3	Optimización del método desplazamiento de solvente para obtener NPP	75
9.3.1	Evaluación del TPP	75
9.3.2	Evaluación del Ψ_z	78
9.4	Preparación de NPP de Ethocel [®] cargadas con AG por el método desplazamiento de solvente	80

9.4.1	Cuantificación de AG en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y E. E. (%)] por HPTLC	87
9.5	Optimización del método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) para obtener NPP	89
9.6	Preparación de NPP de PLGA por el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$)	90
9.6.1	Determinación del TPP	90
9.6.2	Determinación del Ψ_z	92
9.6.3	Microscopia Electrónica de Barrido	93
9.6.4	Evaluaciones mediante DSC	95
9.6.5	Cuantificación de GNH_4 en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y E. E. (%)] por HPTLC	98
X.	Conclusiones	100
XI.	Perspectivas	102
XII.	Referencias	103
XIII.	Anexos	110
1.	Propiedades fisicoquímicas	110
1.1	Propiedades del AG	110
1.2	Propiedades del GNH_4	111
1.3	Propiedades del Ethocel [®] std. 4 Premium	112
1.4	Propiedades del Ethocel [®] std. 10 FP Premium	113
1.5	Propiedades del PLGA 50:50	114
1.6	Propiedades del PVAL	115
1.7	Propiedades del Pluronic [®] F-68 (Poloxámero 188)	116
1.8	Propiedades del LSS	117
1.9	Propiedades del alcohol etílico	118
1.10	Propiedades del acetato de etilo	118
2.	Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC)	119
3.	Análisis estadístico	127

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de las nanopartículas conforme a su organización estructural. Tomado de [Kumari *et al.*, 2010]..... 21

Figura 2. Representación de la bicapa eléctrica. Tomado de [Wu *et al.*, 2011]..... 23

Figura 3. Termograma de PET en donde se observan: a) T_g , b) el proceso exotérmico T_c y c) el proceso endotérmico T_f 27

Figura 4. Unidad química estructural de la etilcelulosa..... 31

Figura 5. Unidades químicas estructurales del ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). 32

Figura 6. Representación esquemática del método emulsificación-evaporación. 38

Figura 7. Representación esquemática del método emulsificación-difusión. 39

Figura 8. Representación esquemática del método “salting out”. 40

Figura 9. Representación esquemática del método desplazamiento de solvente..... 41

Figura 10. Mecanismo de formación de NPP en el método desplazamiento de solvente.. 42

Figura 11. Representación esquemática del método doble emulsión ($w_1/o/w_2$). 44

Figura 12. *Glycyrrhiza glabra*. 45

Figura 13. Estructura molecular del AG..... 50

Figura 14. Desarrollo experimental para la elaboración de NPP cargadas con AG..... 57

Figura 15. Elaboración de NPP por el método desplazamiento de solvente..... 62

Figura 16. Elaboración de NPP por el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$). 67

Figura 17. Micrografía electrónica del gel de AG liofilizado. Solución acuosa al 1% (p/v). Tomado de [Kondo *et al.*, 1986]..... 72

Figura 18. Modelo cíclico de AG en solución acuosa. Tomado de [Kondo *et al.*, 1986]..... 73

Figura 19. Curva de regresión de cantidad de AG contra el promedio de la altura;..... 74

Figura 20. TPP de las NPP de Ethocel[®] obtenidas a diferentes velocidades de agitación.76

Figura 21. Ψ_z de los lotes de NPP de Ethocel[®]. 79

Figura 22. Micrografías de: a I) NPP de Ethocel[®] std. 4 cargadas con AG 10000x, a II) NPP de Ethocel[®] std. 4 cargadas con AG 20000x, b I) NPP de Ethocel[®] std. 10 cargadas con AG 10000x, b II) NPP de Ethocel[®] std. 10 cargadas con AG 20000x..... 82

Figura 23. Termograma de las materias primas (AG, Ethocel® std. 4 y PVAL), mezclas físicas de AG-Ethocel® std. 4 y AG-PVAL (proporciones equivalentes a la formulación) NPP vacías y NPP con AG..... 84

Figura 24. Termograma de las materias primas (AG, Ethocel® std. 10 y LSS), mezclas físicas de AG-Ethocel® std. 10 y AG-LSS (proporciones equivalentes a la formulación) NPP vacías y NPP con AG..... 86

Figura 25. Cromatogramas: a) NPP de Ethocel® std 4 cargadas con AG y b) NPP de Ethocel® std. 10 cargadas con AG. [(−) lote 1. (−) lote 2. (−) lote 3. (−) AG]..... 88

Figura 26. Tamaño de partícula de la (w₁/o) obtenido a diferentes tiempos..... 90

Figura 27. TPP de las NPP de PLGA. 92

Figura 28. Ψ_z de los lotes de NPP de PLGA..... 93

Figura 29. Micrografías de: a I) NPP de PLGA sin carga 10000x, a II) NPP de PLGA sin carga 20000x, b I) NPP de PLGA cargadas con GNH₄ 10000x y b II) NPP de PLGA cargadas con GNH₄ 20000x. 94

Figura 30. Termograma de las materias primas (GNH₄, PLGA, Pluronic® F-68 y PVAL), mezclas físicas de GNH₄-Pluronic® F-68, GNH₄-PVAL y GNH₄-PLGA (proporciones equivalentes a la formulación) NPP vacías y NPP con GNH₄. 97

Índice de tablas

Tabla 1. Estabilidad de suspensiones con base al Ψ_z 24

Tabla 2. Comportamientos térmicos observados por DSC. 27

Tabla 3. Comparación de NPP y SLN..... 28

Tabla 4. Estabilizantes utilizados para elaborar NPP por diferentes métodos..... 34

Tabla 5. Ejemplos de solventes Clase 1..... 35

Tabla 6. Ejemplos de solventes Clase 2..... 36

Tabla 7. Ejemplos de solventes Clase 3..... 36

Tabla 8. Productos comerciales que contienen AG..... 52

Tabla 9. Deposición de partículas en los pulmones según su tamaño..... 81

Tabla 10. Resultados de la caracterización de los lotes de NPP cargados con AG. 81

Tabla 11. Cantidad de GNH_4 cargada en las muestras de NPP liofilizadas. 98

Tabla 12. Resultados obtenidos de la cuantificación de GNH_4 en las NPP liofilizadas. 99

Abreviaturas

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido glicirricínico
ARN	Ácido ribonucleico
CMC	Concentración micelar crítica
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DLS	Dispersión Dinámica de la Luz
Ec.	Ecuación
E. E.	Eficiencia de encapsulamiento
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
GNH ₄	Glicirricinato de amonio
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros
HPTLC	Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
IL-8	Interleucina-8
LD	Límite de detección
LSS	Lauril sulfato de sodio
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido

mPEO-PLA	Monometoxi-oxido de polietileno-ácido poliláctico
NPP	Nanopartículas poliméricas
o	Fase orgánica
o/w	Emulsión aceite/agua
PBCA	Polibutilcianoacrilato
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PEG-PLA	Polietilenglicol-ácido poliláctico
PEO-mPAE	Oxido de polietileno-monometoxi-ester de poliacrílico
PE/F68	Polioxietileno-polioxipropileno
PET	Tereftalato de polietileno
PGA	Ácido poliglicólico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
POP	Poliorganofosfazano
PVAL	Alcohol polivinílico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
T _c	Temperatura de cristalización

T_f	Temperatura de fusión
T_g	Temperatura de transición vítrea
TPP	Tamaño de partícula promedio
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
w_1	Fase acuosa interna
w_2	Fase acuosa externa
w_1/o	Emulsión primaria agua/aceite
$w_1/o/w_2$	Emulsión agua/aceite/agua
Ψ_z	Potencial zeta

I. Introducción

El regaliz es una de las hierbas medicinales más populares y antiguas en el mundo, y se encuentra registrada en las farmacopeas de muchos países asiáticos y europeos (China, Japón, Reino Unido y otros). También es ampliamente utilizado como saborizante en la industria alimentaria debido a su sabor dulce.

El regaliz muestra una variedad de actividades farmacológicas incluyendo actividad antiulcerosa, antiinflamatoria, antiespasmódica, antioxidante, antialérgica, antidiabética, anticancerígena, antidepresiva, hepatoprotectora, expectorante y en el mejoramiento de la memoria. Estas bioactividades se atribuyen a los componentes químicos del regaliz. Hasta el momento, más de 400 compuestos han sido aislados de las especies de *Glycyrrhiza*.

El ácido glicirricínico se deriva de las raíces secas y rizomas de las especies de *Glycyrrhiza*. El género *Glycyrrhiza* contiene cerca de 30 especies y se distribuyen ampliamente en todo mundo.

Los estudios farmacológicos del regaliz se han centrado en los componentes principales: ácido glicirricínico y ácido glicirretínico. Desde la década de los 80's el ácido glicirricínico se ha utilizado como un agente terapéutico potencial para varias enfermedades de origen viral incluyendo hepatitis crónica B y C, así como en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [Qinying Zhang, 2009].

En la actualidad se ha hecho más evidente que la mayoría de los fármacos están limitados en lograr una terapia eficiente en el tratamiento de las enfermedades. Las limitaciones que existen para que una terapia falle son:

1. Pobre solubilidad de los fármacos.
2. Alta toxicidad de los fármacos.
3. Agregación del fármaco debido a su pobre solubilidad.
4. Liberación no específica.
5. Degradación *in vivo*.
6. Rápida eliminación de los fármacos.

La Nanotecnología es un área multidisciplinaria que consiste en la creación y utilización de materiales, dispositivos o sistemas de escala nanométrica. En la actualidad la Nanotecnología juega un papel muy importante en el cuidado de la salud iniciando un proceso cuya finalidad es sustituir la manera tradicional de administrar fármacos, enfocándose en la formulación de agentes terapéuticos en nanoacarreadores biocompatibles como lo son las nanopartículas, sistemas micelares, dendrímeros, entre otros, ya que una de sus principales ventajas que nos ofrece es la liberación del fármaco dirigida al sitio de afección [Parveen *et al.*, 2012].

Las nanopartículas ofrecen una amplia gama de cualidades dentro del área de la Tecnología Farmacéutica. En primer lugar las nanopartículas pueden ser elaboradas por una gran variedad de métodos (Polimerización, Métodos a base de emulsión, Homogeneización a presión elevada, Método doble emulsión, Método por homogeneización con elevada velocidad de corte y Ultrasonido, etc.) y sus modificaciones, dependiendo de la finalidad de las mismas. En segundo lugar, la matriz de las nanopartículas puede ser elaborada con infinidad de materiales

como lo son los polímeros no biodegradables, polímeros biodegradables, lípidos, proteínas o polisacáridos y en tercer lugar la encapsulación de agentes terapéuticos de naturaleza hidrofílica o lipofílica, proporcionándoles nuevas ventajas como nanoacarreadores biocompatibles.

Las finalidades que se persiguen, al desarrollar estos sistemas de liberación de fármacos son:

1. Incrementar la eficacia terapéutica al tener control sobre la liberación del fármaco.
2. Disminuir la toxicidad del fármaco al proporcionar especificidad.
3. Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química.
4. Incrementar su absorción facilitando su difusión a través de los epitelios.
5. Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos para incrementar su eficiencia o disminuir efectos indeseables [Breunig *et al.*, 2008].

El destino de un fármaco *in vivo* depende de sus propiedades fisicoquímicas lo que provoca una deficiente distribución o que no se encuentre en concentraciones adecuadas en el sitio de acción. Las nanopartículas permiten llevar a cabo una liberación controlada en un sitio específico lo que garantiza la acción del agente terapéutico evitando efectos secundarios. El tamaño de estos sistemas depende de la vía de administración, pero se ha demostrado que emplear nanoacarreadores proporciona la ventaja de tener una acumulación eficiente de fármaco en los sitios blanco [Gaumet *et al.*, 2008].

La idea del presente trabajo tiene como finalidad proponer el uso de sistemas de liberación a base de nanopartículas como una alternativa para el transporte de un fármaco hidrofílico modelo (ácido glicirricínico), debido a que existen múltiples investigaciones en las que se ha probado su eficiencia en el tratamiento contra un amplio espectro de virus incluyendo al virus del herpes [Pompei *et al.*, 1979; Lampi *et al.*, 2001]; coronavirus [Cinatl *et al.*, 2003]; virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [Sasaki *et al.*, 2003]; poliovirus tipo I [Crance *et al.*, 2003]; virus de la influenza tipo A [Utsunomiya *et al.*, 1997; Wolkerstorfer *et al.*, 2009].

Con la elaboración de nanopartículas poliméricas cargadas con ácido glicirricínico por los métodos desplazamiento de solvente y doble emulsión ($w_1/o/w_2$), se generará una nueva opción en el tratamiento de enfermedades virales en el área médico veterinaria y en la humana; ya que la finalidad del proyecto es explotar las ventajas tecnológicas que ofrecen los nanoacarreadores comparados con los sistemas convencionales de administración.

II. Marco teórico

1. Nanopartículas

1.1 Definición

Las nanopartículas con propósitos farmacéuticos son partículas coloidales sólidas que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000 nm (1 μm), las cuales consisten de materiales macromoleculares y pueden ser usadas terapéuticamente como acarreadores de fármacos, en las cuales el agente terapéutico está disuelto, entrampado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula [Kreuter, 2007].

Las cualidades más importantes que poseen las nanopartículas como sistemas de liberación son: el control en el tamaño de partícula, las propiedades de superficie y la liberación de agentes farmacológicamente activos para alcanzar la dosis terapéutica óptima en un sitio específico.

Las ventajas al usar nanopartículas como potenciales vías para la liberación de fármacos son:

- a) El tamaño de partícula y las características de la superficie son fácilmente manipulables.
- b) El control en la liberación del fármaco durante la transportación hasta llegar al sitio específico de acción, logrando una mayor eficiencia terapéutica y la reducción de los efectos adversos.

- c) La liberación controlada y las características de degradación en la nanopartícula pueden ser modificadas por cambios en los constituyentes de la matriz.
- d) La vectorización a un sitio específico puede ser realizada con la unión de ligandos en la superficie de la nanopartícula.
- e) Pueden ser empleadas por diferentes rutas de administración incluyendo oral, parenteral, intraocular, pulmonar, etc.

1.2 Clasificación

Las nanopartículas se pueden dividir en dos grupos: las nanoesferas y las nanocápsulas las cuales difieren en su constitución. Las nanoesferas son sistemas matriciales en las cuales el fármaco está físicamente y uniformemente dispersado o adsorbido, mientras que las nanocápsulas son sistemas en los cuales el fármaco se encuentra en una cavidad oleosa rodeada por una membrana polimérica, o adsorbido en ésta (Figura 1) [Kumari *et al.*, 2010].

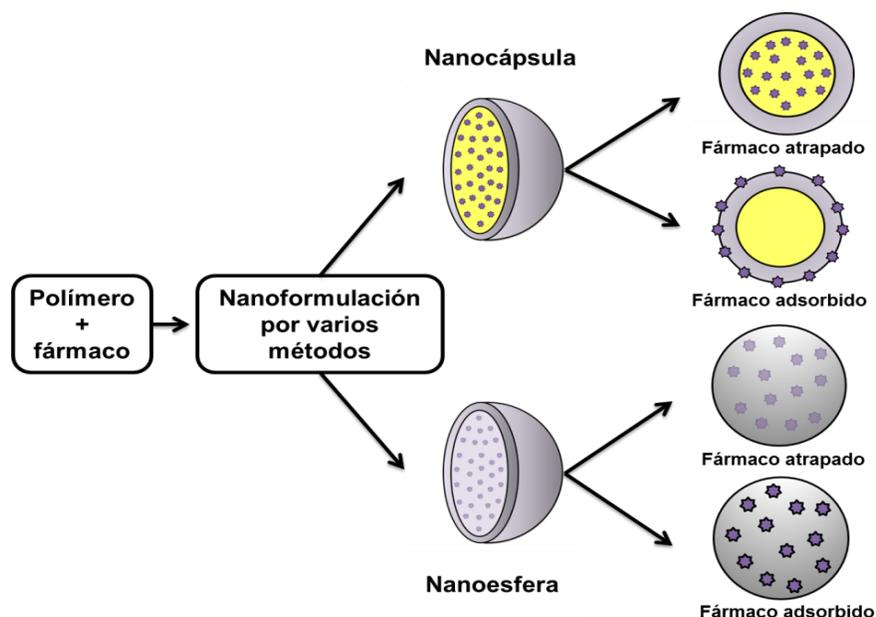


Figura 1. Clasificación de las nanopartículas conforme a su organización estructural. Tomado de [Kumari *et al.*, 2010].

1.3 Efecto de las características de las nanopartículas

1.3.1 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 del 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 mayor área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de partículas grandes que poseen una menor área superficial por lo que la difusión del fármaco será lenta [Gaumet *et al.*, 2008].

1.3.2 Propiedades de superficie

Las cargas superficiales influyen en la distribución de los iones alrededor de la partícula desarrollando un campo eléctrico formado por una carga circundante que consta de: una región interior donde los iones se encuentran fuertemente enlazados a la superficie de la partícula y que se le denomina capa de Stern, y una región donde los iones están menos enlazados a la cual se le conoce como capa de Gouy (Figura 2) [Wu *et al.*, 2011].

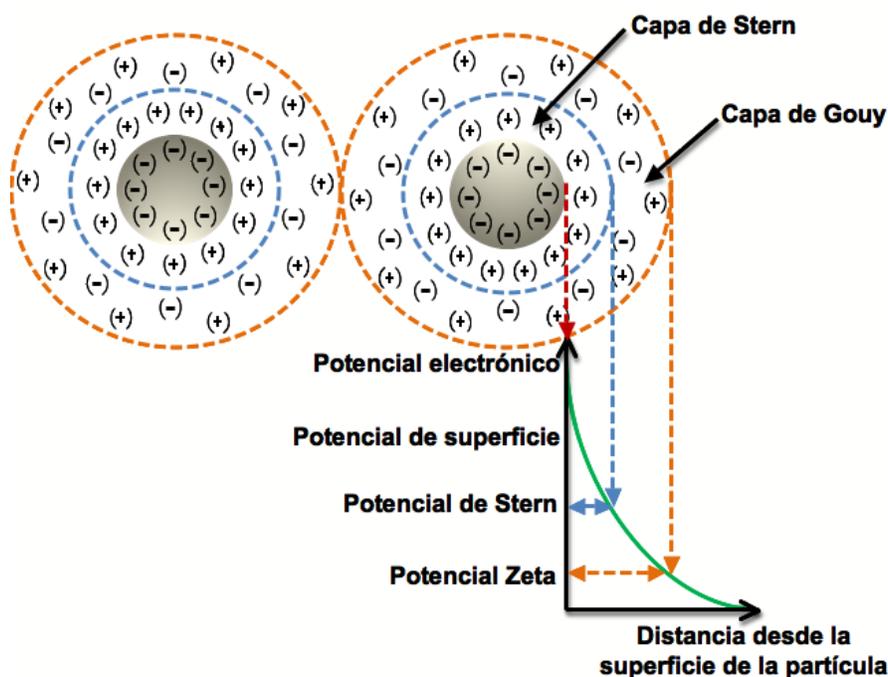


Figura 2. Representación de la bicapa eléctrica. Tomado de [Wu *et al.*, 2011].

En un sistema nanoparticulado, las cargas eléctricas tienen un papel muy importante en la determinación de la interacción de las partículas lo cual se refleja directamente en la estabilidad física del sistema coloidal.

El potencial zeta (Ψ_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. Las nanopartículas con Ψ_z entre (+/-) 30 mV son estables en suspensión y la carga en la superficie previene la agregación de las partículas (Tabla 1) [Riddick, 1968].

Tabla 1. Estabilidad de suspensiones con base al Ψ_z .

Estabilidad	Potencial Zeta (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

Tomado de [Riddick, 1968].

1.3.3 Carga del 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 encapsulamiento 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:

1. Incorporación durante la elaboración de las nanopartículas (método de incorporación).
2. Adsorción del fármaco después de la formación de las nanopartículas por incubación con una solución concentrada del fármaco (método de adsorción/absorción) [Mohanraj y Chen, 2006].

1.4 Caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas pueden ser caracterizadas por diferentes técnicas fisicoquímicas. Los parámetros fisicoquímicos de mayor importancia en este tipo de sistemas a determinar son la morfología, el tamaño de partícula, el Ψ_z , la carga de fármaco y la eficiencia de encapsulamiento.

1.4.1 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

También conocida como Espectroscopía de Correlación de Fotones, es una de las técnicas más populares para caracterizar en sistemas coloidales el tamaño de partícula; midiendo la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida la cual es causada por el movimiento browniano de la partícula. Por esta razón, el tamaño de partícula está influenciado por la interacción de las partículas con el medio en el que se encuentran, por lo cual debe conocerse la viscosidad del mismo [Satinder y Verma, 2011].

1.4.2 Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler

El Ψ_z es una propiedad física que poseen todas las partículas en suspensión, específicamente en sistemas coloidales. Dicho potencial se obtiene usando la combinación de técnicas de medición: Electroforesis y Velocimetría Láser Doppler. Este método mide qué tan rápido se mueve una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado se puede obtener el Ψ_z mediante el uso de otras constantes de la muestra analizada (viscosidad y constante dieléctrica) [Zetasizer Nano Series, 2003].

1.4.3 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 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 la radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se simplifica. Este microscopio tiene una resolución de 3 a 20 nm y un rango de aumentos que varía desde 10 hasta 200 000 con una distancia focal de 35 mm.

Las principales ventajas de la MEB son la alta resolución ($= 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y a la sencilla preparación de las muestras [Vázquez y Echeverría, 2000].

1.4.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La DSC es una técnica bien establecida de análisis térmico dentro de las ciencias farmacéuticas. Se puede usar para caracterizar los eventos físicos y químicos a través de cambios en la entalpía o en la capacidad calorífica de una muestra. En particular, las aplicaciones incluyen la detección de polimorfismo, la medición de la reacción y la cinética de descomposición, la evaluación de la compatibilidad de los constituyentes en la formulación, determinación de la pureza y estudios de la temperatura de transición vítrea.

Los eventos térmicos que son detectables por DSC (Tabla 2) pueden ser endotérmicos, exotérmicos o pueden implicar un cambio en la capacidad calorífica de una muestra.

Tabla 2. Comportamientos térmicos observados por DSC.

Endotérmicos	Exotérmicos
Fusión	Cristalización
Vaporización	Condensación
Sublimación	Solidificación
Degradación	Oxidación
Transición vítrea	Descomposición

Tomado de [Clas *et al.*, 1999].

En la Figura 3 se expone un termograma de tereftalato de polietileno (PET) en donde se pueden observar los principales comportamientos térmicos como lo son transición vítrea, recristalización y fusión [Coleman y Craig, 1996].

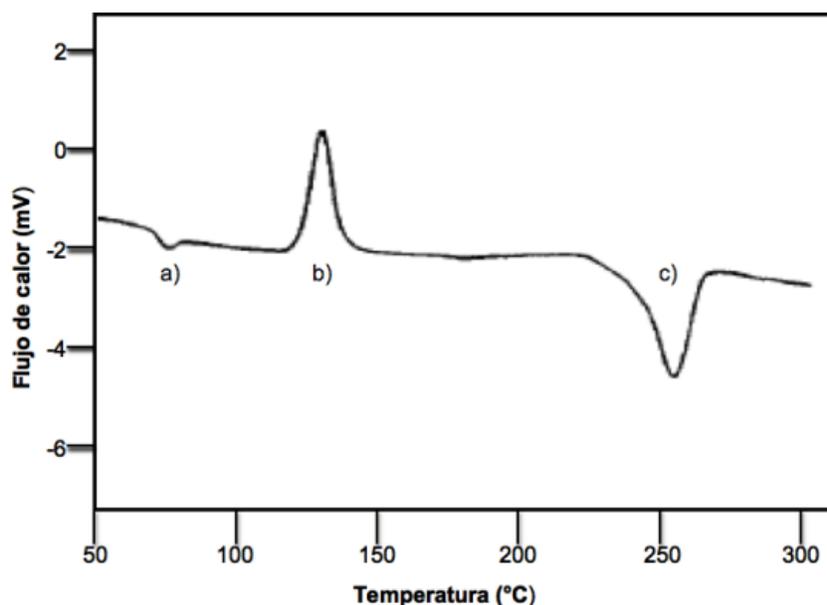


Figura 3. Termograma de PET en donde se observan: a) T_g , b) el proceso exotérmico T_c y c) el proceso endotérmico T_f .

1.5 Nanopartículas poliméricas (NPP)

Las NPP en la actualidad pueden ser elaboradas de diversos materiales. Para llevar a cabo la selección de la matriz existen diversos factores a considerar:

1. Tamaño de partícula requerido.
2. Propiedades inherentes del fármaco (solubilidad y estabilidad).
3. Características de superficie como carga y permeabilidad.
4. Grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad.
5. Perfil de liberación del fármaco.
6. Antigenicidad del producto final [Kreuter, 1994].

Las nanopartículas con fines farmacéuticos son elaboradas principalmente con polímeros y lípidos. En la Tabla 3 se enlistan algunas características que le confieren estos materiales al sistema nanoacarreador comparando a las NPP con las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN).

Tabla 3. Comparación de NPP y SLN.

	NPP	SLN
Liberación parenteral	Posible	Posible
Liberación oral	Posible	Posible
Liberación pulmonar	Posible	Posible*
Liberación de fármacos hidrofílicos y lipofílicos	Si	Si
Estabilidad física	Alta	Alta
Estabilidad biológica	Alta	Moderada
Biocompatibilidad	Moderada	Alta
Fácil esterilización	Moderada	Moderada
Vectorización	Moderada	Moderada
Carga de fármaco	Moderada	De baja a moderada
Fácil comercialización	Baja	Moderada
Aceptación de excipientes	Baja	Alta

Tomado de [A. Date *et al.*, 2007], [Liu *et al.*, 2008]* y [Yang *et al.*, 2008].

