



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“ENCAPSULACIÓN DE UN FÁRMACO  
HIDROSOLUBLE (ÁCIDO GLICIRRICÍNICO) EN  
NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS POR  
INTERACCIÓN PAR IÓNICO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**LUIS MANUEL URAGA RAMÍREZ**

**ASESOR:**

**M. en C. MARÍA ZAIDA URBÁN**

**MORLÁN**

**COASESOR:**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Encapsulación de un fármaco hidrosoluble (Ácido Glicirricínico) en nanopartículas poliméricas por interacción par iónico.

Que presenta el pasante: Luis Manuel Uraga Ramírez

Con número de cuenta: 305150453 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Mayo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
VOCAL	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
SECRETARIO	M. en C. María Zaida Urbán Morlán	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Nava Arzaluz	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriela Rodríguez Patiño	

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

IHM/mmgm\*

## AGRADECIMIENTOS.

***A mis padres: Nicolasa Griselda Ramírez Fierros y Zeferino Graciano Uruga Vidal.***

Por sus consejos, por sus regaños, por su apoyo moral y el amor inigualable que nunca me ha faltado. Les agradezco la oportunidad de permitirme terminar, de seguir creciendo como persona, profesionalmente y mejorar mi calidad de vida. Gracias mamá por nunca dejarme solo, por tu esfuerzo, por tus desvelos y cariño, por darme el amor que solo TU eres capaz de dar. A ti papá te agradezco por tu apoyo, porque sé que cada día de trabajo era para darnos lo mejor, porque nunca has dejado de pensar en nuestro futuro y nos has permitido vestir, comer y crecer. Gracias.

***A mi hermano: Juan Jesús Uruga Ramírez.***

Mi juanito, gracias hermano por tu amor, porque nunca me has dejado solo, siempre a mi lado apoyándome y dándome consejos. Nunca negativo siempre positivo. Gracias por que tú siempre das sin pensar en que vas a recibir. Eres el mejor. Te quiero hermanito.

***A mi hermana: Maricarmen Uruga Ramírez.***

Por tu ayuda que nunca me faltó, por tu cariño y compañía. Tú que con tu sonrisa siempre logras alegrar a los que te rodean, te agradezco por tu apoyo que nunca me negaste. Gracias nena, te quiero.

***A mis abuelitos: Margarita, Eufrosia, Serafín e Inocencio.***

***A mis tíos: Norma, Doris, Mary, Juan, Mago, Martín, Oliverio, Gaude.***

***A mis primos: Marcelino, Nelly, Oscar, Armando, Nayeli, Teresa, Lupita.***

*A mis amigos: Gustavo, Axell, Sandra, Fernanda.*

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

Por la disponibilidad, paciencia y enseñanza que día a día tuvo conmigo, desde que se inició el proyecto hasta su final, por la gran amistad que me brindó y el apoyo incondicional. Gracias por los consejos y el tiempo dedicado hacia mí.

*A mi asesor: Dr. David Quintanar Guerrero.*

Por su apoyo y conocimientos compartidos durante la duración de este proyecto, consejos y por todas las facilidades concedidas para realizar este trabajo.

*A la Dr. Elizabeth Piñon Segundo.*

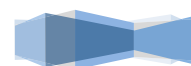
Por brindarme su apoyo para poder utilizar el Zetasizer Nano de su unidad de investigación.

Agradecemos a los proyectos: *PAPIIT 2019143, CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940 Y PIAPI 001* por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Agradezco a la *Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* y a sus profesores, los cuales me enseñaron y compartieron sus conocimientos y experiencias para mejorar mi desarrollo profesional y personal y poder integrarme en el ámbito laboral y así desempeñar cualquier cargo que se me asigne en la industria farmacéutica ayudando en el mejoramiento de la calidad de vida de las personas.



ÍNDICE GENERAL.	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
1. Par-ión.....	3
1.1. Definición y naturaleza.....	3
1.2. Historia.....	4
1.3. Formación del par-ión.....	5
1.4. Solvatación y clasificación del par-ión.....	6
1.5. Pares-iónicos en sistemas acuosos.....	8
1.6. Extracción del par-ión.....	8
2. Ácido Glicirricínico.....	9
2.1 Generalidades y propiedades farmacológicas.....	9
3. Nanotecnología.....	11
3.1. Definición.....	11
3.2. Beneficios de la nanotecnología.....	11
3.3. Nanomedicina.....	12
3.3.1. Definición.....	12
3.3.2. Usos de la nanomedicina.....	12
3.3.3. Beneficios y aplicaciones de la nanomedicina.....	12
3.4. Nanopartículas.....	13
3.4.1. Definición.....	13
3.4.2. Nanoesferas.....	14
3.4.3. Nanocápsulas.....	23
4. Caracterización de nanopartículas.....	28
4.1. Tamaño de Partícula y Potencial Z.....	28
4.1.1. Dispersión dinámica de la luz.....	28
III. HIPÓTESIS.....	32
IV. OBJETIVO GENERAL.....	32
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	33



1.	Formación del Par-Ión Cloruro de tetrabutilamonio-Ácido Glicirricínico (AG-TBC).	36
2.	Elaboración de las NP's por el método de emulsificación-difusión con la inclusión de la interacción Par-Iónico.	38
3.	Caracterización	39
a.	Tamaño de partícula	39
b.	Potencial Z	39
c.	Morfología	39
d.	Interacciones fármaco-excipiente	39
4.	Efecto de la proporción del TBC sobre la encapsulación del AG	40
a.	Preparación de la muestra	40
b.	Curva de calibración	41
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
1.	Formación del par-ión (TBC-AG)	43
2.	Caracterización	44
2.1.	Tamaño de partícula	44
2.2.	Potencial Z	46
2.3.	Morfología	49
2.4.	Interacciones fármaco (AG)-polímero (PLGA, PVAL)	50
2.5.	Efecto de la proporción del TBC sobre la encapsulación del AG	53
a.	Curva de calibración	53
VIII.	CONCLUSIONES	58
IX.	PERSPECTIVAS	59
X.	REFERENCIAS	60
	ANEXO 1: Como trabaja la DLS	63
	ANEXO 2: ANOVA para las pruebas de caracterización	69
	ANEXO 3: Información de análisis por HPLC y Zetasizer Nano ZS®	72





ÍNDICE DE FIGURAS.	Página
Figura 1. Solvatación de iones.....	5
Figura 2. Clasificación del par-ión de acuerdo a Higuchi.....	7
Figura 3. Estructura del Ácido Glicirricínico.....	10
Figura 4. Estructura de las nanocápsulas y nanoesferas biodegradables.....	14
Figura 5. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método emulsificación- evaporación.....	15
Figura 6. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método “salting-out” .....	18
Figura 7. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por desplazamiento del disolvente basado en el mecanismo de turbulencia interfacial, donde $\pi$ y $\gamma$ representan la presión superficial y la tensión interfacial, respectivamente.....	19
Figura 8. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método desplazamiento de solvente .....	20
Figura 9. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método emulsificación-difusión .....	21
Figura 10. Mecanismo de formación de nanopartículas por emulsificación-difusión propuesto por Quintanar <i>et al.</i> , (1998) (a) antes del paso de difusión; (b) durante el paso de difusión. ....	22
Figura 11. Diferentes estructuras nanocapsulares: (a) núcleo líquido, (b) matriz polimérica y (c) sustancia activa en dispersión molecular .....	24
Figura 12. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método de nanoprecipitación.....	25
Figura 13. Método de doble emulsión para la elaboración de nanocápsulas .....	27
Figura 14. Zetasizer Nano ZS que utiliza la técnica DLS para la medición del tamaño de partícula .....	28
Figura 15. Doble capa vista de dos maneras diferentes. Del lado izquierdo se observan los cambios en la densidad de la carga alrededor del coloide, del lado derecho la distribución de los iones positivos y negativos.....	30
Figura 16. Comportamiento del potencial Z con respecto al pH.....	31
Figura 17. Diagrama de flujo experimental.....	35
Figura 18. A) Catión del TBC; B) Estructura molecular del AG .....	37
Figura 19. Formación del par-ión AG-TBC .....	37



Figura 20. Esquematación del proceso de síntesis de las NP's por el método emulsificación-difusión .....	38
Figura 21. Constantes de disociación del AG.....	43
Figura 22. Tamaños de partícula obtenidos a las diferentes relaciones equimolares estudiadas .....	45
Figura 23. Potenciales $Z$ de las NP's obtenidos a las diferentes relaciones equimolares estudiadas .....	47
Figura 24. Micrografías que muestran la morfología de las NP's sintetizadas. A y B) NP's cargadas con AG, C) NP's Placebo .....	49
Figura 25. Termogramas de las muestras analizadas: A) PLGA 50/50; B) AG; C) PVAL; D) NP's PLGA 50/50 1:1/ NP's PLGA 50/50 2:1/NP's PLGA 50/50 3:1 .....	51
Figura 26. Curva de calibración para cuantificación del AG mediante HPLC y sus parámetros de regresión.....	55



ÍNDICE DE TABLAS.	Página
Tabla 1. Componentes y cantidades utilizadas para la síntesis de las NP's .....	36
Tabla 2. Curva de Calibración de AG .....	42
Tabla 3. Evaluación de tamaño de partícula para las NP's obtenidas .....	44
Tabla 4. Evaluación del Potencial Z para las NP's obtenidas .....	46
Tabla 5. Curva de calibración de AG .....	54
Tabla 6. Cuantificación del AG encapsulado en las NP's sintetizadas .....	55



## ABREVIATURAS.

AG.- Ácido Glicirricínico

TBC.- Cloruro de tetrabuilamonio

PLGA 50/50.- Ácido poli (láctico co-glicólico)

PVAL.- Alcohol Polivinílico

PLA.- Ácido poliláctico

HPLC.- Cromatografía de líquidos de alta resolución

DSC.- Calorimetría diferencial de barrido

DLS.- Dispersión dinámica de la luz

NP's.- Nanopartículas

Tg.- Temperatura de transición vitrea



## I. INTRODUCCIÓN.

La nanomedicina es la aplicación de las tecnologías a nanoescala para la práctica de la medicina. Es de gran utilidad para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades y para obtener una mayor comprensión de los complejos mecanismos de las enfermedades (Morrow, KJ Jr., Bawa, R., Wei, C., 2007). En la actualidad la nanomedicina implica la detección de partículas, la administración de sistemas liberadores de fármacos y biomateriales con propiedades inusuales de fuerza, dureza, reducción de fricción y biocompatibilidad. Una de sus áreas de mayor desarrollo es el uso de nanopartículas como vehículos para el transporte de fármacos que permitiría una absorción más rápida, liberación de dosis de forma controlada y mayor eficacia del fármaco. Se han investigado nuevos tratamientos con nanomateriales, tales como los dendrímeros, liposomas, micelas, nanopartículas inorgánicas y nanopartículas poliméricas. Como se afirma por diferentes autores, existen sistemas de nanopartículas prometedoras debido a su capacidad de liberar fármacos, su tamaño subcelular permite relativamente una mayor captación intracelular que otros sistemas de partículas (Furtado, V., Legrand, P., Gulikb, A., Bourdonc, O., Gref, R., Labarrea, D., Barratt, G., 2001), mayor estabilidad y biocompatibilidad. Las nanopartículas poliméricas han sido estudiadas extensamente como transportadores de fármacos en el campo farmacéutico y diferentes autores han publicado información sobre los mecanismos de formación de estas y las técnicas para su preparación (Mora, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2009)

La investigación en nanomateriales para la administración de fármacos y terapias ha tratado de avanzar hacia un nuevo nivel tecnológico no alcanzado antes, con resultados de investigación innovadores orientados a satisfacer los retos que tiene la industria farmacéutica. Tales retos se han convertido en problemas que la han afectado a ella y a sus productos por mucho tiempo (Brewer, M., Zhang, T., Dong, W., Rutherford, M., Tian, Z., 2007). A esto se suma la importancia de incorporar opciones terapéuticas contra enfermedades, como lo es el caso de la Regaliz. Son notables sus propiedades terapéuticas, como planta medicinal se conoce desde hace mucho tiempo. Es una planta conocida por estar dotada de una muy baja toxicidad. Ocupa una de las primeras opciones como planta medicinal (Obolentseva, G.V., Litvinenko, V.I., Ammosov, A.S., Popova, T.P., 1999). Su composición es de suma importancia, de entre



pectinas, polisacáridos, azúcares simples, aminoácidos, entre otros, sobresale el ácido glicirricínico (AG) o glicirricina, la saponina triterpeno más importante de la raíz de la Regaliz, la cual está presente en concentraciones que van hasta un 15% (Fenwick, G.R., 1990). La gran importancia de este triterpeno recae en su amplia gama de propiedades farmacológicas: antiinflamatorio, antiulceroso, antialérgico, antioxidante, antitumoral y antiviral (Raffaello, P., 2009), pero su alta hidrosolubilidad no permite su fácil encapsulación. Lograr encapsular un fármaco con esta característica por medio de un método convencional no es fácil. Para poder lograrlo se diseñó un método que implica el uso de la técnica de emulsificación-difusión en conjunto con la técnica del par-ión. Esta técnica consiste en la lipofilización del AG mediante la formación de un par-iónico el cual se produce por atracciones electrostáticas entre el fármaco y el correcto contra-ión, de esta manera se mejora la partición del AG en solventes orgánicos y por lo tanto se incrementa la cantidad de AG disponible para ser encapsulado.



## II. MARCO TEÓRICO.

### 1. Par-ión.

Con los métodos convencionales de elaboración de NP's se obtienen bajos niveles en la eficiencia de encapsulación de fármacos hidrosolubles; sin embargo, investigaciones previas han demostrado que los fármacos ionizados con una solubilidad alta en agua pueden ser lipofilizados por la formación de un par-ión, con el contra-ión apropiado. Este tipo de asociación puede resultar prometedora para varias aplicaciones biofarmacéuticas, analíticas y tecnológicas (Quintanar, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., 1997).

#### 1.1. Definición y naturaleza.

Los pares-iónicos pueden ser definidos como especies neutras formadas por atracciones electrostáticas entre iones cargados en solución, los cuales son a menudo lo suficientemente lipofílicos para disolverse en disolventes orgánicos (H. Sadek y R.M. Fuoss., 1954).

Cabe destacar que la formación de un par ión se debe únicamente a la llamada interacción de esfera externa y a pesar de que esta interacción molecular puede ser descrita de acuerdo con la ley de acción de masas, no se forma ningún tipo de enlace químico. La notación general  $A^+$ ,  $B^-$  se utiliza para describir a los productos del par-ión el cual existe como una especie estable, termodinámicamente distinta, cambiando continuamente su asociación. Está claro, pues, que cualquier molécula cargada en solución, bajo ciertas condiciones, puede formar un par-ión, con un ión con carga opuesta. En el caso de los péptidos, estos presentan múltiples sitios ionizables, dependiendo de su estructura primaria y del pH de la solución, son capaces de interactuar *in vitro* o *in vivo* con los apropiados contra-iones. La formación de un par-ión peptídico resulta en el “enterramiento” de las cargas involucradas y la alteración de propiedades físicas, por ejemplo, la lipoficidad (Kraus, C.A., 1956).



## 1.2.Historia.

La primera teoría satisfactoria de soluciones iónicas fue propuesta por Arrhenius en 1887. El hizo la suposición de que los electrólitos están completamente disociados en sus iones cuando la solución está completamente diluida. Arrhenius atribuye la disminución de la conductancia equivalente, con el aumento de la concentración y con la asociación de los iones en moléculas neutras. Arrhenius y sus principios básicos de las soluciones electrolíticas marcaron un gran avance en el campo electrolítico y algunos de estos son todavía válidos hoy en día. Sin embargo, la aplicación de estos principios fue limitada para soluciones de ácidos y bases débiles en agua (Martin, A., 1993).

Antes del año 1923 la solución al problema de los electrolitos fue encontrada por Debye y Hückel. Ellos asumían que los electrólitos fuertes se disociaban completamente en sus iones en una solución acuosa y que las desviaciones de las soluciones electrolíticas, expresadas en términos de actividad, coeficientes de actividad, y fuerzas iónicas, se debían a los efectos electrostáticos de los iones de carga opuesta. Sin embargo, la teoría de Debye-Hückel de la disociación completa no explica la baja conductancia de electrólitos fuertes en soluciones no acuosas y no se extendió para incluir a todos los disolventes (Quintanar *et al.*, 1997).

En 1926, Bjerrum desarrolló una teoría que tenía en cuenta la interacción de los iones a corta distancia. Él introdujo el concepto de par-ión y demostró como la constante de acción de masas en equilibrio entre los iones y pares-iónicos es dependiente de la constante dieléctrica del disolvente así como de la temperatura y del tamaño de los iones. La teoría de Bjerrum fue fuertemente respaldada por el trabajo de Kraus a finales de los años treinta y cuarenta (Kraus, C.A., 1956).

Loa autores Atherton y Weissman (1961) investigaron la existencia de los pares-iónicos, utilizando espectroscopia electrónica de resonancia spin, y demostraron la asociación de un catión de sodio con un anión radical de naftaleno. La formación del par-ión es ahora un hecho aceptado, al menos en medios no acuosos (Quintanar *et al.*, 1997).





### 1.3. Formación del par-ión.

Un par-ión puede existir en dos formas: como un par-ión “apretado o íntimo”, o como un par-ión suelto o separado por el solvente, dependiendo de la naturaleza de la interacción solvente-ión (R.C. Roberts y M. Szwsarc., 1965). Los iones libres en solución (Figura 1) están rodeados por moléculas de solvente polarizadas por los campos eléctricos generados por los iones cargados. Una polarización lo suficientemente fuerte e interacción solvente-ión resulta de la formación, alrededor de cada ión, de una cubierta ajustada de solvatación (R.C. Roberts y M. Szwsarc., 1965). La presencia de esta cubierta ajustada de solvatación se refleja en el hecho de que el radio de Stokes del ión solvatado es mayor que la del ión desnudo o descubierto.

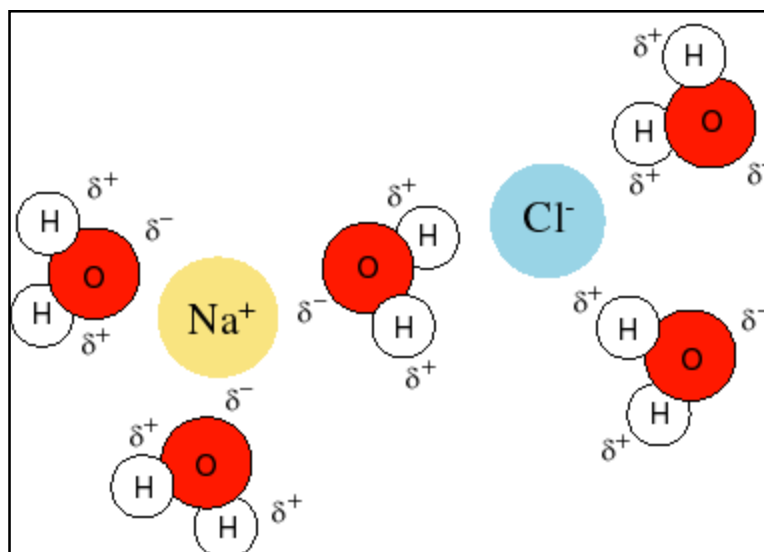


Figura 1. Solvatación de iones. (Accedido el 01 de Agosto, 2015 desde [http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm341/lecture\\_set6/lecture%20set6.html](http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm341/lecture_set6/lecture%20set6.html) )

Un ión que posee una cubierta de solvatación ajustada puede acercarse a un contra-ión sin obstáculos hasta que su cubierta de solvatación contacte con la del contra-ión. A partir de entonces, la asociación mantiene su estructura de forma suelta, como un par-ión separado por el solvente, o las moléculas del solvente separadas de la asociación están apretadas y se forma una interacción par-ión de contacto ajustado. Esto implica que la interacción par-ión separada



por el solvente puede existir sólo en los medios en los que los iones libres adquieren cubiertas de solvatación ajustadas; de lo contrario se produce un contacto apretado en la interacción. El concepto original de Bjerrum de los pares-iónicos solvatados que se mantienen unidos por atracción coulombica, en un solvente de una constante dieléctrica baja, sigue siendo válido a pesar de la presencia de una cubierta de solvatación. Por ejemplo, si los iones solvatados están apareados con un voluminoso contra-ión, la ganancia en energía coulombica derivada de la proximidad de las parejas en estrecha proximidad no puede ser suficiente para llevar a cabo la destrucción de la cubierta de solvatación. Por lo tanto, existen tales pares sólo en forma suelta (Winstein, S., Clippinger, E., Fainberg, A., Robinson, G., 1954).

#### 1.4. Solvatación y clasificación del par-ión.

La formación de pares iónicos es solo posible si los iones se acercan entre sí y llegan a una distancia de separación crítica dada por la ecuación de Bjerrum:

$$d = (Z^+ + Z^-)e^2/2\epsilon kT$$

Donde  $Z^+$  y  $Z^-$  son las cargas iónicas,  $e$  es la carga del electrón,  $\epsilon$  la constante dieléctrica,  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $d$  es la distancia de separación. La ecuación muestra la importancia de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) en la formación del par-ión: en consecuencia un disolvente con una constante dieléctrica alta, tal como el agua ( $\epsilon= 78.5$ ) será desfavorable para la formación de un par ión, pero esto no significa que sea imposible. Por otra parte, la interacción se vuelve cada vez más importante en solventes con  $\epsilon < 40$ . Esta regla es aplicable para un gran número de sistemas de extracción de pares iónicos, algunos autores han mostrado que otras contribuciones no coulombicas pueden ser involucradas en la asociación iónica, por ejemplo enlaces de hidrógeno y la lipofilidad de los iones (Quintanar *et al.*, 1997). Los pares iónicos pueden ser clasificados (Figura 2), de acuerdo con el grado de accesibilidad de la carga, dentro de tres diferentes categorías:

En el primer caso, se asume que el par-ión tiene un catión el cual es grande y lipofílico, se espera que la pequeña superficie externa pueda llevar una carga relativamente negativa por unidad de superficie (mostrado por la sombra externa en la figura 2). Este tipo de sistemas



pueden ser solvatados efectivamente por moléculas lipofílicas que tengan una superficie cargada positivamente, por ejemplo las moléculas dipolares con protones ácidos tales como el cloroformo, fenoles y alcoholes (Higuchi, T., Michaelis, A., Hurwitz, A., 1967).

Dado que las moléculas de solvatación unidas tendrían su extremo polar enterrado junto al anión del par-ión, el aspecto que presenta el solvente rodeante por la solvatación del par-ión sería la de un agregado relativamente no polar.

En el segundo caso, la situación es al revés, el par-ión tiene su carga catiónica en gran parte expuesta. Se puede esperar que las especies de solvatación que contienen sitios nucleófilicos sean particularmente eficaces para este tipo de pares iónicos, por ejemplo: los ésteres, cetonas, amidas y ésteres de fosfatos. El tercer caso es el del par-ión con las cargas profundamente enlazadas o enterradas. Al no tener una superficie expuesta eléctricamente desequilibrada, se podría esperar que no se requiriera de la solvatación para poder ser extraída fácilmente por solventes no polares (Higuchi, T., *et al.*, 1967).

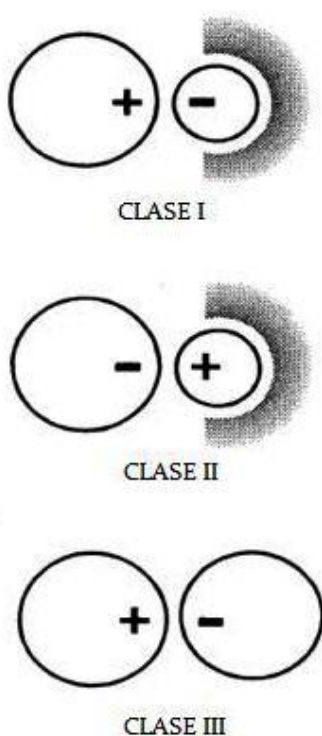
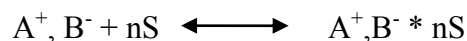


Figura 2. Clasificación del par-ión de acuerdo a Higuchi. (Quintanar *et al.*, 1997)



Higuchi atribuye la solubilidad del par-ión a la formación de complejos que involucran la asociación con moléculas del solvente, que participan en la formación del par-ión en la fase orgánica. Esta solvatación se puede escribir como un equilibrio:



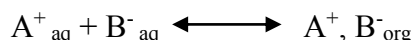
Donde  $A^+$  y  $B^-$  son iones cargados opuestamente en solución y  $nS$  es el número de moléculas de solvente que están complejadas con el par-ión. Esta solvatación ha sido comprobada por medio del uso de técnicas infrarrojas, resonancia magnética nuclear y espectroscopia de resonancia de espín electrónico (Higuchi *et al.*, 1967).