Las NPP son preparadas a partir de polímeros sintéticos para aumentar la vida media biológica en el cuerpo y para reducir la absorción fagocítica y la inactivación de los agentes terapéuticos. En la actualidad los nanoacarreadores se formulan mediante la incorporación de polímeros biodegradables para maximizar la compatibilidad con los tejidos y minimizar la citotoxicidad [Mishra *et al.*, 2010].

1.5.1 Polímeros sintéticos

Para diseñar nuevas sistemas de liberación de fármacos se deben utilizar materiales adecuados con los cuales ni el organismo ni el principio activo se vean afectados de manera negativa. Entre los diferentes materiales empleados para la elaboración de sistemas nanoacarreadores se encuentran los polímeros sintéticos hidrofóbicos, los cuales se pueden clasificar en polímeros no biodegradables y polímeros biodegradables.

1.5.1.1 Polímeros no biodegradables

Los polímeros juegan un papel importante como materiales acarreadores ya que deben de ser baratos, de fácil disponibilidad y procesados fácilmente a gran escala; cuando son administrados en animales o humanos deben ser biocompatibles y no tóxicos. Los polímeros no biodegradables de mayor importancia usados como sistemas de liberación de fármacos incluyen los derivados de celulosa (etilcelulosa), polimetacrilatos, silicones y óxido de polietileno.

Etilcelulosa

La etilcelulosa ha sido utilizada por la industria farmacéutica durante casi 40 años para el recubrimiento de formas farmacéuticas sólidas (comprimidos, pellets, gránulos); en sistemas matriciales que son preparados por granulación húmeda o compresión directa; o en procesos de microencapsulación y tiene excelentes propiedades de formación de película. Además del uso predominante como barreras de liberación controlada, las películas delgadas se han empleado como una barrera contra la humedad para mejorar la estabilidad de las sustancias farmacológicas hidrolíticamente inestables o con fines de enmascaramiento del sabor.

La etilcelulosa es un éter de celulosa preparado por la reacción de celulosa alcalina con cloruro de etilo; su estructura química se muestra en la Figura 4. Se caracteriza por el grado de sustitución de grupos etoxi y la viscosidad de la solución, los grados comerciales de etilcelulosa tienen un grado de sustitución entre 2.25 y 2.58 (44 y 50% de contenido de etoxilo) por unidad de glucosa anhidra. Los polímeros de etilcelulosa se venden bajo el nombre comercial Ethocel[®] y están disponibles en seis grados de estándar de 4 a 10; con los grados 7 y 10 se ofrecen con un tamaño de partícula fino para aplicaciones donde el polímero se utiliza como un polvo seco.

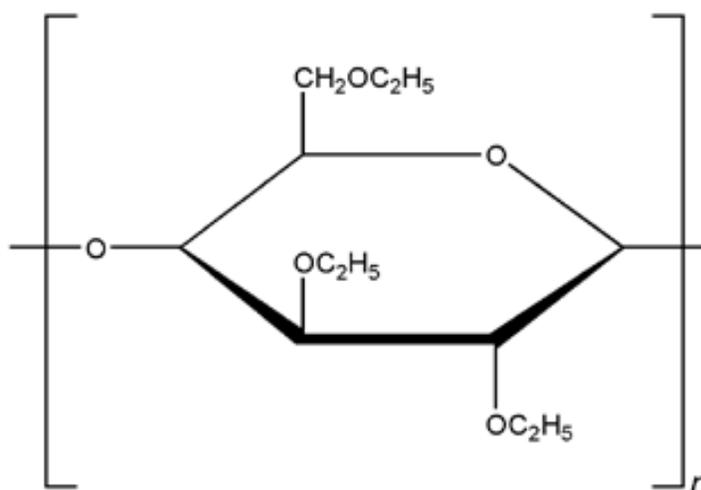


Figura 4. Unidad química estructural de la etilcelulosa.

El polímero es insoluble en agua, insípido e inodoro, fisiológicamente inerte, estable en un rango de pH entre 3 y 11, debido a su carácter no iónico es compatible con la mayoría de los fármacos [Bodmeier y Siepmann, 1999].

1.5.1.2 Polímeros biodegradables

Un polímero biodegradable es aquel que se degrada o divide químicamente en moléculas que son susceptibles a ser eliminadas por el organismo o metabolizadas por éste.

Los poliésteres son los sistemas biodegradables mejor caracterizados. En particular, los poliésteres derivados de los monómeros (láctico, glicólico y caprolactona), tales como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) (Figura 5), el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y la poli- ϵ -caprolactona son los más comúnmente empleados en el área biomédica y farmacéutica, ya que han presentado tener buena histocompatibilidad, biodegradabilidad y generación de

subproductos no tóxicos. Estos polímeros son derivados de monómeros que son metabolitos naturales del cuerpo, convirtiéndolos en sistemas seguros para su uso *in vivo*.

Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)

El ácido poliláctico-co-glicólico es un copolímero aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés); se utiliza en la producción de sistemas de liberación de fármacos, suturas, fijación de fracturas, implantes orales, etc. debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. El PLGA se sintetiza por medio de una co-polimerización de dos monómeros diferentes: ácido láctico y ácido glicólico; durante ésta las unidades monoméricas sucesivas están unidas entre sí mediante enlaces éster produciendo de este modo un poliéster alifático como se observa en la Figura 5.

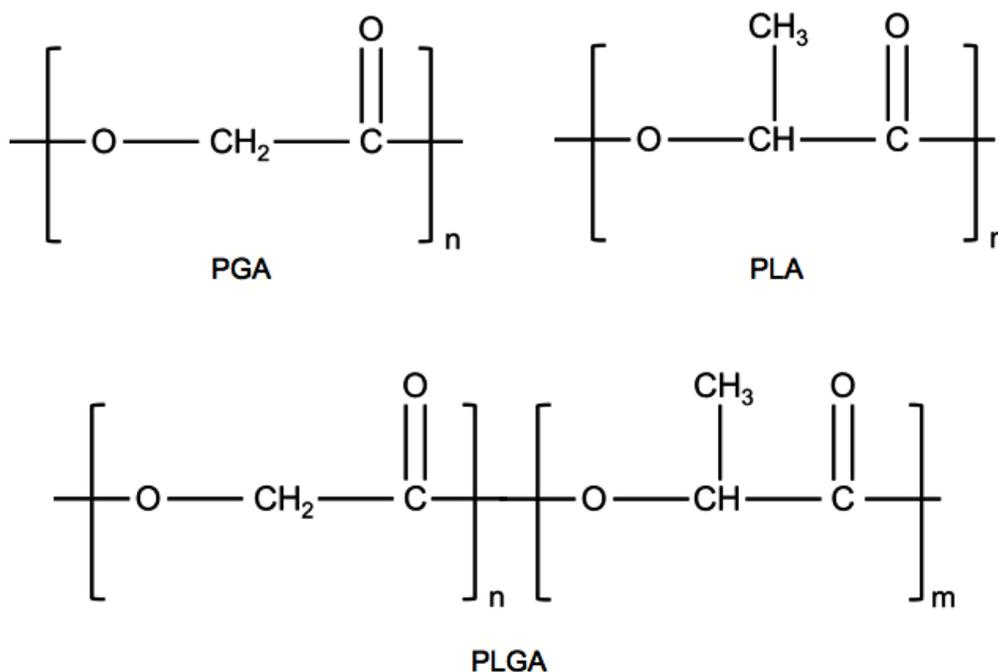


Figura 5. Unidades químicas estructurales del ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

EL PLGA con una relación 1:1 de ácido láctico y ácido glicólico son hidrolizados mucho más rápido que aquellos que contienen una mayor proporción de cualquiera de los monómeros. Los polímeros de esta familia son insolubles en agua pero se degradan por ataque hidrolítico del enlace éster, mediado por el agua que se toma de los tejidos. Los productos finales son ácidos láctico y ácido glicólico, los cuales entran en el ciclo de Krebs, son metabolizados y posteriormente son eliminados del cuerpo como bióxido de carbono y agua [Fredenberg *et al.*, 2011].

Otros materiales importantes para elaborar NPP son los estabilizantes y los solventes ya que de su óptima elección y de la proporción en que se empleen van a depender las características de las nanopartículas en lo que respecta al tamaño de partícula y a la facilidad de su formación. Según el método de elaboración y del material con el que se formará la matriz, será su elección.

1.5.2 Estabilizantes

El estabilizante ayuda a la formación de las NPP al actuar como un agente activo de superficie evitando 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 [Wu *et al.*, 2011].

El tipo de estabilizante y su concentración son de gran impacto en la calidad de la dispersión, varias investigaciones encontraron que altas concentraciones de estabilizante reducen la tensión superficial y facilitan la partición de las partículas durante la homogeneización 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 empleados en el desarrollo de NPP se enlistan en la Tabla 4 [Rao y Geckeler, 2011].

Tabla 4. Estabilizantes utilizados para elaborar NPP por diferentes métodos.

Métodos para elaborar NPP	Polímero	Estabilizante
Emulsificación- evaporación	POP	Poloxamina 908
	PLGA	PVAL
	PEO-mPAE	Pluronic® F-108
Doble emulsión	PLGA	Span® 40
	PLA	PVAL
	PEG-PLA	Colato de sodio
	mPEO-PLA	Sacarosa
	PLGA	SDS
Desplazamiento de solvente	PLGA	PVAL
	PBCA	Pluronic® F-68
	PBCA	Polisorbato 80
	PBCA	Dextran
	PHB	Tween® 80
	PLGA	Tween® 20
	PCL diol	Pluronic® F-127
	PCL	PVAL
	PCL	Span® 20
	PCL	Polisorbato 80
	PLA	Poloxámero® 188
	PCL	PE/F68

Uno de los estabilizantes más empleados es el alcohol polivinílico (PVAL), ya que funciona como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las NPP. Las partículas de PVAL se encuentran adsorbidas formando una capa estable en la superficie de la nanopartícula lo cual permite una fácil redispersión cuando las nanopartículas son liofilizadas.

1.5.3 Solventes

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

Los residuos de solventes en la industria farmacéutica son definidos como químicos orgánicos volátiles que son usados o producidos en la manufactura de fármacos, excipientes y en la preparación de productos farmacéuticos. Los solventes empleados son removidos pero no son completamente eliminados. En consecuencia las NPP están sujetas al uso de solventes menos tóxicos con el principal interés que es, la seguridad del paciente. Según la Conferencia Internacional de Armonización (ICH por sus siglas en inglés) los solventes en la industria farmacéutica han sido clasificados con base a su toxicidad en tres clases:

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

Tabla 5. Ejemplos de solventes Clase 1.

Solvente	Concentración límite (ppm)	Riesgo
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 carcinogénicos en animales, no genotóxicos o posibles causantes de una toxicidad irrelevante como neurotoxicidad o teratogenicidad siendo también solventes sospechosos de otras toxicidades significativas pero reversibles. Se limitará el uso de estos solventes y se cuantificará al final del proceso de manufactura para determinar si los residuos se encuentran dentro de los límites establecidos para cada uno de ellos.

Tabla 6. Ejemplos de solventes Clase 2.

Solventes	Exposición diaria permitida (mg/día)	Concentración límite (ppm)
Acetonitrilo	4.1	410
Clorobenceno	3.6	360
Cloroformo	0.6	60
Ciclohexano	38.8	3880
Diclorometano	6.0	600
Etilenglicol	6.2	620
Formamida	2.2	220
Hexano	2.9	290
Metanol	30.0	3000
Metilbutil cetona	0.5	50
Piridina	2.0	200
Tetrahidrofurano	7.2	720
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 tiene una exposición diaria permitida de 50 mg por día o más [ICH, 2011].

Tabla 7. Ejemplos de solventes Clase 3.

Acetato de etilo	Ácido acético	Heptano
Acetato de isobutilo	Ácido fórmico	Metiletil cetona
Acetato de isopropilo	Butanol	Metilisobutil cetona
Acetato de metilo	Dimetil sulfoxido	Pentanol
Acetona	Etanol	Propanol

1.6 Métodos para la elaboración de NPP

1.6.1 NPP obtenidas por polimerización

La polimerización fue el primer método empleado para la elaboración de NPP el cual fue desarrollado por Birrenbach y Speiser en 1976. En éste método el monómero es dispersado bajo agitación en una fase continua en el cual es inmisible. La polimerización comienza por reacciones 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 [Pinto Reis *et al.*, 2006].

1.6.2 NPP obtenidas de polímeros preformados

El método de polimerización para la elaboración de NPP posee limitantes debido a que algunos polímeros empleados no son biodegradables, además los productos residuales de reacción (monómeros, oligómeros, estabilizantes e iniciadores) no son biocompatibles o pueden ser tóxicos y requieren de una meticulosa purificación en el sistema coloidal.

Para evitar las limitaciones del método de polimerización, Quintanar-Guerrero *et al.* (1998) propone una clasificación para los métodos que emplean polímeros sintéticos preformados en la elaboración de NPP como nanoacarreadores de fármacos:

- Emulsificación-evaporación
- Emulsificación-difusión
- “Salting out”
- Desplazamiento de solvente

1.6.2.1 Emulsificación-evaporación

En este método el polímero y el fármaco hidrofóbico son disueltos en un solvente orgánico inmisible en agua el cual es emulsificado en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante para formar una emulsión o/w. Después de formar la emulsión el solvente orgánico es evaporado bajo presión reducida con agitación continua, obteniendo como resultado la dispersión de NPP (Figura 6). El paso de emulsificación es un factor determinante para obtener un tamaño nanométrico en las partículas [Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998].

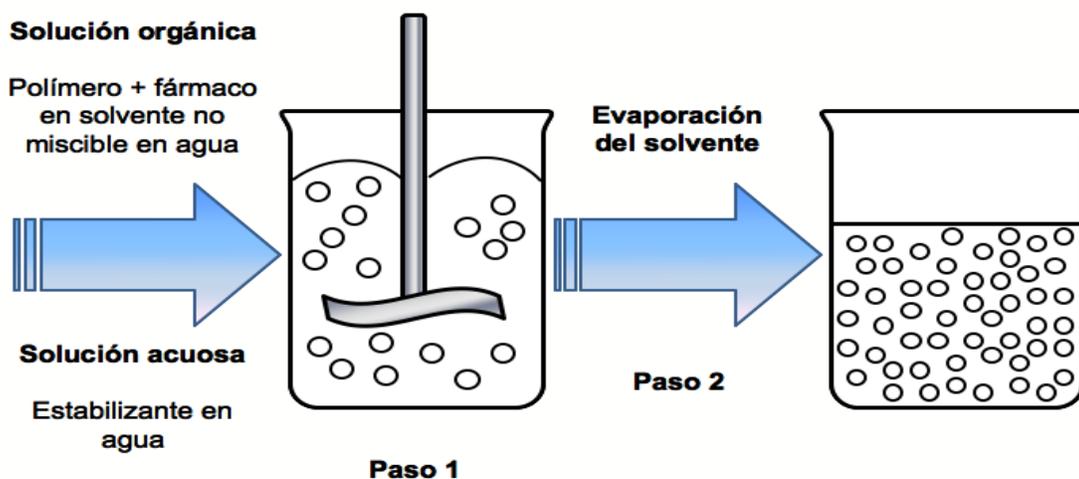


Figura 6. Representación esquemática del método emulsificación-evaporación.

Este método solo puede ser aplicado para la encapsulación de fármacos liposolubles [Pinto Reis *et al.*, 2006].

1.6.2.2 Emulsificación-difusión

Este método involucra el uso de solventes parcialmente miscibles en agua (ejemplos: alcohol bencílico y acetato de etilo) los cuales son previamente saturados con agua para asegurar un equilibrio termodinámico de ambos líquidos. El polímero y el fármaco son disueltos en el solvente saturado con agua y el estabilizante se disuelve en el agua saturada con solvente. Subsecuentemente las fases son emulsificadas y al final se agrega agua sin saturar en el sistema provocando que el solvente difunda hacia la fase externa obteniendo NPP (Figura 7) [Pinto Reis *et al.*, 2006].

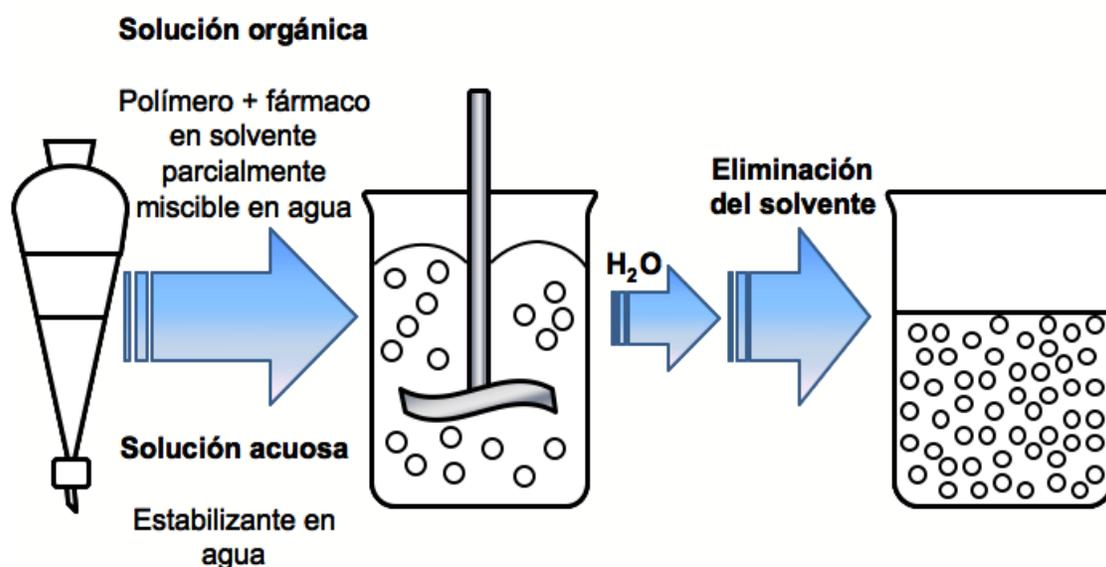


Figura 7. Representación esquemática del método emulsificación-difusión.

En la encapsulación de fármacos liposolubles no existe ningún inconveniente, pero si en fármacos solubles en agua, ya que existe una filtración del solvente hacia la fase acuosa saturada durante la emulsificación provocando una reducción en la eficiencia de encapsulación [Pinto Reis *et al.*, 2006].

1.6.2.3 “Salting out”

En este método las NPP son preparadas empleando una fase acuosa saturada con un electrolito (agente “salting out”), la finalidad es reducir la miscibilidad del solvente en el agua con el proceso de “salting out” y facilitar la formación de una emulsión o/w a partir de fases miscibles entre sí. El polímero y el fármaco son disueltos en un solvente miscible en agua, esta solución es emulsificada bajo 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 agua para que el solvente difunda en la fase acuosa y así inducir la formación de nanopartículas (Figura 8), el solvente y el agente “salting out” son eliminados por filtración de flujo cruzado.

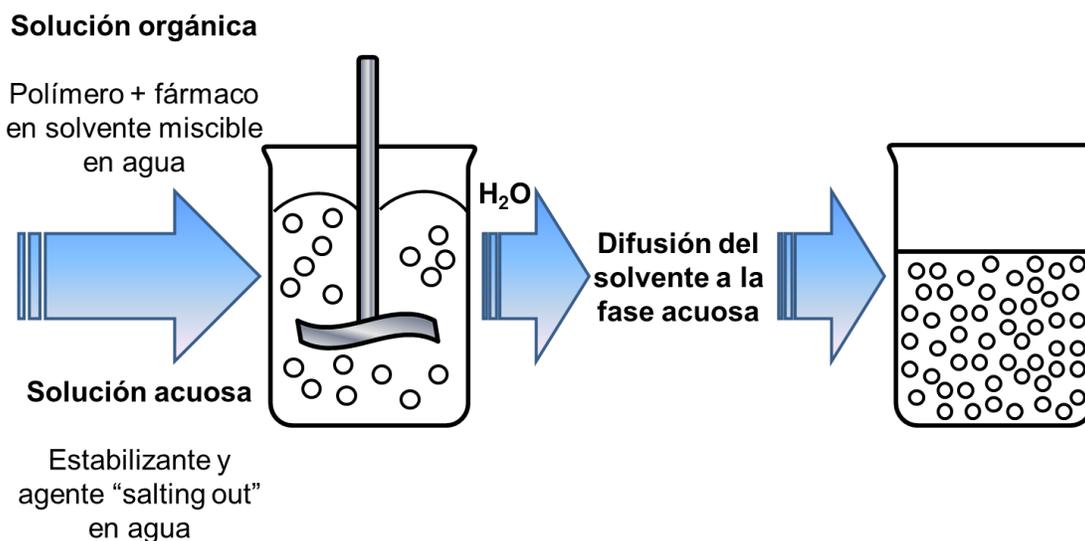


Figura 8. Representación esquemática del método “salting out”.

El método “salting out” puede ser considerado como una modificación del método emulsificación-difusión y los agentes “salting out” empleados son electrolitos como cloruro de magnesio, cloruro de calcio y acetato de magnesio, o no electrolitos

como la sacarosa. Este método se aplica exclusivamente para la encapsulación de fármacos liposolubles [Pinto Reis *et al.*, 2006].

1.6.2.4 Desplazamiento de solvente

En este proceso el polímero, el fármaco y opcionalmente un surfactante lipofílico (ejemplo: fosfolípidos) son disueltos en un solvente miscible en agua (ejemplos: acetona y alcohol etílico). Esta solución es inyectada en una solución acuosa que contiene un estabilizante bajo agitación. Las NPP son formadas instantáneamente por una difusión rápida del solvente (Figura 9) para después ser eliminado bajo presión reducida.

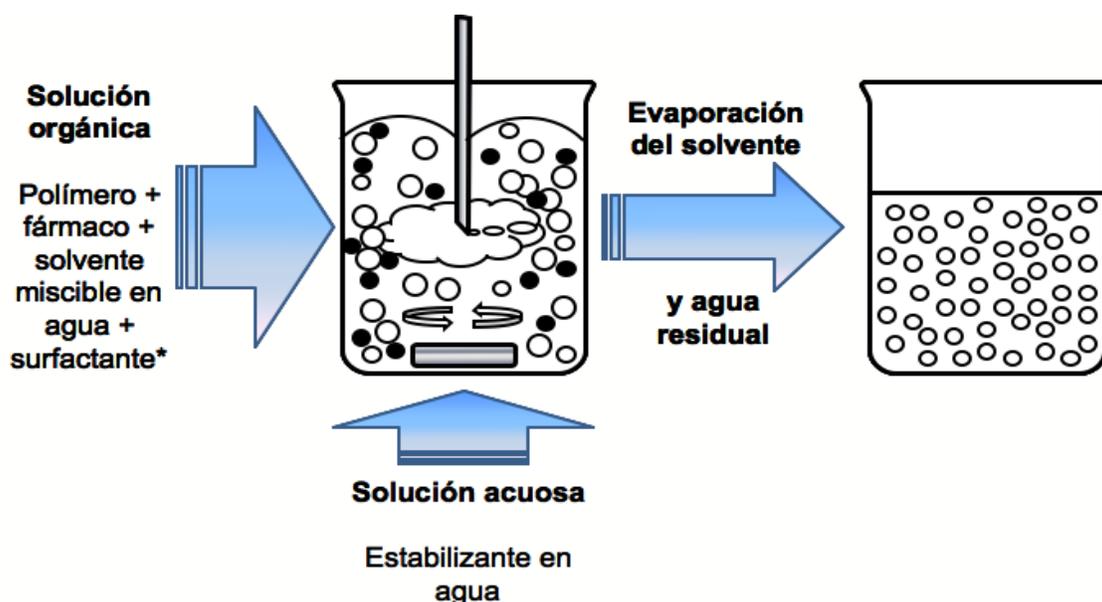


Figura 9. Representación esquemática del método desplazamiento de solvente.

Este método es básicamente aplicable a la encapsulación de fármacos liposolubles, debido a la miscibilidad del solvente con la fase acuosa y no es un medio eficaz para encapsular fármacos solubles en agua [Pinto Reis *et al.*, 2006].

El método fue descrito y patentado por H. Fessi elucidando el mecanismo de formación, el cual 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 glóbulos 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 (Figura 10) [Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998].

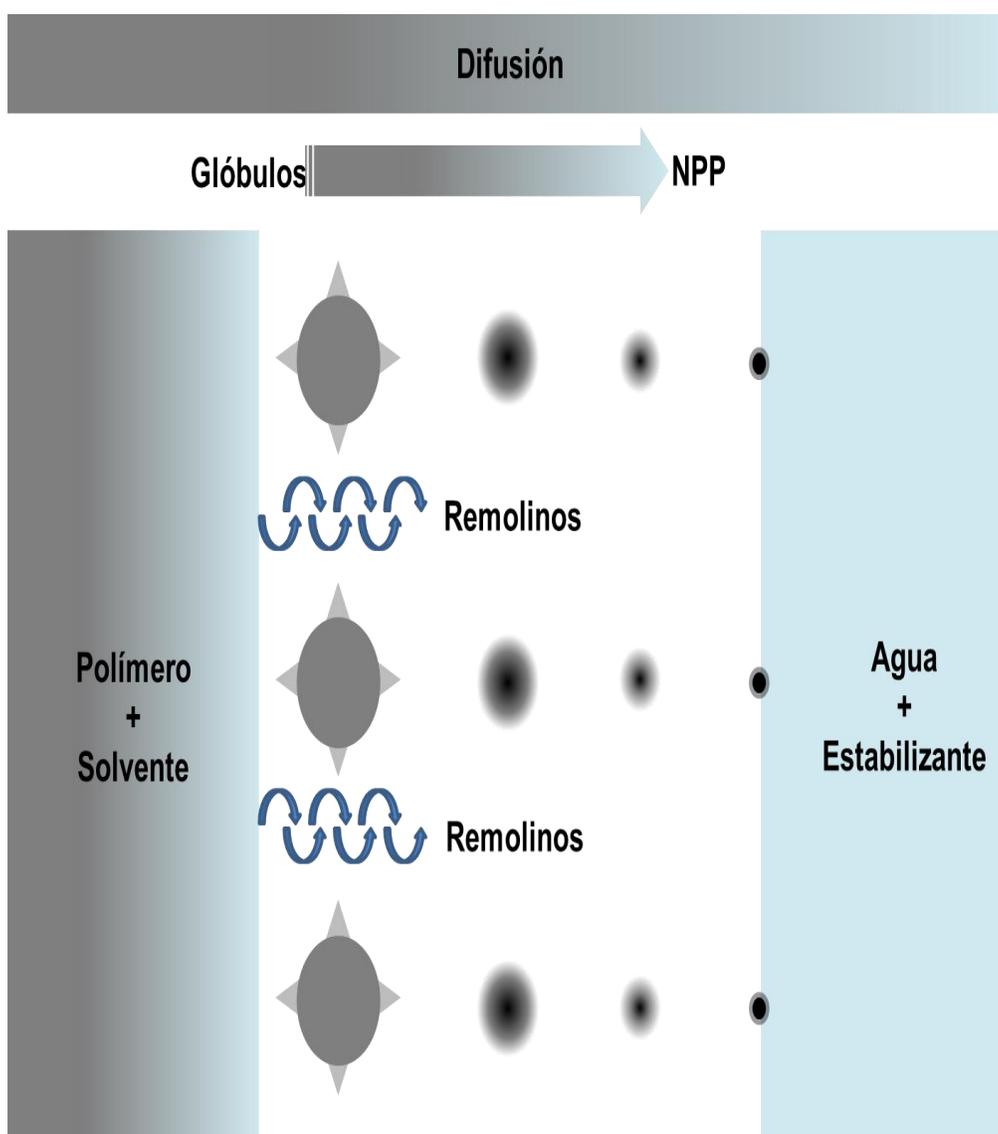


Figura 10. Mecanismo de formación de NPP en el método desplazamiento de solvente.

1.6.3 Encapsulación de fármacos hidrofílicos en NPP

La encapsulación de agentes terapéuticos de naturaleza hidrofílica representa un gran reto en la formulación de un sistema de liberación a base de NPP que suministre al fármaco en el sitio adecuado y además mantenga la concentración terapéutica durante un periodo de tiempo deseado. La principal desventaja de los métodos mencionados anteriormente es su capacidad limitada para encapsular compuestos altamente solubles en agua, incluyendo proteínas y péptidos.

Varios métodos están disponibles para encapsular compuestos solubles en agua en NPP biodegradables, éstos incluyen el método doble emulsión (que entre todos ellos es el método más popular), el método separación de la fase orgánica, el método fluido supercrítico y el método secado por aspersión.

1.6.3.1 Doble emulsión ($w_1/o/w_2$)

En el método doble emulsión agua/aceite/agua, una solución acuosa del fármaco (fase acuosa interna, w_1) se emulsifica en una solución orgánica del polímero (fase orgánica, o), la emulsión primaria resultante (w_1/o) se dispersa a continuación en una segunda fase acuosa (fase acuosa externa, w_2) que contiene un estabilizante adecuado para formar la doble emulsión ($w_1/o/w_2$). La eliminación del solvente orgánico permite la formación de las NPP (Figura 11), éstas son separadas por filtración o centrifugación, lavadas varias veces para eliminar el estabilizante residual y ser liofilizadas. El solvente orgánico usado en la preparación de las NPP por este método debe tener bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación, algunos ejemplos son: acetonitrilo, acetato de etilo, cloroformo y cloruro de metileno [Giri *et al.*, 2012].

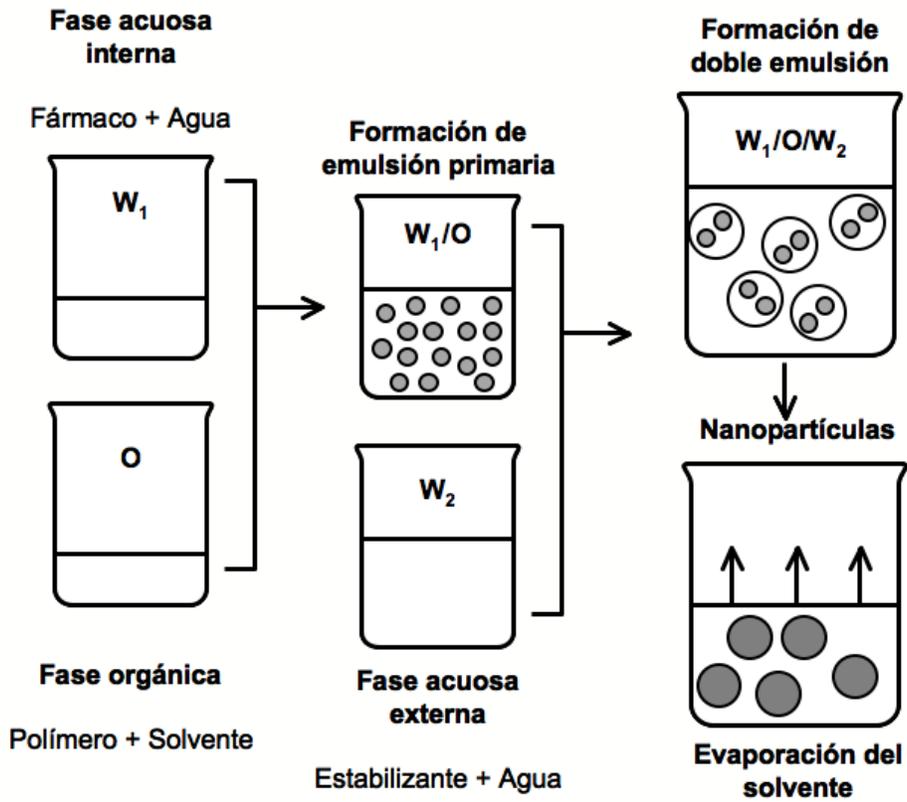


Figura 11. Representación esquemática del método doble emulsión ($w_1/o/w_2$).

2. Regaliz

2.1 Nombre científico: *Glycyrrhiza glabra*.

2.2 Nombre común: Regaliz, Licorice y Gan Cao.

2.3 Descripción botánica

Se trata de una especie herbácea perenne, de la familia de las papilionáceas. Puede alcanzar hasta 1.5 m de altura, su raíz y rizoma aunque están muy desarrollados no suelen presentar ramificaciones. Presenta tallos erguidos con hojas alternas e imparipinnadas con aproximadamente 13 folíolos ovales (siempre un número impar). Las flores de color azul o púrpura crecen en inflorescencias en racimo, alargados y erguidos. Los frutos en vaina contienen de una a cuatro semillas, pequeñas y arriñonadas (Figura 12).



Figura 12. *Glycyrrhiza glabra*.

La raíz de esta planta es cilíndrica, succulenta, flexible, de rápido crecimiento y sabor dulce. Su corteza es de color marrón grisáceo y está estriada longitudinalmente. Internamente, la raíz es de color amarillo, la fractura es granulosa y fibrosa. Crece especialmente en terrenos arenosos, cercanos a alguna corriente de agua y es raro encontrarla a más de 50 m de una zona húmeda [López Luengo, 2008].

2.4 Historia

Nativa de las zonas mediterráneas y de ciertas áreas de Asia, se encuentra distribuida en las regiones subtropicales y cálidas del mundo. *Glycyrrhiza* se deriva de los términos griegos *Glykos* que significa dulce y *Rhiza* que significa raíz.

Históricamente el rizoma seco y la raíz de esta planta fueron empleados con fines medicinales por la civilización egipcia, china, griega, hindú y romana como expectorante y carminativa. En la medicina moderna, el extracto de regaliz se utiliza a menudo como saborizante para enmascarar el sabor amargo en las preparaciones y como expectorante para la tos y el resfriado. Los extractos de regaliz se han utilizado durante más de 60 años en Japón para el tratamiento de la hepatitis crónica, contando con beneficios terapéuticos frente a otros virus. Es una de las medicinas herbolarias más antiguas que se emplean con mayor frecuencia en China y en Europa, se usa ampliamente para el tratamiento de enfermedades de los sistema gastrointestinal, cardiovascular y respiratorio [Rathee *et al.*, 2010].

2.5 Actividad farmacológica

Actualmente, el regaliz es una de las medicinas herbolarias que cuenta con mayor número de estudios farmacológicos y clínicos. Dichos estudios se realizan con el extracto completo, con extractos desglicirricinados o con algunos principios activos aislados; en la mayoría de las ocasiones se ha visto que la actividad farmacológica estudiada es mayor en los extractos completos que en los componentes aislados, por lo que la acción global del regaliz probablemente se debe al conjunto de los diferentes principios activos.

2.5.1 Efecto antiulceroso

Dentro de su actividad farmacológica destaca el efecto antiúlceras péptica y protector de la mucosa gástrica. Este efecto se debe principalmente a las saponinas, aunque no exclusivamente, ya que también intervienen otros principios activos, como por ejemplo los flavonoides.

Existen numerosos estudios clínicos que demuestran que el extracto de regaliz, por un lado, reduce las secreciones gástricas, con lo que previene la formación de úlceras, y por otro lado, el ácido glicirretínico actúa inhibiendo una serie de enzimas del grupo de las deshidrogenasas y reductasas, lo que se traduce en un aumento de los valores de prostaglandinas y, en consecuencia, un aumento en la secreción de mucus, de efecto protector, y de la proliferación celular de la mucosa gástrica, lo que favorece la cicatrización y regeneración de tejidos dañados.

Así mismo, diferentes estudios farmacológicos *in vitro* confirman la eficacia bactericida de los extractos de regaliz y de sus componentes activos frente a *Helicobacter pylori*, por lo que este efecto también puede contribuir a la mejoría [López Luengo, 2008].

2.5.2 Actividad expectorante y antitusiva

Las raíces y rizomas de *Glycyrrhiza glabra* poseen propiedades demulcentes, antitusivas y expectorantes que facilitan la expulsión de las secreciones bronquiales en afecciones del tracto respiratorio superior [López Luengo, 2008].

2.5.3 Actividad antiinflamatoria y antiagregante plaquetario

Su actividad antiinflamatoria podría deberse a la capacidad que poseen algunos principios activos del extracto, como el ácido glicirricínico y el isoliquiritogenósido, de inhibir enzimas implicadas en la cascada del ácido araquidónico, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa y peroxidasa plaquetarias, por lo que también inhibe la formación de eicosanoides como la PGE₂ y el tromboxano B₂. Por este motivo, también ejerce un efecto antiagregante plaquetario.

Por otra parte, el ácido 18-betaglicirretínico inhibe la producción de interleucina-8 (IL-8), que es otro mediador proinflamatorio [López Luengo, 2008].

2.5.4 Efecto antioxidante

Su capacidad antioxidante y captadora de radicales libres es de especial importancia, principalmente los flavonoides y las saponinas actúan como potentes antioxidantes. Estudios *in vitro* en hepatocitos de rata demostraron que algunos isoflavonoides como la hispaglabridina A y B inhiben la peroxidación lipídica mitocondrial inducida por Fe³⁺. Igualmente, se ha visto que la glabridina y el ácido glicirricínico, tienen la capacidad de inhibir la generación de especies reactivas de

oxígeno en neutrófilos durante el proceso inflamatorio. Así mismo, se ha constatado en modelos de isquemia reperusión que el ácido glicirricínico disminuye significativamente la peroxidación lipídica hepática [López Luengo, 2008].

2.5.5 Actividad anticancerosa

Algunos componentes del regaliz, como el ácido glicirricínico, poseen propiedades anticancerosas, ya que han demostrado tener la capacidad de inhibir la proliferación celular, carcinogénesis y crecimiento tumoral en modelos de cáncer de mama, hígado y piel. Así mismo se ha constatado que el extracto de regaliz, así como su principio activo liquiritigenina, poseen un efecto citoprotector frente a la apoptosis inducida por cadmio. Sin embargo, aún es necesario contar con más estudios, tanto en animales como en humanos, para poder establecer su aplicación terapéutica en este campo [López Luengo, 2008].

2.5.6 Efecto despigmentante

Esta actividad se basa en la similitud estructural de principios activos del regaliz como la glabridina, hispaglabridina e isoliquiritina, con los compuestos de tipo hidroxibenceno que poseen propiedades blanqueadoras (hidroquinona, resorcinol o pirocatecol) y cuyo mecanismo de acción es, por una parte, la inhibición de la enzima tirosinasa, así como una ligera acción reductora de la melanina y sus precursores coloreados [López Luengo, 2008].

2.6 Componente principal

El principal componente de la raíz de regaliz es una saponina triterpenoide llamada ácido glicirricínico (AG) ilustrado en la Figura 13 que desde hace tiempo se le conciben los efectos farmacológicos de esta planta; sin embargo, el efecto antiúlceras gástrica del extracto de regaliz se atribuye a las fracciones libres de ácido glicirricínico abundantes en flavonoides. Este hallazgo comprobó que los flavonoides también forman parte de las actividades farmacológicas del extracto. Por lo tanto, las saponinas y flavonoides son considerados los mayores componentes bioactivos del regaliz [Qinying Zhang, 2009].

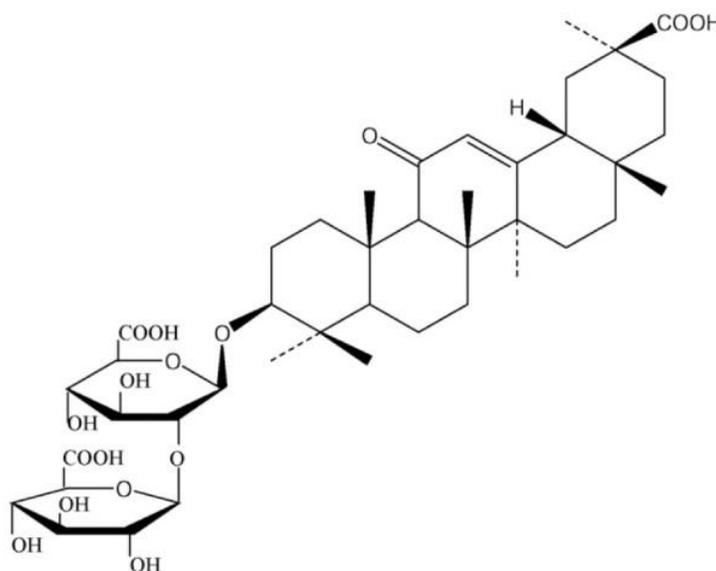


Figura 13. Estructura molecular del AG.

Los estudios farmacológicos se han centrado principalmente en el AG, este compuesto posee extensas actividades farmacológicas incluyendo actividad antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, anticancerígena, antitrombótica, antidiabética, hepatoprotectora, neuroprotectora, entre otras haciéndolo un componente activo versátil para incluirlo en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos.

Al ser una molécula de origen natural, está incluida por la FDA en lista de productos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), en la Farmacopea Europea y otras farmacopeas de países asiáticos. A nivel mundial encontramos productos en diferentes presentaciones y con diferentes aplicaciones (Tabla 8).

2.6.1 Actividad antiviral del AG

En cuanto a sus efectos antivirales, se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo*, que el AG tiene la capacidad de impedir la replicación tanto de virus ADN como ARN, como por ejemplo virus de la varicela zoster, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), Influenza A y B, herpes simple 1 y 2, hepatitis A y C, sin toxicidad en líneas celulares usadas en los diferentes ensayos realizados. El AG disminuye la replicación de los virus en un estadio temprano, además impide la salida del virión de su cápside y con esto su penetración a las células [López Luengo, 2008].

Tabla 8. Productos comerciales que contienen AG.

Nombre del producto	Aplicación	Presentación	País	Referencia
Alkaline Formula [®]	Equilibrar el pH del organismo	Cápsulas	Luxemburgo	http://www.super-smart.eu
Epigen [®]	Antiherpético	Spray	México	http://www.dermaceutical.com.mx
Fuzilizhong [®]	Tratamiento contra enfermedades en el bazo y estomago	Tabletas	China	[Ren y Sun, 2008]
Ganlixin [®]	Antiviral	Cápsulas	China	http://www.evaluatepharma.com
Glicosol [®]	Despigmentante	Gel	España	http://www.iooxlabs.com
Glycyol [®]	Tratamiento contra estomatitis, trastornos hepáticos y trastornos de la piel	Tabletas	Japón	http://www.pharmex.co.jp
Glycyron [®]	Tratamiento contra estomatitis, trastornos hepáticos y trastornos de la piel	Tabletas	Japón	http://www.minophagen.co.jp
Glyzygen [®]	Antiherpético	Gel, spray y crema labial	España	http://www.catalysis.es
Granex [®]	Tratamiento contra el acné	Crema facial y spray	España	http://www.catalysis.es
Herbolax [®]	Laxante y antiflatulento	Tabletas y cápsulas	India, Nicaragua y Costa Rica	http://www.himalayahealthcare.com

Tabla 8 (continuación)

Lax Fitotablet Complex®	Regular tránsito intestinal	Comprimidos	España	http://www.eladiet.com
Licothion®	Tratamiento contra estomatitis, trastornos hepáticos y trastornos de la piel	Tabletas	Japón	http://www.maruzenpcy.co.jp
Liquor pectoralis®	Tratamiento contra tos	Solución oral	Dinamarca	[Hansen <i>et al.</i> , 1999]
Neophagen C®	Tratamiento contra estomatitis, trastornos hepáticos y trastornos de la piel	Tabletas	Japón	http://www.rxlist.cn
Neubormitin®	Tratamiento contra conjuntivitis e inflamación en los ojos	Solución oftálmica	Japón	http://www.rad-ar.or.jp
Nichiphagen®	Tratamiento contra estomatitis, trastornos hepáticos y trastornos de la piel	Tabletas e inyecciones	Japón	http://www.e-pharma.jp
Norske Brystråber®	Tratamiento contra tos y flemas	Solución oral	Dinamarca	[Hansen <i>et al.</i> , 1999]

Tabla 8 (continuación)

Ocoxyn + Viusid [®]	Complemento alimenticio para pacientes con cáncer	Solución oral	España	http://www.catalysis.es
OTC Despigmentante [®]	Despigmentante	Gel	Costa Rica	http://www.carenostrum.com
Paonimin [®]	Tratamiento contra tos y resfriado	Tabletas	Taiwán	http://www.drugcare.com
Polyrhitin N [®]	Tratamiento contra estomatitis, trastornos hepáticos y trastornos de la piel	Tabletas	Japón	http://www.drugs.com
Repavan [®] Regeneradora	Despigmentante	Gel	España	http://www.vademecum.es
Retorna [®]	Tratamiento antiarrugas	Crema	Estados Unidos	http://www.retorna.us
Salina mikstur [®]	Expectorante	Jarabe	Dinamarca	[Hansen <i>et al.</i> , 1999]
Topialyse [®]	Tratamiento contra factores de sequedad atópica	Crema	Francia	http://www.labo-svr.com
Viusid [®]	Fortalecimiento del sistema inmune	Polvo y jarabe	México	http://www.medicamentosplm.com
ViusidVet [®]	Preparado nutricional para aves y cerdos	Polvo	España	http://www.catalysisvet.com
Zhenkening [®]	Tratamiento contra tos, bronquitis y asma	Jarabe y cápsulas	China	[Yong-li <i>et al.</i> , 2012]

III. Hipótesis

Si se logra controlar aquellos factores que afectan la obtención de NPP, tales como, velocidad de agitación y tipo de estabilizante en los métodos a emplear, será posible la obtención de NPP que contengan al fármaco hidrofílico modelo con características tecnológicas adecuadas (tamaño de partícula y Ψ_z) para su uso farmacéutico antiviral.

IV. Objetivo general

Obtener NPP cargadas con un fármaco hidrofílico modelo por los métodos desplazamiento de solvente y doble emulsión ($w_1/o/w_2$) empleando polímeros preformados, con la finalidad de lograr un sistema nanoacarreador de liberación controlada con potencial uso antiviral.

V. Objetivos particulares

- a) Optimizar los métodos desplazamiento de solvente y doble emulsión ($w_1/o/w_2$) para establecer las condiciones adecuadas en la elaboración de NPP cargadas con un fármaco hidrofílico modelo para su posible administración pulmonar.
- b) Caracterizar los sistemas coloidales obtenidos, fisicoquímicamente, en cuanto a morfología, tamaño de partícula, y Ψ_z , mediante el uso de las técnicas: Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

- c) Calcular la eficiencia de encapsulamiento (%) y la carga de fármaco (%) del AG (fármaco hidrofílico modelo), mediante el uso de la técnica Cromatografía en Capa Fina de Alta resolución (HPTLC) a partir de una formulación desarrollada que cumpla con las características de estabilidad en cuanto a tamaño de partícula y Ψ_z .

VI. Metodología

La Figura 14 muestra de manera general los procedimientos experimentales de esta investigación. La primera etapa consistió en caracterizar los materiales y elaborar NPP, la segunda en incorporar el principio activo y finalmente el cálculo de eficiencia de encapsulamiento (%) y carga de fármaco (%) del sistema terapéutico propuesto.

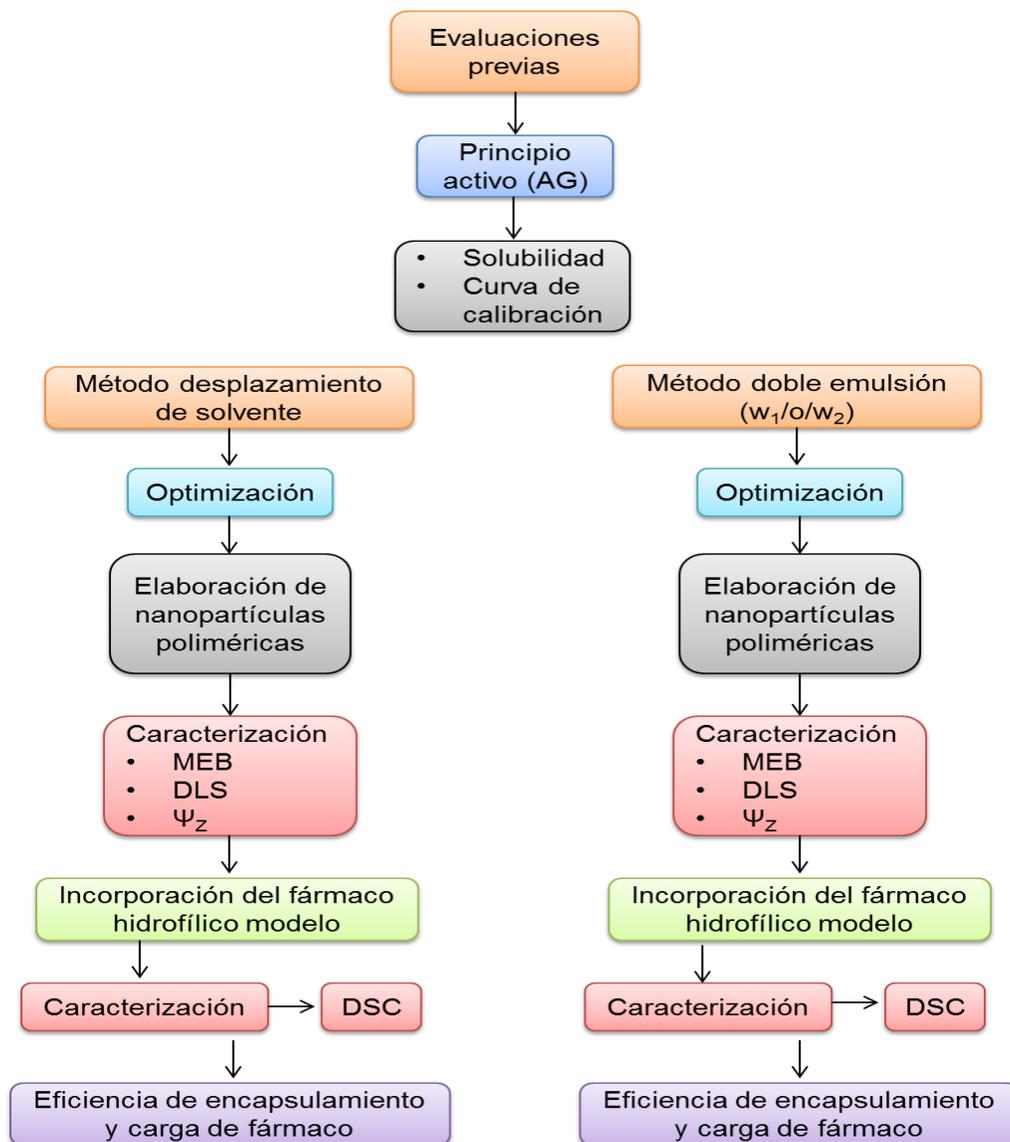


Figura 14. Desarrollo experimental para la elaboración de NPP cargadas con AG.

VII. Reactivos y equipos

7.1 Reactivos

Glicirricinato de amonio (Sigma-Aldrich Química, S. A. de C. V.)

PLGA 50:50 (Lakeshore Biomaterials, USA)

Ethocel[®] std. 4 Premium (Colorcon de México, S. de R. L. de C. V.)

Ethocel[®] std. 10 FP Premium (Colorcon de México, S. de R. L. de C. V.)

Alcohol polivinílico, Mowiol[®] 4-88 (Glomarza, México)

Lauril sulfato de sodio (Hycel de México, S. A. de C. V.)

Pluronic[®] F-68 / Poloxámero 188 (Sigma-Aldrich Química, S. A. de C. V.)