#### 1.5. Pares-iónicos en sistemas acuosos.

Aunque la formación del par-ión ha sido considerada solo para solventes con una baja constante dieléctrica, la existencia de un par-ión en agua o en otro solvente muy estructurado es posible donde los iones involucrados son en gran parte hidrofóbicos (Lee, S. J., Kim, S. W., 1997). En este caso, el apareamiento iónico se debe a un efecto mediado por el solvente en lugar de una interacción electrostática. Si tanto el catión como el anión son especies hidrofóbicas largas, la estructura de agua con puentes de hidrógeno les obliga a estar juntos para maximizar las interacciones agua-agua y para reducir al mínimo la perturbación estructural.

#### 1.6. Extracción del par-ión.

La más importante aplicación del concepto del par-ión en el área farmacéutica es el aislamiento y determinación de las moléculas de fármacos. La extracción del par-ión puede ser descrita como la extracción de un complejo de dos iones cargados opuestamente en una fase acuosa por un solvente que no es miscible en agua (fase orgánica) y este equilibrio se describe de la siguiente manera:



La extracción de un fármaco puede ser regulada por la naturaleza y la concentración del contra-ión así como por la naturaleza del solvente orgánico. Se debe de notar que el solvente es un componente en el cual se lleva a cabo la formación del par-ión, y que su selección influirá en el grado de extracción. En la mayoría de los estudios los solventes clorados tales como el cloroformo y el diclorometano son utilizados como fase orgánica. Estos solventes exhiben una baja constante dieléctrica y son donadores de hidrógenos, lo que les hace particularmente adecuados para la extracción de varios pares-iónicos. Además, la incidencia de reacciones secundarias tales como la disociación y polimerización de los pares-iónicos es baja. Cuando se observa una mala extracción con solventes clorados, debido a la alta hidrofiliidad de los componentes del par-ión, se recomienda el uso de solventes mas polares (por ejemplo, los alcoholes) los cuales forman uniones con el par-ión en la fase orgánica (Quintanar *et al.*, 1997). En la actualidad la aplicación principal de los pares iónicos es dentro del análisis farmacéutico pues mejora la partición de fármacos orgánicos en solventes acuosos o en mezclas de solventes, es muy utilizado dentro del análisis por HPLC.

## 2. Ácido Glicirricínico.

### 2.1 Generalidades y propiedades farmacológicas.

El Ácido Glicirricínico (AG) (figura 3), es un producto natural, una saponina, conocida por estar dotada de una toxicidad muy baja tanto *in vitro* como en modelos *in vivo*. Se trata de un conjugado de una molécula de un triterpeno y dos moléculas de ácido glucurónico. El AG es el glucósido triterpeno bioactivo principal del extracto de la raíz de regaliz y posee una amplia gama de propiedades farmacológicas: antiinflamatorio, antiulceroso, antialérgico, antioxidante, antitumoral, antiviral (Pompei, R., Laconi, S., Ingianni, A., 2009). El contenido del AG dentro de la raíz de regaliz varía de 2 a 24% del peso seco. El AG es uno de los principales compuesto naturales utilizados en ensayos clínicos de hepatitis activa crónica viral y las infecciones por VIH, y su sal de monoamonio se utiliza como remedio antiinflamatorio y antialérgico (Pompei *et al.*, 2009).



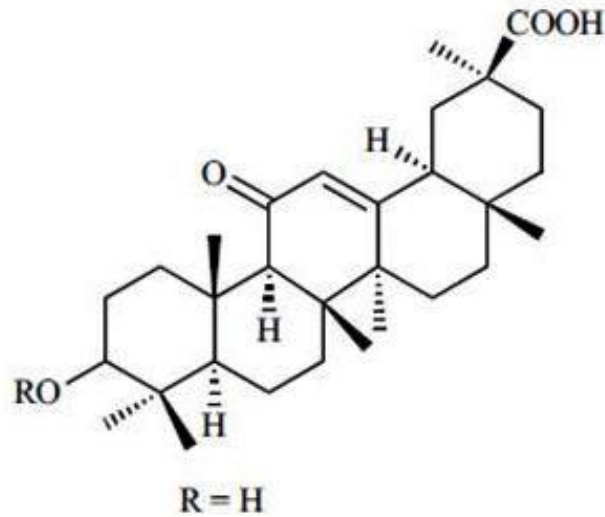


Figura 3. Estructura del Ácido Glicirricínico (Pompei *et al.*, 2009)

Las propiedades biológicas y farmacológicas de los compuestos contenidos en las plantas medicinales están relacionadas con su similitud estructural a los metabolitos y sustratos presentes en los organismos humanos y animales. La molécula del AG comprende tanto una parte hidrofílica (las dos moléculas de ácido glucorónico) y un fragmento hidrofóbico (ácido glicirricínico) (Obolentseva, G. V., Litvinenko, V. I., Ammosov, A. S., Popova, T. P., Sampiev, A. M., 1999)

El AG presenta una actividad antiinflamatoria y antiulcerosa significativa ya que sus derivados afectan (de forma similar a los antiinflamatorios no esteroideos) el ciclo del ácido araquidónico, lo que inhibe la biosíntesis de prostaglandinas. Los derivados del AG por lo general no presentan un efecto ulcerógeno, que es el efecto secundario no deseado de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos ampliamente usados (tales como el ácido acético salicílico e indometacina,) que provocan daño en la pared estomacal (Obolentseva *et al.*, 1999). Es por esta razón que el AG puede ser utilizado como otra opción por su efecto antiinflamatorio. Aunque en el mercado mexicano no existen medicamentos antiinflamatorios que utilicen al AG, su efecto antiviral sí, indicado en contra del virus del herpes simple (VSV1 y HSV2).



### 3. Nanotecnología.

#### 3.1. Definición.

La nanotecnología es un término general utilizado para definir los productos, procesos y propiedades en la escala de nanométrica que han resultado de la convergencia de la física, química, y ciencias de la vida. La Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI, por sus siglas en inglés) define la nanotecnología como la investigación y el desarrollo a nivel atómico, molecular y macromolecular en la gama por debajo de los 100 nm (0.1-100 nm) para crear estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades funcionales (Morrow, K., Bawa, R., Wei, C., 2007). Bawa (2005) en cambio, define a la nanotecnología de una manera más práctica como:

El diseño, la caracterización, la producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas por manipulación controlada de tamaño y forma a la escala nanométrica (escala atómica, molecular y macromolecular) que produce estructuras, dispositivos y sistemas con al menos una nueva característica o propiedad" (Morrow *et al.*, 2007).

#### 3.2. Beneficios de la nanotecnología.

La nanotecnología se aplica al descubrimiento y desarrollo de fármacos o medicamentos y al procesamiento también. El proceso de descubrimiento de fármacos es largo y costoso (de 8-14 años a un costo de \$1 billón de dólares). La nanotecnología se traducirá en el diseño y desarrollo de fármacos, además mejorará el proceso de descubrimiento de estos a través de la miniaturización, automatización, la velocidad y la fiabilidad de los ensayos (Bawa *et al.*, 2005). La nanotecnología dará lugar a la introducción más rápida de nuevos productos rentables para el mercado. En el área de los nanodiagnósticos, mucha de la investigación se ha centrado en biochips, dispositivos que contienen numerosos sensores biológicos y sobre los cuales la nanotecnología ha sido propuesta para aumentar la capacidad de tales sensores y proporcionar mecanismos de detección alternativos (Bawa *et al.*, 2005).



### 3.3. Nanomedicina.

#### 3.3.1. Definición.

La nanomedicina se define como la supervisión, reparación, construcción, y el control de sistemas biológicos humanos a nivel molecular, utilizando ingeniería, nanodispositivos y nanoestructuras. La nanomedicina adopta los conceptos de manipulación a nanoescala y el conjunto de las aplicaciones a nivel clínico de las ciencias médicas. En un sentido amplio, la nanomedicina es la aplicación de las tecnologías de nanoescala para la práctica de la medicina (Webster., 2005).

#### 3.3.2. Usos de la nanomedicina.

La nanomedicina se utiliza para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y para obtener una mayor comprensión de los complejos mecanismos de estas, aunque la nanotecnología es una disciplina establecida, la nanomedicina comercial (con su amplia gama de ideas, hipótesis, conceptos, y dispositivos clínicos no desarrollados) se encuentra todavía en una etapa incipiente de desarrollo (Morrow *et al.*, 2005).

#### 3.3.3. Beneficios y aplicaciones de la nanomedicina.

Las aplicaciones de la nanotecnología a las ciencias médicas mantienen una gran cantidad de promesas, la investigación en nanomateriales para la administración de fármacos y terapias ha tratado de avanzar hacia un nuevo nivel tecnológico no alcanzado antes, con resultados de investigación innovadores orientados a satisfacer los muchos retos de los productos farmacéuticos, terapéuticos en relación a la liberación de fármacos (Brewer *et al.*, 2007). La búsqueda para resolver los problemas de biodisponibilidad, solubilidad, estabilidad química y la disminución de los efectos secundarios provocados por los tratamientos farmacológicos se persigue ferozmente y se ve prometedora por la evolución de la investigación en la nanomedicina (Brewer *et al.*, 2007). En la actualidad, de la nanomedicina se obtienen beneficios que implican la detección de partículas, la mejora en la administración de fármacos





y biomateriales nano fabricados con propiedades inusuales de fuerza, dureza, reducción de fricción, y biocompatibilidad mejorada. Un ejemplo de su aplicación es la inversión en el desarrollo de nanopartículas que se ha vuelto una prioridad por su gran potencial para ser utilizadas como transportadoras o vehículos de entrega de fármacos que permitirían una absorción más rápida y una mayor eficacia. (Morrow *et al.*, 2005).

### 3.4. Nanopartículas.

#### 3.4.1. Definición.

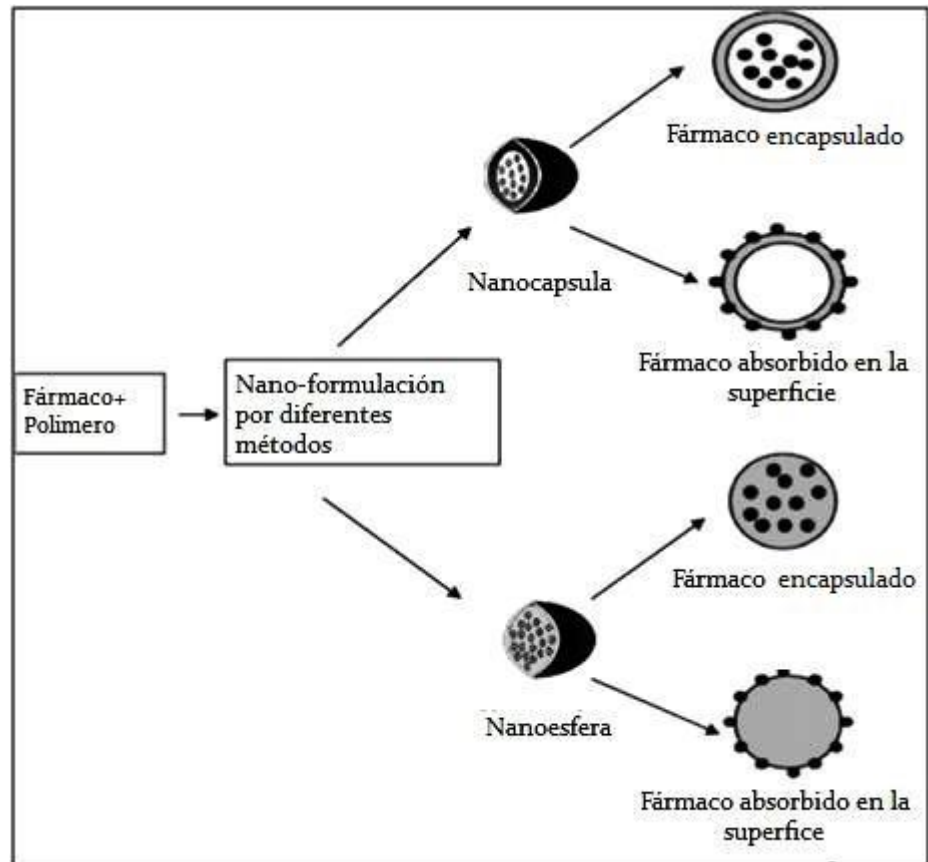
Las Nanopartículas (NP's) se definen como partículas sólidas coloidales que contienen una sustancia activa, que se producen por medios mecánicos o químicos. El límite de tamaño menor puede estar alrededor de 5 – 10 nm y el límite superior de aproximadamente 1000 nm (1  $\mu\text{m}$ ). Las NP's incluyen tanto nanoesferas como nanocápsulas, pero la diferencia entre estas dos radica en su morfología. (Quintanar, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E. 1998).

La nanoencapsulación de fármacos incrementa su eficacia, especificidad, tolerabilidad y su índice terapéutico (Kumari *et al.*, 2009). Las NP's poliméricas se han estudiado ampliamente como vehículos de fármacos en los campos farmacéuticos y médicos, debido a que se muestran prometedoras como sistemas de administración de fármacos por sus propiedades de liberación sostenida y controlada, tamaño nanométrico, y la biocompatibilidad con el tejido y las células. Estas NP's poliméricas (Figura 4) son además frecuentemente utilizadas para mejorar el valor terapéutico de varios fármacos solubles o insolubles en agua, para mejorar la biodisponibilidad, la solubilidad y el tiempo de retención o de liberación. Esta formulación fármaco-nanopartícula reduce los riesgos de toxicidad (Kumari *et al.*, 2010).

A pesar de que todos los métodos permiten la preparación de nanoesferas, sólo los métodos de desplazamiento de solvente y más recientemente el método de Emulsificación-difusión permiten la preparación de nanocápsulas (D. Quintanar *et al.*, 1998).



Figura 4. Estructura de las nanocápsulas y nanoesferas biodegradables (Kumari *et al.*, 2010).



### 3.4.2. Nanoesferas.

#### 3.4.2.1. Definición.

Las nanoesferas son NP's que están formadas por una matriz polimérica densa, en la cual el fármaco se encuentra atrapado en esta matriz, o se puede encontrar adsorbido en la superficie polimérica.

#### 3.4.2.2. Métodos de preparación.

Las nanoesferas se pueden preparar a partir de polímeros preformados por medio de 4 métodos: emulsificación- evaporación, desplazamiento de solvente, "salting-out" y emulsificación-difusión. Estos métodos son similares en que implican una fase orgánica que contiene los componentes de las nanoesferas, la que funciona como una fase interna durante la



preparación y una solución acuosa que contiene estabilizadores que constituyen el medio de dispersión (Quintanar et al., 1998).

#### 3.4.2.2.1. Emulsificación- evaporación.

En este método (Figura 5) el polímero preformado y el fármaco se disuelven en un solvente orgánico inmiscible en agua, que se emulsiona en una solución acuosa. Esta emulsión se expone entonces a una fuente de alta energía como dispositivos de ultrasonido o se pasa a través de homogeneizadores para reducir el tamaño del glóbulo. Posteriormente, se realiza la eliminación del solvente orgánico, por calor, vacío, o ambos, dando como resultado la formación de las nanoesferas (Quintanar *et al.*, 1998).

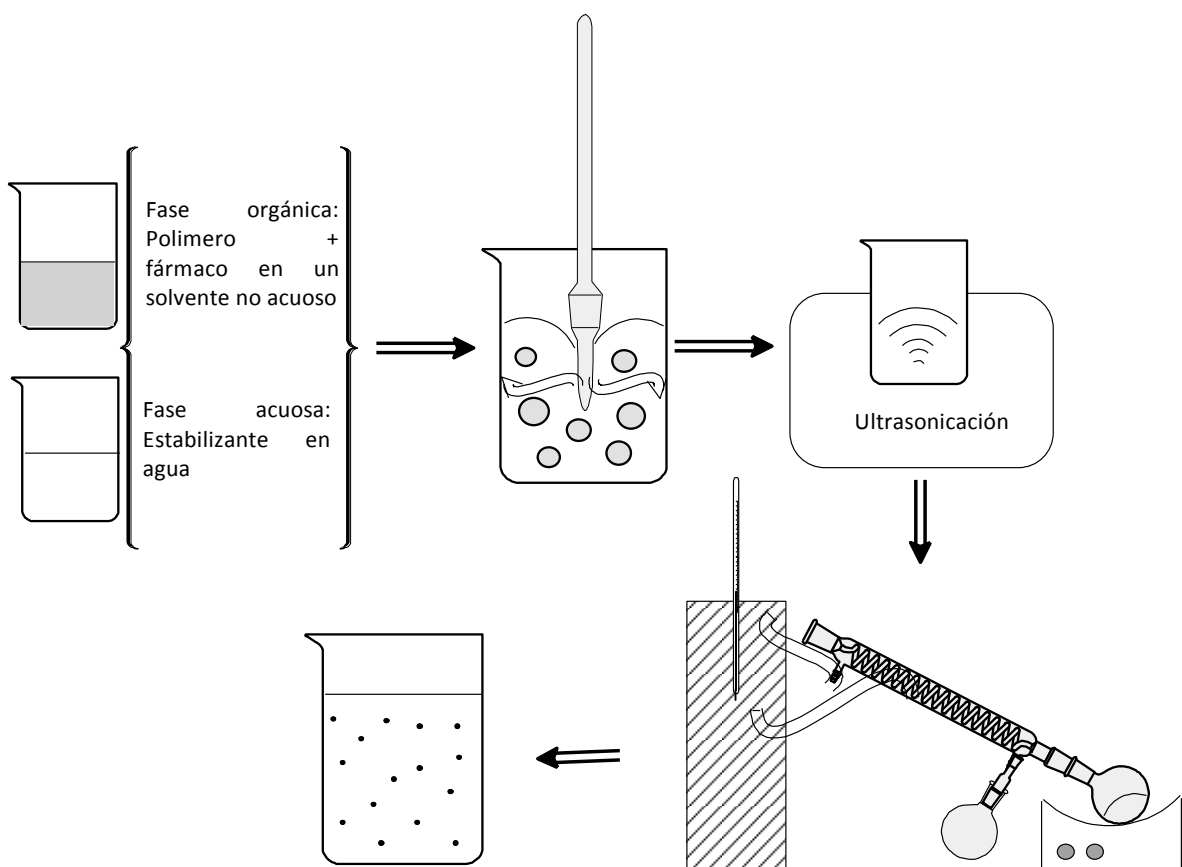


Figura 5. Representación esquemática de la preparación de nanoesferas por el método emulsificación- evaporación.



El polímero se precipita en forma de nanoesferas en las que el fármaco se dispersa finamente en la red de la matriz polimérica. (Pinto, C., Neufeld, R., Ribeiro, A., Veiga, F., 2006).

Los solventes más utilizados como fase orgánica en este método son el cloroformo y el cloruro de metileno debido a su insolubilidad en agua, a su fácil emulsificación, a sus propiedades solubilizantes y su bajo punto de ebullición. Sin embargo, la desventaja de estos solventes es su toxicidad. En cuanto al agente estabilizante el alcohol polivinílico (PVAL) y la albúmina se han utilizado preferentemente como estabilizadores. El PVAL ha demostrado ser un excelente estabilizador para preparar NP's, no sólo por emulsificación-evaporación, sino también con los métodos estudiados más adelante. Por otra parte, es uno de los pocos estabilizadores que evita que las NP's se agreguen durante los pasos posteriores a su preparación (por ejemplo, la liofilización). Sin embargo, el PVAL tiene la desventaja de no ser aceptado para la administración intravenosa. El tipo y la concentración de estabilizador son condiciones que afectan el tamaño de partícula y la polidispersidad para esta técnica (Quintanar *et al.*, 1998).

El tamaño se puede controlar mediante el ajuste de la velocidad de agitación, el tipo y cantidad de agente de dispersión, la viscosidad de las fases orgánica y acuosa, y la temperatura (C. Pinto *et al.*, 2006). A pesar de que se pueden utilizar diferentes tipos de emulsiones, las emulsiones aceite/agua son de mayor interés debido a que utilizan agua como la fase externa, lo que simplifica y mejora así la economía del proceso, ya que elimina la necesidad de reciclaje, facilita la etapa de lavado y minimiza la aglomeración (Pinto *et al.*, 2006). En cuanto a los polímeros utilizados más comúnmente son el PLA, PLGA, etilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, poli ( $\epsilon$  - caprolactona) y poli ( $\beta$ -hidroxibutirato), sin embargo, este método sólo puede aplicarse a fármacos liposolubles.

#### 3.4.2.2.2. “Salting-Out”.

Este método (Figura 6) se basa en la separación de un solvente miscible en agua a partir de soluciones acuosas por medio de un efecto de desplazamiento salino. La acetona se elige generalmente como el solvente miscible en agua debido a sus propiedades solubilizantes y su conocida separación de las soluciones acuosas por desplazamiento salino con electrolitos



(Matkovich., 1973). Es por esto que el polímero y el fármaco se disuelven en acetona y esta solución se emulsiona con agitación mecánica vigorosa en un gel acuoso que contiene el agente de desplazamiento salino y un estabilizador. Esta emulsión O/W se diluye con un volumen suficiente de agua o soluciones acuosas para mejorar la difusión de acetona a la fase acuosa, induciendo de este modo la formación de las nanoesferas. El disolvente y el agente de desplazamiento salino son posteriormente eliminados por filtración de flujo cruzado. La difusión de la acetona a partir de los glóbulos durante la etapa de dilución puede generar turbulencia interfacial y la agregación del polímero en nanoesferas. Las principales ventajas de este método son la incorporación de altas cantidades de polímero y fármaco, los excelentes rendimientos que se obtienen, y la fácil ampliación a gran escala del proceso (Quintanar *et al.*, 1998).

Por otro lado, este método se limita a fármacos lipófilicos, a agentes de desplazamiento salino que permitan la separación de fases sin precipitaciones, y estabilizadores solubles compatibles con soluciones acuosas saturadas y su no coacervación en presencia del solvente. Los agentes de desplazamiento salino para la acetona son los electrolitos del cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, y acetato de magnesio (Allémann, E., Gurny, R., Doelker, E., 1992) y un no electrólito, como la sacarosa (Matkovich., 1973). La selección del agente de desplazamiento salino es importante, ya que puede jugar un papel importante en la eficacia de atrapamiento del fármaco. Con respecto a los estabilizadores, han sido utilizados con éxito el PVAL, polivinilpirrolidona, y hidroxietilcelulosa (Quintanar *et al.*, 1998).



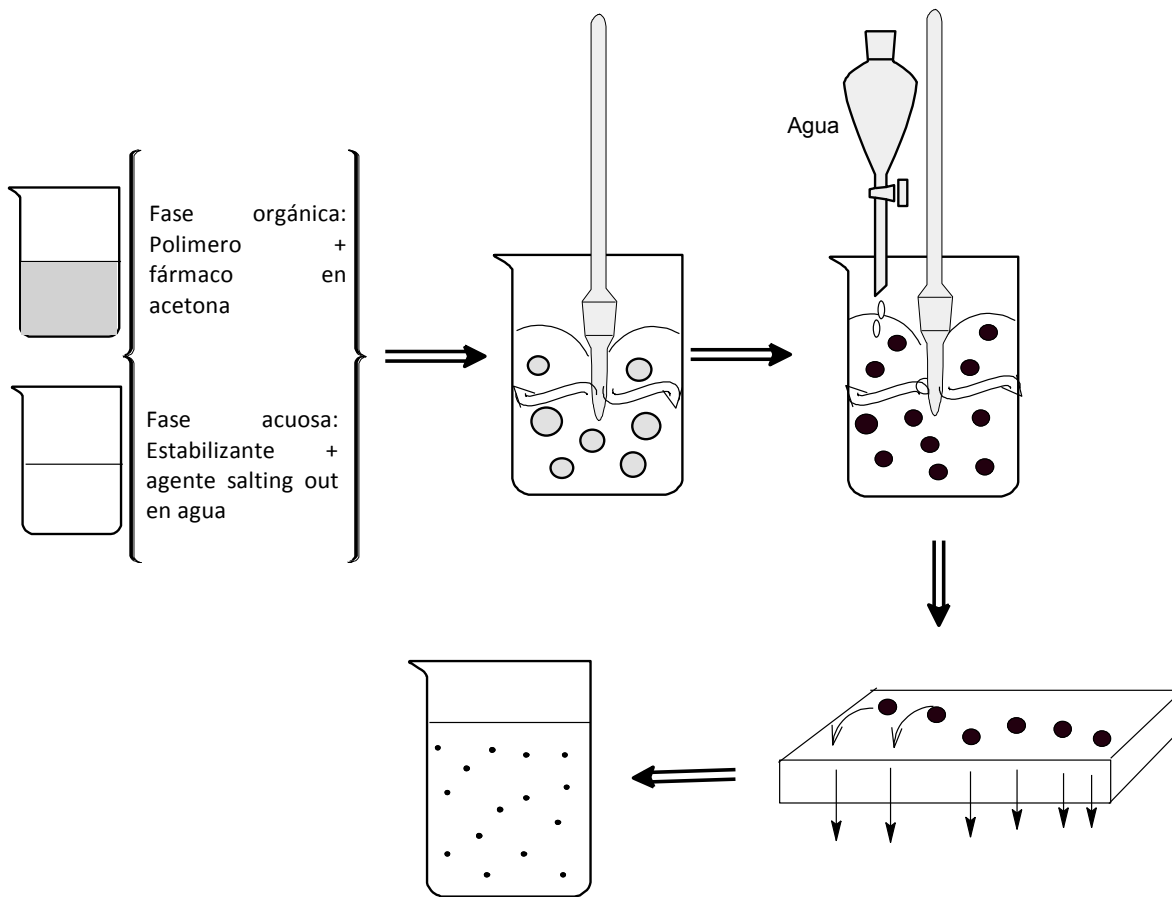


Figura 6. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método “salting-out”.