Ácido clorhídrico GR (J. T. Baker, México)

Ácido acético glacial GR (J. T. Baker, México)

Metanol GA (Fermont, México)

Alcohol etílico GA (Fermont, México)

Acetato de etilo GA (Fermont, México)

Agua desionizada GA (Milli-Q[®], Millipore USA)

7.2 Equipos

Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)

Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec[®], Thermoline, USA)

Homogeneizador (Ultraturrax[®] T-25 Basic, IKA[®])

Rotaevaporador (Laborota[®] 4000, Heidolph, Alemania)

Liofilizadora de mesa (Labconco[®], USA)

Contador submicrónico de partículas (Coulter[®] N4 Plus, USA)

Zetasizer[®] ZEN 3600 (Malvern Instruments[®] Ltd. UK)

Calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10 TA Instruments, USA)

Cromatógrafo de Capa Fina de Alta Resolución, HPTLC (Camag[®] TLC Scanner 3 y Camag[®] Automatic TLC Sampler 4, Suiza)

Microscopio electrónico de barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)

Milli-Q[®] (Millipore, USA)

Ultracentrifuga Optima LE-80K (Beckman, USA)

Ultrasonicador (Branson[®], USA)

Material de cristalería en general

VIII. Evaluaciones previas

8.1 Solubilidad del AG

El AG fue obtenido a partir de la reacción de Glicirricinato de amonio (GNH_4) con ácido clorhídrico (HCl) a temperatura ambiente, obteniendo la formación de un gel extremadamente rígido. Después de evaporar la mayor parte de agua del sistema a una temperatura controlada de 40°C , el precipitado se filtró y lavó con agua para retirar las impurezas obteniendo un polvo fino de color blanco.

Se determinó la solubilidad de AG en 3 ml de alcohol etílico ya que se cuenta con el registro donde se indica que es el único disolvente empleado para su disolución a temperatura ambiente (Anexo 1).

8.2 Curva de calibración para la cuantificación de AG por Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC)

Esta técnica se describe con mayor detalle en el Anexo 2. Se preparó una solución estándar de AG en alcohol etílico de 2.8×10^{-2} ng/nl. De esta solución se hicieron aplicaciones por triplicado en el equipo Camag[®] Automatic TLC Sampler 4 (Suiza) sobre placas ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ de los siguientes volúmenes 2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 nl; para dar cantidades finales aplicadas de 56, 112, 168, 224 y 280 ng de AG. Estas aplicaciones se dejaron secar durante 5 minutos y en seguida, se colocó la placa en una cámara cromatográfica de vidrio con fondo plano, previamente saturada durante 20 minutos con la fase móvil compuesta por una mezcla de acetato de etilo-metanol-ácido acético-agua (67:8:8:17). La placa se dejó correr hasta una altura de 4.5 cm y luego se secó a temperatura ambiente para eliminar el exceso de fase móvil. La cuantificación del fármaco se hizo leyendo la placa a una longitud de onda de 254 nm con una lámpara de deuterio en el modo Absorción/Reflexión en el equipo Camag[®] TLC Scanner 3 (Suiza). El análisis estadístico se presenta en el Anexo 3.

8.3 Optimización del método desplazamiento de solvente para obtener NPP

Se llevó a cabo la optimización del proceso de desplazamiento de solvente con el objetivo de encontrar las condiciones adecuadas de elaboración de la dispersión

de NPP y también para asegurar la obtención de las características deseadas como tamaño de partícula submicrónico (200 - 500 nm), población unimodal, formulación estable y factible de separar por ultracentrifugación de los residuos del proceso de elaboración. Se evaluaron las variables como velocidad de agitación y tipo de estabilizante con la finalidad de satisfacer las especificaciones requeridas.

i) Velocidad de agitación

Se elaboraron dispersiones de NPP con tres diferentes velocidades 11000, 13000 y 16000 rpm.

ii) Tipo de estabilizante

Se realizó la comparación del efecto de dos estabilizantes diferentes: PVAL al 5% (p/v) y lauril sulfato de sodio (LSS) al 2% (p/v).

Una vez que se optimizó el método para las NPP blanco, las condiciones establecidas se utilizaron de forma fija para elaborar los lotes de NPP posteriores cargados con AG.

8.4 Preparación de NPP de Ethocel[®] por el método desplazamiento de solvente

El material polimérico elegido para la preparación de las NPP fue propuesto debido a que presenta adecuada estabilidad física, su compatibilidad con la

mayoría de los fármacos y alta biocompatibilidad. Dicho polímero es soluble en el solvente miscible en agua (alcohol etílico) empleado como fase orgánica. La elección de dicho solvente se debe a los estudios previos de solubilidad realizados al AG.

Las NPP se prepararon por el método descrito por Fessi *et al.* (1987) basado en la agregación del polímero después de la difusión del solvente. Primero se pesaron 400 mg de Ethocel[®] y se disolvió en 20 ml del solvente orgánico miscible en agua, en este caso alcohol etílico. En seguida, se procedió a homogeneizar esta fase orgánica con 40 ml de solución estabilizante empleando un homogeneizador (Ultraturrax[®] T-25 Basic, IKA[®]) durante 4 min a las velocidades a evaluar. Finalmente se retiró el exceso de solvente en el rotaevaporador bajo presión reducida (-5 °C baño de recirculación / 30 °C evaporador). La dispersión final se centrifugó a 30000 rpm durante 50 min. El sedimento formado se resuspendió y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, con el fin de eliminar el exceso de estabilizante (Figura 15).

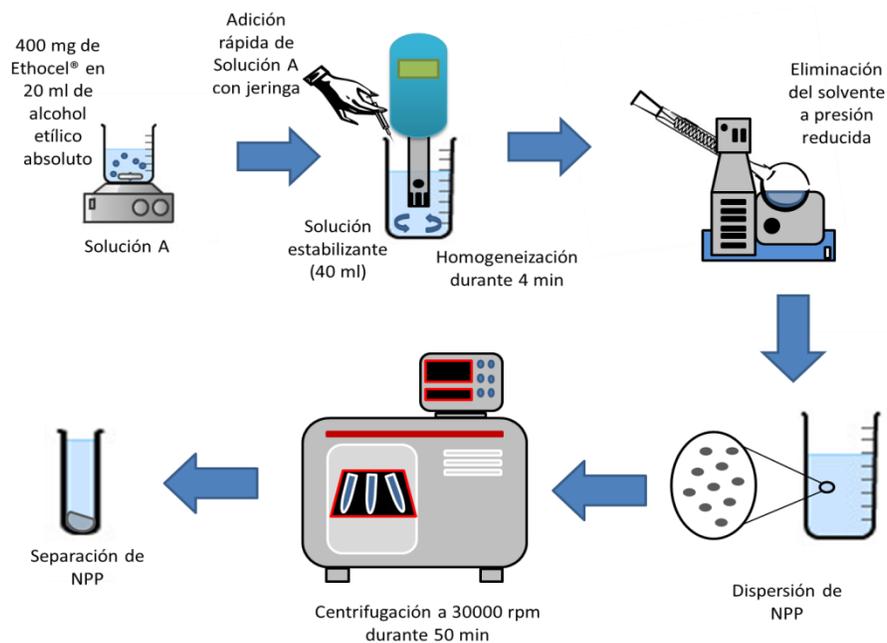


Figura 15. Elaboración de NPP por el método desplazamiento de solvente.

8.4.1 Incorporación del AG en las NPP

El principio activo hidrofílico modelo fue incorporado junto con el polímero en la fase orgánica. Se pesaron 30 mg de AG y se disolvieron completamente en 20 ml de alcohol etílico, posteriormente se añadió el polímero hasta completar su disolución, finalmente se procedió con el método general de desplazamiento de solvente.

8.4.2 Determinación del tamaño de partícula promedio (TPP)

El tamaño promedio de las NPP se determinó mediante el uso de un contador submicrónico de partículas con dispersión de rayos láser a un ángulo de 90° que emplea la técnica de DLS (Contador submicrónico de partículas Coulter® N4 Plus, USA). Los datos de la luz dispersada se analizaron mediante un correlacionador digital en el modo de análisis unimodal. Las muestras se diluyeron con agua destilada hasta que la señal de la luz dispersada por las partículas estaba dentro del intervalo de sensibilidad del instrumento. Cada muestra se leyó por triplicado (n=3) para calcular el TPP y la desviación estándar.

8.4.3 Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler (Ψ_z)

De cada uno de los lotes elaborados, se hizo una dilución de 1:5 con agua filtrada en membrana de 0.22 μm . La movilidad electroforética se transformó a Ψ_z aplicando la aproximación de Smoluchowski. Las mediciones se hicieron por triplicado a 25 °C en celdas desechables de capilar doblado en el equipo Zetasizer® ZEN 3600 (Malvern Instruments® Ltd. UK).

8.4.4 Microscopía Electrónica de Barrido

Una vez retirado el exceso de estabilizante de las dispersiones cargadas con AG mediante centrifugación, se colocó la muestra diluida en un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se recubrió con una película fina de oro (1200 V, 5 mA y 0.15 Torr durante 10 min) y se examinó la superficie con el microscopio electrónico de barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón).

8.4.5 Calorimetría Diferencial de Barrido

Las muestras evaluadas fueron: AG, Ethocel[®] std. 4, Ethocel[®] std. 10, LSS y PVAL como materias primas, mezcla física AG-Ethocel[®] std. 4, mezcla física AG-Ethocel[®] std. 10, mezcla física AG-PVAL, mezcla física AG-LSS, lotes de NPP vacías y lotes de NPP con AG. Todas las muestras se colocaron en un desecador a humedad ambiente. De cada una de las muestras se pesaron entre 3-6 mg y se colocaron en crisoles no herméticos de aluminio. En seguida se sometieron a una rampa de calentamiento de 0 a 250 °C, con una velocidad de 10 °C/min y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. La calibración se realizó con un estándar de Indio con el calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10 TA Instruments, USA).

8.4.6 Metodología para la cuantificación de AG en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y Eficiencia de encapsulamiento (%)] por HPTLC

Se prepararon lotes con 400 mg de Ethocel[®] y 30 mg de AG. Se separaron y lavaron las partículas, y luego se liofilizaron. Del liofilizado se pesaron cantidades aproximadas de 20 mg y se adicionaron a 5 ml de alcohol etílico. Se agitaron por

24 h. Las muestras se filtraron con membrana de 0.45 μm manteniendo el volumen constante en 5 ml. De este filtrado se aplicaron 50000 nl sobre una placa ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄. Se desarrolló la placa en una fase móvil compuesta de acetato de etilo-metanol-ácido acético-agua (67:8:8:17); las aplicaciones se leyeron a 254 nm en el densitómetro del equipo de HPTLC. El análisis se realizó por triplicado.

Al aplicar las ecuaciones 1 y 2, se calculó el porcentaje de fármaco contenido en las NPP (% de AG cargado) y la eficiencia de encapsulamiento [E. E. (%)].

$$AG\ cargado(\%) = \frac{cantidad\ de\ AG\ en\ liofilizado}{cantidad\ de\ liofilizado} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$E.E.(\%) = \frac{AG\ cargado(\%)}{\% inicial\ de\ AG} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

8.5 Optimización del método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) para obtener NPP

Se llevó a cabo la optimización del proceso de doble emulsión ($w_1/o/w_2$) evaluando la variable tiempo de agitación a una velocidad de 16000 rpm, con el objetivo de encontrar las condiciones adecuadas de elaboración de la dispersión de NPP y también para asegurar la obtención de las características deseadas como tamaño de partícula submicrónico (≤ 500 nm), población unimodal, formulación estable y factible de separar por ultracentrifugación de los residuos del proceso de elaboración.

8.6 Preparación de NPP de PLGA por el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$)

El material polimérico elegido para la preparación de las NPP fue propuesto debido a que presenta una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y uso potencial como acarreador en la liberación de fármacos. Dicho polímero es soluble en solventes con bajo punto de ebullición (acetato de etilo y cloruro de metileno) empleados como fase orgánica en el método.

Las NPP se prepararon por este método basado en el proceso de emulsificación- evaporación y con la finalidad de poder encapsular sustancias hidrofílicas. Primero se pesaron 20 mg de Pluronic[®] F-68 y se disolvieron en 10 ml de agua destilada (fase acuosa interna, w_1). Después se pesaron 400 mg de PLGA 50:50 y se disolvieron en 20 ml de acetato de etilo (fase orgánica, o). La emulsión primaria (w_1/o) se obtuvo con una homogeneización a 16000 rpm durante 5 min. Finalizado este procedimiento se adicionó 30 ml de una solución de PVAL al 1% (p/v) (fase acuosa externa, w_2). La doble emulsión ($w_1/o/w_2$) se obtuvo con una homogeneización a 16000 rpm durante 4 min y por último se diluyó en 100 ml de una solución de PVAL al 0.3% (p/v). Se retiró el exceso de solvente en el rotaevaporador bajo presión reducida (-5 °C baño de recirculación / 30 °C evaporador). La dispersión final se centrifugó a 20000 rpm durante 20 min. El sedimento formado se resuspendió y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, con el fin de eliminar el exceso de estabilizante (Figura 16).

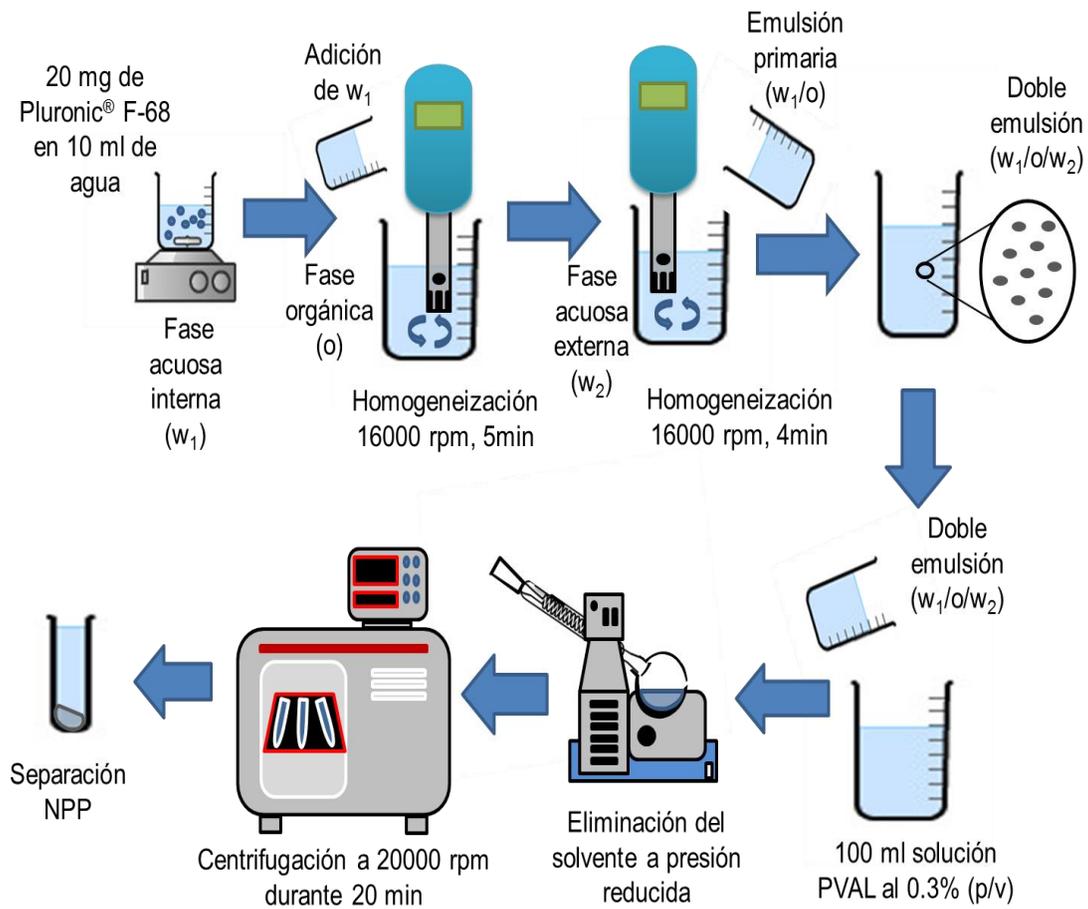


Figura 16. Elaboración de NPP por el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$).

8.6.1 Incorporación del GNH_4 en las NPP

El principio activo modelo se disolvió en la fase acuosa interna (w_1) junto con el estabilizante Pluronic® F-68. Se pesaron 15 mg de GNH_4 (sal correspondiente del AG) y se disolvieron completamente en 10 ml agua destilada, posteriormente se añadió el estabilizante hasta completar su disolución, finalmente se procedió con el método general de doble emulsión ($w_1/o/w_2$).

8.6.2 Determinación del TPP

El tamaño promedio de las NPP se determinó mediante el uso de un contador submicrónico de partículas con dispersión de rayos láser a un ángulo de 90° que emplea la técnica de DLS (Contador submicrónico de partículas Coulter® N4 Plus, USA). Los datos de la luz dispersada se analizaron mediante un correlacionador digital en el modo de análisis unimodal. Las muestras se diluyeron con agua destilada hasta que la señal de la luz dispersada por las partículas estaba dentro del intervalo de sensibilidad del instrumento. Cada muestra se leyó por triplicado (n=3) para calcular el TPP y la desviación estándar.

8.6.3 Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler (Ψ_z)

De cada uno de los lotes elaborados, se hizo una dilución de 1:5 con agua filtrada en membrana de 0.22 μm . La movilidad electroforética se transformó a Ψ_z aplicando la aproximación de Smoluchowski. Las mediciones se hicieron por triplicado a 25 °C en celdas desechables de capilar doblado en el equipo Zetasizer® ZEN 3600 (Malvern Instruments® Ltd. UK).

8.6.4 Microscopia Electrónica de Barrido

Una vez retirado el exceso de estabilizante de las dispersiones cargadas con GNH_4 mediante centrifugación, se colocó la muestra diluida en un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se recubrió con una película fina de oro (1200 V, 5 mA y 0.15 Torr durante 10 min) y se examinó la superficie con el microscopio electrónico de barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón).

8.6.5 Calorimetría Diferencial de Barrido

Las muestras evaluadas fueron: GNH₄, PLGA 50:50, Pluronic[®] F-68 y PVAL como materias primas, mezcla física GNH₄-Pluronic[®] F-68, mezcla física GNH₄- PLGA 50:50, mezcla física GNH₄-PVAL, lote de NPP vacías y lote de NPP con GNH₄. Todas las muestras se colocaron en un desecador a humedad ambiente. De cada una de las muestras se pesaron entre 3-6 mg y se colocaron en crisoles no herméticos de aluminio. En seguida se sometieron a una rampa de calentamiento de 0 a 250 °C, con una velocidad de 10 °C/min y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. La calibración se realizó con un estándar de Indio con el calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10 TA Instruments, USA).

8.6.6 Metodología para la cuantificación de GNH₄ en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y Eficiencia de encapsulamiento (%)] por HPTLC

Se prepararon lotes con 400 mg de PLGA 50:50 y 15 mg de GNH₄. Se separaron y lavaron las partículas, y luego se liofilizaron. Del liofilizado se pesaron cantidades aproximadas de 20 mg y se adicionaron a 5 ml de acetato de etilo. Se agitaron por 24 h y mediante extracción líquido-líquido con 3 ml de agua destilada por triplicado, se filtraron con membrana de 0.45 µm aforando a un volumen de 10 ml. De este filtrado se aplicaron 50000 nl sobre una placa ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄. Se desarrolló la placa en una fase móvil compuesta de acetato de etilo-metanol-ácido acético-agua (67:8:8:17); las aplicaciones se leyeron a 254 nm en el densitómetro del equipo de HPTLC. El análisis se realizó por triplicado.

Al aplicar las ecuaciones 1 y 2, se calculó el porcentaje de fármaco contenido en las NPP (% de GNH₄ cargado) y la eficiencia de encapsulamiento [E. E. (%)].

$$GNH_4 \text{ cargado}(\%) = \frac{\text{cantidad de } GNH_4 \text{ en liofilizado}}{\text{cantidad de liofilizado}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$E.E.(\%) = \frac{GNH_4 \text{ cargado}(\%)}{\% \text{ inicial de } GNH_4} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

IX. Resultados y análisis

9.1 Solubilidad del AG

La solubilidad de un fármaco es un parámetro fisicoquímico que tiene un papel importante en diversos procesos físicos, biológicos y tecnológicos. Durante las fases de descubrimiento y desarrollo la información de solubilidad es útil en una amplia variedad de necesidades. En las primeras etapas la solubilidad se usa para la caracterización de compuestos y como un parámetro de formulación.

La finalidad de conocer la solubilidad del AG permite caracterizar el producto obtenido así como la selección del método por el cual se elaboraron las NPP. El procedimiento para determinar el valor de la solubilidad fue pesar cantidades conocidas del AG e ir adicionando éstas en el volumen de alcohol etílico bajo agitación magnética hasta observar la saturación del sistema. El valor experimental de solubilidad es de **89.37 ± 3.02 mg/ml**.

Durante la obtención de AG, se generó un gel extremadamente rígido con la disminución del pH en medio acuoso. El comportamiento de gelificación se debe a la actividad superficial de la estructura característica (Figura 17) donde la fracción triterpeno funciona como parte lipofílica y la fracción de ácido glucurónico es la parte hidrofílica. Al estar por encima del valor experimental de concentración micelar crítica (CMC) [**2 x 10⁻⁴ M**] [Segal *et al.*, 1985] la asociación intermicelar y su orientación dan como resultado la eventual formación del gel rígido.

Kondo *et al.* (1986) explican que la formación de este gel se debe a factores relacionados con la estructura química del AG. Los factores esenciales que explican el mecanismo de gelificación son:

1. La configuración cis del AG, donde los anillos D y E de la fracción triterpeno se doblan en el enlace C₁₇-C₁₈.
2. El grupo carboxílico de la fracción triterpeno debe estar libre.
3. Al menos uno de los grupos carboxílicos de la fracción de ácido glucurónico debe estar libre.

La micrografía obtenida por Kondo *et al.* (1986) a partir de una muestra de gel liofilizado de AG muestran una estructura de red regular, donde la molécula en un estado micelar se orienta cíclicamente por la interacción intramolecular entre un grupo carboxílico de la aglicona y otro grupo carboxílico de la fracción de ácido glucurónico.

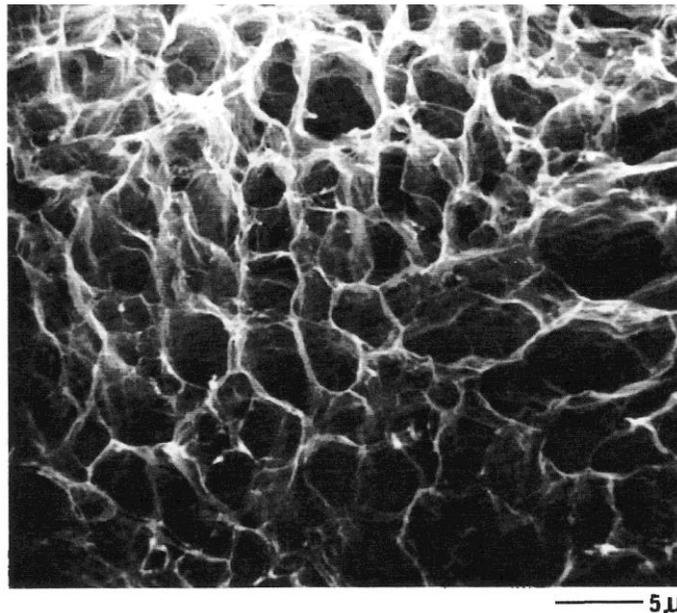


Figura 17. Micrografía electrónica del gel de AG liofilizado. Solución acuosa al 1% (p/v). Tomado de [Kondo *et al.*, 1986].

Kondo *et al.* (1986) proponen un modelo cíclico de la molécula de AG el cual explica la formación del gel tomando en cuenta los factores estructurales mencionados en la página anterior y que se ilustra en la Figura 18.

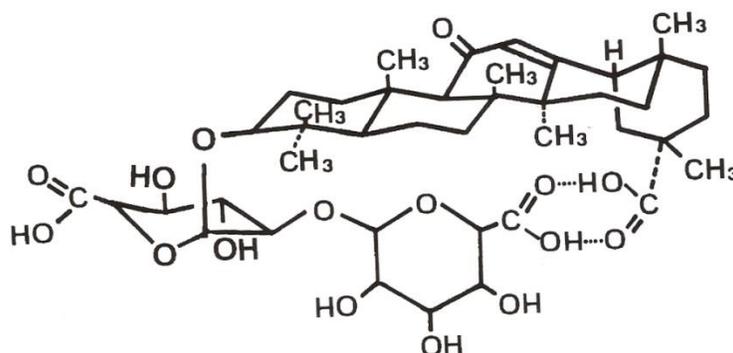


Figura 18. Modelo cíclico de AG en solución acuosa. Tomado de [Kondo *et al.*, 1986].

9.2 Curva de calibración para la cuantificación de AG mediante HPTLC

Existen reportes previos donde la cuantificación de AG por HPTLC se ha llevado a cabo en los extractos de *Glycyrrhiza glabra* y en formulaciones que se encuentran a la venta en el mercado [Singh *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2011]. Debido a las ventajas que posee esta técnica y a la eficiente cuantificación del AG, en este trabajo se decidió desarrollar un método que permitiera la adecuada cuantificación del fármaco modelo hidrofílico en las dispersiones de NPP obtenidas.

Los resultados de altura correspondientes a la determinación de la linealidad del sistema analítico por HPTLC para cuantificar AG se muestran en el Anexo 3. La Figura 19 muestra la gráfica correspondiente a la respuesta con la que se evaluó la linealidad.

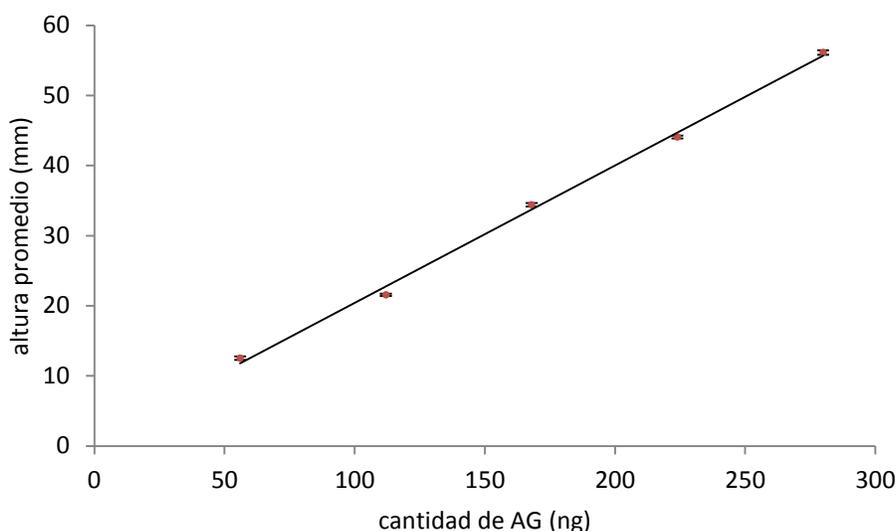


Figura 19. Curva de regresión de cantidad de AG contra el promedio de la altura;

$$y = 0.1959 + 0.83x, r^2 = 0.9975.$$

De acuerdo a los resultados del Anexo 3, se observa que el coeficiente de determinación de la curva se encuentra por arriba de 0.98. Estadísticamente, este valor de r^2 por arriba de 0.98 indica que existe una relación lineal altamente significativa entre las cantidades aplicadas de AG y su respectiva altura, teniendo así que el 99.75% de la variación de la altura está explicada por los cambios en la cantidad de fármaco.

Para demostrar si existe una relación lineal entre las variables estudiadas (cantidad aplicada y altura) se realizó un análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en el Anexo 3.2, ($F_{\text{cal}} = 2.78$ y $F_{\text{crítica}} (\alpha = 0.05/2; 2/12) = 5.10$) y se encontró que hay evidencia estadística con un nivel de significancia de 0.05 que la variación de la altura se explica por una variación en la cantidad aplicada de AG.

También se evaluó si el valor de la ordenada al origen era significativamente diferente de cero, con un nivel de confianza de 0.05 (Anexo 3).

Las curvas de calibración densitométricas relacionadas con una señal de absorción (altura o área de pico) y cantidad (concentración o peso) de estándares sobre la placa, generalmente son no lineales y/o no pasan por el origen cuando se emplean altas concentraciones [Sherma, 1997]. Con los resultados del Anexo 3.3, se concluye que existe evidencia estadística de que la ordenada al origen de la recta de regresión es igual a cero, empleando bajas cantidades ya que los límites de sensibilidad de la HPTLC son típicamente en nanogramos o picogramos.

9.3 Optimización del método desplazamiento de solvente para obtener NPP

9.3.1 Evaluación del TPP

Las propiedades de las NPP tienen que ser optimizadas dependiendo de la vía de administración y cuya finalidad es conseguir el tamaño de partícula, el Ψ_z y la eficiencia de encapsulamiento de interés por lo que el método de preparación juega un papel vital en su obtención. De las opciones para preparar NPP a partir de polímeros preformados, la elección del método desplazamiento de solvente se debe a la solubilidad del AG en alcohol etílico. Sabemos que la capacidad de liberación de las NPP está influenciada por el tamaño de partícula ya que éste determina su interacción con las membranas celulares y su penetración a través de las barreras fisiológicas, por lo tanto el tamaño requerido para el cruce de diferentes barreras biológicas dependerá de la morfofisiología del sitio de acción.

El evaluar la velocidad de agitación en la preparación de las dispersiones de NPP derivó de la necesidad de encontrar el tamaño de partícula adecuado para llegar al sitio de acción al cual estará destinado este sistema nanoacarreador.

El método desplazamiento de solvente es un proceso de manufactura en un solo paso, conveniente, reproducible, rápido y económico para la preparación de NPP en un intervalo de tamaño de partícula de 50-300 nm aproximadamente. Los parámetros más importantes que determinan el éxito del método y afectan a las propiedades fisicoquímicas de las NPP son la miscibilidad del solvente con el agua y la naturaleza de las interacciones polímero/solvente/agua [Beck-Broichsitter et al., 2010].

En la Figura 20 se puede observar los TPP que se obtuvieron a diferentes velocidades en los diferentes lotes, estos resultados se deben a parámetros importantes como lo es la velocidad de difusión del solvente, el proceso de agitación de la fase orgánica (conteniendo el polímero) con la fase acuosa, la velocidad en que se inyecta la fase orgánica en la fase acuosa y propiedades del polímero como lo son el peso molecular y la viscosidad.

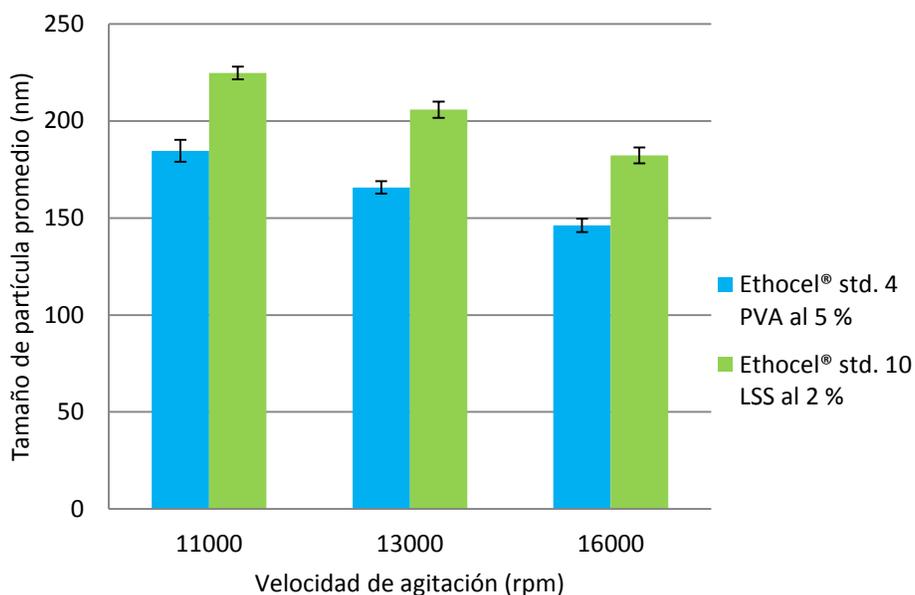


Figura 20. TPP de las NPP de Ethocel® obtenidas a diferentes velocidades de agitación.

La manera preferida de preparar NPP por éste método consiste en un rápida inyección de la fase orgánica a la fase acuosa [Fessi *et al.*, 1989; Molpeceres *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 2000; Beck-Broichsitter *et al.*, 2010]. Tomando en consideración este paso en la obtención de NPP de Ethocel[®] la inyección de la fase orgánica se realizó con un flujo de 20 ml/min y se observó que a mayor velocidad de agitación se permitió la reducción significativamente del tamaño de partícula ($p < 0.05$) en los lotes de NPP de Ethocel[®] std. 4 y Ethocel[®] std. 10 (Anexo 3).

Los TPP obtenidos en los lotes con Ethocel[®] std. 4 (184.6 ± 5.7 , 165.7 ± 3.2 y 146.1 ± 3.4) comparados con los lotes de Ethocel[®] std. 10 (224.7 ± 3.2 , 205.8 ± 4.2 y 182.2 ± 4.1) a las mismas velocidades presentan una variación notable, encontrando que la inyección de soluciones de polímero con un incremento en la viscosidad da como resultado NPP más grandes. Esto se debe al grado de sustitución de grupos etoxi entre los dos tipos de polímero, lo cual influye directamente en su peso molecular y en la viscosidad de la fase orgánica. Cuanto mayor sea la viscosidad de la solución del polímero, la velocidad de difusión del solvente será menor y las NPP formadas a partir del flujo turbulento del solvente serán más grandes [Beck-Broichsitter *et al.*, 2010].

En el método desplazamiento de solvente, el agente estabilizante evita la agregación durante la formación de las NPP sin afectar significativamente la formación de las gotas nanométricas, esto es debido a los altos coeficientes de difusión del solvente que garantizan la eficiente interacción entre la fase orgánica y la fase acuosa cuando están en contacto [Mora-Huertas *et al.*, 2011]. Aunque un agente estabilizante no es necesario para garantizar la formación de la nanopartícula por este método, el tamaño de partícula se ve influenciado por la naturaleza de éste.

Mora-Huertas *et al.* (2011) con base a los resultados obtenidos por este método sugieren que un agente estabilizante con efecto electro-estérico es factible para la obtención de nanopartículas con tamaños más pequeños en comparación con un agente estabilizante con efecto estérico, ya que éste podría retrasar la difusión del solvente favoreciendo el crecimiento de éstas. Bajo las condiciones de trabajo reportadas en la Figura 20 los agentes estabilizantes no tuvieron influencia sobre el TPP de cada lote ya que el peso molecular y la viscosidad de las soluciones de polímero determinaron los TPP como se ha explicado en la página anterior, aunque el uso del agente estabilizante es muy recomendable ya que previene la formación de agregados y contribuye a la estabilidad del sistema.

9.3.2 Evaluación del Ψ_z

Este parámetro es un indicativo de la estabilidad de las partículas en dispersión. Actualmente se acepta que un valor de Ψ_z mayor a $|30|$ mV (mayor a $|60|$ mV, sería lo ideal [Riddick, 1968]) nos habla de una formulación adecuada con una completa estabilización electroestática, en la que difícilmente las partículas formarán agregados, en el caso de las NPP la gran área superficial que poseen genera una alta energía superficial que es termodinámicamente desfavorable por lo que tienden a la aglomeración para minimizar esta energía, provocando una dosificación inconsistente cuando son administradas [Wu *et al.*, 2011].

Dependiendo de la naturaleza del agente estabilizante utilizado en la formulación de las NPP existen dos mecanismos principales a través de los cuales pueden ser estabilizadas: la repulsión electrostática y la estabilización estérica. Estos dos mecanismos se pueden lograr mediante el empleo de agentes estabilizantes iónicos y no iónicos respectivamente, en el caso de la estabilización por la repulsión electrostática las fuerzas repulsivas son originadas por la superposición

de la doble capa eléctrica que rodea a las NPP en el medio evitando así su aglomeración. En el caso de la estabilización estérica los estabilizantes no iónicos son adsorbidos sobre las NPP, en donde la parte hidrofóbica interactúa con la partícula y la parte hidrofílica se orienta hacia el medio generando una barrera estérica la cual minimiza las interacciones entre partículas y evita la aglomeración. En la Figura 21 se observan los resultados correspondientes al Ψ_z de las dispersiones poliméricas y de acuerdo con éstos, existe una diferencia muy marcada conforme al tipo de estabilizante empleado en la elaboración de las NPP.

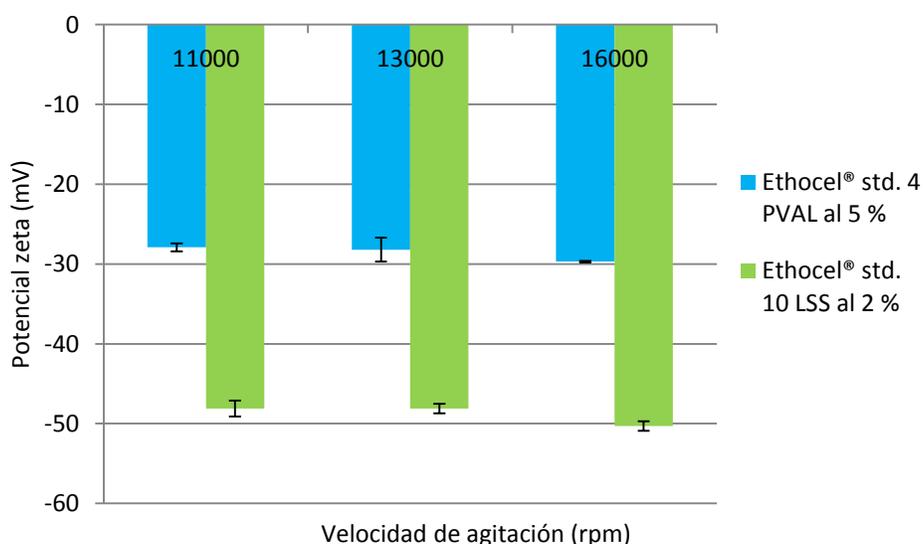


Figura 21. Ψ_z de los lotes de NPP de Ethocel®.

Los lotes de NPP elaborados con Ethocel® std. 4 empleando al PVAL como agente estabilizante poseen valores de Ψ_z menores de -30 mV lo cual sugiere, que las dispersiones obtenidas se encuentran en el umbral de dispersión, mientras que los lotes de NPP de Ethocel® std. 10 donde se empleó al LSS como agente estabilizante adquirieron valores de Ψ_z cercanos a los -50 mV, obteniendo dispersiones que poseen una buena estabilidad. Se sabe que los agentes estabilizantes no iónicos tales como el PVAL y poloxameros son adsorbidos sobre las partículas, estabilizando la interfaz polímero-agua durante la preparación, y

que la carga así como la distribución del potencial de la doble capa eléctrica que rodea a la partícula se ve afectada por la presencia de esta nueva capa adicional disminuyendo el Ψ_z debido al cambio en el plano de deslizamiento [Mora-Huertas *et al.*, 2011].

En cuanto al empleo del LSS (estabilizante de carácter iónico) se puede suponer que las moléculas de éste sufren interacciones de la fracción hidrofóbica con la matriz de la nanopartícula y la fracción hidrofílica, que es orientada hacia el medio acuoso, enmascarando al polímero con cargas negativas aumentando el comportamiento negativo de la partícula al igual que su plano de deslizamiento.

9.4 Preparación de NPP de Ethocel[®] cargadas con AG por el método desplazamiento de solvente

La incorporación de AG en un sistema nanoacarreador tiene la finalidad de obtener una formulación innovadora para administrar este principio activo por la vía pulmonar y asegurar su llegada al sitio de acción. La deposición de NPP en el tracto respiratorio está determinada principalmente por el desplazamiento difusional debido al movimiento térmico de las moléculas de aire que interactúan con éstas al inhalar y exhalar [Schurch *et al.*, 1990; Geiser *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008]. Dependiendo del tamaño de partícula, forma y parámetros de ventilación, la deposición se produce en todas las regiones del pulmón: vías respiratorias y los alvéolos (Tabla 9). Con la disminución del tamaño de partícula por debajo de los 500 nm, la deposición aumenta en todas las regiones del pulmón debido a que incrementa la movilidad difusional. Conforme disminuye el tamaño, las NPP penetrarán en regiones más profundas en los pulmones [Byron, 1986; Oberdorster, 2002; Oberdorster *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008].

Tabla 9. Deposición de partículas en los pulmones según su tamaño.

Sitio	Tamaño de partícula (μm)
Vías respiratorias superiores	5-9 (inhalación lenta) 3-6 (inhalación rápida)
Vías respiratorias inferiores	1-5
Bronquios	1-3
Alvéolos	≤ 0.5

Después de analizar los resultados de la optimización del método y ver que todos los sistemas son factibles para la incorporación de AG, seleccionamos la velocidad de agitación de 11000 rpm ya que implica un menor gasto de energía para elaborar un lote de NPP de Ethocel[®] std. 4 cargadas con AG por triplicado y otro lote de NPP de Ethocel[®] std. 10 cargadas con AG por triplicado. Cada lote se elaboró con sus respectivas condiciones y una vez obtenidas las dispersiones poliméricas estas fueron caracterizadas en cuanto a tamaño de partícula para obtener el TPP, Ψ_z , MEB y DSC. Los datos de TPP muestran que las NPP producidas poseen un tamaño submicrónico y que existe un ligero aumento en el tamaño de partícula con respecto a los lotes sin carga (Tabla 10), lo cual es muy favorable ya que estas siguen siendo candidatas para la administración por vía pulmonar. En cuanto los valores de Ψ_z también sufrieron un ligero incremento, este aumento puede deberse a que el AG tiene características superficiales, lo que hace que se oriente preferentemente hacia la interfase sólido-líquido, originando un cambio en la carga neta de las NPP.

Tabla 10. Resultados de la caracterización de los lotes de NPP cargados con AG.

Lotes	Cantidad de AG (mg)	TPP (nm)	Ψ_z (mV)
NPP de Ethocel [®] std. 4	---	184.6 ± 5.7	-27.9 ± 0.5
	30	192.2 ± 3.4	-29.1 ± 1.1
NPP de Ethocel [®] std. 10	----	224.7 ± 3.2	-48.1 ± 1.0
	30	252.6 ± 5.3	-51.6 ± 1.5

El uso de la MEB nos permite hacer evidente la existencia de partículas de tamaño submicrónico y a la vez nos da una idea de la morfología de las mismas, por lo que es un excelente complemento de los resultados obtenidos por otras técnicas. En la Figura 22 se muestran las micrografías de los lotes de NPP cargados con AG, como se puede observar las partículas presentan una forma esférica con un tamaño nanométrico corroborando los resultados obtenidos mediante DLS.

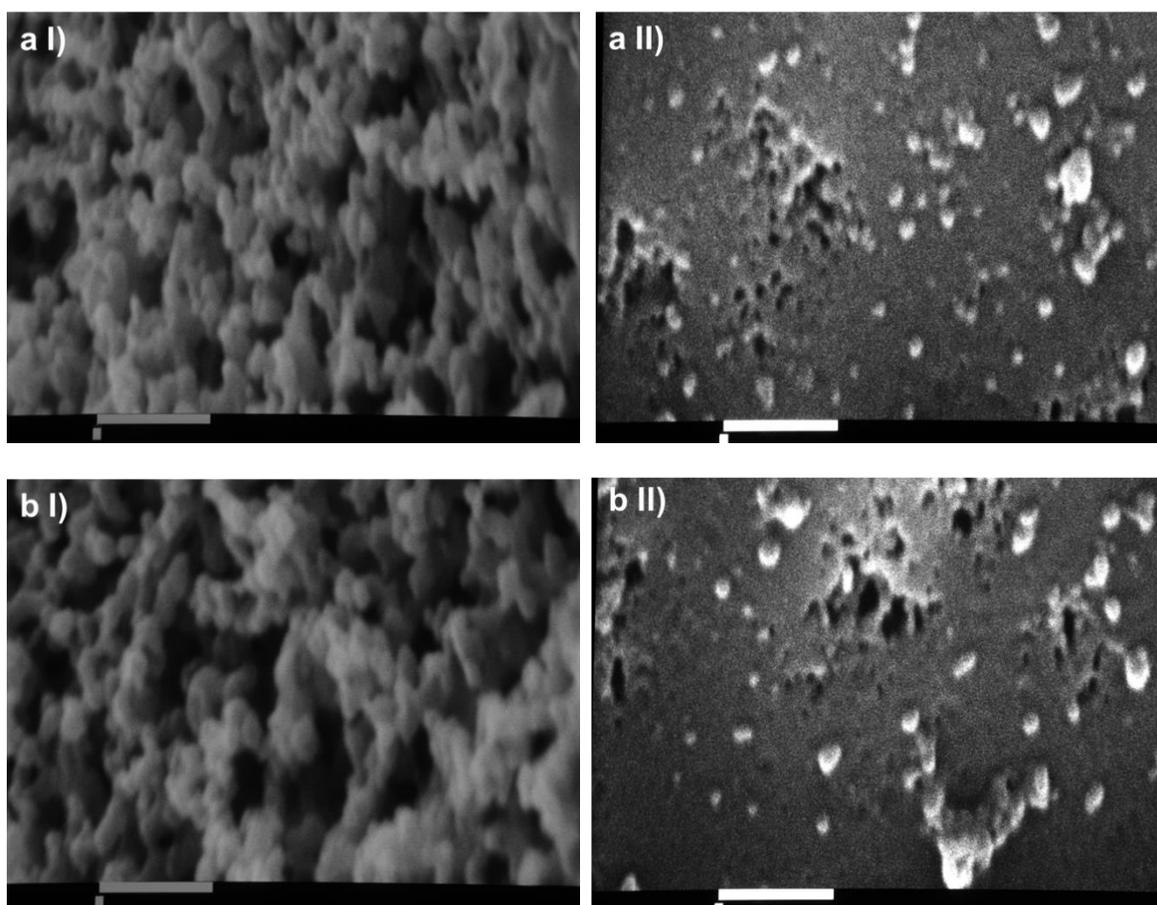


Figura 22. Micrografías de: a I) NPP de Ethocel[®] std. 4 cargadas con AG 10000x, a II) NPP de Ethocel[®] std. 4 cargadas con AG 20000x, b I) NPP de Ethocel[®] std. 10 cargadas con AG 10000x, b II) NPP de Ethocel[®] std. 10 cargadas con AG 20000x.

Se realizaron estudios de DSC con la finalidad de investigar el estado físico del fármaco en las NPP. Para el caso del AG se presentaron dos eventos térmicos importantes: el primero es una deshidratación a los 126.78 °C y el segundo a los

206.13 °C, el cual es atribuido al punto de fusión del principio activo, aunque también se ha reportado como la descomposición de la fracción de ácido glucurónico por el tratamiento térmico convirtiéndose a ácido glicirretínico [Sui *et al.*, 2012; Kondo *et al.*, 1984]. Para el caso del Ethocel[®] std. 4 se encontró: movilidad molecular a los 62.68 °C [Hyppola *et al.*, 1996], una temperatura de transición vítrea que se encuentra a 138.48 °C y un punto de fusión a los 173.68 °C. En este mismo termograma se observa un evento endo/exotérmico entre los 170-190 °C el cual es reportado como una degradación oxidativa del polímero [Lai *et al.*, 2010]. El PVAL muestra tres endotermas: la primera a los 45.12 °C correspondiente a la temperatura de transición vítrea, la segunda en los 103.42 °C que corresponde a la deshidratación y la última a los 192.53 °C perteneciente a su punto de fusión (Figura 23).

En esta misma figura se muestran los termogramas de las mezclas físicas de AG con cada uno de los componentes (Ethocel[®] std. 4 y PVAL) en proporciones equivalentes a la formulación, NPP sin carga de AG y NPP con carga de AG. En el caso de la mezcla física con el Ethocel[®] std. 4 la endoterma perteneciente al punto de fusión del AG no sufrió ningún cambio, pero en el caso de la mezcla física AG-PVAL solo se observa el evento térmico correspondiente al punto de fusión del estabilizante. El pico del AG desaparece totalmente en la curva calorimétrica de las NPP cargadas, evidenciando la ausencia de fármaco cristalino en las muestras o una baja encapsulación del fármaco en las NPP.

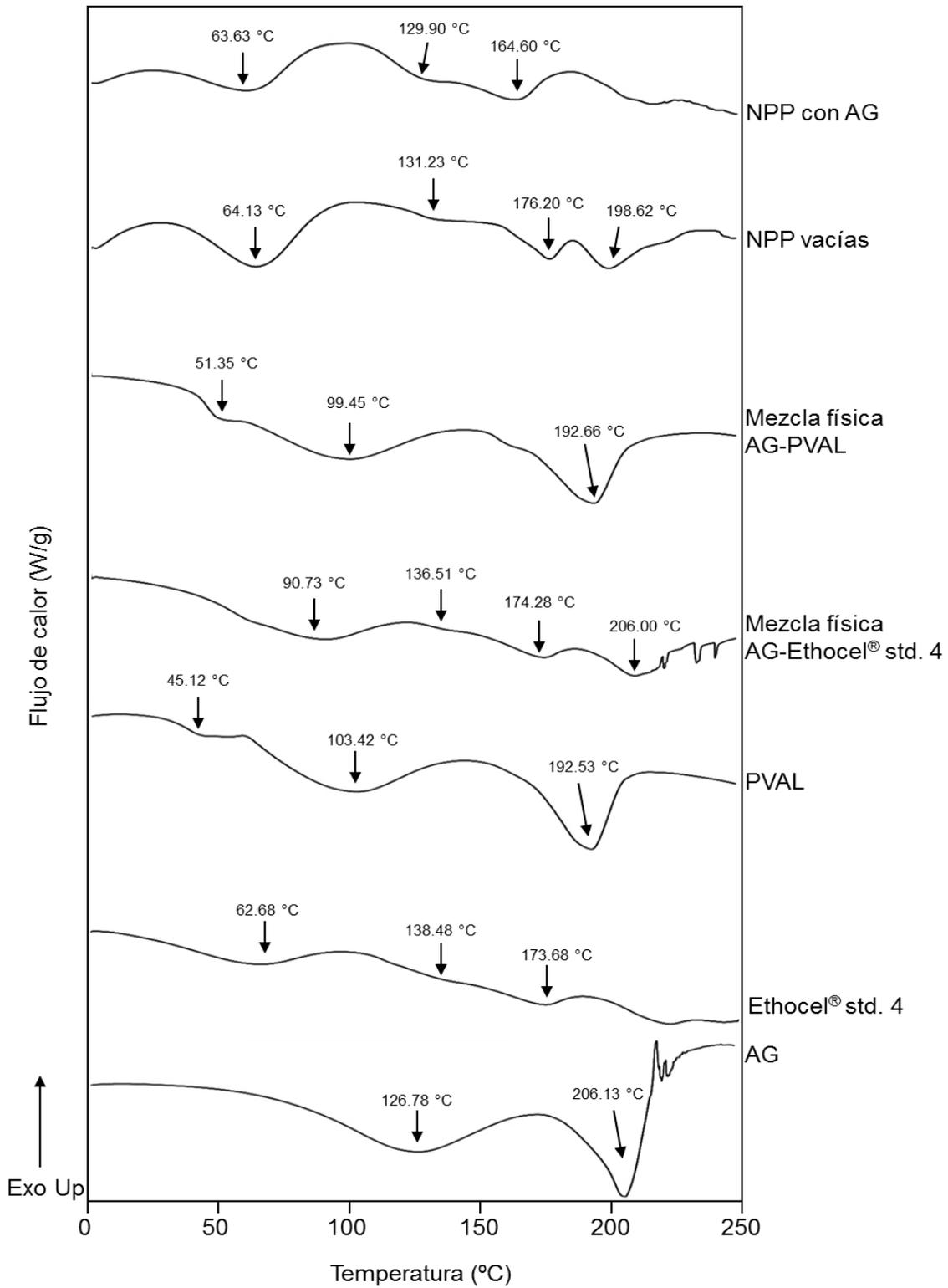


Figura 23. Termograma de las materias primas (AG, Ethocel® std. 4 y PVAL), mezclas físicas de AG-Ethocel® std. 4 y AG-PVAL (proporciones equivalentes a la formulación) NPP vacías y NPP con AG.