Cuando se incrementa la concentración de PVAL en la fase externa de la emulsión, se observa una disminución en el tamaño de partícula. Un aumento en la agitación y concentración del polímero permite sólo una leve reducción del tamaño de partícula. En contraste, la relación de fase interna-externa no parece tener influencia significativa en el tamaño (Allémann *et al.*, 1992).



### 3.4.2.2.3. Desplazamiento de solvente.

Como se mencionó anteriormente, por medio de los dos siguientes métodos se pueden elaborar tanto nanocápsulas como nanoesferas. El método desplazamiento de solvente es también conocido como nanoprecipitación (Figura 8). En este proceso, el polímero, el fármaco, y opcionalmente un estabilizador lipófilico se disuelven en un solvente polar semi-miscible en agua, tal como acetona o etanol. Esta solución se vierte en una solución acuosa que contiene un estabilizador (por ejemplo, PVAL o poloxámero 188) bajo agitación magnética. Las NP's se forman instantáneamente por la rápida difusión del solvente, que se elimina bajo presión reducida. El mecanismo de formación de las NP's por este método se debe a la turbulencia interfacial generada durante el desplazamiento del solvente orgánico (Figura 7). Posteriormente se produce una difusión violenta debido a la miscibilidad entre los dos solventes (Quintanar *et al.*, 1998). Este mecanismo se explica a continuación:

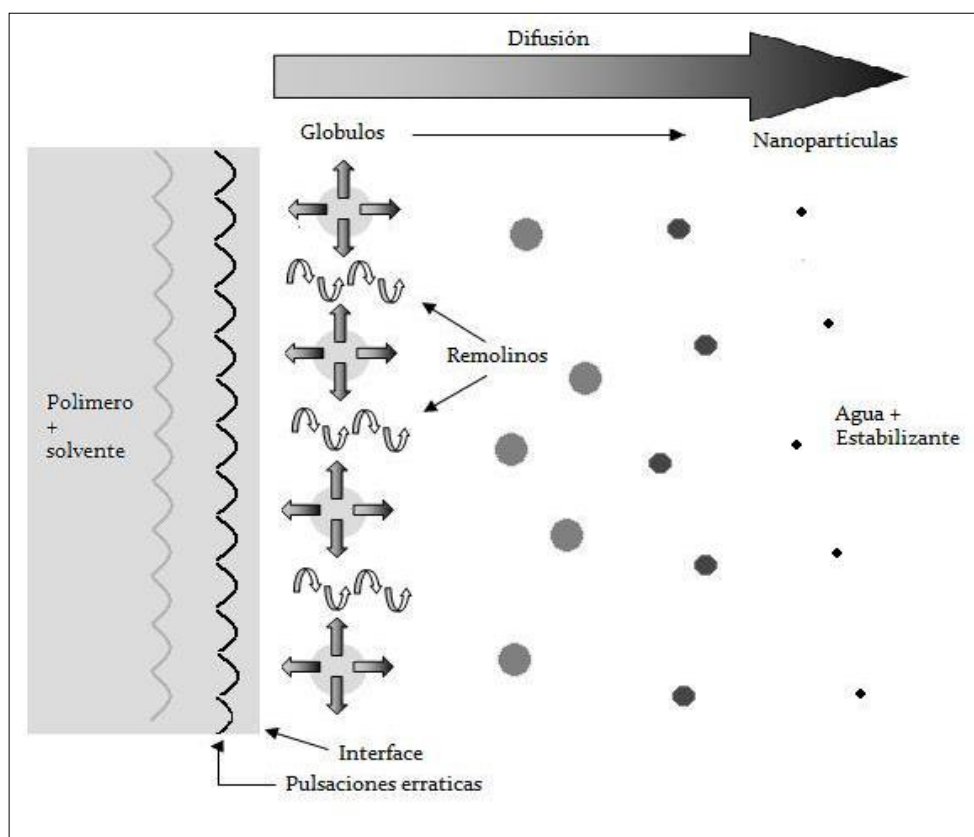


Figura 7. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por desplazamiento del disolvente basado en el mecanismo de turbulencia interfacial, donde  $\pi$  y  $\gamma$  representan la presión superficial y la tensión interfacial, respectivamente propuesto por Quintanar *et al.*, 1998.



Los glóbulos del solvente de la fase orgánica, probablemente de tamaño nanométrico, son arrancados de la interfase. Estos glóbulos se estabilizan rápidamente por el agente estabilizante, hasta que la difusión del solvente es completada y se produce la agregación de polímero (Quintanar *et al.*, 1998).

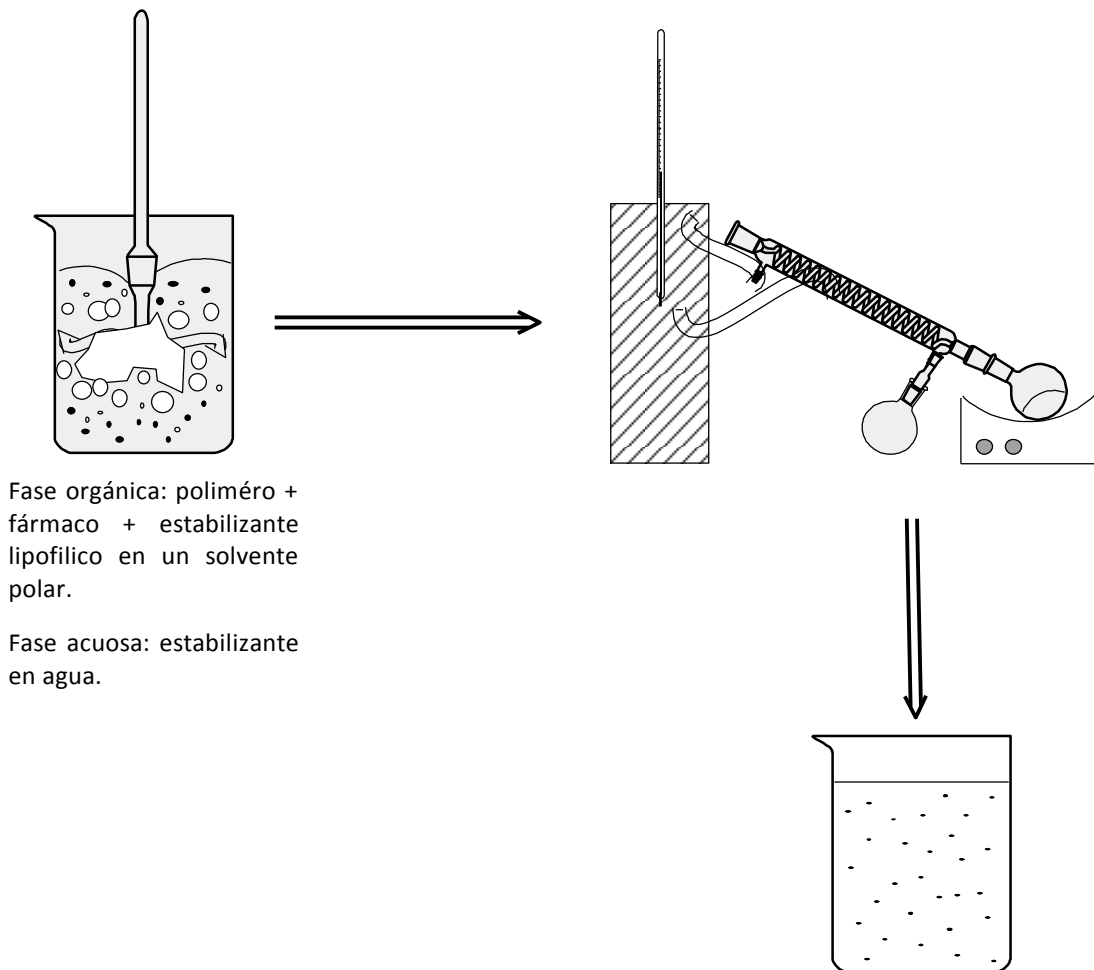


Figura 8. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas y nanoesferas por el método Desplazamiento de solvente.

#### 3.4.2.2.4. Emulsificación-difusión.

Este método (Figura 9) puede ser considerado una modificación del procedimiento “salting-out”, ya que evita el uso de sales y por lo tanto, pasos de purificación. Este método implica el uso de un solvente parcialmente soluble en agua, que es previamente saturado en agua para asegurar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. El





polímero es disuelto en el solvente saturado con agua, y esta fase orgánica se emulsiona, bajo una vigorosa agitación, en una solución acuosa que contiene un estabilizador. Para producir la precipitación del polímero y la consiguiente formación de NP's, es necesario promover la difusión del solvente orgánico de la fase interna a la externa, esto se provoca con la adición de agua en el sistema, dando como resultado la formación de las NP's (Pinto *et al.*, 2006). También este proceso de difusión se puede provocar por la evaporación constante del solvente orgánico, de hecho, algunos autores que utilizan esto llaman al método como emulsificación- evaporación, el cual se diferencia con el método normal solo en la manera de provocar la difusión (Pinto *et al.*, 2006).

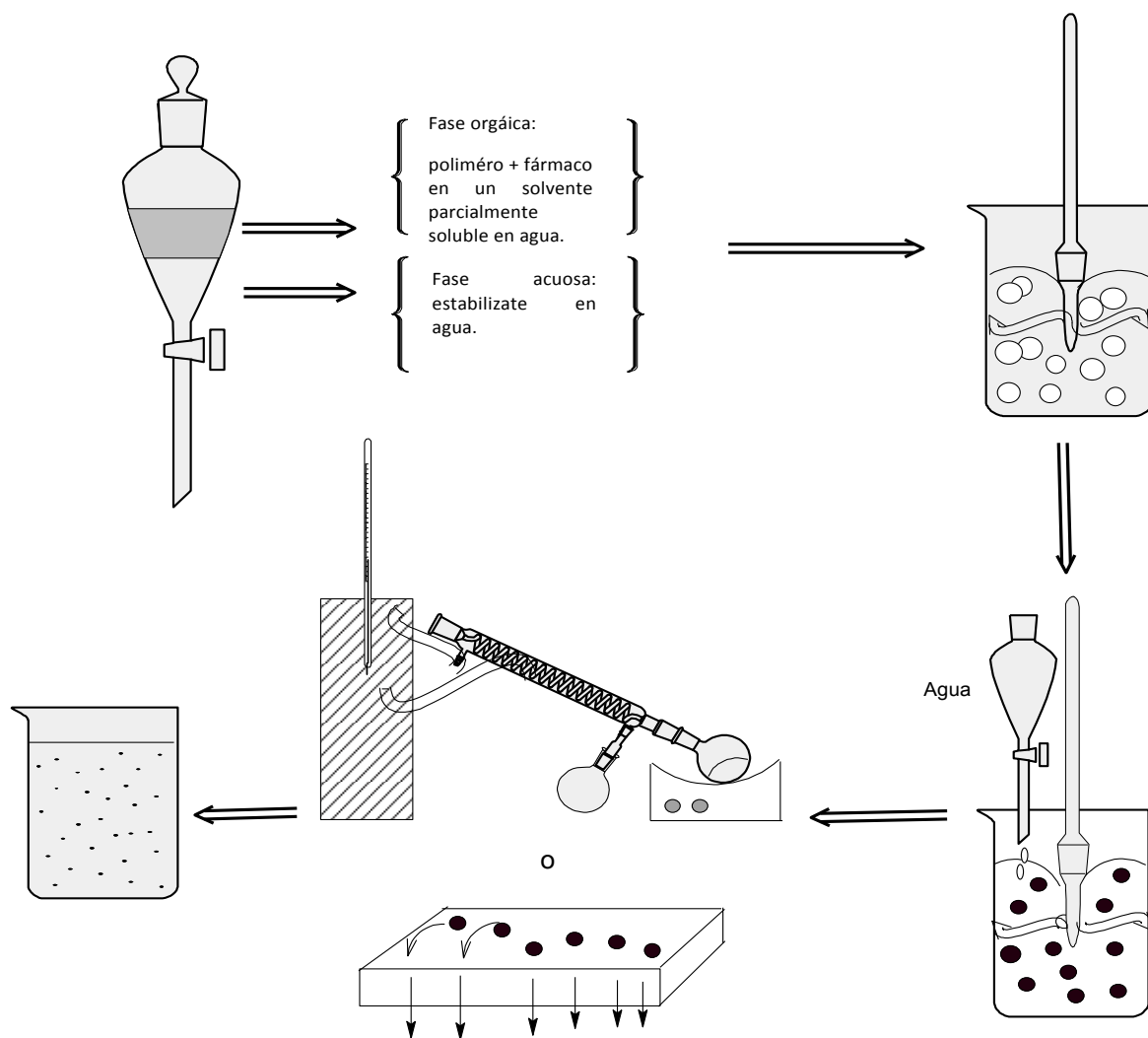


Figura 9. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas y nanoesferas por el método emulsificación-difusión.



El mecanismo de formación de NP's por el método emulsificación-difusión describe la difusión del solvente orgánico a partir de los glóbulos, lleva moléculas hacia la fase acuosa, formando regiones locales de supersaturación en la cual se forman los nuevos glóbulos o polímeros agregados (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas "protonanopartículas" por la presencia del estabilizante es muy importante para evitar su fusión y la formación de aglomerados. Así, si el estabilizante se mantiene en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y si su efecto protector es adecuado, entonces se formarán las NP's después de que se produzca la difusión completa del solvente. (Figura 10) (Quintanar *et al.*, 1998).

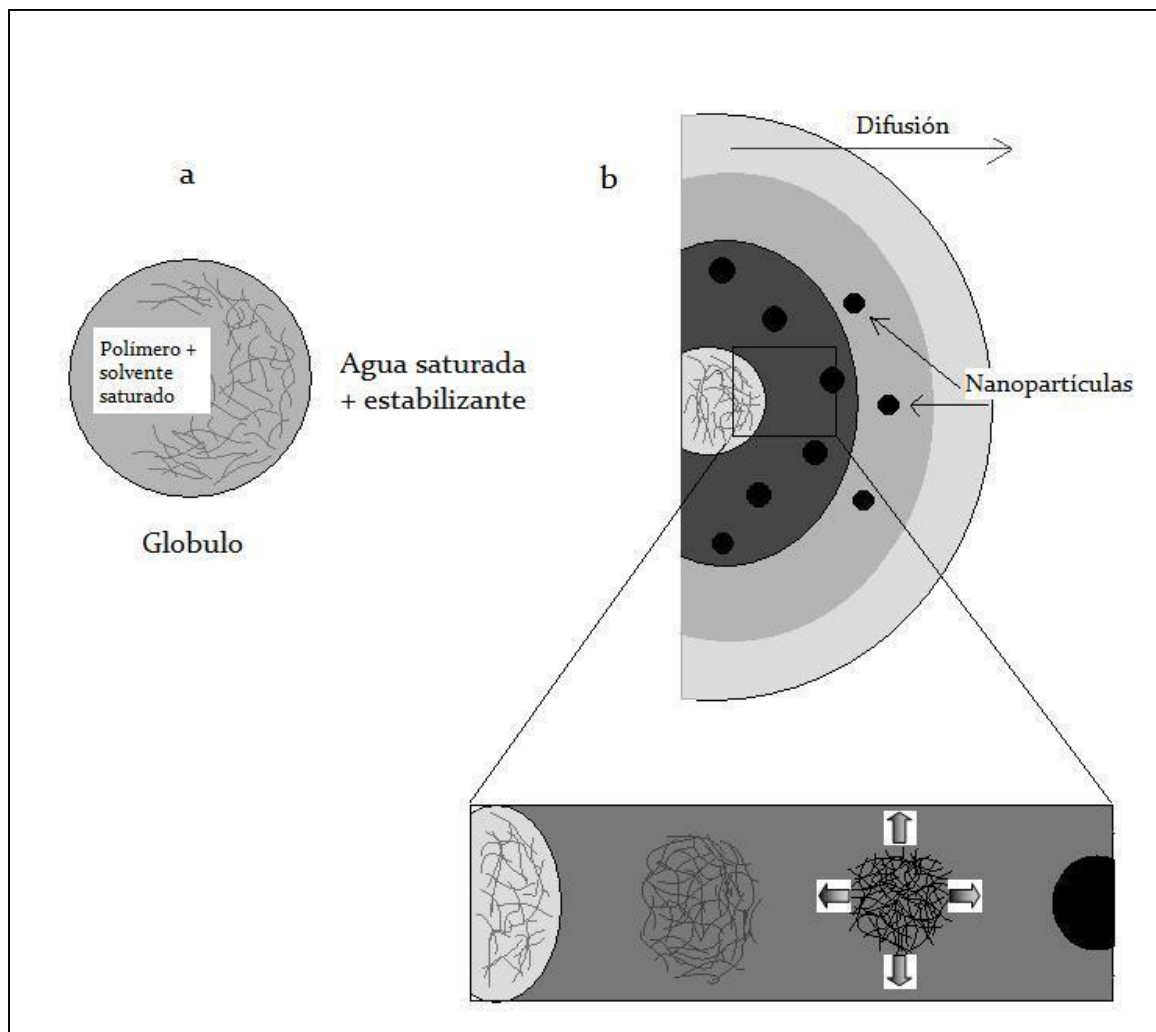


Figura 10. Mecanismo de formación de nanopartículas por emulsificación-difusión propuesto por Quintanar *et al.*, (1998) (a) antes del paso de difusión; (b) durante el paso de difusión.



Por esta técnica se han utilizado solventes como alcohol Bencílico y Acetato de etilo y con respecto al estabilizador, este se selecciona dependiendo de su habilidad para formar emulsiones, por ejemplo, el PVAL o el poloxamero 188. Esta técnica presenta algunas ventajas sobre los otros métodos descritos arriba, tales como el uso de solventes orgánicos aceptables farmacéuticamente, sin necesidad de pasos de homogenización, obteniendo generalmente altos rendimientos y alta reproducibilidad pero tiene un gran inconveniente, pues los fármacos hidrosolubles se fugan a la fase acuosa saturada externa durante la emulsificación. Como con las otras técnicas, la emulsificación-difusión es eficiente en la encapsulación de fármacos lipofílicos (Quintanar *et al.*, 1998).

### 3.4.3. Nanocápsulas.

#### 3.4.3.1. Definición.

Las nanocápsulas pueden ser comparadas con los sistemas vesiculares en el que un fármaco es confinado en una cavidad que consta de un núcleo líquido interno rodeado por una membrana polimérica (Quintanar *et al.*, 1998). Sin embargo, estas pueden ser definidas como nanovesículas; sistemas que tienen una típica estructura núcleo-corteza en la que el fármaco está confinado y limitado en una cavidad rodeada por una membrana polimérica. (Letchford y Burt, 2007; Anton, N., Benoit, JP., Saulnier, P., 2008). La cavidad puede contener al fármaco en forma líquida o sólida o como una dispersión molecular (Mora, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2009). Igualmente, este reservorio puede ser lipofílico o hidrofílico conforme al método de preparación y materias primas utilizadas. Teniendo en cuenta las limitaciones operativas de los métodos de preparación, las nanocápsulas pueden llevar al fármaco sobre su superficie o absorbidas en la membrana polimérica (Mora *et al.*, 2009) (Figura 11).



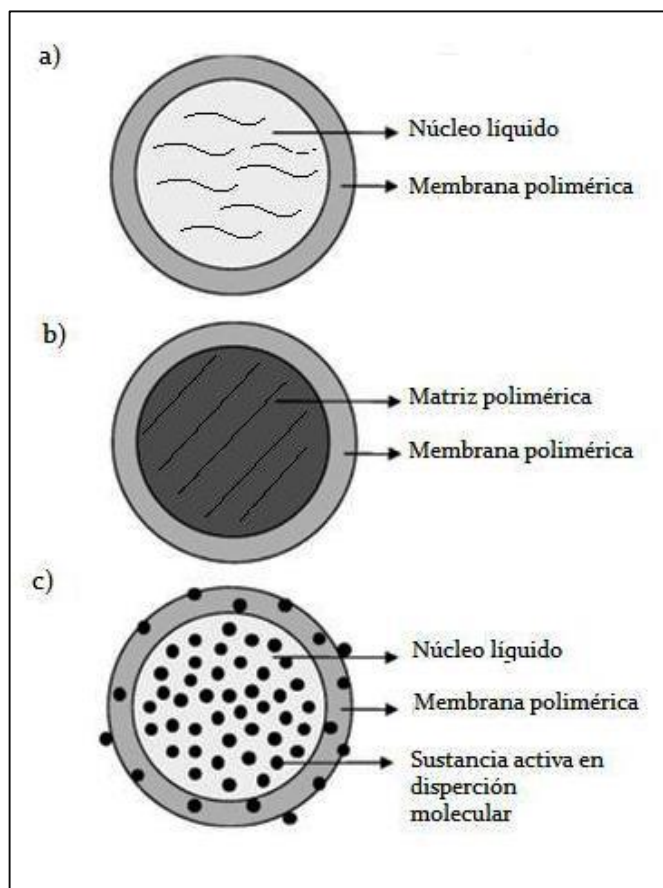


Figura 11. Diferentes estructuras nanocapsulares: (a) núcleo líquido, (b) matriz polimérica y (c) sustancia activa en dispersión molecular (Mora *et al.*, 2009).

### 3.4.3.2. Métodos de preparación.

Hay tres métodos clásicos para la preparación de nanocápsulas: doble emulsificación, desplazamiento de solvente o nanoprecipitación y emulsificación-difusión, este dos últimos ya han sido explicados anteriormente.



### 3.4.3.2.1. Nanoprecipitación.

Este método también es conocido como desplazamiento de solvente y ya se había descrito anteriormente, pero algunos autores realizan una descripción más específica para su aplicación en nanocápsulas. Por este método las nanocápsulas se obtienen como una suspensión coloidal que se forma cuando se añade la fase orgánica lentamente y con agitación moderada a la fase acuosa (Mora *et al.*, 2009) (Figura 12). Las variables clave del procedimiento son las asociadas con las condiciones de la adición de la fase orgánica a la fase acuosa, tales como la velocidad de inyección de la fase orgánica, la velocidad de agitación de la fase acuosa, el método de adición de la fase orgánica y la relación fase orgánica/fase acuosa. Del mismo modo, las características de las nanocápsulas se ven influidas por la naturaleza y la concentración de sus componentes (Mora *et al.*, 2009).

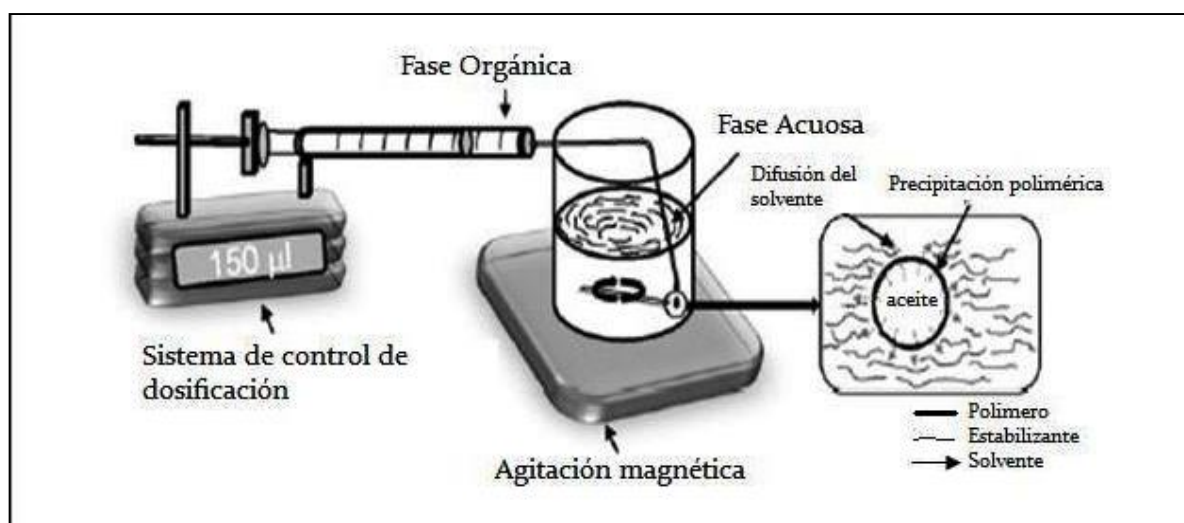


Figura 12. Representación esquemática de la preparación de nanocápsulas por el método de Nanoprecipitación (Mora *et al.*, 2009).