En la Figura 24 se muestra el mismo comportamiento calorimétrico para el AG. Para el caso del Ethocel[®] std. 10 la temperatura de transición vítrea se encuentra a 134.07 °C seguido de su punto de fusión a 179.82 °C. Mientras que el LSS muestra diferentes eventos relacionados con impurezas y al agua adsorbida, siendo su punto de fusión a los 195.12 °C el más importante con su posterior degradación.

En esta misma figura se muestran también los termogramas de las mezclas físicas de AG con cada uno de los componentes (Ethocel[®] std. 10 y LSS) en proporciones equivalentes a la formulación, NPP sin carga de AG y NPP con carga de AG. En el caso de la mezcla física con el Ethocel[®] std. 10 existe una endoterma a los 86.57 °C, temperatura correspondiente a la movilidad molecular del polímero al interaccionar con el AG. En el caso de la mezcla física AG-LSS se observa el punto de fusión del estabilizante a menor temperatura por la interacción con el fármaco (178.77°C) finalizando con la degradación de los componentes de esta mezcla. Se cree que la etilcelulosa es un material altamente o completamente amorfo y sus eventos térmicos parecen ser dependientes del tipo que se emplee en la formulación [Sakellariou *et al.*, 1985; Lai *et al.*, 2010]. En los polímeros, los procesos exotérmicos se asocian generalmente con cualquiera de los procesos de cristalización o alteración química (entrecruzamiento o degradación) y tomando en cuenta que la etilcelulosa es propensa a sufrir degradación oxidativa a altas temperaturas, los termogramas de NPP sin carga y NPP cargadas presentan este comportamiento a los 208.72 °C y 207.54 °C respectivamente, evidenciando que el encapsulamiento del fármaco hidrofílico modelo es muy bajo.

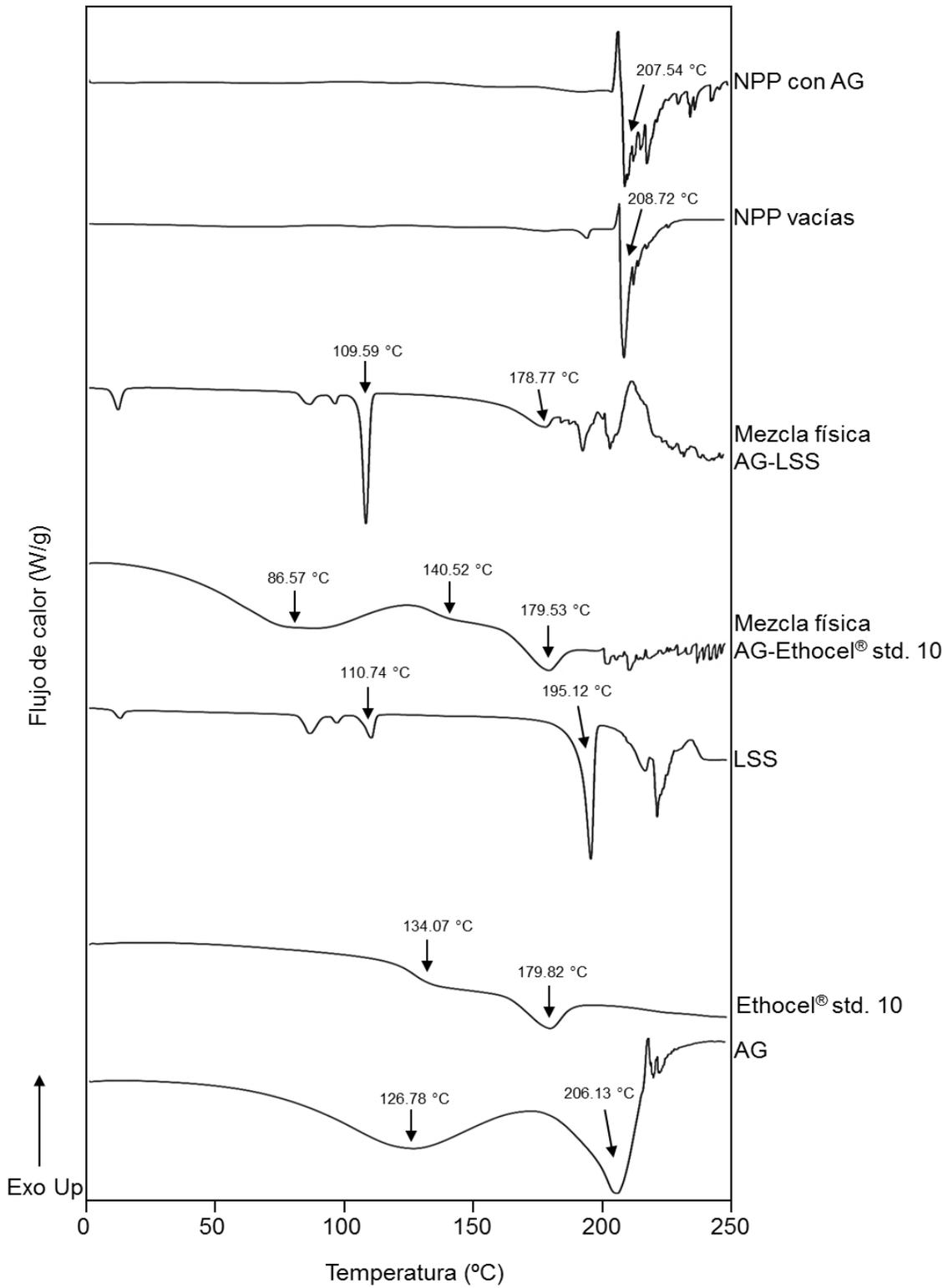


Figura 24. Termograma de las materias primas (AG, Ethocel® std. 10 y LSS), mezclas físicas de AG-Ethocel® std. 10 y AG-LSS (proporciones equivalentes a la formulación) NPP vacías y NPP con AG.

9.4.1 Cuantificación de AG en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y E. E. (%)] por HPTLC

La máxima carga de fármaco y una elevada E. E. en un sistema nanoacarreador reducirán la cantidad de acarreador requerida para la administración del compuesto activo en el sitio de acción, así como el desperdicio del fármaco durante la elaboración de los sistemas. El método desplazamiento de solvente sufre la desventaja de una pobre eficiencia de incorporación de fármacos solubles en agua debido a una migración rápida y por lo tanto, la pérdida de fármaco en la fase acuosa [Govender *et al.*, 1999].

El procedimiento inicial implicó la producción de NPP con AG, enfocándonos en disminuir la solubilidad del fármaco en la fase acuosa ya que la forma ácida es menos soluble en agua (1 mg/ml) que su sal correspondiente (5 mg/ml). Probablemente la permanencia del AG en el alcohol etílico (Anexo 1) disminuiría la fuga del fármaco hacia la fase acuosa, mejorando su asociación con la matriz hidrofóbica de etilcelulosa obteniendo la mayor carga de fármaco y E.E. posibles.

La selección de una formulación en este estudio se basó en aquella que proporciona una buena morfología, tamaños requeridos de partícula, estabilidad, una carga de fármaco y E. E. óptimos. La Figura 25 ilustra los cromatogramas obtenidos a partir de las dos formulaciones seleccionadas para la encapsulación de AG, en estos claramente se observa que la cantidad de AG es relativamente mínima ya que no es detectada por el sistema estando por debajo del límite de detección (LD) (Anexo 3). La mala eficiencia de incorporación del AG en las NPP de Ethocel[®] bajo las condiciones de esta investigación se debe al pH de la fase acuosa que influye en la ionización del fármaco y por lo tanto en su solubilidad [Govender *et al.*, 1999], por consiguiente era probable que la disminución del pH

de la fase acuosa redujera la solubilidad del AG lo que podría mejorar la captura del fármaco en las NPP.

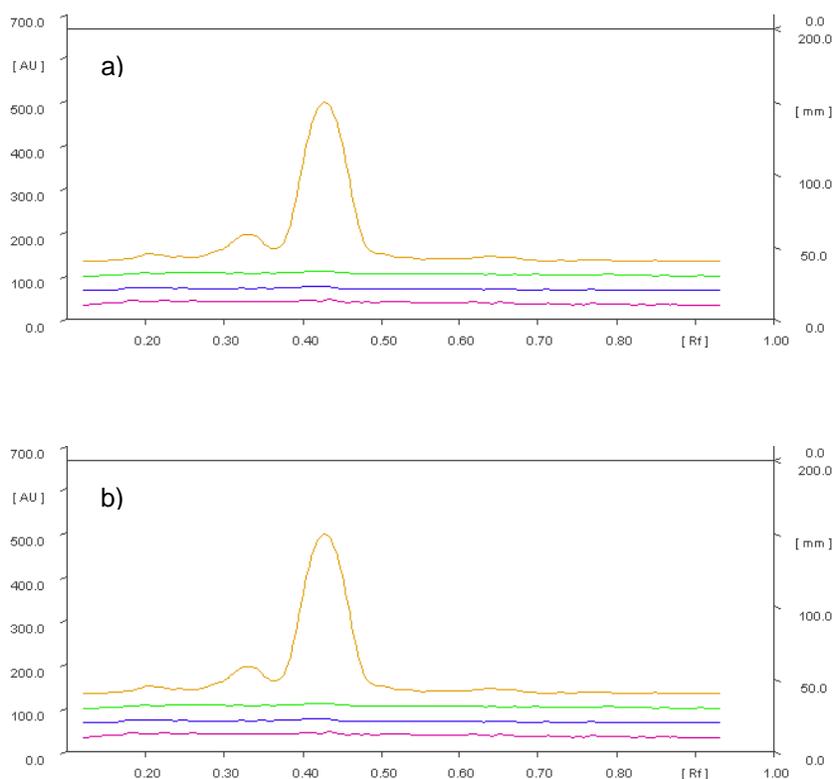


Figura 25. Cromatogramas: a) NPP de Ethocel[®] std 4 cargadas con AG y b) NPP de Ethocel[®] std. 10 cargadas con AG. [(—) lote 1. (—) lote 2. (—) lote 3. (—) AG].

Sun *et al.* (2007) en su proceso de extracción de AG de la raíz de regaliz explican el comportamiento de esta molécula bajo diferentes pH's. Bajo condiciones extremadamente ácidas ($\text{pH} < 3$) el AG existe como forma molecular, mientras que la forma dissociada del AG predomina en $\text{pH} > 6$. A valores altos de pH (por encima de sus pK_a 's) el AG es desprotonado y su comportamiento es como el de una molécula hidrofílica que es fácilmente solubilizada en agua, lo que sugiere que la forma molecular es más hidrofóbica que la forma dissociada.

El inconveniente de emplear un medio acuoso con un $\text{pH} < 3$ para la preparación de NPP cargadas con el fármaco hidrofílico modelo es la promoción de la degradación del polímero en condiciones extremadamente ácidas indicado por Bodmeier y Siepmann (1999). Debido a la mala incorporación del AG en las NPP de Ethocel[®] bajo las condiciones de esta investigación, éstas indican claramente que son necesarios otros enfoques de formulación con el fin de mejorar la captura del fármaco en las NPP.

9.5 Optimización del método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) para obtener NPP

Varios métodos han sido propuestos para la encapsulación de fármacos hidrofílicos, siendo el método doble emulsión el más popular. Sin embargo, las investigaciones no han reportado la encapsulación de AG en nanoesferas de PLGA, la única referencia que se encuentra sobre este tema describe la encapsulación de AG en nanoesferas de chitosán mediante el método gelificación iónica [Wu *et al.*, 2005]. La desventaja de este sistema de liberación podría ser la vía de administración al cual está dirigido. Para la asociación del fármaco modelo hidrofílico con las NPP de PLGA se seleccionó al GNH_4 (sal correspondiente del AG) por su solubilidad en agua, la cual es mayor en comparación con el AG. Después elegimos ajustar el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) reportado por [Blanco y Alonso, 1997] para la preparación de nanoesferas. Se modificó del procedimiento original el empleo de un homogeneizador (Ultraturrax[®] T-25 Basic, IKA[®]) para reducir el tamaño de los glóbulos en la emulsión primaria y, por consiguiente, la obtención de partículas submicrónicas.

La optimización del tiempo de agitación a la velocidad seleccionada fue necesaria para obtener un tamaño de partícula requerido para nuestros fines (≤ 500 nm). Seleccionamos el tiempo de agitación de 5 min ya que el tamaño de partícula

obtenido se acerca al reportado por Blanco y Alonso (1997) (Figura 26). Una vez establecidas las condiciones óptimas del proceso se hicieron un lote sin fármaco por triplicado y un lote cargado con GNH_4 por triplicado para ser caracterizados en términos de tamaño de partícula para obtener TPP, Ψ_z , MEB y DSC.

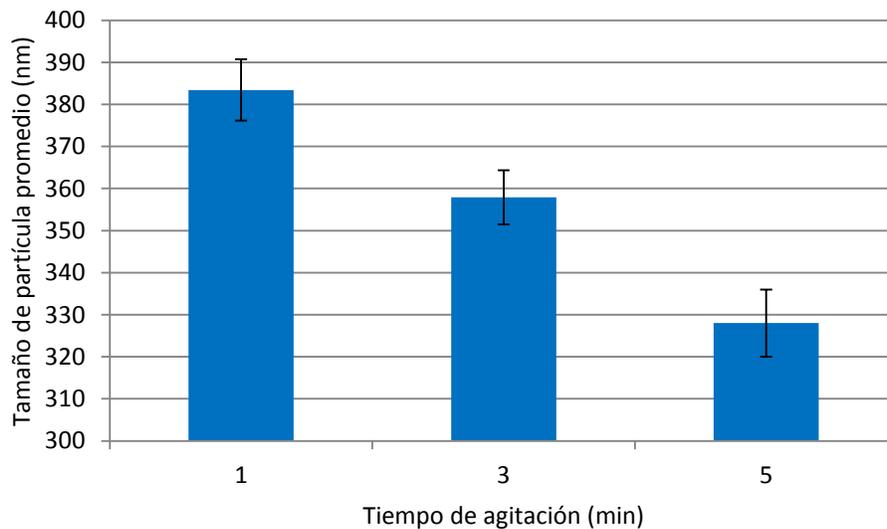


Figura 26. Tamaño de partícula de la (w_1/o) obtenido a diferentes tiempos.

9.6 Preparación de NPP de PLGA por el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$)

9.6.1 Determinación del TPP

La preparación de NPP biodegradables que contienen agentes activos solubles en agua ha recibido mucha atención por sus numerosas ventajas en comparación con formas de dosificación convencionales, incluyendo una eficacia mejorada, toxicidad reducida, un mejor cumplimiento en el tratamiento y la conveniencia para el paciente [J. L. Cleland, 1997; Meng *et al.*, 2003]. Todas estas ventajas están íntimamente relacionadas con las características fisicoquímicas de las NPP las

cuales a su vez dependen de los componentes de la matriz así como el método seleccionado para su elaboración.

El proceso típico del método doble emulsión consiste en cuatro pasos: 1) emulsificación primaria, 2) re-emulsificación, 3) solidificación, y por último, 4) separación-purificación. Cuando una doble emulsión ($w_1/o/w_2$) con una fase orgánica compuesta de polímero y acetato de etilo es directamente vertida en una gran cantidad de solución acuosa externa la rápida difusión de acetato de etilo de los glóbulos de aceite hacia esta fase provocará una aglutinación y coagulación de las mismas, obteniendo como resultado algunos aglomerados de polímero en la suspensión resultante [H. Groothuis *et al.*, 1960; G. V. Jeffreys *et al.*, 1971; Meng *et al.*, 2003]. Por lo tanto, para preparar con éxito NPP sin la formación de aglomerados de polímero se necesita en primer lugar el empleo de un estabilizante en la emulsificación primaria ya que reduce este efecto, desempeñándose como dispersador de los glóbulos de la emulsión y previniendo la coagulación y precipitación en el sistema; y en segundo lugar la doble emulsión ($w_1/o/w_2$) debe ser parcialmente solidificada mediante la adición de una pequeña cantidad de solución acuosa externa para extraer lentamente el acetato de etilo de la fase orgánica, y entonces las protonanopartículas son completamente solidificadas mediante la adición de exceso de solución acuosa eliminando al acetato de etilo residual de las NPP semisólidas [Meng *et al.*, 2003].

El TPP de las NPP sin fármaco y con fármaco son de 353.9 ± 4.7 nm y 371.9 ± 8.1 nm respectivamente y se muestra en la Figura 27. Los valores de índice de polidispersión fueron inferiores a 0.5, indicando que la distribución de tamaños de partícula es estrecha y las formulaciones son monodispersas. Sin duda el volumen de la fase interna, la agitación y el exceso de solución acuosa rigen la tasa de eliminación del acetato de etilo limitando eficazmente la coagulación de los

glóbulos de aceite transformándolas en NPP sin aglomerados en la suspensión resultante. También se observó un incremento en el tamaño al incorporar al GNH_4 .

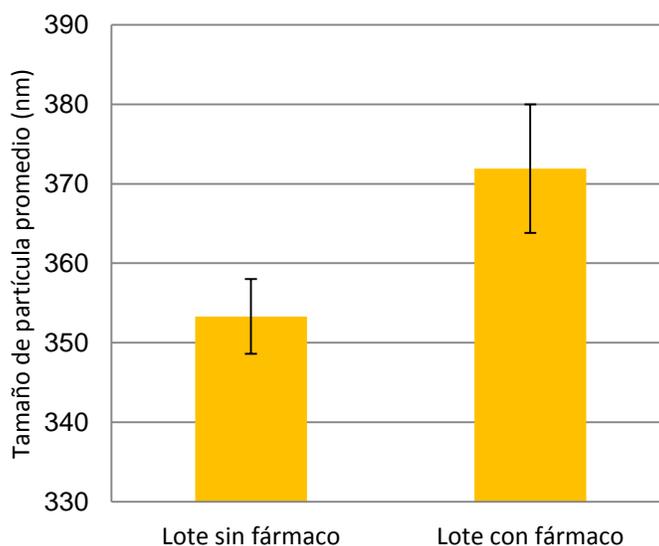


Figura 27. TPP de las NPP de PLGA.

9.6.2 Determinación del Ψ_z

En la Figura 28 se muestran los resultados del Ψ_z para los lotes sin fármaco y con fármaco, en los casos los lotes sin carga de GNH_4 la media se encuentra en -25.2 mV mientras que los lotes con carga de GNH_4 la media se encuentra en -30 mV. Ambas formulaciones debido al tipo de copolímero seleccionado tiene al final de los grupos carboxílicos una esterificación y por lo tanto, no son susceptibles a la ionización, además es importante tener en cuenta que el tipo de estabilización empleada en estos casos se lleva a cabo mediante efecto estérico, entonces la regla general que dice que valores mayores a $|30|$ mV indican una dispersión estable, no puede aplicarse estrictamente porque la adsorción de los estabilizantes estéricos disminuirá el Ψ_z debido a un cambio en el plano de

deslizamiento de la partícula. El incremento del Ψ_z al incorporar GNH_4 confirma que existe una orientación de sus moléculas hacia la interfase sólido-líquido de las NPP debido a sus características superficiales. La fracción de ácido glucurónico, la cual se encuentra en contacto con la fase continua del sistema coloidal, posee grupos carboxílicos susceptibles a la ionización, siendo éstos los responsables de modificar las propiedades de superficie de las NPP con fármaco y de posicionarlas en la zona de dispersión estable a pesar del tipo de estabilización.

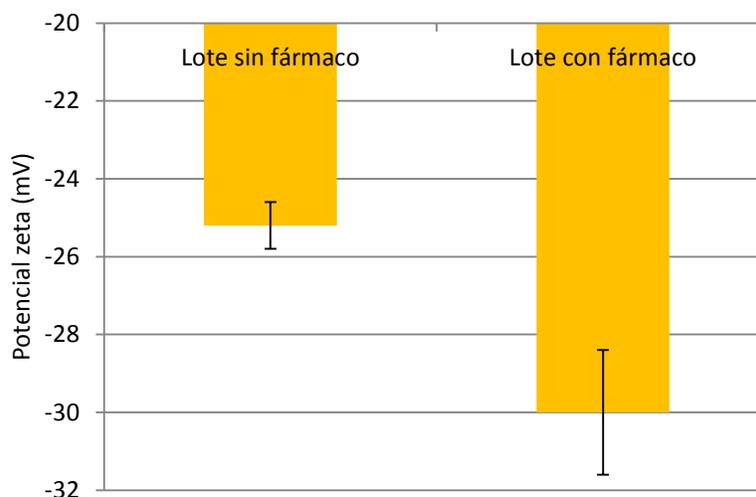


Figura 28. Ψ_z de los lotes de NPP de PLGA.

9.6.3 Microscopia Electrónica de Barrido

El uso de la MEB nos permite hacer evidente la existencia de partículas de tamaño submicrónico y a la vez nos da una idea de la morfología de las mismas, por lo que es un excelente complemento de los resultados obtenidos por otras técnicas. En la Figura 29 se muestran las micrografías de los lotes sin carga y de los lotes cargados con GNH_4 , como se puede observar las partículas presentan una forma

esférica con un tamaño nanométrico respectivamente corroborando los resultados obtenidos mediante DLS.

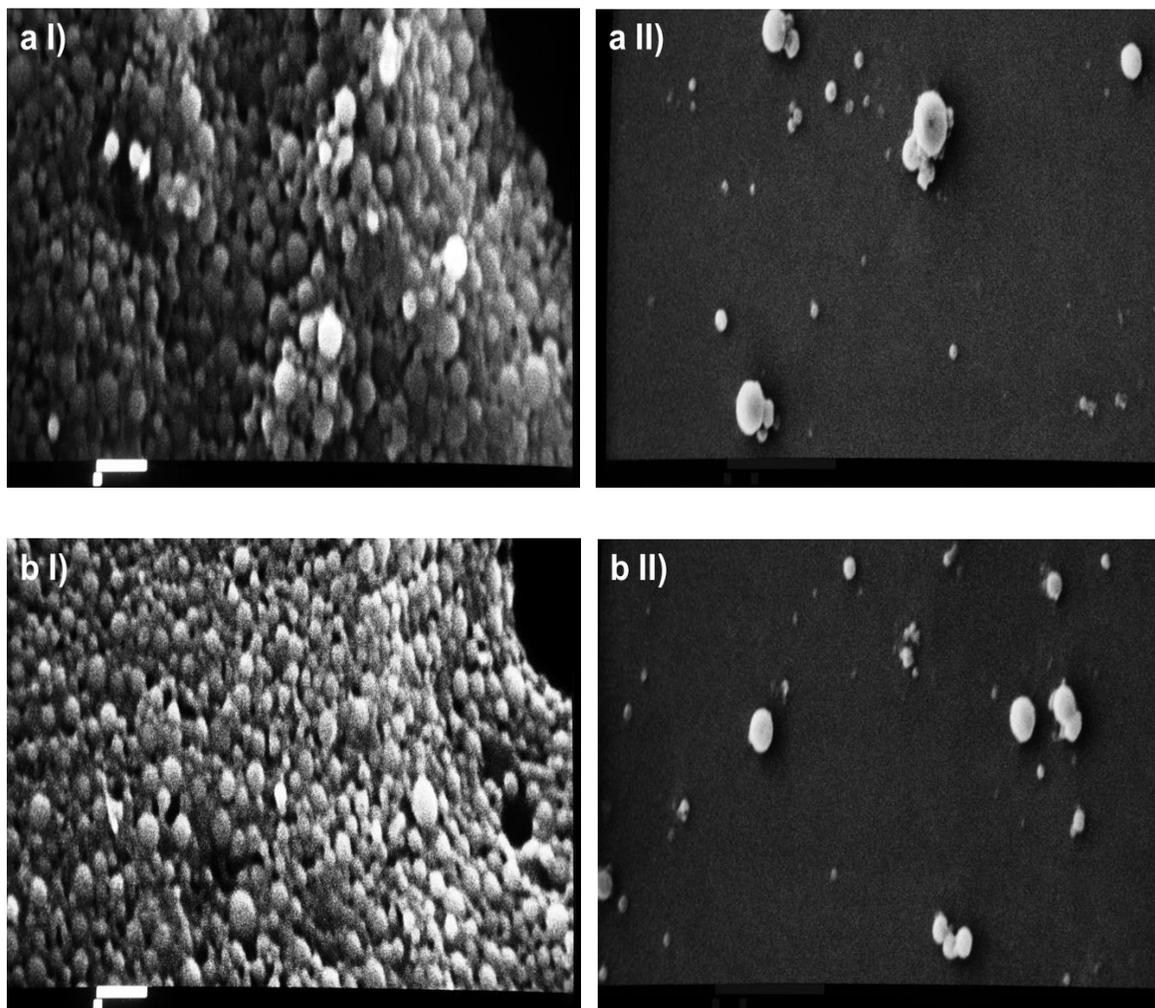


Figura 29. Micrografías de: a I) NPP de PLGA sin carga 10000x, a II) NPP de PLGA sin carga 20000x, b I) NPP de PLGA cargadas con GNH_4 10000x y b II) NPP de PLGA cargadas con GNH_4 20000x.

9.6.4 Evaluaciones mediante DSC

La finalidad de los estudios de DSC es la investigación del estado físico del fármaco en las NPP. Diferentes combinaciones de fármaco/polímero pueden coexistir en los nanoacarreadores poliméricos, tales como: 1) fármaco amorfo, interaccionando con un polímero amorfo o con un polímero cristalino y 2) fármaco cristalino, interaccionando con un polímero amorfo o con un polímero cristalino. Además, un fármaco puede estar presente ya sea como una solución sólida o una dispersión sólida en un polímero amorfo o cristalino [Musumeci *et al.*, 2006].

De acuerdo al termograma de la materia prima GNH₄, encontramos un pico endotérmico a 206.13 °C atribuido a su punto de fusión pero también se ha reportado como la descomposición de la fracción de ácido glucurónico por el tratamiento térmico convirtiéndole a ácido glicirretínico [Sui *et al.*, 2012; Kondo *et al.*, 1984]. Además se encontró otra endoterma a los 126.78 °C la cual representa la existencia de deshidratación del GNH₄. Para el caso del PLGA 50:50 la temperatura de transición vítrea se encuentra a 49.54 °C. El Pluronic[®] F-68 tiene un punto de fusión a 53.06 °C, mientras que el PVAL muestra tres endotermas: la primera a los 45.12 °C correspondiente a la temperatura de transición vítrea, la segunda en los 103.42 °C que corresponde a la deshidratación y la última a los 192.53 °C perteneciente a su punto de fusión (Figura 30).

En esta misma figura se muestran los termogramas de las mezclas físicas de GNH₄ con cada uno de los componentes (Pluronic[®] F-68, PVAL y PLGA) en proporciones equivalentes a la formulación, NPP sin carga de GNH₄ y NPP con carga de GNH₄. En el caso de las mezclas físicas con el Pluronic[®] F-68 la endoterma perteneciente al punto de fusión del GNH₄ no sufrió ningún cambio, pero en el caso de la mezcla física GNH₄-PVAL solo se observa el evento térmico

correspondiente al punto de fusión del estabilizante. El pico del GNH_4 desaparece totalmente en las curvas calorimétricas de la mezcla física GNH_4 -PLGA y las NPP cargadas, este proceso endotérmico puede ser no evidente debido a la proporción que se utilizó (400 mg de PLGA-15 mg de GNH_4), aunque durante la formación de las NPP puede ser la hipótesis que el polímero puede inhibir la cristalización del GNH_4 y por lo tanto, se podría concluir que el fármaco se encuentra en fase amorfa o en estado de solución sólida en la matriz del polímero después de la producción [Yan *et al.*, 2010; Dubernet, 1995]. La temperatura de transición vítrea del copolímero se desplazó ligeramente a una temperatura más alta después de la elaboración de las NPP. Resultados similares han sido obtenidos por Esmaeili *et al.* (2008) y Yan *et al.* (2010) al preparar NPP de PLGA. El aumento en la temperatura de transición vítrea del copolímero al preparar NPP se debe al proceso de cristalización durante la preparación [Esmaeili *et al.*, 2008].

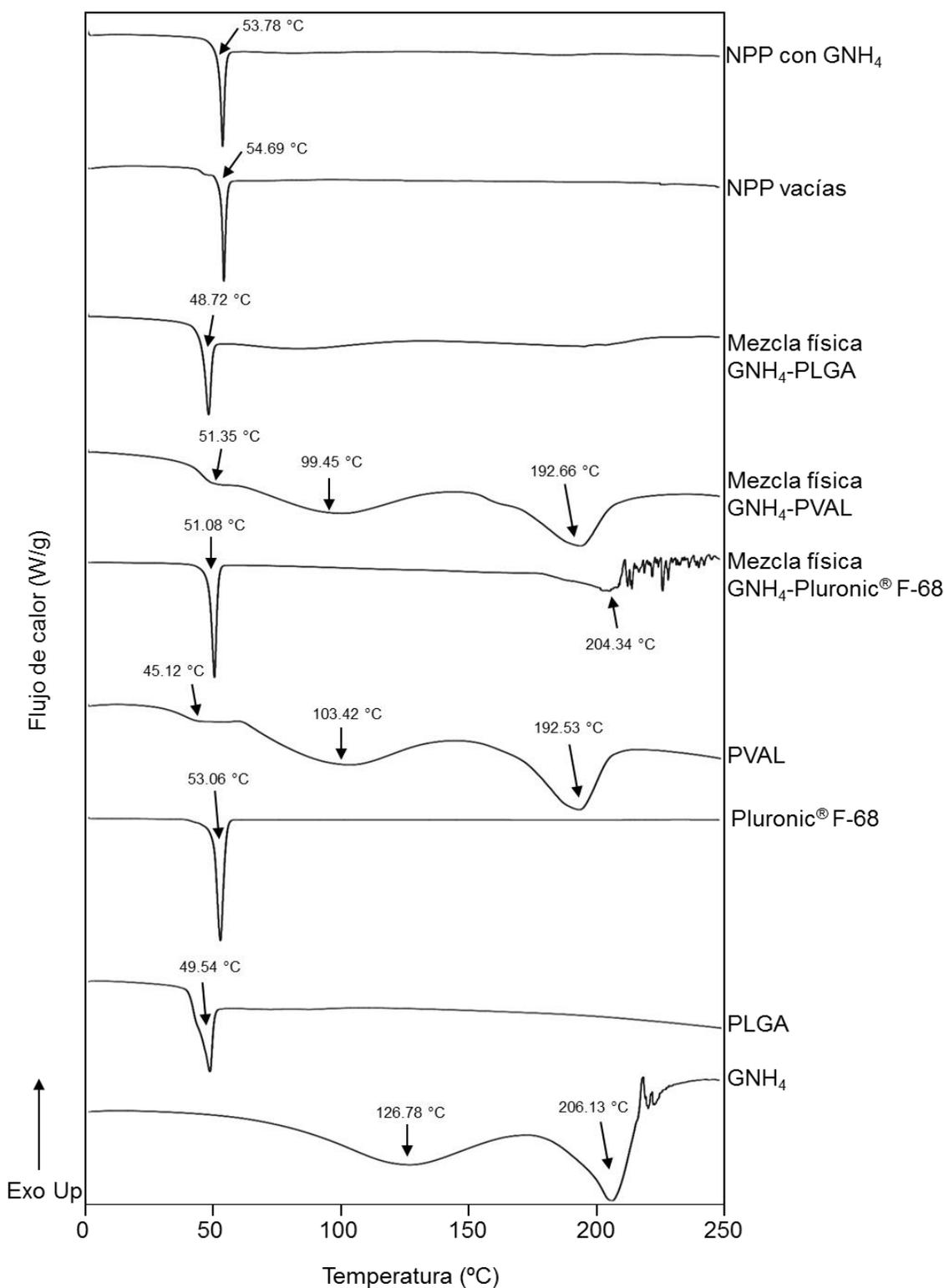


Figura 30. Termograma de las materias primas (GNH₄, PLGA, Pluronic® F-68 y PVAL), mezclas físicas de GNH₄-Pluronic® F-68, GNH₄-PVAL y GNH₄-PLGA (proporciones equivalentes a la formulación) NPP vacías y NPP con GNH₄.

9.6.5 Cuantificación de GNH₄ en las NPP obtenidas [Carga de fármaco (%) y E. E. (%)] por HPTLC

Los resultados de carga de GNH₄ (Tabla 11 y 12) indican un porcentaje bajo de fármaco encapsulado al compararlo con la carga teórica. Asimismo, la E. E. fue baja, lo que indica que el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) resultó adecuado en comparación con el método desplazamiento de solvente pero no eficiente, pues se ha reportado E. E. de 35-80% para el GNH₄ empleando el método gelificación iónica en la elaboración de NPP. Wu *et al.* (2005) explicaron que estos valores de E. E. se obtienen debido al mecanismo de asociación entre las NPP de quitosán y el GNH₄ ya que existe una interacción iónica entre los grupos carboxílicos del fármaco y los grupos amino del polímero

Aunque varios autores [Blanco y Alonso, 1997; Lemoine y Préat, 1998; Tobío *et al.*, 1998; Lamprecht *et al.*, 2000] han demostrado que el método doble emulsión es el más apropiado para encapsular fármacos hidrofílicos, obteniendo E. E. elevadas para proteínas y péptidos. Existe una dificultad importante relacionada con el procedimiento del método doble emulsión en lo que respecta a fármacos con pesos moleculares bajos, ya que existe una baja afinidad de éstos con el polímero lo que resulta en bajas E. E. [Tewes *et al.*, 2007].

Tabla 11. Cantidad de GNH₄ cargada en las muestras de NPP liofilizadas.

Sistema	Cantidad de GNH ₄ en el liofilizado* (mg)	Porcentaje de GNH ₄ en el liofilizado (%)
1	0.0337	0.1686
2	0.0295	0.1476
3	0.0307	0.1537
Promedio	0.0313	0.1566
Desv. Estándar	0.0022	0.0108

*datos obtenidos a partir de la curva de calibración.

Tabla 12. Resultados obtenidos de la cuantificación de GNH_4 en las NPP liofilizadas.

Evaluaciones	Cantidad (mg)	Porcentaje (%)
Cantidad de GNH_4 promedio	0.03	
Cantidad de muestra analizada	20.00	
Contenido inicial de GNH_4	---	3.75
Carga de GNH_4	---	0.16
E. E.	---	4.27

Las razones por las cuales el GNH_4 dio estos resultados se deben a las débiles interacciones por su baja afinidad con el polímero y la tendencia del fármaco de pasar de la fase acuosa interna a la fase acuosa externa por la difusión de la fase orgánica. Estos resultados son satisfactorios ya que han reportado E. E. de hasta el 4.5% para fármacos hidrofílico de bajo peso molecular en NPP empleando el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) [Cohen-Sela *et al.*, 2009]. Conforme a la idea planteada en la sección de los experimentos de DSC no existe diferencia significativa entre las NPP sin carga y con carga ya que la cantidad de GNH_4 encapsulada es muy baja para observar el punto de fusión característico [Gómez-Gaete *et al.*, 2007].

X. Conclusiones

1. Se prepararon y caracterizaron NPP mediante el método desplazamiento de solvente utilizando como acarreador polimérico la etilcelulosa (Ethocel[®] std. 4 y Ethocel[®] std. 10).
2. Los sistemas coloidales poliméricos obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente obteniendo los siguientes resultados: i) DLS: todos los lotes preparados tienden a disminuir su TPP conforme se aumenta la velocidad de agitación en la preparación. Las NPP preparadas con Ethocel[®] std. 10 poseen un TPP mayor en comparación con las NPP de Ethocel[®] std. 4, variable que se encuentra íntimamente relacionada con la viscosidad de la solución polimérica. ii) Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler: el Ψ_z tiene un efecto claro en función del tipo de estabilizante empleado en la preparación de las NPP, se observó que con PVAL las dispersiones se encuentran en el umbral de dispersión mientras que con LSS las dispersiones poseen buena estabilidad. iii) MEB: se observaron partículas esféricas de forma definida de tamaño nanométrico. iv) DSC: se hizo evidente que la incorporación del AG en las NPP no es adecuada.
3. El método desplazamiento de solvente mostró ser ineficaz para encapsular AG debido al mecanismo de formación de las NPP.
4. Se prepararon y caracterizaron NPP biodegradables mediante el método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) utilizando como acarreador polimérico al PLGA.
5. La caracterización fisicoquímica de estos sistemas incluyó: i) DLS: los lotes cargados con GNH_4 presentan un incremento en el TPP en comparación con los lotes sin carga. ii) Movilidad Electroforética-Velocimetría Láser Doppler: Al incorporar al GNH_4 el Ψ_z tiene un incremento, posicionando a los sistemas en una estabilidad moderada en relación con las NPP sin

- fármaco. iii) MEB: se observaron partículas esféricas de forma definida de tamaño nanométrico. iv) DSC: se hizo evidente la formación de dispersiones moleculares.
6. El método doble emulsión ($w_1/o/w_2$) permitió cargar al GNH₄, fármaco de naturaleza hidrofílica, en las NPP biodegradables. La E. E., calculada a partir de la dispersión más estable de GNH₄ en PLGA fue de 4.27%, generando una investigación nueva para el GNH₄ en NPP biodegradables de PLGA.
 7. Se logró optimizar un método mediante HPTLC para la cuantificación rápida y confiable de GNH₄.

XI. Perspectivas

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo se propone lo siguiente a fin de dar seguimiento a la investigación:

- a) La obtención de NPP biodegradables con un mejor % carga de fármaco y E. E., aplicando otras variables como un incremento en la cantidad fármaco a encapsular y el cambio en la fase orgánica, así como una caracterización más extensa.
- b) Continuar con estudios *in vitro* del sistema ya optimizado, para determinar la viabilidad de emplearlo en el área de la medicina veterinaria como un nanoacarreador del AG con uso principalmente antiviral.
- c) Emplear una variación del método aplicado conocido como doble emulsión-difusión del solvente, el cual es propuesto para incrementar el valor de E. E. en el caso de fármacos hidrofílicos.
- d) Emplear el método del par iónico para hacer lo menos soluble posible al ácido glicirricínico y evitar su fuga hacia la fase acuosa e incrementar su interacción con la fase orgánica para obtener altos % de eficiencia de encapsulamiento en las NPP.

XII. Referencias

- A. Date, A., D. Joshi, M., & B. Patravale, V. (2007). Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 505-521.
- Beck-Broichsitter, M., Rytting, E., Lehardt, T., Wang, X., & Kissel, T. (2010). Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the "ouzo region" upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 244-253.
- Blanco, M. D., & Alonso, M. J. (1997). Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43, 287-294.
- Bodmeier, R., & Siepmann, J. (1999). Nanoparticles to Nondegradable Polymers for Drug Delivery in: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. New York. Wiley-Interscience Publication.
- Breunig, M., Bauer, S., & Goepferich, A. (2008). Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 112-128.
- Clas, S.-D., Dalton, C. R., & Hancock, B. C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 2 (8), 311-320.
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 133, 90-95.
- Coleman, N. J., & Craig, D. Q. (1996). Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics* 135, 13-29.
- Dias, V., Ambudkar, V., Vemekar, P., Steffenio, R., & Rajaba-Siahboomi, A. (Julio de 2009). The Influence of Molecular Weight on Drug Release from Ethylcellulose Barrier Membrane Multiparticulates. Poster presented at 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. Copenhagen, Denmark.
- Esmaeili, F., Ghahremani, M. H., Esmaeili, B., Khoshayand, M. R., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2008). PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution. *International Journal of Pharmaceutics* 349, 249-255.

- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., & Axelsson, A. (2011). The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *International Journal of Pharmaceutics* 415, 34-52.
- García, M. A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., & Alcántara, A. (2000). Guía de validación de métodos analíticos. México, D. F.: Colegio Nacional de Químico Farmacéuticos Biólogos México, A. C.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 1-9.
- Giri, T. K. et al. (2012). Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.009>.
- Gómez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., & Fattal, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 331, 153-159.
- Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., & Davis, S. S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release* 57, 171-185.
- Hansen, H. K., Hansen, S. H., Kraunsøe, M., & Petersen, G. M. (1999). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinic acid in pharmaceutical preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9, 41-46.
- Hyppola, R., Husson, I., & Sundholm, F. (1996). Evaluation of physical properties of plasticized ethylcellulose films cast from ethanol solution. Part I. *International Journal of Pharmaceutics* 386, 161-170.
- ICH. (Febrero de 2011). *Impurities: Guideline for residual solvents Q3C (R5)*.
- Kondo, M., Minamino, H., Okuyama, G., Honda, K., Nagasawa, H., & Otani, Y. (1986). Physicochemical properties and applications of alfa- and beta-glycyrrhizins, natural surface active agents in licorice root extract. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 37, 177-189.
- Kreuter, J. (1994). Nanoparticles en: *Colloidal Drug Delivery Systems*. New York: Marcel-Dekker.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles - a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* 331, 1-10.

- Kumari, A., Kumar Yadav, S., & C. Yadav, S. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 75, 1-18.
- Lai, H. L., Pitt, K., & M. Craig, D. Q. (2010). Characterisation of the thermal properties of ethylcellulose using differential scanning and quasi-isothermal calorimetric approaches. *International Journal of Pharmaceutics* 386, 178-184.
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Hombreiro Pérez, M., Lehr, C. M., Hoffman, M., & Maincent, P. (2000). Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *International Journal of Pharmaceutics* 196, 177-182.
- Liu, J., Gong, T., Fu, H., Wang, C., Wang, X., Chen, Q., Zhang, Q., He, Q., Zhang, Z. (2008). Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics* 356, 333-344.
- López Luengo, M. T. (2008). El regaliz: Actividad farmacológica, indicaciones y consejos para su uso. *OFFARM: Farmacia y Sociedad* 27 (1), 66-71.
- Meng, F. T., Ma, G. H., Qiu, W., & Su, Z. G. (2003). W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release* 91, 407-416.
- Mishra, B., Patel, B. B., & Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6, 9-24.
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (1), 561-573.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods. Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science* 163, 90-122.
- Musumeci, T., Ventura, C. A., Giannone, I., Ruozi, B., Montenegro, L., Pignatello, R., & Puglisi, G. (2006). PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *International Journal of Pharmaceutics* 325, 172-179.
- Parveen, S., Misra, R., & Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8, 147-166.

- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., J. Ribeiro, A., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2, 8-21.
- Qinying Zhang, M. Y. (2009). Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *Journal of Chromatography A* 1216, 1954-1969.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24 (12), 1113-1128.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 36, 887-913.
- Rathee, P., Rathee, S., & Ahuja, D. (2010). Simultaneous Quantification of Glycyrrhetic acid and Apigenin using HPTLC from *Glycyrrhiza glabra* Linn. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* 5 (1), 95-103.
- Ren, P., & Sun, G. (2008). HPLC determination of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in Fuzilizhong pills. *Asian Journal of Traditional Medicines* 3 (3), 110-116.
- Riddick, T. M. (1968). *Control of colloid stability through zeta potential*. New York: Zeta-Meter Inc.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J. & Weller, P. J. (2003). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Chicago: American Pharmaceutical Association.
- Sakellariou, P., Rowe, R. C., White, E. F. T. (1985). The thermomechanical properties and glass transition temperature of some cellulose derivatives used in film coating. *International Journal of Pharmaceutics* 27, 267-277.
- Satinder, K., & Verma, M. (2011). Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends in Analytical Chemistry* 30 (1), 4-17.
- Segal, R., Pisanty, S., Wormser, R., Azaz, E., & Sela, M. N. (1985). Anticariogenic Activity of Licorice and Glycyrrhizine I: Inhibition of In Vitro Plaque Formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74, 79-81.
- Sherma, J. (1997). Thin Layer Chromatography in: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Volumen 15. New York. Marcel-Dekker.
- Sherma, J. (2002). Thin Layer Chromatography in: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2° edición. Volumen 2. New York. Marcel-Dekker.

- Singh, B., Mungara, P., Nivsarkar, M., & Anandjiwala, S. (2009). HPTLC Densitometric Quantification of Glycyrrhizin, Glycyrrhetic Acid, Apigenin, Kaempferol and Quercetin from *Glycyrrhizia glabra*. *Chromatographia* 70, 1665-1672.
- Sui, X., Wei, W., Yang, L., Zu, Y., Zhao, C., Zhang, L., Yang, F., Zhang, Z. (2012). Preparation, characterization and in vivo assesment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. *International Journal of Pharmaceutics* 423, 471-479.
- Sun, C., Xie, Y., Tian, Q., & Liu, H. (2007). Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. *Colloids and Surfaces A* 305, 42-47.
- Tewes, F., Munnier, E., Antoon, B., Okassa, L. N., Cohen-Jonathan, S., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Soucé, M., Dubois, P., Chourpa, I. (2007). Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66, 488-492.
- Tiwari, S., Bhadoriya, U., Saini, L., Gupta, A., & Solanki, S. (2011). Quantitative analysis of glycyrrhizic acid by HPTLC in herbal formulation. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science* 1 (2), 124-127.
- Vázquez, G., & Echeverria, O. (2000). *Introducción a la Microscopia Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas*. México, D. F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Wolkerstorfer, A., Kurz, H., Bachhofner, N., & J. Szolar, O. H. (2009). Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Research* 83, 171-178.
- Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 456-469.
- Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., & Fu, S. (2005). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics* 295, 235-245.
- Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., Mei, L., Tang, L., Song, C., Sun, H., Huang, L. (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6, 170-178.
- Yang, W., Peters, J. I., & Williams III, R. O. (2008). Inhaled nanoparticles - A current review. *International Journal of Pharmaceutics* 356, 239-247.

Yong-li, L.; Hao, Y., Dong-mei, L., & Li, F. (2012). Simultaneous determination of ephedrine hydrochloride, liquiritin, and glycyrrhizic acid in Zhenkening syrup by dual wavelength-HPLC. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* 29 (1), 26-30.

Zetasizer Nano Series. (2003). *User Manual*. England: Malvern Instruments Ltd.

<http://www.carenostrum.com> (2012)

<http://www.catalysis.es> (2012)

<http://www.catalysisvet.com> (2012)

<http://www.dermaceutical.com.mx> (2012)

<http://www.drugcare.com> (2012)

<http://www.drugs.com> (2012)

<http://www.eladiet.com> (2012)

<http://www.e-pharma.jp> (2012)

<http://www.evaluatepharma.com> (2012)

<http://www.himalayahealthcare.com> (2012)

<http://www.iooxlabs.com> (2012)

<http://www.labo-svr.com> (2012)

<http://www.maruzenpcy.co.jp> (2012)

<http://www.medicamentosplm.com> (2012)

<http://www.minophagen.co.jp> (2012)

<http://www.pharmex.co.jp> (2012)

<http://www.quimica.unam.mx> (2012)

<http://www.rad-ar.or.jp> (2012)

<http://www.retorna.us> (2012)

<http://www.rxlist.cn> (2012)

<http://www.selleckchem.com> (2012)

<http://www.sigmaaldrich.com> (2012)

<http://www.super-smart.eu> (2012)

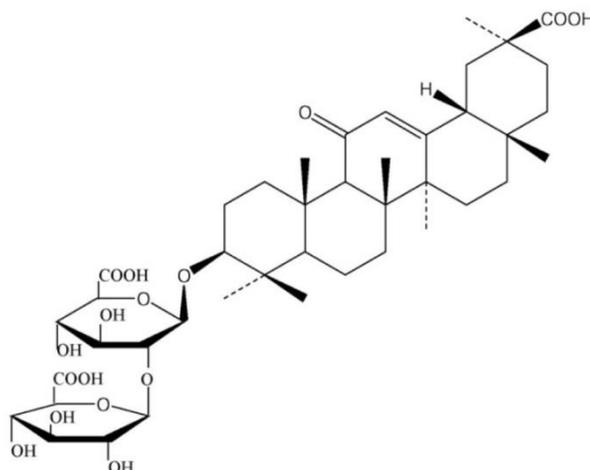
<http://www.vademecum.es> (2012)

XIII. Anexos

1. Propiedades fisicoquímicas

1.1 Propiedades del AG

Estructura química:

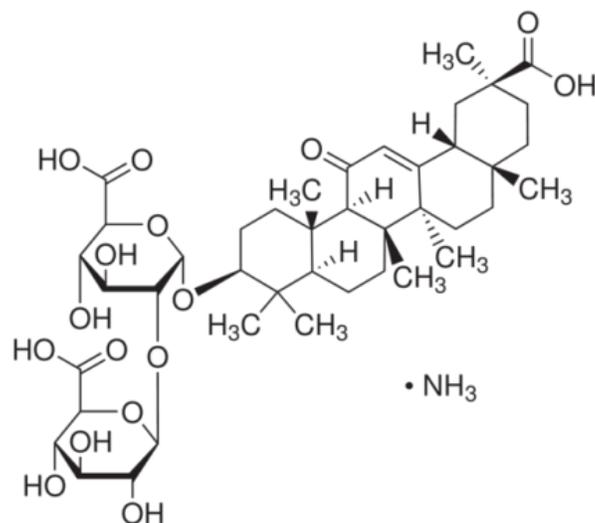


Fórmula condensada:	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
Peso molecular:	822.93 g/mol
pK _a :	2.76, 2.81 y 4.71
Apariencia física:	Polvo fino blanco hasta amarillo claro
Solubilidad a 25 °C:	DMSO 117 mg/ml, agua 1 mg/ml y alcohol etílico 8.25 mg/ml
Naturaleza química:	Saponina triterpenoide de origen natural, semipolar
Uso terapéutico:	Posee actividad antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, anticancerígena, antitrombótica, antidiabética, hepatoprotectora, neuroprotectora, antiviral, entre otras haciéndolo un componente activo versátil

Datos de la referencia [Qinying Zhang, 2009], [Sun *et al.*, 2007] y www.selleckchem.com

1.2 Propiedades del GNH₄

Estructura química:

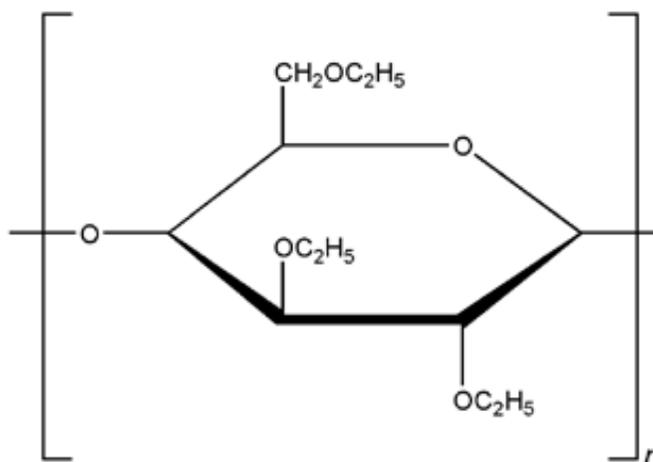


Fórmula condensada:	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆ NH ₃
Peso molecular:	839.96 g/mol
Apariencia física:	Polvo fino blanco hasta amarillo claro
Solubilidad a 25 °C:	DMSO 168 mg/ml, agua 5 mg/ml y alcohol etílico <1 mg/ml
Naturaleza química:	Saponina triterpenoide de origen natural, semipolar
Uso terapéutico:	Posee actividad antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, anticancerígena, antitrombótica, antidiabética, hepatoprotectora, neuroprotectora, antiviral, entre otras haciéndolo un componente activo versátil

Datos de la referencia [Qinying Zhang, 2009] y www.selleckchem.com

1.3 Propiedades del Ethocel® std. 4 Premium

Estructura química:

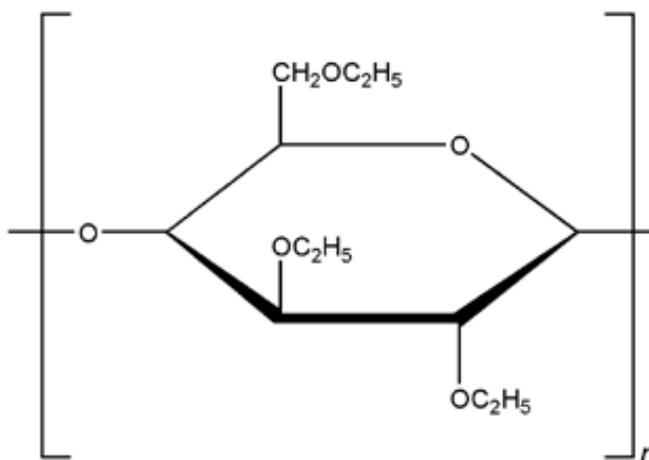


Fórmula condensada:	$-(C_{12}H_{22}O_5)_n-$ La etilcelulosa puede ser completamente o parcialmente etoxilada
Peso molecular:	Éste también depende del grado de sustitución de los grupos etoxi
Apariencia física:	Polvo blanco insípido que fluye libremente
Contenido de etoxilo:	48.7 %
Viscosidad:	5.3 Cp
Tamaño de partícula	En promedio 250 μm
Solubilidad:	Insoluble en glicerina, propilenglicol y agua. Soluble en cloroformo, alcohol etílico, acetato de etilo, metanol y tolueno
Densidad aparente:	0.4 g/cm^3
Transición vítrea:	129-133 $^{\circ}\text{C}$
Aplicaciones:	Encapsulación de activos, liberación sostenida, recubrimiento y excipiente de tabletas

Datos de la referencia [Rowe, R. C. *et al.*, 2003] y [Dias, V. *et al.*, 2009].