La velocidad de inyección determina el tamaño de partícula y la fuerza motriz de estos fenómenos es la sobresaturación. El mecanismo de formación de las NP's por este método es debido a las diferencias en la tensión superficial, un líquido con una alta tensión superficial (fase acuosa) jala más fuertemente al líquido que rodea, que uno con una tensión superficial baja (fase orgánica). Esta diferencia entre las tensiones superficiales provoca la turbulencia interfacial y las desigualdades térmicas en el sistema, dando lugar a la continua formación de



los remolinos del solvente en la interfase de ambas fases. Por consiguiente, se observa una difusión violenta debido a la miscibilidad mutua entre los solventes, el solvente orgánico fluye lejos de las regiones de baja tensión superficial y el polímero tiende a agregarse y formar las nanocápsulas. De acuerdo con esta explicación, la formación de nanocápsulas se debe a la agregación del polímero en glóbulos estabilizados de la emulsión (Mora *et al.*, 2009).

#### 3.4.3.2.2. Doble emulsión.

Las emulsiones dobles son sistemas heterodispersos complejos llamados “emulsiones de emulsiones”, que se pueden clasificar en dos tipos principales: emulsión agua-aceite-agua (w/o/w) y aceite-agua-aceite (o/w/o). Por lo tanto la fase dispersa es en sí una emulsión y el interior dispersa un glóbulo que está separado de la fase líquida externa por una capa de otra fase. Las emulsiones dobles se preparan normalmente, por un procedimiento de emulsión de dos pasos, utilizando dos tensoactivos, uno hidrofóbico diseñado para estabilizar la interfase de la emulsión interna w/o y uno hidrófilico para estabilizar la interface externa de los glóbulos oleosos para emulsiones w/o/w (Mora *et al.*, 2009).

Para la preparación de las nanocápsulas, el principio de la formación de la emulsión doble, específicamente del tipo w / o / w, se asocia con los principios tanto de nanoprecipitación y de emulsificación-difusión. En este caso, en la primera emulsión (w/o) el aceite se cambia por una fase orgánica que contiene un disolvente que es total o parcialmente miscible en agua, el polímero y el tensoactivo de tipo w/o. Posteriormente el agua que contiene un agente estabilizante se añade al sistema para obtener una emulsión w/o/w (Figura 13). Sin embargo las nanocápsulas se obtienen a través de la difusión del solvente orgánico y precipitación del polímero (Bilati *et al.*, 2005;. Khoee y Yaghoobian, 2008). El agua se añade poco a poco a la doble emulsión con el fin de lograr la difusión completa del solvente. La encapsulación eficiente y el tamaño de partícula se ven afectados por los cambios en el tipo y concentración tanto de la emulsión y del agente estabilizante. Además, la fase acuosa interna está compuesta solo por la sustancia activa y agua mientras que la fase orgánica pueden ser algunos de los siguientes solventes: acetato de etilo, cloruro de metileno y diclorometano, en cuanto a los



poliésteres biodegradables, han sido utilizados frecuentemente el PLA y el PLGA. Los agentes estabilizantes más utilizados son el PVAL y los polisorbatos (Mora *et al.*, 2009).

En el procedimiento típico para preparar nanocápsulas por este método, la primera emulsión es formada por ultrasonido y un surfactante w/o el cual estabiliza la interfase de la emulsión interna. La segunda emulsión también es formada por ultrasonido y es estabilizada por la adición de un agente estabilizante. Finalmente, el solvente es extraído por evaporación o extracción por vacío, obteniendo las nanocápsulas en un medio acuoso (Mora *et al.*, 2009).

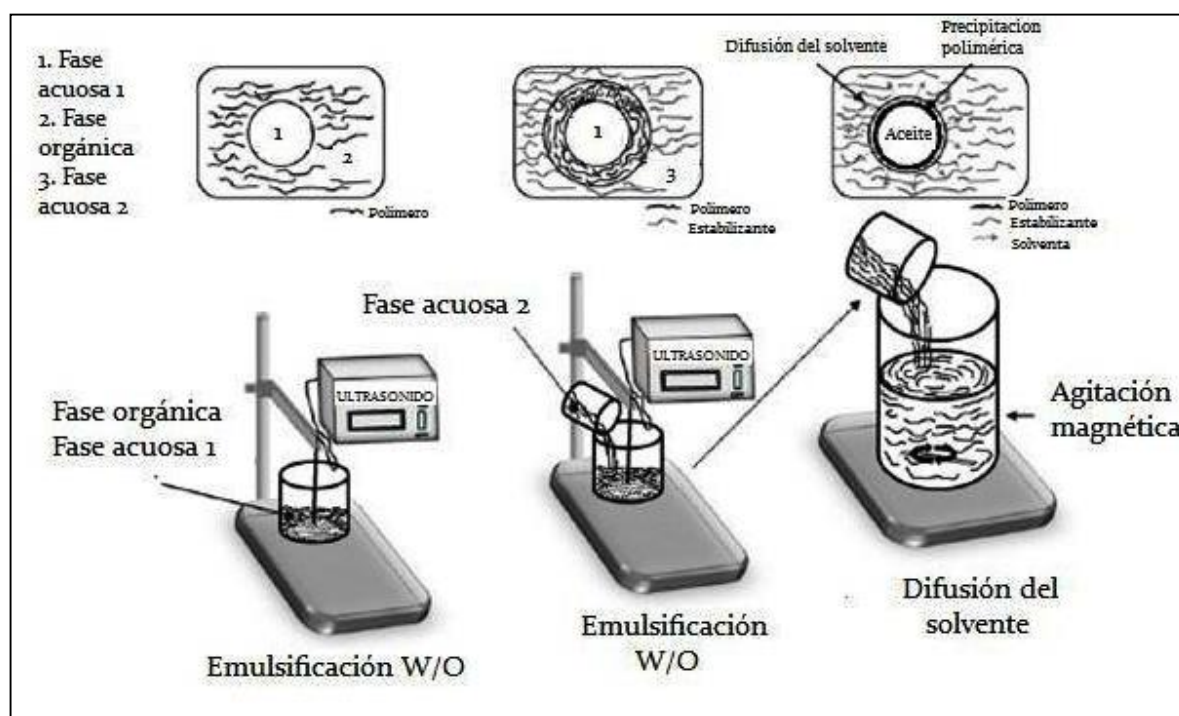


Figura 13. Método de doble emulsión para la preparación de nanocápsulas (Mora *et al.*, 2009).



#### 4. Caracterización de nanopartículas.

##### 4.1. Tamaño de Partícula y Potencial Z.

##### 4.1.1. Dispersión dinámica de la luz.

La dispersión dinámica de la luz (a veces conocida como espectroscopia de correlación de fotones), es una técnica establecida para medir el tamaño y la distribución del tamaño de las moléculas y las partículas típicamente en la región submicrónica, y con la última tecnología se han analizado partículas con tamaño menor a 1 nanómetro. (Malvern Instruments., 2006) (Ver anexo 1).

Las aplicaciones típicas de la dispersión dinámica de la luz son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas, que han sido dispersas o disueltas en un líquido. Estas aplicaciones se realizan mediante el Zetasizer Nano (Figura 14).



Figura 14. Zetasizer Nano ZS que utiliza la técnica DLS para la medición del tamaño de partícula (Accedido el 01 de agosto de 2015, desde <http://www.cas-instrumental.com.ar/zetasizer-nano-zs/> )

El movimiento browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y, por tanto, el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein (Malvern Instruments., 2006).

##### 4.1.1.1. Movimiento Browniano.

El movimiento browniano se relaciona con el tamaño de las partículas. Es el movimiento aleatorio de partículas debido al bombardeo realizado por las moléculas del solvente que las





rodean. Cuanto más larga sea la partícula, más lento será el movimiento browniano. Las partículas más pequeñas son "expulsadas" aún más por las moléculas del solvente y se mueven más rápidamente. Conocer la temperatura con exactitud es necesario pues se requiere tener conocimiento de la viscosidad (debido a que la viscosidad está relacionada con las fuerzas de cohesión moleculares que se pueden presentar entre las moléculas del solvente y las partículas y tal viscosidad depende de la temperatura) (Malvern Instruments., 2006).

#### 4.1.1.2.Estructura Superficial.

Cualquier cambio en la superficie de una partícula afecta a la velocidad de difusión. Una capa de polímero adsorbido que sobresale en el medio reducirá de mayor forma la velocidad de difusión más que si el polímero tiene una superficie plana. La naturaleza de la superficie y el polímero, así como la concentración iónica del medio puede afectar la conformación del polímero, que a su vez puede cambiar el tamaño aparente por varios nanómetros (Malvern Instruments., 2006).

#### 4.1.1.3.El potencial $Z$ y la doble capa eléctrica.

El desarrollo de una carga en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de iones contrarios (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. Por lo tanto existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (Malvern Instruments., 2006).

Esta doble capa del líquido que rodea la partícula está compuesta por dos partes; una zona interior, llamada capa de Stern, donde los iones están fuertemente atados o unidos y una exterior, llamada capa difusa, una región en la que los iones no están tan firmemente unidos (Figura 15). Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro del límite se mueven con ella, pero cualquier ion más allá del límite no viaja con la partícula (Malvern Instruments., 2006).



El potencial que existe en el límite de entre la capa de Stern y la capa difusa se conoce como el potencial  $Z$ . La magnitud del potencial  $Z$  da una indicación de la estabilidad del sistema coloidal. (Malvern Instruments., 2006).

Si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial  $Z$  negativo o positivo, entonces tienden a repelerse entre sí y no hay tendencia a flocular. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial  $Z$  bajos, entonces no hay fuerza para impedir que las partículas se unan y floculen. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables generalmente se da en cualquiera de 30 mV o -30 mV. Las partículas con potenciales  $Z$  más positivos que 30 mV o más negativos que -30 mV normalmente se consideran estables (Malvern Instruments., 2006).

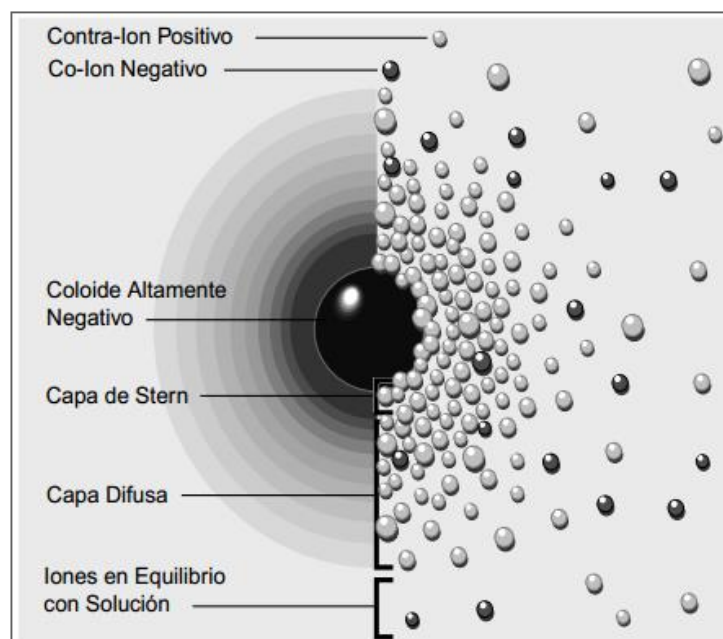
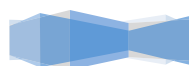


Figura 15. Doble capa vista de dos maneras diferentes. Del lado izquierdo se observan los cambios en la densidad de la carga alrededor del coloide, del lado derecho la distribución de los iones positivos y negativos. (Accedido el 01 de agosto de 2015, desde <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/rt/prINTERfriendly/1715/11607> ).



El factor más importante que afecta el potencial  $Z$  es el pH. Por ejemplo, si tuviéramos una partícula en suspensión con un potencial  $Z$  negativo, si se añade una base para alcalinizar la suspensión, las partículas tienden a adquirir una carga más negativa. Si se añade un ácido a esta suspensión se alcanzará un punto en el que se neutraliza la carga negativa. Cualquier otra adición de ácido puede causar una acumulación de carga positiva. Por lo tanto un potencial  $Z$  será positivo a pH's bajos y negativo a pH's altos (Figura 16).

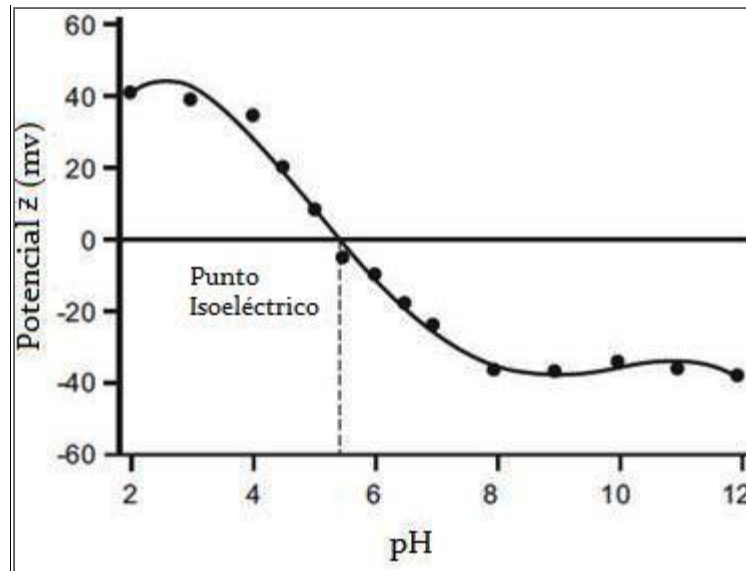


Figura 16. Comportamiento típico del potencial  $Z$  con respecto al pH (Accedido el 01 de Agosto de 2015, desde [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_us\\_er\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_us_er_manual_Man0317-1.1.pdf)).

El punto en el que el diagrama pasa por el potencial  $Z$  cero se denomina punto isoelectrico. Normalmente es el punto en el que el sistema coloidal es menos estable



### III. HIPÓTESIS.

Si se incluye el par-ión TBC-AG en la elaboración de NP's por el método de emulsificación-difusión, entonces se incrementará la eficiencia de encapsulamiento de un fármaco hidrosoluble (AG).

### IV. OBJETIVO GENERAL.

Encapsular un fármaco hidrosoluble modelo (Ácido Glicirricínico) en nanopartículas poliméricas por medio del método emulsificación-difusión en conjunto con la interacción par-iónico para mejorar la eficiencia de encapsulamiento de este fármaco.

### V. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Elaborar NP's por el método de emulsificación-difusión con la inclusión de la interacción par-iónico utilizando el TBC como contra-ión del AG para mejorar la partición de este fármaco en un medio no acuoso (acetato de etilo) e identificar como esta interacción puede modificar las características de las NP's.
- Incluir la interacción par-iónico a 3 relaciones equimolares TBC-AG (1:1, 2:1 y 3:1) dentro del método emulsificación-difusión como una nueva variable para incrementar la eficiencia de encapsulación de un fármaco hidrosoluble (AG).
- Caracterizar las nanopartículas mediante la determinación del tamaño de partícula y su potencial  $Z$  por medio de la DLS y Movilidad electroforética, respectivamente, su morfología por Microscopía electrónica de barrido, las interacciones polímero-componentes de la formulación por DSC y el porcentaje de encapsulación por HPLC para determinar las ventajas o desventajas de la interacción par-iónico.



## VI. PARTE EXPERIMENTAL.

### ❖ Polímeros y Surfactantes

- Alcohol Polivinílico (PVAL); Sigma-Aldrich, EUA.
- Ácido poli (láctico co-glicólico) (PLGA) 50:50; Lakeshore Biomaterials®; Brookwood Pharmaceuticals, EUA.

### ❖ Reactivos

- Cloruro de tetrabuil amonio (TBC); Sigma-Aldrich, EUA.
- Biftalato de potasio; Fermont, México.
- Hidróxido de sodio; Fermont, México.

### ❖ Activos

- Ácido Glicirricínico (AG) 97%; Sigma-Aldrich, EUA.

### ❖ Solventes

- Acetato de Etilo; J.T. Baker, México.
- Ácido Acético Glacial; J.T. Baker, México.
- Metanol HPLC; J.T. Baker, México.

### ❖ Equipos e instrumentos

- Parrilla Eléctrica con Agitación; Cimarec®, Thermoline, EUA.
- Balanza analítica; Boeco®, Alemania.
- Ultracentrífuga; Optima® LE-80K, Beckman, EUA.
- Centrifuga; Hettich® EBA 12, EUA.
- Agitador Mecánico; Ultraturrax T18®, IKA, EUA.
- Horno Mecánico; Thelco GCA® 18, EUA.
- Rotaevaporador; Polyscience®, EUA.
- pHmetro; Corning® 430, EUA.
- Ultrasonicador; Branson® 5210, EUA.
- Liofilizadora; Labcono®, EUA.



- HPLC; Varian Prostar<sup>®</sup> 400, EUA.
- DSC, TA Instruments<sup>®</sup> Q10; EUA.
- Medidor de Tamaño de partícula, Potencial Z; Zetasizer Nano ZS<sup>®</sup>, EUA.
- Milli-Q<sup>®</sup>, Francia.



El siguiente diagrama muestra el resumen de la metodología experimental de este trabajo.

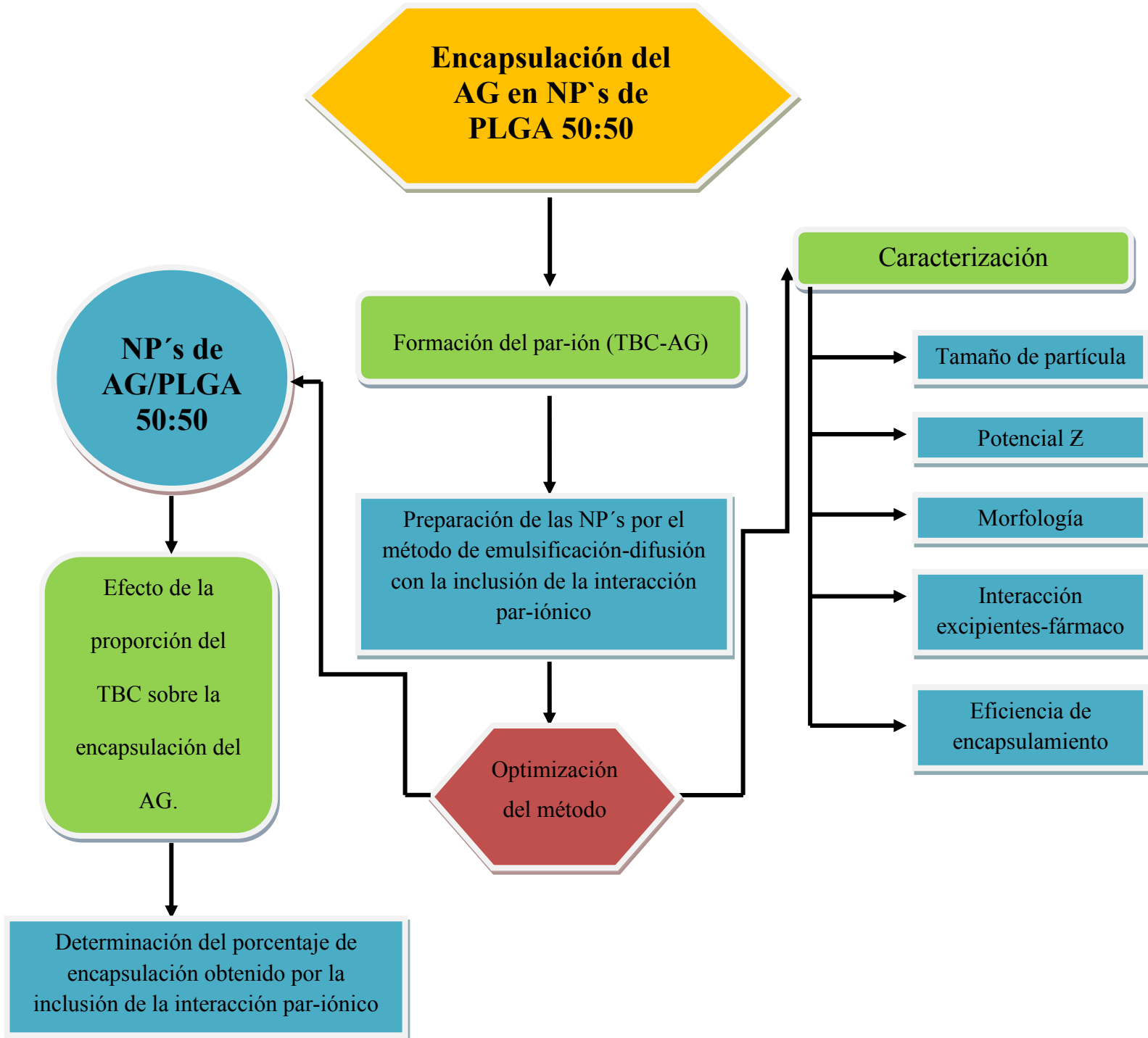


Figura 17. Diagrama de flujo experimental.



## 1. Formación del Par-Ión Cloruro de tetrabutilamonio-Ácido Glicirricínico (AG-TBC).

Para la formación del par-ión (Figura 19) se utilizó el TBC (Sigma-Aldrich, EUA) como contra-ión, siendo el AG (Sigma-Aldrich, EUA) el anión. Se probaron 3 relaciones equimolares entre el AG y el TBC, las cuales fueron 1:1, 2:1 y 3:1, siendo constante la cantidad de AG y la variante el TBC. El procedimiento siguiente se realizó a estas 3 relaciones equimolares.

Fase acuosa: En 40 ml de una solución búfer de Bifalatos pH= 5.4 previamente saturada con 22 ml de Acetato de etilo se disolvió el PVAL al 5%, que actúa como agente estabilizante de la emulsión y evita la agregación de partículas. Una vez disuelto se agregaron 157.89 mg de AG reactivo comercial con agitación constante hasta disolver y el TBC de la misma manera, hasta disolver.

Tabla 1. Componentes y cantidades utilizadas para la elaboración de las NP's.

COMPONENTE	FASE ORGÁNICA (Acetato de etilo)			FASE ACUOSA (Sol. Búfer de Bifalatos pH= 5.4)		
	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1
Ácido Glicirricínico (mg)	N/A	N/A	N/A	150	150	150
Cloruro de tetrabutilamonio (mg)	227.1	454.2	681.3	227.1	454.2	681.3
PVAL (% p/v)	N/A	N/A	N/A	5%	5%	5%
PLGA 50/50(mg)	200	200	200	N/A	N/A	N/A

Fase orgánica: Se tomaron los 20 ml del mismo Acetato de etilo que se utilizó en la saturación de la fase acuosa, en él se colocó y disolvió la misma cantidad de TBC disuelta en la fase acuosa para mantener el equilibrio de esta sal (Figura 18).





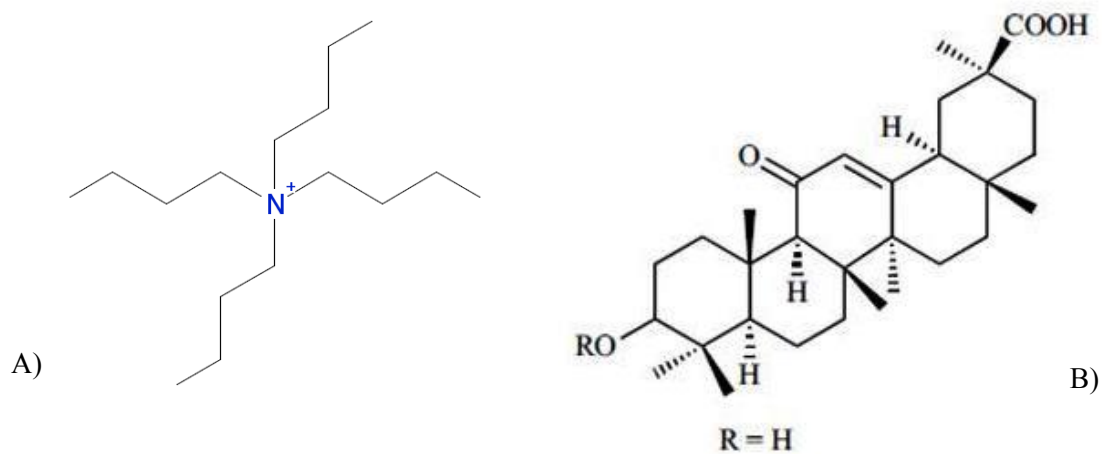


Figura 18. A) Cati3n del TBC (Accedido el 15 de agosto de 2015, desde [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrabutylammonium\\_chloride](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrabutylammonium_chloride) ) ; B) Estructura molecular del AG (Pompei et al., 2009).