1.4 Propiedades del Ethocel® std. 10 FP Premium

Estructura química:

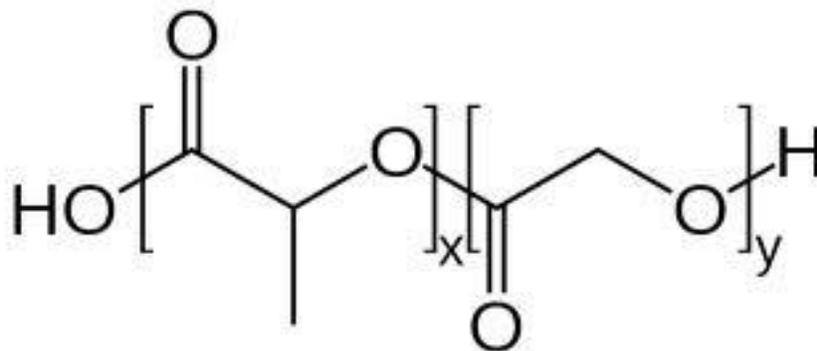


Fórmula condensada:	$-(C_{12}H_{22}O_5)_n-$ La etilcelulosa puede ser completamente o parcialmente etoxilada
Peso molecular:	Éste también depende del grado de sustitución de los grupos etoxi
Apariencia física:	Polvo fino blanco insípido
Contenido de etoxilo:	49.4 %
Viscosidad:	10.3 Cp
Tamaño de partícula	En promedio 5 μ m
Solubilidad:	Insoluble en glicerina, propilenglicol y agua. Soluble en cloroformo, alcohol etílico, acetato de etilo, metanol y tolueno
Densidad aparente:	0.4 g/cm ³
Transición vítrea:	129-133 °C
Aplicaciones:	Encapsulación de activos, liberación sostenida, recubrimiento y excipiente de tabletas

Datos de la referencia [Rowe, R. C. *et al.*, 2003] y [Dias, V. *et al.*, 2009].

1.5 Propiedades del PLGA 50:50

Estructura química:

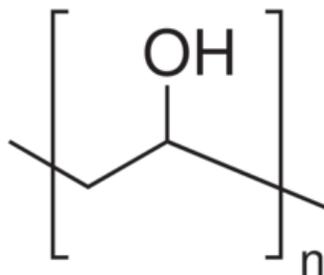


Fórmula condensada:	$\text{HO}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_x(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2)_y\text{H}$ Donde $x = 50$ y $y = 50$
Peso molecular:	38000-54000 Da
Apariencia física:	Gránulos de color ámbar y de flujo libre
Solubilidad:	Soluble en acetato de etilo, cloruro de metileno, acetona, etc. Insoluble en soluciones acuosas
Viscosidad	0.45-0.60 dl/g
Transición vítrea:	46-50 °C
Aplicaciones:	Se utiliza en la producción de sistemas de liberación de fármacos, suturas, fijación de fracturas, implantes orales, etc.

Datos de la referencia [Fredenberg, S. *et al.*, 2011] y www.sigmaaldrich.com

1.6 Propiedades del PVAL

Estructura química:

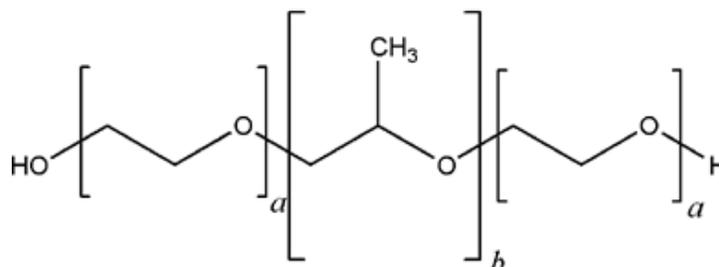


Fórmula condensada:	$-(C_2H_4O)_n-$ El valor de n se encuentra entre 500 y 5000
Peso molecular:	Éste también depende de n obteniendo valores entre 20000-200000 g/mol
Apariencia física:	Polvo granular inodoro de color blanco
Solubilidad:	Soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol etílico e insoluble en solventes orgánicos
Punto de fusión:	228 °C para grados completamente hidrolizados 180-190 °C para parcialmente hidrolizados
Aplicaciones:	Estabilizante, recubrimiento, lubricante y modificador de la viscosidad.

Datos de la referencia [Rowe, R. C.*et al.*, 2003].

1.7 Propiedades del Pluronic® F-68 (Poloxámero 188)

Estructura química:

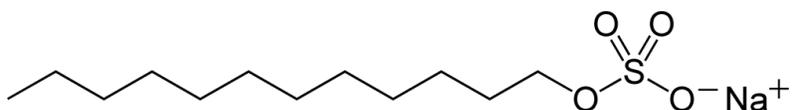


Fórmula condensada:	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a$ Donde $a = 80$ y $b = 27$
Peso molecular:	7680-9510 g/mol
Apariencia física:	Gránulos comprimidos blancos con aspecto ceroso de flujo libre
Solubilidad:	Soluble en agua y alcohol etílico
Punto de fusión:	52-57 °C
Aplicaciones:	Estabilizante, agente de mojado, lubricante de tabletas, agente de solubilización y agente dispersante

Datos de la referencia [Rowe, R. C. *et al.*, 2003].

1.8 Propiedades del LSS

Formula química:

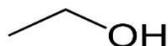


Fórmula condensada:	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S
Peso molecular:	288.38 g/mol
Apariencia física:	Polvo con sensación suave de color blanco
Solubilidad:	Soluble en agua e insoluble en cloroformo y éter
Punto de fusión:	204-207 °C
Aplicaciones:	Surfactante iónico, detergente, lubricante de tabletas y capsulas, agente de mojado y penetrador de piel

Datos de la referencia [Rowe, R. C.*et al.*, 2003].

1.9 Propiedades del alcohol etílico

Estructura química:

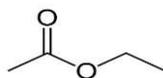


Fórmula condensada:	C ₂ H ₆ O
Peso molecular:	46.07 g/mol
Apariencia física:	Líquido incoloro con olor característico
Solubilidad:	Miscible con agua en todas proporciones, éter metanol, cloroformo y acetona
Punto de ebullición:	78.3 °C
Punto de fusión:	-130 °C
Aplicaciones:	Disolvente, desinfectante y excipiente de algunos medicamentos y cosméticos

Datos de la referencia www.quimica.unam.mx

1.10 Propiedades del acetato de etilo

Estructura química:



Fórmula condensada:	C ₄ H ₈ O ₂
Peso molecular:	88.1 g/mol
Apariencia física:	Líquido incoloro con olor a frutas
Solubilidad:	1 ml es miscible con 10 ml de agua a 25 °C, miscible en alcohol etílico, acetona, cloroformo y éter
Punto de ebullición:	77 °C
Punto de fusión:	-83 °C
Aplicaciones:	Disolvente, ingrediente de formulaciones cosméticas y farmacéuticas, es comúnmente usado en mezclas para cromatografía y extracción

Datos de la referencia www.quimica.unam.mx

2. Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC)

2.1 Aspectos generales

Todos los métodos cromatográficos involucran el mismo proceso para la separación de una mezcla de sustancias, el cual se basa en la migración de los componentes individuales a diferentes velocidades debido a sus distribuciones únicas entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La Cromatografía en Capa Fina (TLC) es un tipo de cromatografía de líquidos, en la que la fase estacionaria es una capa delgada y uniforme de partículas finas de un adsorbente sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico. En el procedimiento básico en TLC, una solución de la muestra se aplica en la parte baja de la placa, que es entonces colocada en una cámara cerrada, cuya base ha sido cubierta con una cierta cantidad de la fase móvil, usualmente una mezcla de solventes. Después del desarrollo de la placa, ésta se saca de la cámara, y se marca el frente del disolvente para calcular el R_f , que es la distancia que recorrió la muestra dividida entre la distancia recorrida por el disolvente [Sherma, 2002].

La HPTLC, se inicia con la introducción de placas comercialmente disponibles de alta eficiencia, las cuales son más pequeñas (10 x 10 ó 10 x 20 cm), tienen una capa más delgada (0.1-0.2 mm) compuesta de un adsorbente con tamaño de partícula más uniforme (5-6 μm), y el cromatograma se desarrolla en distancias más cortas (3-7 cm); comparadas con las de TLC, que son generalmente de 20 x 20 cm con una capa de 0.25 mm y se desarrollan en distancias de 10-12 mm. Así la principal diferencia entre HPTLC y la TLC convencional es el tamaño de poro y el tamaño de partícula más uniforme y pequeño [Sherma, 2002].

El uso de las placas de alto desempeño mejora la resolución, reduce el tiempo de análisis, aumenta la sensibilidad y mejora la cuantificación *in situ*. La TLC cualitativa o semicuantitativa tradicional es simple de usar y requiere materiales de muy bajo costo (una cámara para cromatografía, un capilar de vidrio, una placa precubierta y un reactivo de detección o revelado) [Sherma, 2002].

En HPTLC cuantitativa se requiere de instrumentos más caros y es un poco más compleja de efectuar; sin embargo, utiliza el procedimiento básico de TLC para desarrollar el cromatograma, con la diferencia de que la aplicación de la muestra no se hace con capilares de vidrio, sino que ésta se realiza con aplicadores automatizados que reducen errores y variaciones, además de aplicar el volumen requerido [Sherma, 2002].

2.2 Ventajas

Las ventajas de utilizar HPTLC son:

- a) Bajo costo (utiliza aproximadamente el 5% de disolvente con respecto a HPLC).
- b) La preparación de la muestra antes de la aplicación suele ser sencilla, ya que frecuentemente no se necesita remover aditivos u otras impurezas, pues las placas se usan una sola vez.
- c) No es necesario eluir los componentes para detectarlos. Todos los componentes se detectan sobre la placa.

- d) No hay restricciones en cuanto a la elección de la fase móvil (por ejemplo, pueden usarse disolventes de baja transparencia al UV, pues estos son evaporados antes de la detección).
- e) Es posible correr muchas muestras al mismo tiempo (por ejemplo, en una placa de 20 cm de largo pueden correrse hasta 70 muestras).
- f) Los límites de sensibilidad son típicamente en nanogramos y picogramos.

2.3 Procedimientos experimentales

a) Preparación de la muestra

Los procedimientos para preparar la muestra son similares a aquéllos usados en HPLC y en cromatografía de gases. Las muestras deben ser representativas, de tamaño adecuado para que sea posible la detección del analito de interés y lo suficientemente puras para que el analito pueda ser separado como una zona o mancha compacta. Si la concentración del analito es alta, las formas farmacéuticas pueden ser simplemente disueltas en un disolvente que solubilice por completo al analito y deje a los excipientes o compuestos extraños sin disolver para dar una solución del analito que pueda ser directamente aplicada para análisis en TLC. Para obtener una óptima resolución y sensibilidad, el punto de aplicación no debe ser mayor que 1-3 mm de diámetro. Si el analito se encuentra en bajas concentraciones en una muestra compleja, se debe extraer el solvente, purificar y concentrar la muestra, antes de realizar TLC, esto con el fin de maximizar al analito y minimizar componentes extraños de la solución prueba [Sherma, 2002].

b) Fases estacionarias

La placa y la fase móvil se eligen de acuerdo a la naturaleza de los analitos y de la matriz de la muestra. Las placas precubiertas comerciales son utilizadas en la mayoría de los casos, excepto cuando placas con características especiales se necesitan para un análisis en particular. Las placas de sílica gel con una fase menos polar, como cloroformo-metanol, han sido usadas en más del 90% de los análisis reportados para fármacos.

Las separaciones en sílica gel se basan principalmente en uniones de hidrógeno e incluyen interacciones dipolo-dipolo entre la placa polar y los grupos funcionales del compuesto. Las placas lipofílicas químicamente modificadas, tales como C-8 (octasilil), C-18 (octadecilsilil) y fenilo, se usan para TLC de fase reversa. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es no polar. Las placas de fase reversa comercialmente disponibles varían en la longitud de la cadena unida desde trimetil a 22 carbonos. El alargamiento de la cadena alquilo, incrementa la retención del analito y promueven la separación entre mezclas.

La sílica gel puede ser impregnada con varios disolventes, amortiguadores y reactivos selectivos para mejorar las separaciones. Las placas algunas veces se limpian mediante un desarrollo con fase móvil o cloruro de metileno-metanol (1:1) antes de la aplicación de la muestra [Sherma, 2002].

c) Fases móviles

La fase móvil para una separación en particular se selecciona algunas veces empíricamente usando la experiencia personal o los reportes de la literatura de

separaciones similares. Los sistemas de disolventes generales que han sido utilizados comúnmente, basados en sus diferentes propiedades de selectividad, son dietil éter, cloruro de metileno y cloroformo, combinados individualmente o juntos con hexano como el disolvente que ajusta la fuerza para TLC de fase normal, así como metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano mezclados con agua para ajustar la fuerza en TLC de fase reversa.

d) Aplicación de muestras y estándares

Para lograr la máxima resolución y el mejor análisis cuantitativo la aplicación debe de ser pequeña, de forma regular y precisamente colocada en la zona deseada, sin dañar la superficie de la capa. El disolvente debe ser removido por evaporación antes del desarrollo del cromatograma para que la selectividad y la zona de aplicación no se vean alteradas. El coleo de ciertas zonas puede originarse si toda o parte de la muestra se solidifica o adsorbe en la superficie de la capa.

Las muestras y estándares se aplican manualmente en la parte inferior de la placa con micropipetas de vidrio o con microdispensadores digitales. Asimismo, instrumentos manuales y automatizados están disponibles para la aplicación de la solución. Las zonas iniciales, en forma de manchas con un diámetro variable (se recomienda que sean de 1-3 mm), son aplicadas y los volúmenes de dichas aplicaciones pueden determinarse. Existen pipetas de capilares de vidrio o de platino-iridio que están colocadas en un dispositivo mecánico para hacer los puntos de aplicación y que se encuentra controlado electrónicamente; éste aparato guía al capilar a la posición deseada y la regresa, poniéndolo en contacto uniforme con la placa para que descargue la solución.

Un aplicador complemente automatizado, se encuentra controlado por una computadora y consiste de un capilar e acero inoxidable conectado a una jeringa de dosificación, la cual es operada por un motor. La muestra es rociada por un atomizador controlado por presión de nitrógeno. Esta clase de dispositivo, puede aplicar secuencialmente (en banda o en punto) un volumen constante o variable de la muestra, eligiendo entre un número de viales que están en un soporte. Este instrumento ha sido el más utilizado que cualquier otro para la cuantificación densitométrica en análisis farmacéutico [Sherma, 2002].

2.4 Cuantificación en HPTLC

La cuantificación de analitos por HPTLC se puede realizar mediante dos métodos:

- a) **Indirectos:** involucran la remoción del analito de la placa, seguido de un paso para cuantificarlo.
- b) **Directos:** involucran algún tipo de medición directamente sobre la placa, como cálculo del área, comparación visual o densitometría.

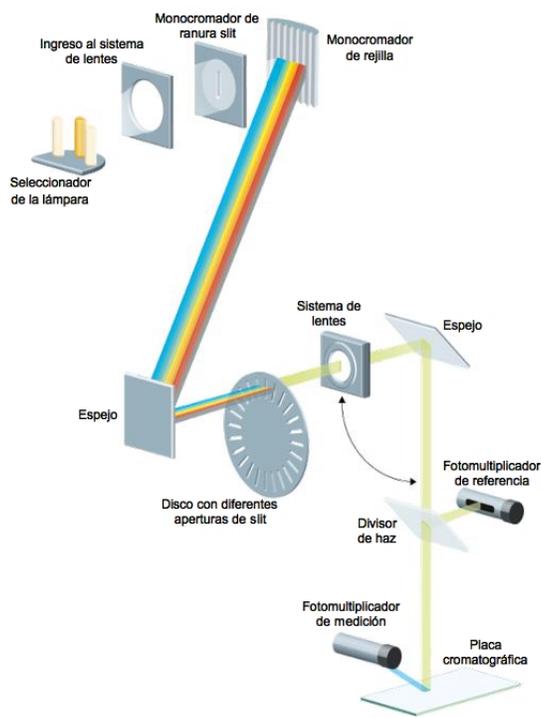
2.5 Densitometría

Un densitómetro es un dispositivo que tiene ajustada una lámpara de haz de luz simple con una abertura rectangular o circular que sirve para realizar análisis cuantitativos en HPTLC *in situ*, midiendo las zonas de las muestras y estándares. Todos los densitómetros tienen ciertas características en común. Estas incluyen una fuente de luz, un dispositivo de selección de la longitud de onda, sistemas de enfoque y condensación y un detector fotosensible. Además, se necesita de un

mecanismo que permite mover la placa bajo el haz de luz enfocado con el fin de examinar la placa.

El dispositivo que selecciona el haz de luz es un monocromador y el detector es un tubo fotomultiplicador, cuando éste se coloca debajo de la placa, el instrumento opera en el modo de transmitancia (T) y colocando por arriba de la placa se tiene el modo de reflexión (R).

En la figura siguiente se muestra un densitómetro de haz de luz simple ajustado para mediciones de absorción en el modo de reflexión. Una lámpara de tungsteno o halógeno es la fuente para examinar las zonas coloridas (absorción visible) y una lámpara de deuterio para examinar zonas que absorben en UV directamente. El monocromador puede ser un prisma o una rejilla siendo esta última la más frecuentemente usada. El detector es un fotomultiplicador o fotodiodo [Sherma, 2002].



Trayectoria de la luz del densitómetro.

Existen varios densitómetros comerciales disponibles que tienen diferentes capacidades de medición. Se puede efectuar una medición simultánea de reflexión o transmitancia, o solamente transmitancia, mediante un segundo detector colocado en el lado opuesto de la placa.

El densitómetro se conecta a una grabadora, a un integrador o a una computadora, siendo ésta última la más utilizada. Algunas de las tareas que puede realizar la computadora son:

- a) Adquisición de datos.
- b) Búsqueda automática de los picos y optimización del scanning de cada zona deseada.
- c) Scanning a múltiples longitudes de onda.
- d) Cálculo de curvas de calibración por regresión lineal.
- e) Cálculo de áreas bajo la curva o alturas de muestras y estándares.
- f) Almacenamiento de datos en disco.

Las curvas de calibración densitométricas relacionadas con una señal de absorción (altura o área de pico) y cantidad (concentración o peso) de estándares sobre la placa, generalmente son no lineales, especialmente a altas concentraciones, y/o no pasan por el origen [Sherma, 1997].

3. Análisis estadístico

3.1 Curva de calibración para cuantificar AG mediante HPTLC

Los datos con los que se graficó la curva de calibración para AG, se muestran a continuación.

cantidad (ng)	altura (mm)	altura promedio (mm)
56	12.5	12.5333±0.2517
	12.8	
	12.3	
112	21.4	21.5667±0.1528
	21.7	
	21.6	
168	34.2	34.4000±0.2646
	34.7	
	34.3	
224	44.0	44.0667±0.2082
	43.9	
	44.3	
280	56.0	56.1333±0.3215
	56.5	
	55.9	

Los parámetros estadísticos obtenidos, se muestran a continuación.

Parámetros estadísticos de la regresión	Curva por altura
Coeficiente de correlación (r)	0.9987
Coeficiente de determinación (r ²)	0.9975
Intercepto (b)	0.8300
Pendiente (m)	0.1959

Límite de Detección (LD) con base en la Curva de calibración y la desviación estándar de regresión [García, M. A. *et al.*, 2000].

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión y b_1 es el valor de la pendiente.

$$LD = \frac{3.3 \times 0.8592}{0.1959} = 14.47 \text{ ng}$$

Límite de Cuantificación (LC) con base en la Curva de calibración y la desviación estándar de regresión [García, M. A. *et al.*, 2000].

$$LC = \frac{10xS_{y/x}}{b_1}$$

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión y b_1 es el valor de la pendiente.

$$LC = \frac{10x0.8592}{0.1959} = 43.86ng$$

3.2 Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema analítico por HPTLC para cuantificar AG

Prueba de hipótesis:

Ho: Existe una relación lineal entre la cantidad de AG y la altura del pico obtenido en el densitómetro.

Hi: No existe relación lineal entre la cantidad de AG y la altura del pico obtenido en el densitómetro.

Criterio de aceptación: si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho, y por lo tanto, existe relación lineal entre la cantidad de AG y su respectiva altura.

ANOVA para la linealidad del sistema

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica ($\alpha=0.05/2; 2/12$)
Desviación de medias debida a la regresión	2	6392.49	3196.25	2.78	5.10
Desviación debida a la medida	12	13797.18	1149.76		
Desviación total	14				

3.3 Prueba para determinar si la ordenada al origen es diferente de cero

Prueba de hipótesis:

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación: si $t_{cal} < t_{crítica}$, no se rechaza Ho, y por lo tanto el intercepto es igual a cero.

Resultados de la prueba del intercepto, $\alpha=0,05$

Ordenada al origen	t calculada	t crítica ($1-\alpha/2; g.l.=n-2$)
0.83	1.61	2.16

3.4 Resultados de tamaños de partícula de los lotes de NPP de Ethocel[®] a diferentes velocidades

	11000 rpm	13000 rpm	16000 rpm
Ethocel [®] std. 4 PVAL al 5%	193.5	169.9	149.5
	193.7	168.2	148.2
	186.8	167.6	150.6
	180.5	167.4	145.7
	178.9	165.5	142.1
	180.9	167.5	140.4
	185.0	161.7	147.8
	181.4	162.2	146.9
	180.6	161.3	143.7
Ethocel [®] std. 10 LSS al 2%	223.8	210.3	185.7
	227.5	207.6	183.6
	228.3	211.4	182.4
	224.6	203.1	179.3
	228.1	200.4	172.9
	226.2	202.7	180.8
	219.5	200.5	186.0
	220.1	209.2	185.2
	223.9	206.8	183.7

3.5 Análisis de varianza de comparación de las medias para el efecto de velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula de los lotes de NPP de Ethocel[®] std. 4

Prueba de hipótesis:

Ho: Todas las velocidades de agitación producen el mismo tamaño de partícula.

Hi: No todas las velocidades de agitación producen el mismo tamaño de partícula.

Criterio de aceptación: si la razón de varianzas (R. V.) \geq F crítica se rechaza Ho, y por lo tanto, no todas las velocidades de agitación producen el mismo tamaño de partícula.

ANOVA para comparación de medias de lotes de NPP de Ethocel[®] std. 4

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	R. V.	F crítica ($\alpha=0.05;2/24$)	Probabilidad
Entre muestras	2	6667.00	3333.50	185.30	3.40	2.60×10^{-15}
Dentro de las muestras	24	431.70	18.00			
Total	26	7098.70				

3.6 Análisis de varianza de comparación de las medias para el efecto de velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula de los lotes de NPP de Ethocel[®] std. 10

Prueba de hipótesis:

Ho: Todas las velocidades de agitación producen el mismo tamaño de partícula.

Hi: No todas las velocidades de agitación producen el mismo tamaño de partícula.

Criterio de aceptación: si la razón de varianzas (R. V.) \geq F crítica se rechaza H_0 , y por lo tanto, no todas las velocidades de agitación producen el mismo tamaño de partícula.

ANOVA para comparación de medias de lotes de NPP de Ethocel[®] std. 10

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	R. V.	F crítica ($\alpha=0.05;2/24$)	Probabilidad
Entre muestras	2	8157.20	4078.60	269.90	3.40	3.50×10^{-17}
Dentro de las muestras	24	362.60	15.10			
Total	26	8519.80				