Posteriormente, se tomaron las dos fases y se colocaron en un embudo de separaci3n para realizar la partici3n del par-i3n de la fase acuosa a la fase org3nica agitando y dejando reposar por 30 minutos (tiempo al cual se observa la separaci3n total de las fases). Una vez realizado esto se recuperaron las fases para posteriormente realizar la elaboraci3n de las NP's. En la tabla 1 se muestran los componentes de la fase org3nica y acuosa a cada relaci3n equimolar que se estudi3.

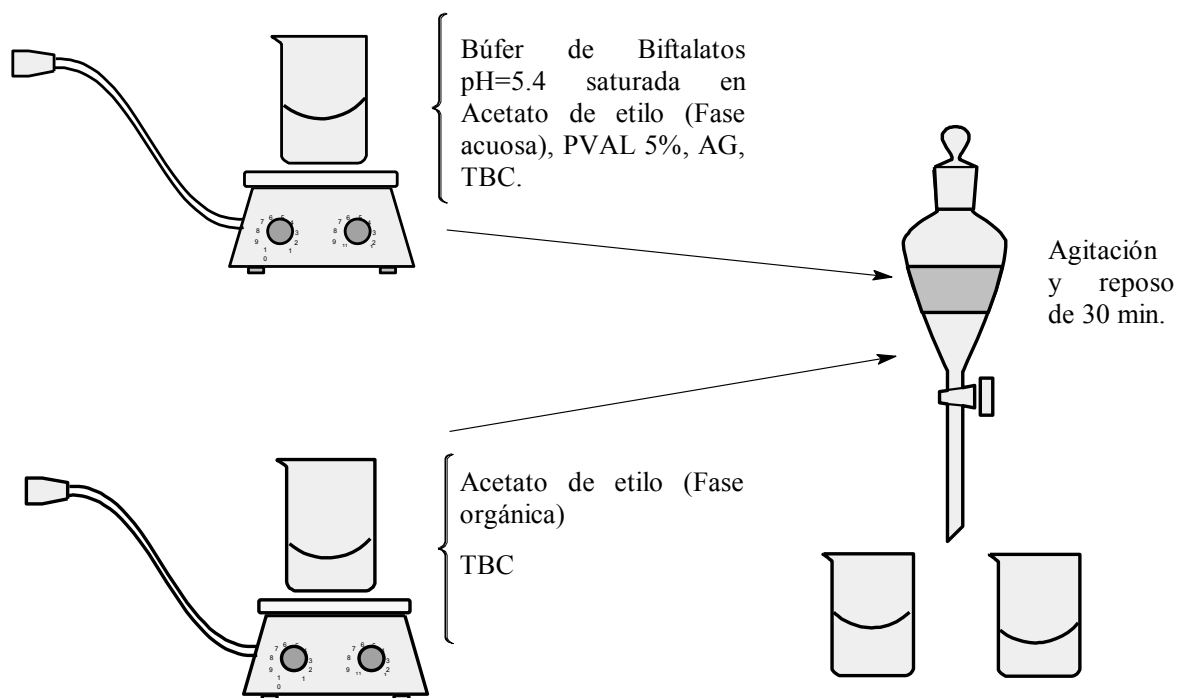


Figura 19. Formaci3n del par-i3n AG-TBC.



## 2. Elaboración de las NP's por el método de emulsificación-difusión con la inclusión de la interacción Par-Iónico.

Se elaboraron NP's de PLGA 50:50 por el método de emulsificación-difusión (Figura 20). Se tomaron 20 ml de la fase orgánica del procedimiento anterior y en esta se disolvieron 200 mg PLGA 50:50 con agitación constante aproximadamente durante 40 min. Una vez disuelto el polímero se emulsionó esta fase orgánica en la fase acuosa, con un agitador mecánico (Ultraturrax T 18®, IKA, EUA) a 16,000 rpm/5 min. Esta se estabilizó con PVAL al 5%. Posteriormente se llevó al rotaevaporador para realizar la formación de las NP's por el arrastre de la fase orgánica a 30°C y 90 rpm/15 min.

Una vez formadas las NP's se lavaron tres veces con agua destilada, centrifugándolas a 36,000 rpm / 20 min utilizando una ultracentrifuga (Optima® LE-80K, Beckman, EUA). Estas NP's se suspendieron en la mínima cantidad de agua destilada, se congelaron a -20 °C y se liofilizaron durante 24 horas, para posteriormente determinar las interacciones entre los componentes de la formulación y el AG por medio de DSC. Otras muestras de NP's sin liofilizar fueron almacenadas en viales de vidrio para su caracterización. Solo en el caso de la determinación del porcentaje de encapsulación por HPLC se realizó un solo lavado con agua destilada. Para las demás pruebas (tamaño de partícula, potencial Z y morfología) se realizaron tres lavados, se re-suspendieron con agua destilada y se realizaron las pruebas de caracterización.

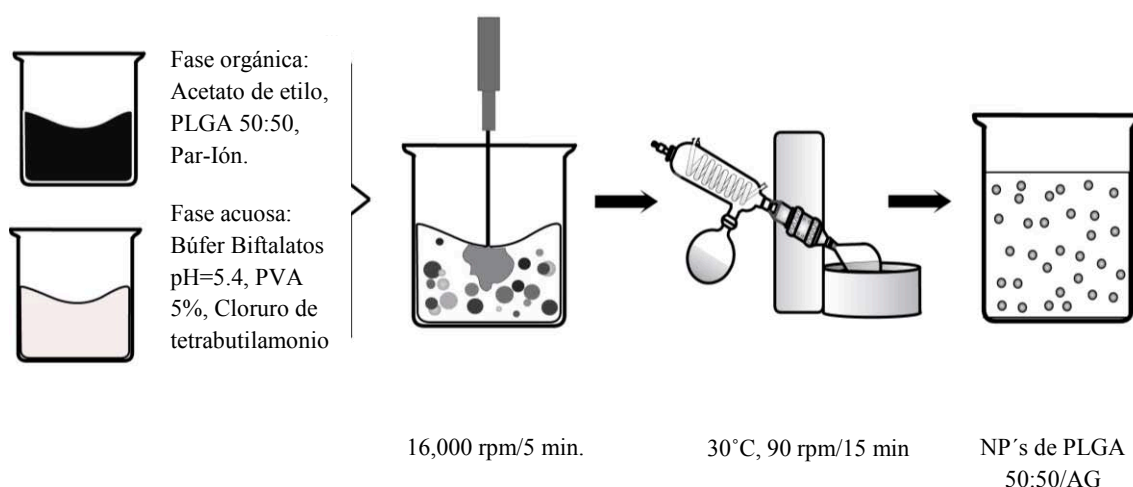


Figura 20. Esquematación del proceso de elaboración de las NP's por el método emulsificación-difusión.



### 3. Caracterización.

#### a. Tamaño de partícula.

La determinación del tamaño de las NP's se realizó empleando un medidor del tamaño de partícula y potencial Z (Zetasizer Nano ZS®, EUA). Las NP's se lavaron tres veces para eliminar el exceso de PVAL a 36,000 rpm/20 min con agua destilada y posteriormente se analizaron. Se realizaron mediciones por triplicado a tres lotes diferentes de cada relación equimolar estudiada (1:1, 2:1 y 3:1) para calcular el tamaño de partícula promedio en cada caso.

#### b. Potencial Z

La determinación del potencial Z se realizó empleando un medidor del tamaño de partícula y potencial Z (Zetasizer Nano ZS®, EUA). Las NP's se lavaron tres veces para eliminar el exceso de PVAL a 36,000 rpm/20 min con agua destilada y posteriormente se analizaron. Se realizaron mediciones por triplicado a 3 lotes diferentes de cada relación equimolar estudiada (1:1, 2:1 y 3:1) para calcular el potencial Z promedio en cada caso.

#### c. Morfología.

Se observó la morfología de las NP's por medio de Microscopia Electronica de Barrido utilizando un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío LV-SEM JSM 5600 (resolución de 5 nm), con un voltaje de 20 kV y 12-20 Pa de presión de cámara. Las NP's se lavaron 3 veces previamente para eliminar el exceso de PVAL a 36,000 rpm/20 min con agua destilada, se re-suspendieron con la mínima cantidad de agua destilada y se almacenaron en viales para su análisis.

#### d. Interacciones fármaco-excipiente.

Se identificaron las interacciones AG-PLGA 50:50, AG-PVAL y AG-Cloruro de tetrabutilamonio que presentan las NP's por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido



utilizando un DSC (TA Instruments® Q10; EUA). Para esta prueba una vez recuperadas las NP's de cada relación equimolar estudiada (1:1, 2:1 y 3:1) se suspendieron en la mínima cantidad de agua destilada, se congelaron a -20 °C y se liofilizaron durante 24 horas, se almacenaron en viales de vidrio con papel parafilm y se llevaron al DSC. Los componentes de la formulación se analizaron de forma individual (PLGA 50/50, PVAL, AG y TBC)

#### 4. Efecto de la proporción del TBC sobre la encapsulación del AG.

Esta prueba se realizó por medio de la determinación del % de encapsulación obtenido por la inclusión de la interacción par-iónico. La prueba se realizó por triplicado a tres lotes diferentes de cada relación equimolar estudiada (1:1, 2:1 y 3:1) para calcular el % de encapsulación promedio en cada caso utilizando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

##### a. Preparación de la muestra.

Los sistemas coloidales se centrifugaron a 36,000 rpm/50 min en una ultracentrífuga (Optima® LE-80K, Beckman, EUA) de los cuales se obtuvo una pastilla por cada sistema, las cuales se expusieron a calor dentro de un horno mecánico (Thelco GCA® 18, EUA) a una temperatura de 35°C/ 24 hrs. Las pastillas secas se colocaron en agitación constante con agua destilada durante 5 días.

Posteriormente se centrifugaron a 15,000 rpm/20 min y el sobrenadante se analizó por HPLC (Varian Prostar® 400, EUA) a las siguientes condiciones:

Fase Móvil: Metanol – Agua – Ácido Acético (57:37:6).

Velocidad de flujo: 1.5ml/min.

Volumen de inyección: 100µl.

Columna de fase reversa: C18 (Dimetiloctadecil) 25X4.6mm.

Detección: 254nm.

Concentración de la muestra: 1 ml de la muestra aforado en 10 ml de agua destilada.



Para este análisis se recupera una pastilla de NP's por cada sistema, estas se exponen a calor dentro de un horno mecánico para eliminar el exceso de agua a una temperatura de 35°C/ 24 hrs. Las pastillas secas se colocaron en agitación constante con agua destilada durante 5 días para romper la película formada por el polímero y provocar la migración del AG.

Posteriormente, se centrifugó este sistema para separar el polímero. Se toma 1 ml del sobrenadante y se lleva a un volumen de aforo de 10 ml con agua destilada. Este sistema se inyecta en el HPLC.

Para obtener el porcentaje de encapsulación primero se calculó la cantidad teórica de AG correspondiente al peso de la muestra si se lograra encapsular el 100% del AG:

$$\text{AG TEÓRICO ENCAPSULADO} = \frac{\text{PESO DE LA MUESTRA(mg)} \times 150 \text{ mg AG}}{200 \text{ mg de PLGA 50/50}}$$

Una vez calculado este valor, se realizó la siguiente operación para determinar el % de encapsulación, considerando al valor calculado arriba como el 100%:

$$\% \text{ DE ENCAPSULACIÓN} = \frac{\text{mg DE AG ENCAPSULADO EN LA MUESTRA} \times 100}{\text{AG TEÓRICO ENCAPSULADO}}$$

#### b. Curva de calibración.

Para la curva de calibración (Tabla 2) se pesaron exactamente 50 mg de AG con una pureza de 95.0%. Esta cantidad se disolvió y se llevó a un volumen de aforo de 10 ml con agua destilada en un matraz volumétrico. De este se tomaron 2 ml y se llevaron a un volumen de aforo de 100



ml con agua destilada para tener una concentración de 100 mcg/ml (STD). A partir de estos estándares se realizaron 5 sistemas. Cada sistema fue leído por triplicado a 254 nm.

Tabla 2. Curva de Calibración de AG.

REACTIVO	SISTEMAS					
	BCO	1	2	3	4	5
STD de AG	0 ml	4 ml	6 ml	7 ml	9 ml	10 ml
Agua destilada	10 ml	6 ml	4 ml	3 ml	1 ml	0 ml

Para considerar adecuada esta curva de calibración se determinó el coeficiente de variación (C.V.), el cual debe ser  $< 2 \%$ , así como un coeficiente de correlación ( $R^2$ )  $> 0.99$  (CIPAM., 2006).



## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1. Formación del par-ión (TBC-AG).

La formación del par-ión se realiza para mejorar la solubilidad del AG en un medio en el cual no es soluble, es decir, en la fase orgánica y el uso de tres relaciones equimolares se debió al interés de conocer como este afecta o mejora la partición del AG. El AG fue disuelto en un Búfer de Bifalatos pH= 5.4 (saturado previamente con la fase orgánica) para permitir que se mantuviera en su forma más ionizada, de acuerdo a sus tres pka's (Figura 21). De esta manera se permite tener disponible la molécula del AG para formar un par-ión. El uso de una sal de amonio como lo es el TBC tiene que ver con el hecho de que estas sales cuando se encuentran en solución producen iones que se mantienen cargados positivamente sin importar el pH de la solución (también llamados cationes de sales cuaternarias de amonio) pues tienen una estructura  $NR_4^+$  en donde los radicales son grupos alquilo. (<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/biocides-antibiotic-resistance/glossary/pqrs/quaternary-ammonium-cation.htm>). Estos cationes serán los encargados de formar el Par-Ión con el AG.

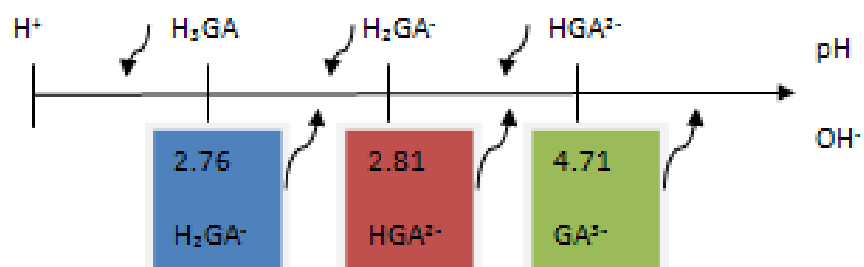


Figura 21. Constantes de disociación del AG.

La formación de este par-ión se da cuando la molécula del AG mantiene una interacción íntima con el TBC debido a que tienen cargas opuestas, pero sin formar un enlace. Esta interacción puede ser afectada por dos situaciones, la primera provocada por un desequilibrio en la concentración del TBC en ambas fases, es por eso que se adiciono ese contra-ión tanto en la fase acuosa como en la fase orgánica en cantidades iguales para evitar que una vez que se



encuentre en la fase orgánica no migre a la fase acuosa, disminuyendo la cantidad de AG disponible, y la segunda, debido a que una parte de la fase orgánica parte hacia la fase acuosa, lo que provocaría que el AG que se encuentra en ella no esté disponible para ser encapsulado, es por esto que la saturación de fases se realiza previamente a la formación del par-ión.

## 2. Caracterización.

### 2.1. Tamaño de partícula.

La determinación del tamaño de las NP's se realizó utilizando la técnica de la dispersión dinámica de la luz. Una vez lavadas las NP's (para evitar que la presencia del PVAL genere resultados falsos) se realizaron mediciones por triplicado a tres lotes diferentes de cada relación equimolar estudiada (1:1, 2:1 y 3:1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación de tamaño de partícula para las NP's obtenidas.

TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)			
LOTE	SISTEMA (TBC-AG)		
	1:1	2:1	3:1
A	149.8	162.5	129.4
B	149.1	134.4	152.1
C	148	138.5	136.7
PROMEDIO	148.9	145.1	139.4
DESV. STD	0.90	15.17	11.58

Nota: cada lote fue analizado por triplicado y los valores presentados son un promedio de esos 3 valores

Como se puede observar en la Figura 22, se lograron obtener NP's con tamaño promedio de 148.9 nm, 145.1 nm y 139.4 nm para las relaciones equimolares 1:1, 2:1 y 3:1 respectivamente. Estos resultados verifican tanto que el método utilizado permite obtener partículas de tamaño nanométrico, las cuales se deben encontrar dentro un límite de tamaño, desde 5 nm hasta 1000 nm (1 µm) (Quintanar *et al.*, 1998) así como la formación de las NP's





no se ve afectada por la inclusión de la interacción par-iónico pues estas cumplen con el tamaño y también, como más adelante veremos, con la morfología. De acuerdo a esto, el sistema más conveniente por tener un tamaño más pequeño es el 3:1. Además podemos observar en la figura 22, que el aumento en la proporción del TBC provoca una reducción en el tamaño de partícula, de esta manera el aumento del tamaño de partícula es directamente proporcional a la disminución del TBC, al ser el único factor variable. Sin embargo, las diferencias de tamaño entre los sistemas no son tan notables y estadísticamente no existe una diferencia significativa entre ellos de acuerdo al análisis de varianza simple (ver anexo 2).

El tamaño de partícula se ve afectado al disminuir la presencia del contra-ión ya que éste mejora la estabilidad de las NP's, evitando que estas aglomeren más rápidamente, esta característica se analizará con el potencial Z en la siguiente sección.

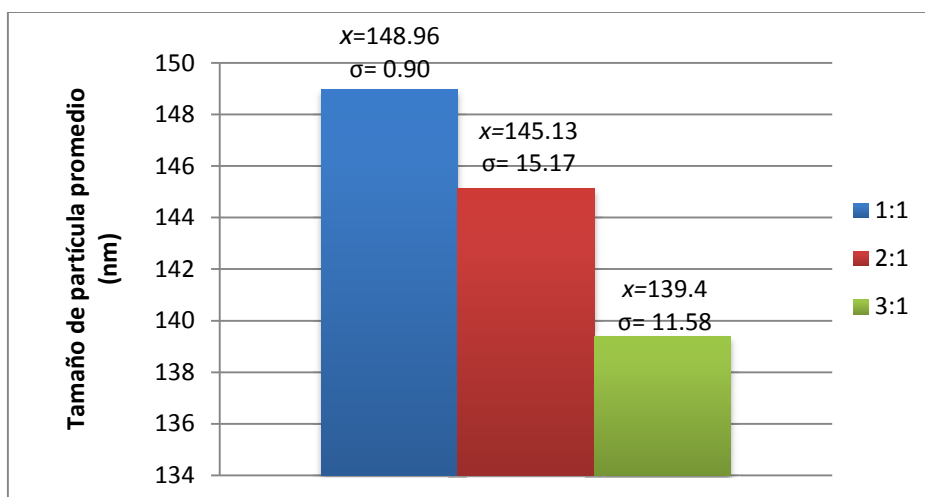


Figura 22. Tamaños de partícula obtenidos a las diferentes relaciones equimolares estudiadas.



## 2.2. Potencial Z

Tabla 4. Evaluación del Potencial Z para las NP's obtenidas.

POTENCIAL Z (mV)									
LOTE	SISTEMA (TBC-AG)								
	1:1			2:1			3:1		
SEMANA	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	-8.58	-8.57	-8.57	-9.17	-9.17	-9.17	-13.7	-13.7	-13.7
B	-5.49	-5.49	-5.47	-9.08	-9.08	-9.08	-11.0	-11.0	-11.0
C	-10.80	-10.70	-10.70	-9.95	-9.95	-9.92	-8.32	-8.32	-8.32
PROMEDIO	-8.29	-8.25	-8.24	-9.4	-9.39	-9.38	-11.0	-11.0	-11.0
DESV. STD.	2.66	2.61	2.62	0.47	0.48	0.47	2.69	2.69	2.69

Nota: cada lote fue analizado por triplicado y los valores presentados son un promedio de esos 3 valores.

Como se puede observar en la Figura 23, se obtuvieron NP's con un potencial Z promedio de -8.28, -9.40 y -11.0 mV para las relaciones equimolares 1:1, 2:1. y 3:1 respectivamente. Se puede observar que el potencial Z se ve modificado como el tamaño de partícula, por la presencia del TBC.

El incremento de esta sal favorece al sistema coloidal pues incrementa la estabilidad al incrementar el potencial. Se puede decir entonces que el aumento del potencial Z es directamente proporcional al aumento del TBC. Sin embargo, de acuerdo al análisis de varianza, no existe diferencia significativa entre cada relación equimolar (ver anexo 2).



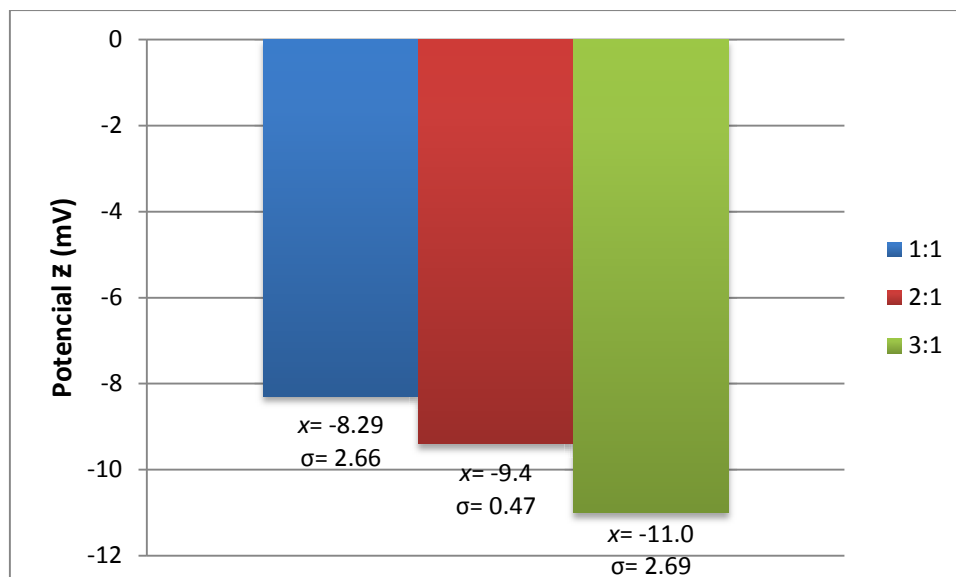


Figura 23. Potenciales Z de las NP's obtenidos a las diferentes relaciones equimolares estudiadas. Nota: Estos valores corresponden a los obtenidos al inicio del análisis.

De acuerdo al análisis de varianza no hay diferencias significativas entre los valores de potencial y tamaños de partícula, pero se resalta como la inclusión del contra-ión TBC reduce el tamaño e incrementa la estabilidad de las NP's de PLGA 50/50 con AG. En los 3 sistemas el potencial se mantuvo constante durante 30 días en los cuales se monitoreó, en muestras almacenadas a condiciones de temperatura y presión ambiente (Tabla 4) pero el sistema más estable es el correspondiente a la relación 3:1 con un potencial  $Z = -11$  mV.

De acuerdo al potencial Z la carga que presentan las NP's que se elaboraron es negativa, esto se debe a que se utilizó como fase acuosa para la elaboración de las NP's una solución búfer de Biftalatos a un pH de 5.4 y debido a que el potencial Z de un sistema coloidal se ve afectado por la presencia de iones (ya sea cationes o aniones) este pH provoca que se tenga un potencial negativo y bajo pues a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico se presentan potenciales altos y con carga positiva, por encima de este se tienen potenciales bajos y negativos, dependiendo de la concentración de iones  $H^+$  será el la carga y el potencial. Aunque el tipo de carga no es un indicativo de la estabilidad de los coloides, no así el valor de la carga, en nuestro caso los potenciales de las tres relaciones estudiadas son menores a -30 mV lo que representa que nuestro sistema coloidal es poco estable debido a que la línea general entre suspensiones estables e inestables se toma como -30 mV o + 30 mV



considerando que las partículas que tienen potenciales  $Z$  fuera de estos límites son considerados sistemas estables, si todas las partículas en suspensión tienen un alto potencial  $Z$  negativo o positivo, entonces estas se repelen entre si y no flocculan, pero si existen fuerzas de repulsión bajas o potenciales  $Z$  bajos (sin importar si son positivos o negativos), estas tenderán a floccular unas con otras pues su fuerza de repulsión no es tal para lograr mantenerse separadas entre ellas y por lo tanto, estables (Larsson *et al.*, 2012)

La elección del pH de la fase acuosa se baso en la compatibilidad que presentaron los componentes de la formulación y principalmente a que se pretendía provocar que el AG se encontrara en forma de anión, a un pH más alto que su último pKa. Aunque el uso de este valor de pH propició la formación del par-ión también generó un potencial  $Z$  bajo y un sistema coloidal poco estable.

El TBC al ser una sal cuaternaria de amonio, genera un catión de amonio cuaternario, que a diferencia de los primarios, secundarios o terciarios, este mantiene su carga positiva permanentemente sin importar el pH de la solución, pues al ser una amina cuaternaria no presenta electrones libres, manteniendo una carga positiva en todo momento, razón por la cual se utiliza como contra-ión.

Este catión del TBC se encuentra “apareado” al AG, por la interacción par-ión y se une a la superficie del PLGA 50/50 debido a que este polímero tiene un grupo carboxilo final (COOH) en su estructura, lo que puede facilitar la retención del contra-ión en la superficie del polímero y por ende del AG.

Así como se ve afectado el tamaño de partícula y el potencial  $Z$  por el contra-ión, también el porcentaje de encapsulación se puede ver afectado.



### 2.3. Morfología.

Se observó la morfología de las NP's por medio de Microscopia Electrónica de Barrido. Las imágenes se observan en la Figura 24.

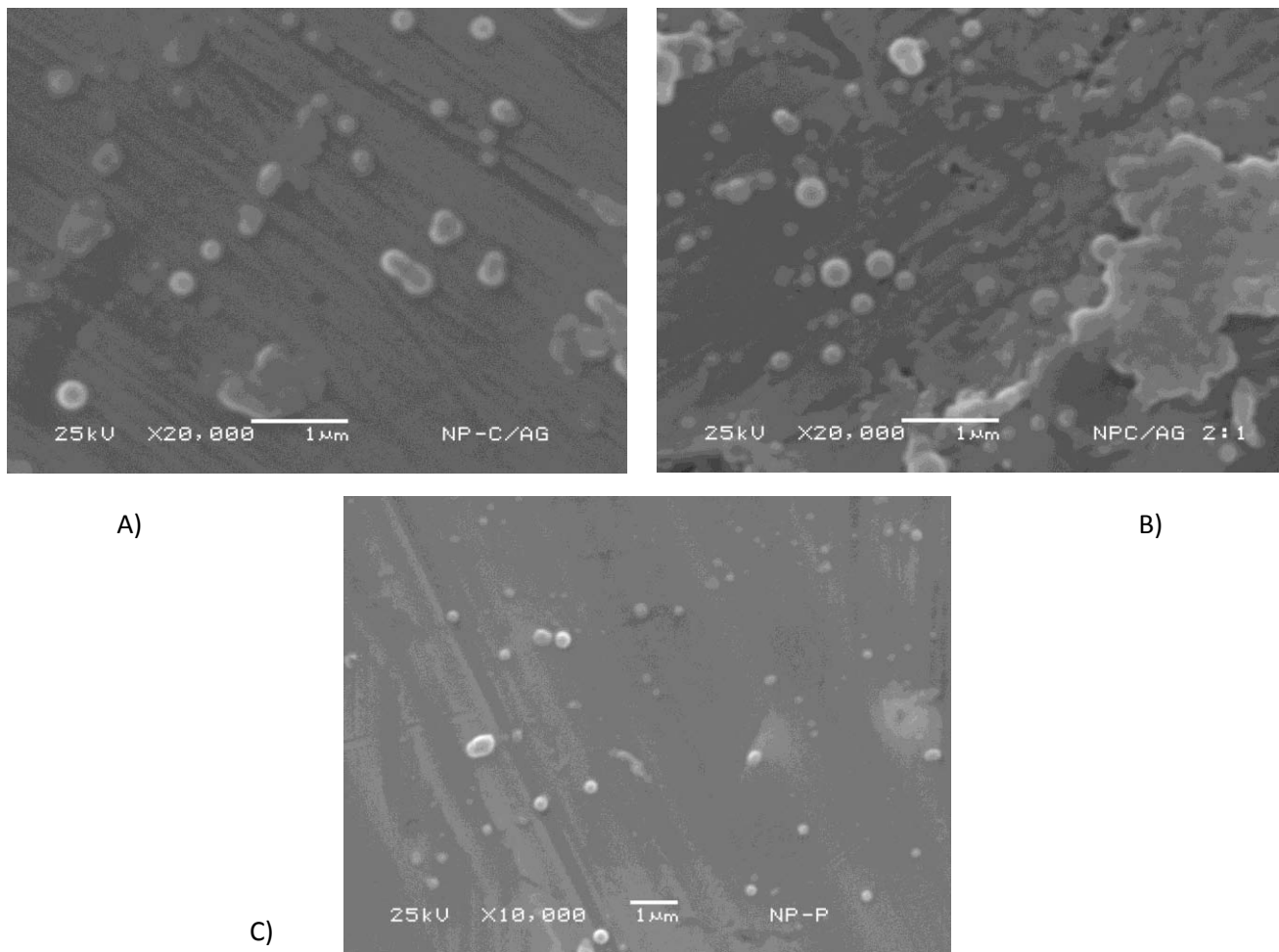
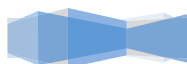


Figura 24. Micrografías que muestran la morfología de las NP's sintetizadas. A y B) NP's cargadas con AG, C) NP's Placebo.

El objetivo principal de observar las NP's por microscopia diferencial de barrido es el de identificar la morfología que presentan, también se puede utilizar esta prueba para verificar que el tamaño de partícula medido es el correcto. En la Figura 25 se puede observar que se obtienen NP's con una morfología de tipo esférica. En estas muestras, la presencia del AG y



del TBC generan una modificación en el potencial  $Z$  del PLGA 50/50 puesto que se puede observar que existen aglomeraciones de NP's en las muestras que fueron cargadas con AG (Figura 25 A y B), mientras que en la muestra de NP's placebo (Figura 25 C) no existen estas aglomeraciones, pues estas NP's de PLGA 50/50 son estables y tienen un potencial  $Z$  igual a -30mV. Al incluir dentro de la formación al AG y al TBC provocan cambios de potencial y generan las aglomeraciones.

Hasta esta prueba, no se puede determinar si la presencia del TBC es la responsable de provocar estos cambios, tanto en la morfología y el tamaño como en el potencial  $Z$ , o si el responsable es el AG, esto se determinará una vez analizados los termogramas de los 3 sistemas de NP's estudiados y su comparación con el correspondiente al del AG y PLGA 50/50 y también al determinar y analizar el porcentaje de encapsulación obtenido.

#### 2.4. Interacciones fármaco (AG)-polímero (PLGA, PVAL).

El análisis de las muestras por DSC ayuda a determinar la interacción del fármaco con el polímero en el que se encuentra, además, nos da información útil sobre la morfología del polímero (que ya se conoce) y el estado de dispersión sólido del fármaco asociado al sistema polimérico. Las interacciones entre fármaco y los excipientes a menudo resultan en cambio, aparición o desaparición de picos endotérmicos o exotérmicos (Ceschel *et al.*, 2003). En nuestro caso los termogramas obtenidos se pueden observar a continuación en la Figura 25.



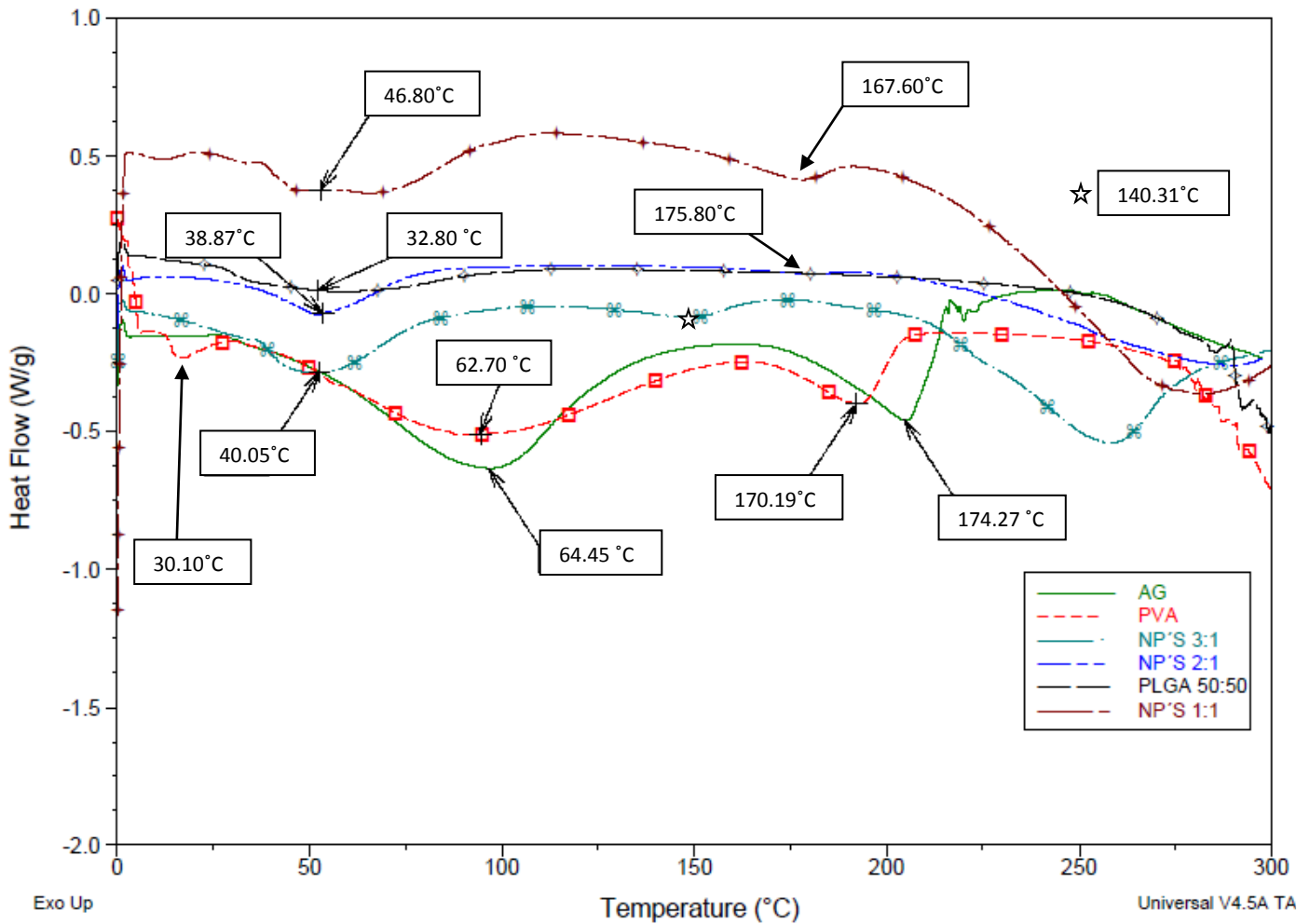


Figura 25. Termogramas de las muestras analizadas. Nota: Los valores de temperatura señalados en el termograma corresponden al inicio de los eventos térmicos.

Podemos observar el termograma correspondiente al PLGA 50/50 (en negro) muestra como este polímero tiene una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) que comienza a los 32.80°C, este resultado se aproxima al rango de temperatura que se describe en la bibliografía el cual comienza a los 42°C y termina a los 55°C (Khan *et al.*, 2012). El PLGA 50/50, es un polímero con estructura amorfa que no presenta por lo tanto, un proceso de cristalización, de ahí que no se observe en el termograma la presencia de un evento térmico correspondiente a la fusión de un cristal.

Debido a que el PLGA 50/50 sufre una hidrólisis formando ácido láctico y glicólico (los cuales son metabolitos naturales) es de gran utilidad pues es un polímero seguro para el organismo. El ácido láctico se degrada en dióxido de carbono y ácido cítrico y el ácido



glicólico se excreta con la orina o se oxida en ácido glioxílico (Pirooznia *et al.*, 2012). Esta es la razón de que se utilice como el componente principal de las NP's además de su aplicación, como ya sabemos, de transportador de fármacos.

En el termograma correspondiente al AG (en verde) se pueden observar dos eventos térmicos importantes: el primero la deshidratación a los 64.45 °C y el segundo evento correspondiente al punto de fusión a los 174.27 °C aunque también ha sido reportado como la descomposición de la fracción del ácido glucurónico convirtiéndose en ácido glicirretínico (Sui *et al.*, 2012).

En el caso del PVAL (en rojo) se observan tres endotermas: el primero a los 30.1 °C correspondiente a la temperatura de transición vítrea, el segundo a los 62.70 °C que corresponde a la deshidratación y el último a los 170.19 °C perteneciente al punto de fusión.

Los 3 termogramas restantes son los correspondientes a las NP's elaboradas con la interacción par-ión TBC-AG. Al comparar el termograma de la interacción 1:1 (TBC-AG) (en café) con los demás se logra identificar el evento térmico que corresponde a la Tg del PLGA 50/50, a los 46.80 °C y el segundo evento identificado es a los 167.60 °C el cual corresponde al punto de fusión del PVAL. En cuanto a los eventos que se observan al principio del termograma están relacionados con impurezas o contaminación de la muestra analizada, puesto que no se presentan en los otros dos.

En el termograma correspondiente a la relación 2:1 (TBC-AG) (en azul marino) se observa el primer evento térmico relacionado con la Tg del PLGA 50:50 a los 38.80 °C y el segundo a los 175.8 °C que corresponde al punto de fusión del PVAL (el cual no se observa tan claramente como en el primer sistema).

En las NP's correspondientes a la relación 3:1(TBC-AG) el evento relacionado con la Tg del PLGA 50:50 se observa a los 40.05 °C y un segundo evento se observa a los 140.31 °C el cual siendo el endoterma más cercano a la temperatura de fusión del PVAL se determina que hay relación entre ambos eventos.

En los 3 casos, la Tg del PLGA 50:50 es diferente, esto se debe a la presencia del contra-ión TBC, el cual tiene la característica de ser higroscópico y su punto de fusión se encuentra en un intervalo de 47 a 50 ° C. Al ser su punto de fusión cercano a la Tg del PLGA 50/50 éste





modifica esta  $T_g$ , como se puede observar en los tres casos (1:1, 2:1 y 3:1) se observa que cada evento térmico tiene un diferente valor de temperatura en comparación con el del PLGA 50:50 solo.

Al ser el PLGA el componente principal de las NP's los termogramas de los sistemas coloidales que contienen a éste polímero deben presentar las mismas transiciones de calor que el del polímero solo. Es por esto que la aparición de algún cambio sugerirá la presencia de interacciones entre los componentes de la formulación y que serán representadas por la aparición de picos o ausencia de estos. Esto se observa en los 3 termogramas de los sistemas de NP's analizados en los cuales se identificó que el segundo evento térmico corresponde al punto de fusión del PVAL, puesto que la temperatura a la cual se observa el endoterma del punto de fusión del PVAL es más cercana al correspondiente a la descomposición del AG, además se debe de considerar que éste estabilizante se encuentra en mayor cantidad en la formulación que el AG.

La ausencia de cambios muy significativos en el termograma de las NP's es importante pues se descarta que se vea afectada alguna de las características específicas del PLGA 50:50, como lo es el tiempo de degradación.

## 2.5. Efecto de la proporción del TBC sobre la encapsulación del AG.

Esta prueba se realizó por medio de la determinación del porcentaje de encapsulación obtenido por la inclusión de la interacción par-iónico. La prueba se realizó por triplicado a tres lotes diferentes de cada relación equimolar estudiada (1:1, 2:1 y 3:1) para calcular el porcentaje de encapsulación promedio en cada caso por medio de HPLC.

### a. Curva de calibración

Los resultados se muestran en la Tabla 5 en la que se determino el C.V.



Tabla 5. Curva de calibración de AG.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN ( $\mu$ /ml)	ÁREA	ÁREA/CONCENTRACIÓN
1A	40	1698165	42454.1
1B		1761959	44048.9
1C		1742555	43563.8
2A	60	2657880	44298.0
2B		2495468	41591.1
2C		2571431	42857.1
3A	70	2945089	42072.7
3B		2971431	42449.0
3C		2971614	42451.6
4A	90	3845609	42728.9
4B		3840265	42669.6
4C		3844730	42719.2
5 <sup>a</sup>	100	4385930	43859.3
5B		4221870	42218.7
5C		4233631	42336.3
		PROMEDIO	42821.2
		DESV. STD	776.5
		C.V. (%)	1.81

Cada punto fue preparado por triplicado. Se determinaron los parámetros estadísticos como la desviación estándar, el promedio y con ello el C.V., el cual es de 1.813 % lo cual es menor a 2% (CIPAM, 2006), por lo tanto, es factible el uso de esta curva de calibración para la cuantificación del AG en las muestras.

La Figura 26 muestra la representación gráfica de las lecturas obtenidas en área vs concentración, del cual se obtuvo la ecuación de la línea recta y el coeficiente de correlación que es > 99%. Este criterio, junto con el C.V. que es < a 2% son parámetros suficientes para considerar útil esta curva de calibración.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación del AG en las NP's.



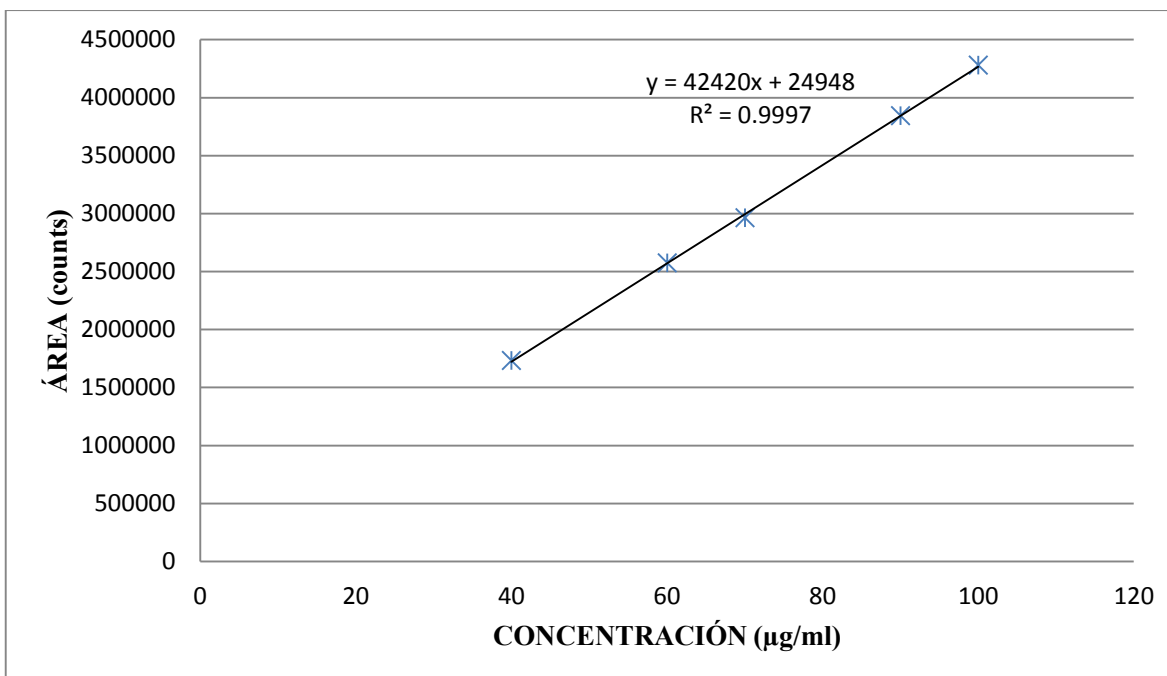


Figura 26. Curva de calibración para cuantificación del AG mediante HPLC y sus parámetros de regresión.

Tabla 6. Cuantificación del AG encapsulado en las NP's.

SISTEMA	LOTE	PESO DE LA MUESTRA (mg)	ÁREA	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	% DE ENCAPSULACIÓN	% PROMEDIO DE ENCAPSULACIÓN
1:1 (TBC-AG)	A	98.3	1,088,782	0.62907	1.5188	1.6046
	B	95.5	1,154,264	0.66761	1.6591	
	C	101.1	1,204,098	0.69694	1.6360	
2:1 (TBC-AG)	A	109.8	1,426,278	0.82770	1.7890	1.9805
	B	114.4	1,979,883	1.15352	2.3930	
	C	94.5	1,210,414	0.70066	1.7596	
3:1 (TBC-AG)	A	115.9	4,087,134	2.39372	4.9017	4.6525
	B	113.8	3,460,265	2.02478	4.2227	
	C	115.8	4,026,797	2.35821	4.8331	
*X	A	99.2	*Sin lectura	N/A	N/A	N/A
	B	102.5				
	C	105.4				

\*Sistema sin la inclusión de la interacción par-iónico. La cantidad encapsulada está por debajo del límite de cuantificación, por lo que no se obtuvo lectura.



De acuerdo a estos resultados, el uso de la interacción par-iónico entre el AG y el TBC provoca un incremento en la encapsulación del AG en las NP's, pues al realizar la elaboración de las NP's sin la inclusión previa de la interacción par-iónico no se obtuvo lectura en el cromatograma correspondiente, debido a que la cantidad de AG no sobrepasó el límite de detección y por ende el límite de cuantificación. Como ya fue revisado en el marco teórico el AG es hidrosoluble, lo que significa que es una molécula poco encapsulable en NP's por los métodos ya vistos, sin embargo, al incluir al TBC y provocar la formación de la interacción par-iónico se provoca un incremento de la encapsulación del AG al aumentar la presencia de este contra-ión, pues mejora la partición del AG en el acetato de etilo; lo que permitió realizar la fácil extracción del AG de la fase acuosa o de la solución búfer al acetato de etilo.

El TBC mejora la partición del AG porque existe un apareamiento iónico en el cual tanto el AG (anión) como el TBC (catión) forman por atracciones coulombicas un par-ión. Tal par-ión tiene la característica de ser, de acuerdo a la clasificación vista en el marco teórico, del segundo tipo, en el cual la parte positiva se encuentra mayormente expuesta y libre para ser solvatada, o en nuestro caso, disponible para poder interactuar a nivel iónico con la superficie del PLGA 50/50, que por tener un grupo carboxílico final, puede ser atraído hacia ella, obteniéndose así la adsorción del AG en su superficie.

De acuerdo a estos resultados, los porcentajes de encapsulación de los sistemas 1:1 y 2:1 son muy bajos (1.60 y 1.98% respectivamente) y el sistema que presenta una mejor encapsulación es el de la relación TBC-AG 3:1 con un 4.65% de los 150 mg de AG que contiene la formulación; entre los primeros dos sistemas no se encuentra una gran diferencia, esto se verificó mediante el análisis de varianza (ver anexo 2).

A pesar de presentar un incremento del porcentaje de encapsulación en relación al incremento del contra-ión, la cantidad encapsulada en los tres casos es muy baja. El porcentaje de encapsulación se puede ver afectado por dos razones, la primera debido a que al momento de realizar la emulsión de las fases, el AG que se extrajo de la fase acuosa por la interacción par-iónico al encontrarse de nuevo en contacto con esa fase tiende a regresar a ella y la segunda debido a que la cantidad utilizada de PLGA 50/50 en la formulación y el cual es el principal componente de las NP's no fue la suficiente, al no existir el suficiente polímero, el AG que se



encuentra disponible al momento de la precipitación del PLGA 50/50 en NP's no se encapsula en su totalidad, quedando un aproximadamente un 95 % de este fuera de las NP's.

Zheng *et al* (2011) realizó la encapsulación del AG mediante el método de gelificación iónica utilizando iones de calcio y como base derivados de carboximetil quitosano, obteniendo porcentajes de encapsulación entre 61.9 y 62.7 %. La cuantificación se realizó de igual manera por HPLC pero se cuantificó la cantidad fuera del sistema y por diferencia de concentraciones se obtuvo la cantidad encapsulada.

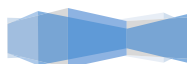
El método de gelificación iónica tiene la característica en comparación con el de emulsificación-difusión de no presentar los puntos críticos que puedan representar pérdida del fármaco AG inicial, como son tiempos largos de disolución de excipientes o emulsificantes, el uso de solventes orgánicos y puntos donde exista contacto entre el fármaco hidrosoluble y una fase acuosa, contrario al método utilizado en el cual una vez formado el par-ión, esta interacción se ve afectada por el contacto del AG con la fase acuosa tanto al momento de realizar la emulsión como al realizar la difusión.

Mientras que Aguilar *et al* (2014), reportan que utilizando el método desplazamiento de solvente elaboraron NP's de Poli (metil vinil éter-co-anhídrido maleico) PVM/MA con una cantidad de AG encapsulado de 15.07  $\mu\text{g}$  por cada mg de NP's. Esto es más aproximado a nuestro resultado en comparación con el primer autor, ya que por el método de emulsificación-difusión con la inclusión del par-ión se logran encapsular 11.29  $\mu\text{g}$  de AG por cada mg de NP's.



## VIII. CONCLUSIONES.

- Se replicó el método de emulsificación-difusión incluyendo la interacción par-iónico y se identificó que la inclusión de una sal de amonio como contra-ión (TBC) dentro de la formulación mejora el tamaño de partícula disminuyéndolo y el potencial  $Z$ , aumentándolo.
- El incremento en el porcentaje de encapsulación del método emulsificación-difusión se debe a que el apareamiento iónico entre el TBC y el AG mejora la afinidad de este fármaco hidrosoluble a un medio no acuoso (acetato de etilo) aumentando su disponibilidad para ser encapsulado además el porcentaje de encapsulación es directamente proporcional al incremento del TBC, siendo el sistema 3:1 (TBC-AG) el que presenta el mayor porcentaje de encapsulación (4.65%).
- El método emulsificación-difusión con la inclusión de la interacción par-iónico (TBC-AG) tiene la desventaja en los 3 casos estudiados (1:1, 2:1, 3:1) de presentar una baja estabilidad por tener valores de potencial  $Z$  por debajo del valor sobre el cual se consideran estables ( $\pm 30$  mV), en relación a su tamaño estas cumplen con esta característica al estar dentro del rango establecido (desde 5 nm hasta aproximadamente 1000 nm) y su morfología es de tipo esférica sin embargo, de los 3 casos el sistema 3:1 (TBC-AG) es el que presenta el tamaño de partícula más pequeño (139.4 nm) y la mejor estabilidad (potencial  $Z$  igual a -11 mV) y su análisis calorimétrico no muestra la aparición de eventos no relacionados con los componentes de la formulación, solo se resalta la ausencia de eventos térmicos del AG debido a la baja encapsulación obtenida.



## IX. PERSPECTIVAS.

Dentro de las perspectivas para este trabajo está el estudio de otras variables en la elaboración que influyen principalmente en la eficiencia de encapsulación del método sobre un fármaco hidrosoluble, como lo es el aumentar el porcentaje del polímero utilizado en la formulación, encontrar una interacción par-ión más afín al medio orgánico o un contra-ión que provoque una mejora en el porcentaje de fármaco extraído de la fase acuosa y por lo tanto que mejore la afinidad de este al solvente orgánico.

Realizar la validación del método analítico que se utilizo, de tal manera que los resultados obtenidos sean más exactos y se demuestre la reproducibilidad del método.

Acortar los tiempos del método en general, de tal manera que se agilice el proceso de elaboración de las NP's.

Realizar un estudio de liberación del AG encapsulado en las NP's que permita tener un panorama general de su comportamiento.



## X. REFERENCIAS.

- Aguilar, I., Alcalá, S., Llera, V., Ganem, A. (2014). "Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) containing glycyrrhizic acid intended for vaginal administration." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 13, 1-8.
- Allémann, E., Gurny, R., Doelker, E. (1992). "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process, Influence of process parameters on particle size." *International Journal of Pharmaceutics*, 87, 247-253.
- Anton, N., Benoit, JP., Saulnier, P. (2008). "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates." *Journal of Controlled Release*, 128, 185-199.
- Atherton, B.M y Weissman, S. Y. (1961). "Association between sodium and naphthalenide ions." *Journal of the American Chemical Society*, 83, 1330-1334.
- Bilati, U., Allémann, E., Doelker, E. (2005). "Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 375-388.
- Brewer, M., Zhang, T., Dong, W., Rutherford, M., Tian, Z. (2007). "Future Approaches of Nanomedicine in Clinical Science." *The Medical Clinic of North America*, 91, 963-1016.
- Ceschel, G.C., Badiello, R., Ronchi, C., Maffei, P. (2003). "Degradation of components in drug formulations: a comparison between HPLC and DSC methods." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32, 1067-1072.
- Fenwick, G.R., Lutomski, J., Nieman, C. (1990). "Licorice, *Glycyrrhiza glabra* L. Composition, Uses and Analysis." *Food Chemistry*, 38, 119-143.
- Furtado, V., Legrand, P., Gulikb, A., Bourdonc, O., Gref, R., Labarrea, D., Barratt, G. (2001). "Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules." *Biomaterials*, 22, 2967-2979.
- Higuchi, T., Michaelis, A., Hurwitz, A. (1967). "Ion pair extraction of pharmaceutical amines." *Analytical Chemistry*, 39, 974-979.
- Khan, S., Khan, M., Kenneth, D., Matthew, G. (2012). "Using additive manufactured tooling in the fabrication of poly (L-Lactide-co-Glycolide) implants." *Innovative Developments in Virtual and Physical Prototyping*, 437-441.
- Kraus, C.A (1956). "The ion-pair concept: its evolution and some applications." *The Journal of Physical Chemistry*, 60, 129-141





- Khoe, S., y Yaghoobian, M. (2008). "An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion." *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (6), 2392-9.
- Kumari, A, et al. (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Letchford, K. y Burt, H. (2007). "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 259-269.
- Lee, S. J., Kim, S. W., (1997). "Hydrophobization of ionic drugs for transport through membranes." *Journal of Controlled Release*, 6, 3-13.
- Matkovich, C.E. (1973). "Salting-out of acetone from water: basis of a new solvent extraction system." *Analytical Chemistry*, 45, 1915-1921.
- Marverl Instruments. (2006). "Size, molecular weight and zeta potential theory." User manual Zetasizer nano series, 1-11.
- Marlvern Instruments (2012) "Light scattering techniques support formulation development" Eurolab, 1-2.
- Mora, C.E., Fessi, H., Elaissari, A. (2009). "Polymer-based nanocapsules for drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics*, 1-30.
- Morrow, KJ Jr., Bawa, R., Wei, C. (2007). "Recent Advances in Basic and Clinical Nanomedicine." *The Medical Clinic of North America*, 91, 805-843.
- Obolentseva, G. V., Litvinenko, V. I., Ammosov, A. S., Popova, T. P., Sampiev, A. M., (1999). "Pharmacological and therapeutic properties of licore preparations." *Pharmaceutical Chemist Journal*, 33, 8.
- Pinto, C., Neufeld, R., Ribeiro, A., Veiga, F. (2006). "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, 8- 21.
- Pompei, R., Laconi, S., Ingianni, A. (2009). "Antiviral Properties of Glycyrrhizic Acid and its Semisynthetic Derivatives." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 996-1001.
- Quintanar, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E. (1996). "Influence of stabilizing agent and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique." *International Journal of Pharmaceutics*, 143, 133-141.



Quintanar, 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, 1113-1128.

Quintanar, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E. (1997). "Applications of the Ion-Pair Concept to Hydrophilic Substances with Special Emphasis on Peptides." *Pharmaceutical Research*, 14, 2.

Roberts, R.C., Szysarc, M. (1965). "The chemistry of the radical anion of tetraphenylethylene." *Journal of the American Chemical Society*, 87, 5542-5548

Sadek, H y Fuoss, R.M. (1954). "Electrolite-solvent interaction. IV. Tetrabutylammonium bromide in methanol-carbon tetrachloride and methanol-heptane mixtures." *Journal of the American Chemical Society*, 76,5897-5901.

Shin, J., Torrison, J., Choi, C., Gonzalez, S., Crabo, B. (1997). "Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection boars." *Veterinary Microbiology*, 55, 337-346.

Winstein, S., Clippinger, E., Fainberg, A., Robinson, G., (1954). "Salt effects and ion-pairs in solvolisis." *Journal of the American Chemical Society*, 76, 2597–2598.

Zheng, H., Zhang, X., Yin, Y., Xiong, F., Gong, X., Zhu, Z., Xu, P. (2011). "In vitro characterization, and in vivo studies of crosslinked lactosaminated carboxymethyl chitosan nanoparticles." *Carbohydrate Polymers*, 84, 1048–1053.

Buenas Prácticas de Validación. Guía Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación CIPAM. México, 2006.

ec.europa.eu (s.f.) quaternary ammonium cation, recuperado el 10 de agosto de 2015, de <http://ec.europa.eu/health/opinions/en/biocides-antibiotic-resistance/glossary/pqrs/quaternary-ammonium-cation.htm>.



## ANEXO 1: Como trabaja la DLS

En la dispersión dinámica de la luz, se mide la velocidad a la cual las partículas están difundiéndose debido al movimiento browniano. Esto se hace mediante la medición de la velocidad a la que la intensidad de la luz dispersada fluctúa (Malvern Instruments., 2006).

Imaginemos una celda, que contiene partículas las cuales son estacionarias, es iluminada por un láser y una pantalla se utiliza para ver la celda de la muestra (Figura 1). Entonces se puede observar que los espacios oscuros es en donde las adiciones de fase de la luz dispersada son mutuamente destructivas y se anulan entre sí (figura 2-A) mientras que las manchas brillantes de luz son donde la luz dispersada por las partículas llega con la misma fase e interfiere constructivamente para formar una mancha brillante (Figura 2-B) (Malvern Instruments., 2006).

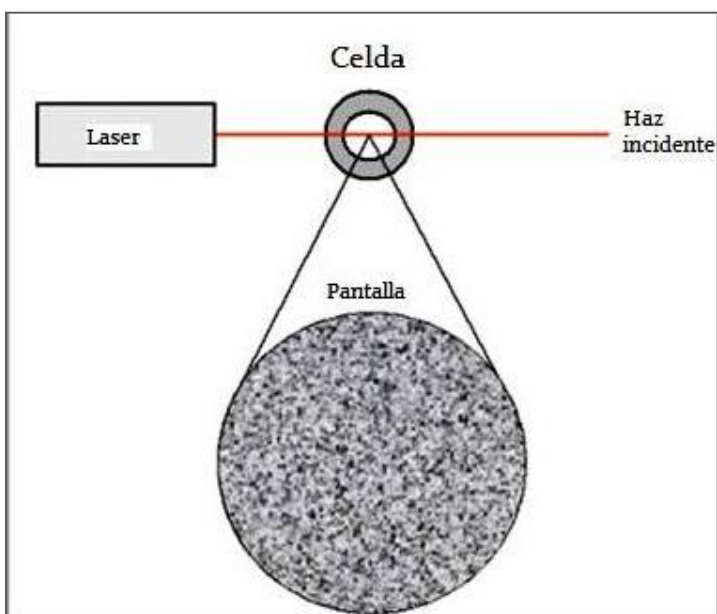


Figura 1. Representación esquemática de la dispersión dinámica de la luz.

Para un sistema de partículas sometidas a movimiento browniano, estas se encuentran formando nuevos patrones pues se observa como la posición de cada mancha está en constante movimiento. La velocidad a la que se producen las fluctuaciones de intensidad dependerá del tamaño de las partículas (Malvern Instruments., 2006). En la Figura 3 se ilustran esquemáticamente las fluctuaciones de intensidad típicas que surgen de una dispersión de



partículas grandes y de una dispersión de partículas pequeñas. Las partículas pequeñas son causa de que la intensidad varíe más rápidamente que las grandes.

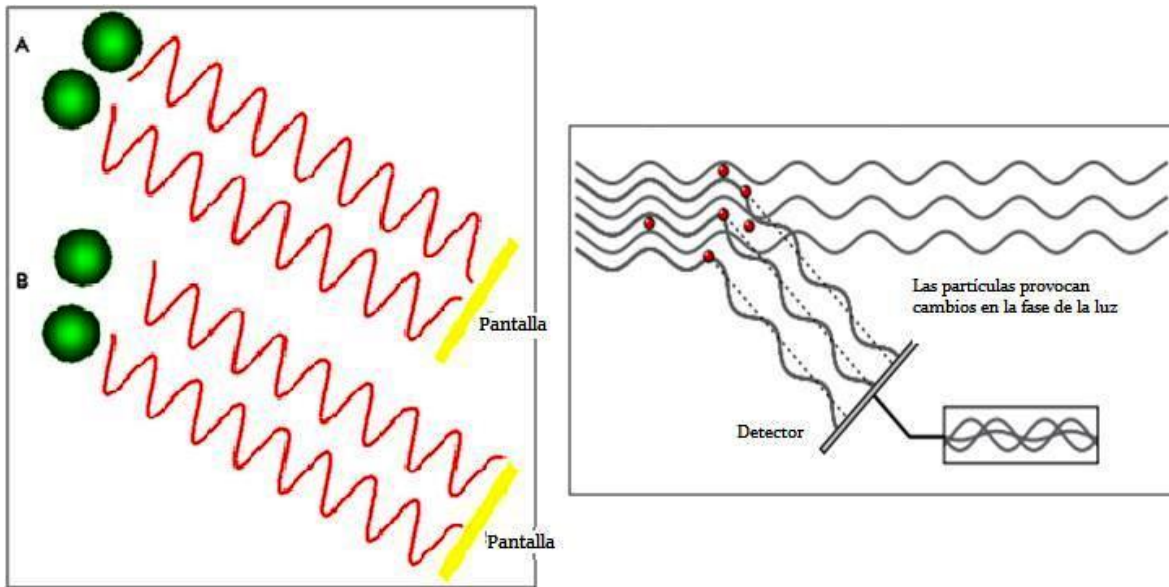


Figura 2. Adiciones de la fase de la luz dispersada. La señal observada depende de la fase de la luz dispersada que llega al detector.



Figura 3. Fluctuaciones de intensidad típicas por partículas grandes y pequeñas.



Un sistema de dispersión dinámica de la luz típico consta de seis componentes principales (Figura 4). En primer lugar, un láser (1) que proporciona una fuente de luz para iluminar la muestra contenida en una celda (2) para concentraciones diluidas, la mayor parte del haz de láser pasa a través de la muestra, pero en algunos casos es dispersada por las partículas dentro de la muestra en todos los ángulos. Un detector (3) se utiliza para medir esta luz dispersada. En la serie Zetasizer Nano, la posición del detector será en cualquiera de  $173^\circ$  o  $90^\circ$ , dependiendo del modelo. La intensidad de la luz dispersada debe estar dentro de un rango específico para que el detector la mida con éxito. Si se detecta un exceso de luz, entonces el detector se saturará. Para superar esto, un atenuador (4) se utiliza para reducir la intensidad de la fuente del láser y por lo tanto reducir la intensidad de la dispersión. Para las muestras que no dispersan mucha luz, tales como partículas muy pequeñas o muestras de baja concentración, la cantidad de luz dispersada se debe aumentar. En esta situación, el atenuador permitirá pasar más luz láser a través de la muestra. Para las muestras que dispersan más luz, como las partículas grandes o muestras con mayor concentración, la intensidad de la luz dispersada se debe disminuir (Malvern Instruments., 2006).

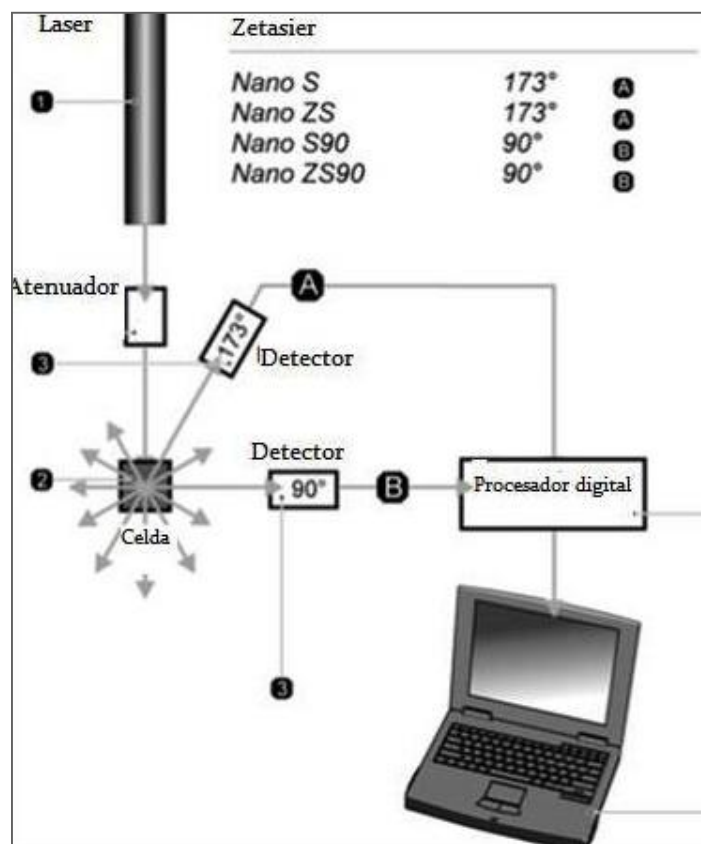


Figura 4. Configuraciones ópticas de la serie Zetasizer Nano para las mediciones de dispersión dinámica de la luz.



➤ Movilidad electroforética.

El Zetasizer Nano calcula el potencial  $Z$  mediante la determinación de la movilidad electroforética y posteriormente la aplicación de la ecuación de Henry. La movilidad electroforética se obtiene mediante la realización de un experimento de electroforesis en la muestra y la medición de la velocidad de las partículas utilizando Laser Doppler Velocimetry (LDV) (Malvern Instruments., 2006). La movilidad electroforética se mide mediante un sistema de micro-electroforesis clásico (Figura 5), este sistema consta de una celda con electrodos en cada extremo al que se aplica un potencial. Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta (Malvern Instruments., 2006).

➤ Laser Doppler Velocimetry

Láser Doppler Velocimetría (LDV) es una técnica utilizada para medir la velocidad de las partículas pequeñas dentro de las corrientes de un fluido que se mueven a la velocidad del fluido que se está midiendo en la electroforesis.

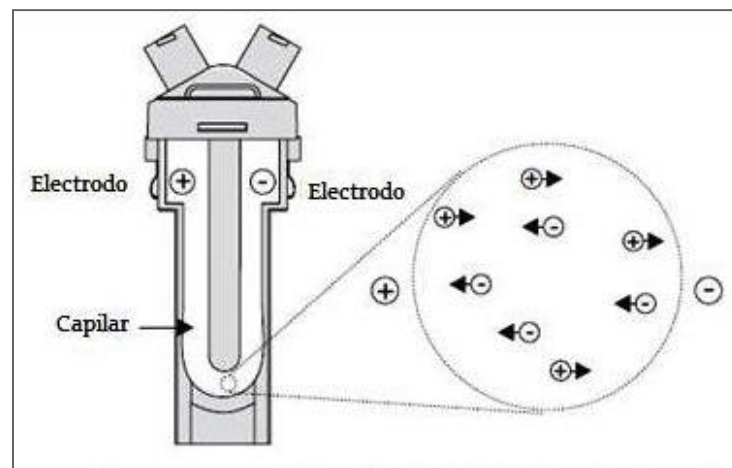


Figura 5. Sistema de micro-electroforesis utilizado en el Zetasizer Nano series de Malvern.



La luz dispersada en un ángulo de  $17^\circ$  se combina con el haz de referencia (Figura 6). Esto produce una señal de intensidad fluctuante donde la tasa de fluctuación es proporcional a la velocidad de las partículas. Un procesador de señal digital se utiliza para extraer las frecuencias características de la luz dispersada.

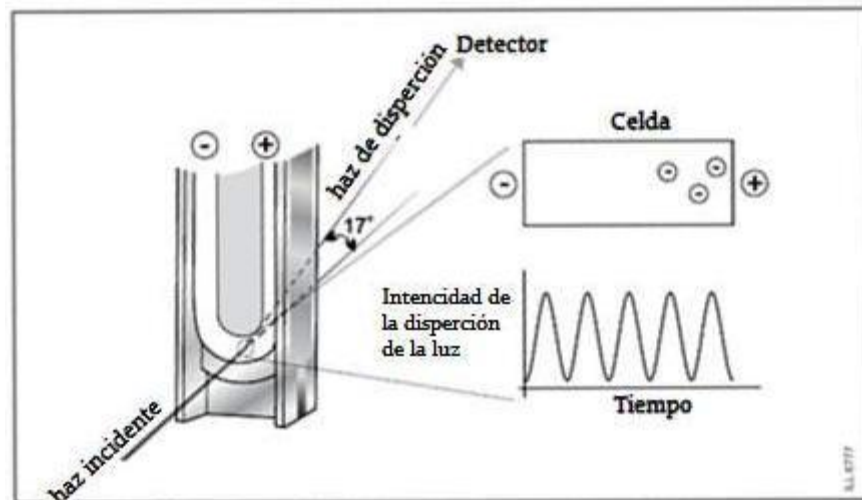


Figura 6. Las partículas dispersan la luz provocando fluctuaciones que son proporcionales a su velocidad.

Para evitar mediciones equívocas se realiza un refinamiento del sistema que implica la modulación de uno de los haces de láser con un espejo oscilante. Esto da una medida inequívoca de la señal del potencial Z. Un segundo beneficio del modulador es que las partículas de baja o de movilidad cero dan una igualmente buena señal, por lo que la medición es tan exacta como para las partículas con una alta movilidad (Malvern Instruments., 2006).

➤ Medición del potencial Z.

El sistema de medición de potencial Z se compone de seis componentes principales (Figura 7). En primer lugar se utiliza un láser (1) para proporcionar una fuente de luz para iluminar las partículas dentro de la muestra; para las mediciones de potencial Z se divide esta fuente de luz para proporcionar un incidente y el haz de referencia.



El haz de láser pasa a través del centro de la celda de la muestra (2), y se detecta la dispersión en un ángulo de  $17^\circ$ . Al insertar la celda, las terminales de la celda permiten que el sistema reconozca el tipo de celda, y se configura el software para utilizar la secuencia de medición correcta (Malvern Instruments., 2006).

Cuando un campo eléctrico es aplicado a la celda, las partículas se mueven lo que hará que la intensidad de la luz detectada fluctúe con una frecuencia proporcional a la velocidad de las partículas.

Un detector envía esta información a un procesador de señal digital. Esta información luego se pasa a un ordenador, donde el software Zetasizer Nano produce un espectro de frecuencia de la que se calcula la movilidad electroforética y la información del potencial Z.

La intensidad de la luz dispersada dentro de la celda debe estar dentro de un rango específico para que el detector mida con éxito. Si se detecta un exceso de luz, entonces el detector estará sobrecargado. Para superar esto un atenuador se utiliza para reducir la intensidad del láser y por lo tanto reducir la intensidad de la dispersión. Para muestras que no dispersan la cantidad de luz necesaria, tales como partículas muy pequeñas o muestras de baja concentración, la cantidad de luz dispersada se debe aumentar. El atenuador automáticamente pasara más luz a través de la muestra.

Para las muestras que dispersan más luz, como las partículas grandes o muestras de mayor concentración, la cantidad de luz dispersada se debe disminuir. El atenuador reducirá automáticamente la cantidad de luz que pasa a través de la muestra (Malvern Instruments., 2006).





## ANEXO 2: ANOVA para las pruebas de caracterización.

### ➤ Tamaño de partícula.

Tabla 1. ANOVA para tamaño de partícula por relación equimolar (TBC-AG)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	139.087	2	69.5433	0.57	0.5930
Intra grupos	731.033	6	121.839		
Total (Corr.)	870.12	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza de tamaño de partícula en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.570781, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del tamaño de partícula entre un nivel de relación quimolar (TBC-AG) y otro, con un nivel del 95.0% de confianza (Figura 22).

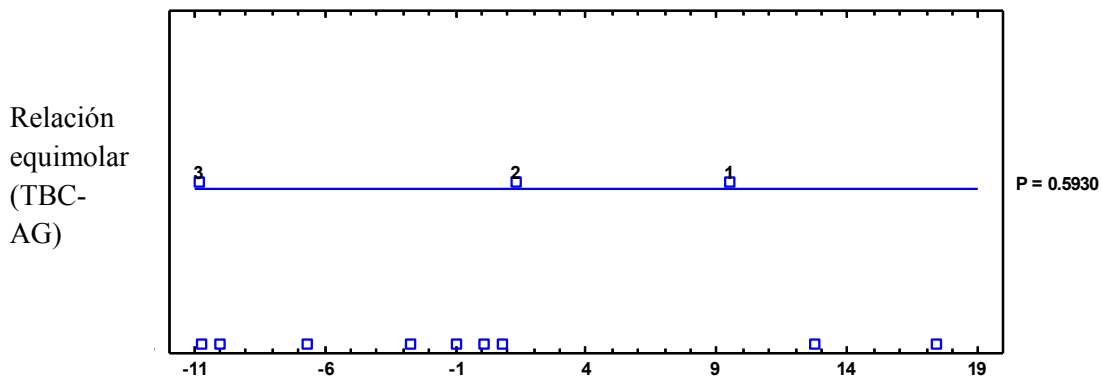
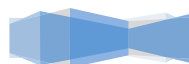


Figura 7. ANOVA para el tamaño de partícula.



➤ Potencial Z.

Tabla 2. ANOVA para potencial Z por relación equimolar (TBC-AG)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.54709	2	2.27354	0.27	0.7750
Intra grupos	51.2743	6	8.54571		
Total (Corr.)	55.8214	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza de potencial Z en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 1.15185, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de potencial Z entre un nivel de relación equimolar (TBC-AG) y otro, con un nivel del 95.0% de confianza (Figura 25).

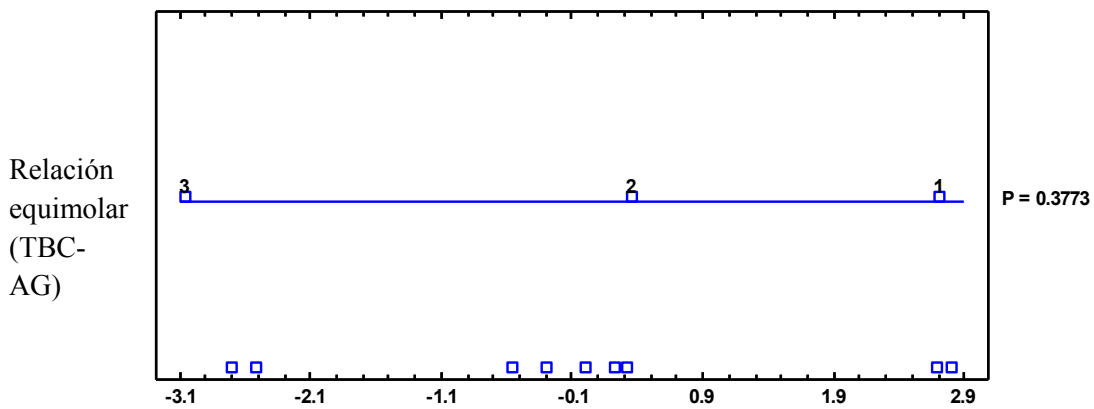


Figura 8. ANOVA para el potencial Z.



➤ Porcentaje de encapsulación.

Tabla 3. ANOVA para porcentaje de encapsulación por relación equimolar (TBC-AG)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16.5701	2	8.28507	90.98	0.0000
Intra grupos	0.546395	6	0.0910659		
Total (Corr.)	17.1165	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza del porcentaje de encapsulación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 90.9788, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de encapsulación entre un nivel de relación equimolar (TBC-AG) y otro, con un nivel del 95.0% de confianza (Figura 30).

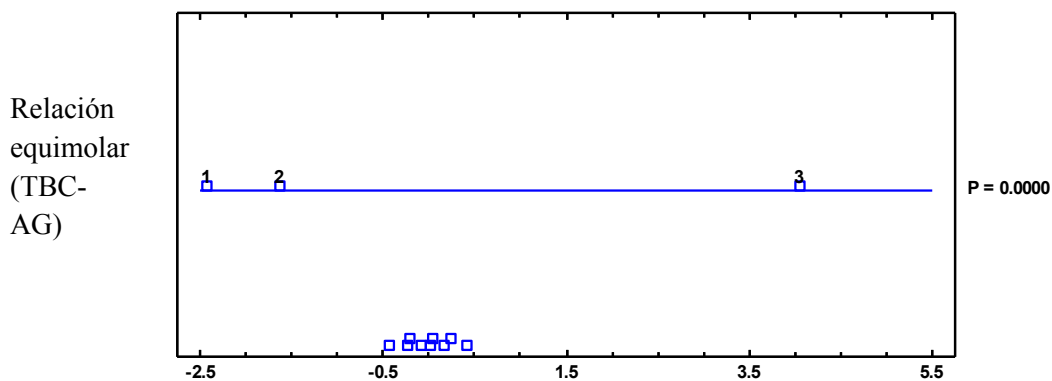
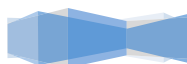


Figura 9. ANOVA para él porcentaje de encapsulación



### ANEXO 3: Información de análisis por HPLC y Zetasizer Nano ZS®

```

Title       : Muestra 1:1
Run File    : d:\tesistas\luis\pruebas\salsal 2\1 en 5\1.1 1.5.run
Method File : D:\Tesistas\Luis\Metodo AG.mth
Sample ID   : 1.1 L.5
Injection Date: 18/08/2007 05:13 a.m.    Calculation Date: 18/08/2007
05:33 a.m.
Operator    : Luis                      Detector Type: ProStar/Dynamax (2
Volts)
Workstation : DATOS                      Bus Address   : 24
Instrument   : Varian Star #1             Sample Rate   : 5.00 Hz
Channel      : 1 = INTGR 1               Run Time      : 20.003 min
** LC Workstation Version 6.41 ** 03169-2690-AE7-0761 **
Run Mode     : Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent

  Peak      Peak      Result      Ret.      Time      Area      Width
  Status    No.      Name      ( )      Time      Offset      Sep.      1/2
  Codes
-----
          5.0648    1.229    0.000    219228    BV    9.4
          66.9714    1.367    0.000    2898854   VB    4.7
          27.9639   10.557    0.000    1204098   BB   33.8
-----
Totals:          100.0001          0.000    4328496
Total Unidentified Counts : 4328497 counts
Detected Peaks: 3          Rejected Peaks: 0          Identified Peaks: 0
Multiplier: 1          Divisor: 1          Unidentified Peak Factor: 0
Baseline Offset: 50192 microVolts          LSB: 1 microVolts
Noise (used): 1688 microVolts - monitored before this run
Vial: 2          Injection Number: 1          Injection Volume: 100          ul
*****

```



Title : Muestra 2:1  
 Run File : d:\tesistas\luis\pruebas\2.1 1.2.run  
 Method File : D:\Tesistas\Luis\Metodo AG.mth  
 Sample ID : Sob L.2 S.2 2.1  
 Injection Date: 06/05/2007 07:05 a.m. Calculation Date: 06/05/2007 07:25 a.m.  
 Operator : Luis Detector Type: ProStar/Dynamax (2 Volts)  
 Workstation : DATOS Bus Address : 24  
 Instrument : Varian Star #1 Sample Rate : 5.00 Hz  
 Channel : 1 = INTGR 1 Run Time : 20.003 min  
 \*\* LC Workstation Version 6.41 \*\* 03169-2690-AE7-0761 \*\*  
 Run Mode : Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent

Peak Status	Peak Name	Result	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. Code	1/2 (sec)
		35.4862	1.323	0.000	1131804	BB	7.9
		2.4372	2.354	0.000	77732	BB	5.1
		62.0766	8.751	0.000	1979883	BB	39.1
Totals:		100.0000		0.000	3189419		

Total Unidentified Counts : 3189419 counts  
 Detected Peaks: 3 Rejected Peaks: 0 Identified Peaks: 0  
 Multiplier: 1 Divisor: 1 Unidentified Peak Factor: 0  
 Baseline Offset: 84683 microVolts LSB: 1 microVolts  
 Noise (used): 2695 microVolts - monitored before this run  
 Vial: 4 Injection Number: 1 Injection Volume: 100 ul



Title : Muestra 3:1  
 Run File : d:\tesistas\luis\pruebas\datos 2\3.1.run  
 Method File : D:\Tesistas\Luis\Metodo AG.mth  
 Sample ID : 4B  
 Injection Date: 05/02/2007 07:51 a.m. Calculation Date: 05/02/2007  
 08:03 a.m.  
 Operator : Luis Detector Type: ProStar/Dynamax (2  
 Volts)  
 Workstation : DATOS Bus Address : 24  
 Instrument : Varian Star #1 Sample Rate : 5.00 Hz  
 Channel : 1 = INTGR 1 Run Time : 12.003 min  
 \*\* LC Workstation Version 6.41 \*\* 03169-2690-AE7-0761 \*\*  
 Run Mode : Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent

Ret. Peak Status	Time Peak Name	Result	Width Time (min)	Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	1/2 (sec)
		2.3672	1.219	0.000	83896	BB	0.0
		97.6328	8.804	0.000	3460265	BB	40.8

-----		=====	-----	=====	=====	-----	-----
Totals:		100.0000		0.000	3544161		

Total Unidentified Counts : 3544160 counts  
 Detected Peaks: 2 Rejected Peaks: 0 Identified Peaks: 0  
 Multiplier: 1 Divisor: 1 Unidentified Peak Factor: 0  
 Baseline Offset: 10602 microVolts LSB: 1 microVolts  
 Noise (used): 1352 microVolts - monitored before this run  
 Vial: 81 Injection Number: 1 Injection Volume: 100 ul



# Size Distribution Modal Analysis

v2.1



## Sample Details

**Sample Name:** Lote 2 1:1 Sal 2 1

**SOP Name:** TP SAL 2.sop

**General Notes:**

<b>File Name:</b> LuisMa.dts	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 49	<b>Dispersant RI:</b> 1.330
<b>Material RI:</b> 1.59	<b>Viscosity (cP):</b> 0.8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0.010	<b>Measurement Date and Time:</b> miércoles, 09 de octubre de 2...

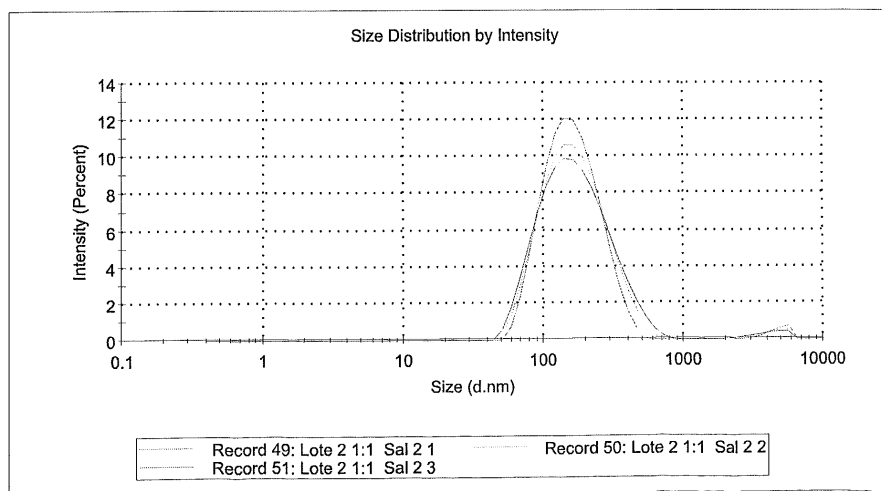
## System

<b>Temperature (°C):</b> 25.0	<b>Duration Used (s):</b> 50
<b>Count Rate (kcps):</b> 239.5	<b>Measurement Position (mm):</b> 5.50
<b>Cell Description:</b> Clear disposable zeta cell	<b>Attenuator:</b> 11

## Results

	Size (d.nm...)	Width (d.nm...)	% Intensity	Volume	Number
<b>Z-Average (d.nm):</b> 149.1	<b>Peak 1:</b> 171.8	77.25	97.9	69.7	100.0
<b>Pdl:</b> 0.207	<b>Peak 2:</b> 4722	767.2	2.1	30.3	0.0
<b>Intercept:</b> 0.707	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.000	0.0	0.0	0.0

**Result quality :** Good



# Zeta Diagnostics Report

v2.3



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

## Sample Details

**Sample Name:** L.2 1.1 Sal 2 3  
**SOP Name:** NP-ZUMpotZ.sop  
**File Name:** LuisMa.dts  
**Record Number:** 54  
**Measurement Date and Time:** miércoles, 09 de octubre de ...  
**Dispersant Name:** Water  
**Dispersant RI:** 1.330  
**Viscosity (cP):** 0.8872

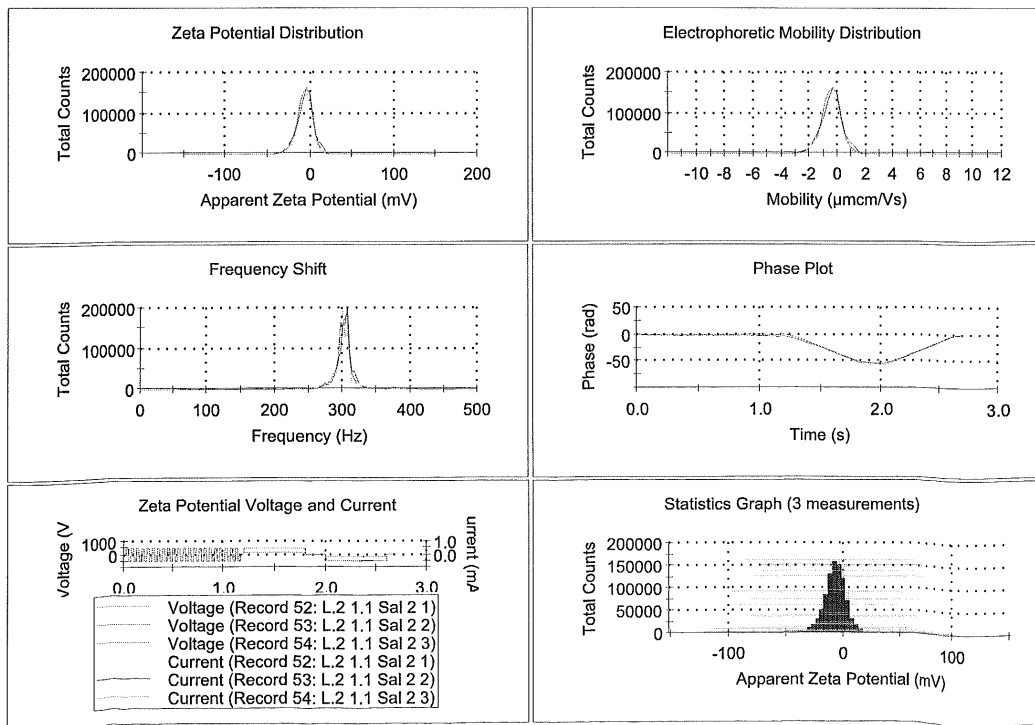
## System

**Temperature (°C):** 25.0  
**Count Rate (kcps):** 62.3  
**Cell Description:** Clear disposable zeta cell  
**Zeta Runs:** 20  
**Measurement Position (mm):** 2.00  
**Attenuator:** 8

## Results

**Result quality:** Good  
**Zeta Potential (mV):** -5.49  
**Zeta SD (mV):** 9.49  
**Mobility (µmcm/Vs):** -0.4302  
**Mobility SD (µmcm/Vs):** 0.7443  
**Wall Zeta Potential (mV):** -10.2  
**Effective Voltage (V):** 148  
**Conductivity (mS/cm):** 0.244

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1:	-5.49	100.0	9.49
Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Peak 3:	0.00	0.0	0.00





**Size Distribution Modal Analysis**  
v2.1



**Sample Details**

**Sample Name:** Lote 2 2.1 Sal 2 1  
**SOP Name:** NP-LUISMA-TP.sop  
**General Notes:**

**File Name:** LuisMa.dts      **Dispersant Name:** Water  
**Record Number:** 73      **Dispersant RI:** 1.330  
**Material RI:** 1.59      **Viscosity (cP):** 0.8872  
**Material Absorbtion:** 0.010      **Measurement Date and Time:** miércoles, 09 de octubre de 2...

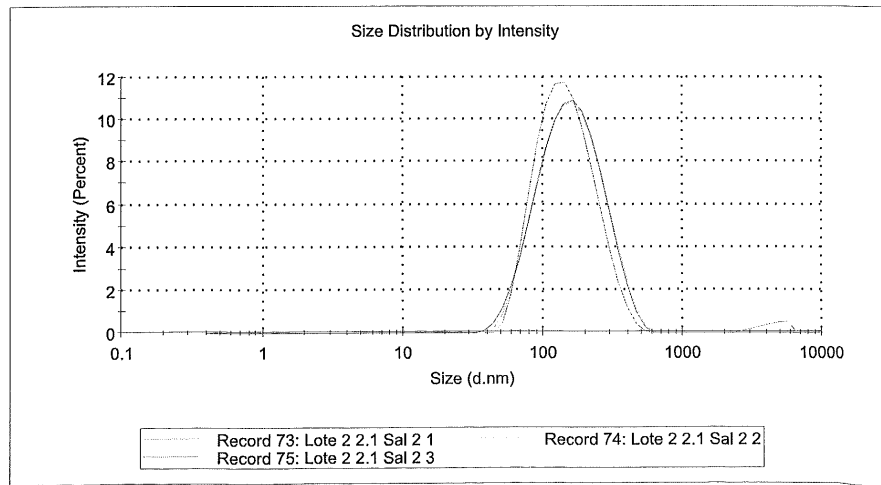
**System**

**Temperature (°C):** 25.0      **Duration Used (s):** 50  
**Count Rate (kcps):** 177.6      **Measurement Position (mm):** 5.50  
**Cell Description:** Clear disposable zeta cell      **Attenuator:** 11

**Results**

	Size (d.nm...)	Width (d.nm...)	% Intensity	Volume	Number
<b>Z-Average (d.nm):</b>	134.4				
<b>Pdl:</b>	0.197				
<b>Intercept:</b>	0.698				
<b>Peak 1:</b>	157.8	74.71	97.9	77.8	100.0
<b>Peak 2:</b>	4390	923.9	2.1	22.2	0.0
<b>Peak 3:</b>	0.000	0.000	0.0	0.0	0.0

**Result quality : Good**



# Zeta Diagnostics Report

v2.3



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

## Sample Details

**Sample Name:** Lote 3 2.1 Sal 2 1  
**SOP Name:** NP-ZUMpotZ.sop  
**File Name:** LuisMa.dts  
**Record Number:** 76  
**Measurement Date and Time:** miércoles, 09 de octubre de ...  
**Dispersant Name:** Water  
**Dispersant RI:** 1.330  
**Viscosity (cP):** 0.8872

## System

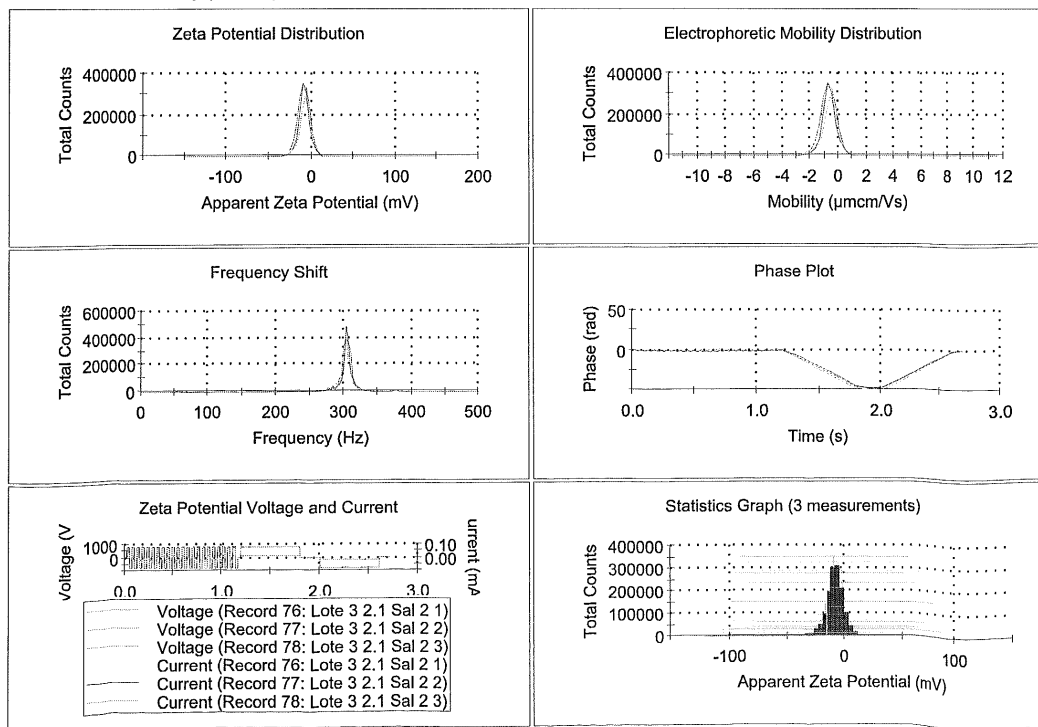
**Temperature (°C):** 25.0  
**Count Rate (kcps):** 199.1  
**Cell Description:** Clear disposable zeta cell  
**Zeta Runs:** 20  
**Measurement Position (mm):** 2.00  
**Attenuator:** 10

## Results

**Result quality:** Good

**Zeta Potential (mV):** -9.08  
**Zeta SD (mV):** 6.94  
**Mobility (µcm/Vs):** -0.7117  
**Mobility SD (µcm/Vs):** 0.5437  
**Wall Zeta Potential (mV):** -4.54  
**Effective Voltage (V):** 148  
**Conductivity (mS/cm):** 0.0431

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1:	-9.08	100.0	6.94
Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Peak 3:	0.00	0.0	0.00



# Size Distribution Modal Analysis

v2.1



## Sample Details

**Sample Name:** Lote 3 3:1 Sal 2 3  
**SOP Name:** NP-LUISMA-TP.sop  
**General Notes:**

<b>File Name:</b> LuisMa.dts	<b>Dispersant Name:</b> Water
<b>Record Number:</b> 100	<b>Dispersant RI:</b> 1.330
<b>Material RI:</b> 1.59	<b>Viscosity (cP):</b> 0.8872
<b>Material Absorbtion:</b> 0.010	<b>Measurement Date and Time:</b> miércoles, 09 de octubre de 2...

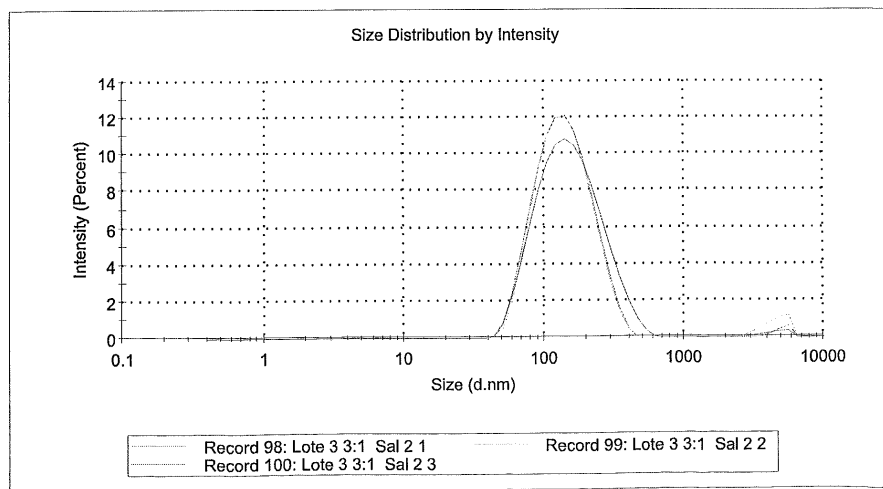
## System

<b>Temperature (°C):</b> 25.0	<b>Duration Used (s):</b> 50
<b>Count Rate (kcps):</b> 151.7	<b>Measurement Position (mm):</b> 5.50
<b>Cell Description:</b> Clear disposable zeta cell	<b>Attenuator:</b> 11

## Results

	Size (d.nm...)	Width (d.nm...)	% Intensity	Volume	Number
<b>Z-Average (d.nm):</b> 136.7	<b>Peak 1:</b> 168.5	87.65	98.8	84.8	100.0
<b>Pdl:</b> 0.206	<b>Peak 2:</b> 4573	838.3	1.2	15.2	0.0
<b>Intercept:</b> 0.712	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.000	0.0	0.0	0.0

**Result quality : Good**



# Zeta Diagnostics Report

v2.3



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

## Sample Details

**Sample Name:** L.3 3.1 Sal 2 3  
**SOP Name:** NP-ZUMpotZ.sop  
**File Name:** LuisMa.dts  
**Record Number:** 103  
**Measurement Date and Time:** miércoles, 09 de octubre de ...  
**Dispersant Name:** Water  
**Dispersant RI:** 1.330  
**Viscosity (cP):** 0.8872

## System

**Temperature (°C):** 25.0  
**Count Rate (kcps):** 273.0  
**Cell Description:** Clear disposable zeta cell  
**Zeta Runs:** 20  
**Measurement Position (mm):** 2.00  
**Attenuator:** 9

## Results

**Result quality:** Refer to quality report

**Zeta Potential (mV):** -5.32  
**Zeta SD (mV):** 9.55  
**Mobility (µcm/Vs):** -0.4167  
**Mobility SD (µcm/Vs):** 0.7487  
**Wall Zeta Potential (mV):** -17.5  
**Effective Voltage (V):** 149  
**Conductivity (mS/cm):** 0.423

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1:	-5.32	100.0	9.55
Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Peak 3:	0.00	0.0	0.00

