



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**SOLUBILIZACION MICELAR DE ECONAZOL Y ALFA-TOCOFEROL EN
COPOLIMEROS TRIBLOQUE P123 Y F127**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARÍA LUISA RODRÍGUEZ LOYA



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Alma Miriam Novelo Torres**
VOCAL: **Profesor: Ma. Guadalupe Lemus Barajas**
SECRETARIO: **Profesor: Ernesto Carrillo Nava**
1er. SUPLENTE: **Profesor: María Josefa Bernad Bernad**
2° SUPLENTE: **Profesor: José Abraham Ortínez Álvarez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**EDIFICIO F2. LABORATORIO 303 BIOFISICOQUÍMICA.
FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ernesto Carrillo Nava: _____

SUSTENTANTE:

María Luisa Rodríguez Loya: _____

Índice

Introducción	6
1. Generalidades	9
1.1 Tensoactivos.....	9
1.2 Clasificación de los tensoactivos.....	11
1.2.1 Tensoactivos aniónicos	11
1.2.2 Tensoactivos catiónicos	11
1.2.3 Tensoactivos no iónicos	11
1.2.4 Tensoactivos anfotéricos.....	12
1.3 Copolímeros tribloque (PPO _a -PEO _b -PPO _c)	13
1.3.1 Síntesis y nomenclatura	13
1.3.2 Micelas poliméricas (PPO _a -PEO _b -PPO _c).....	14
1.3.3 Micelización de copolímeros tribloque (PPO _a -PEO _b -PPO _c) en solución acuosa.	16
1.4 Solubilización micelar de fármacos.....	18
1.4.1 Núcleo de micelas poliméricas	21
1.4.2 Corona de micelas poliméricas	23
1.4.3 Termodinámica de solubilidad	23
1.4.4 Ejemplos de estudios de solubilidad empleando copolímeros PPO-PEO-PPO. 25	
2. Fármacos	26
2.1 Nitrato de Econazol	26
2.2 α-tocoferol (Vitamina E).....	27
2.3 Pluronic P123 y F127	28
3. Técnicas experimentales	29
3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	29
3.1.1 Fundamento	29
3.1.2 Definición de capacidad calorífica (Cp).....	30
3.1.2 Instrumentación	33
3.2 Dispersión dinámica de luz	33
3.2.1 Fundamento	33
3.2.2 Parámetros de distribución: Intensidad, Volumen y Número	35
3.2.3 Instrumentación	36

3.3 Preparación de micelas poliméricas.....	37
3.3.1 Método de disolución directa.....	38
3.3.2 Método de diálisis.....	38
3.4 Incorporación de fármaco en micelas poliméricas.....	39
3.4.1 Disolución directa.....	39
3.4.2 Diálisis.....	39
3.4.3 Emulsión solvente en agua.....	39
3.4.4 Evaporación del disolvente.....	40
3.4.5 Fundición de la solución.....	40
3.5 Celda de Franz.....	41
3.6 Modelos cinéticos de liberación.....	43
3.6.1 Orden Cero.....	43
3.6.2 Primer Orden.....	43
3.6.3 Modelo de Higuchi.....	44
3.6.4 Modelo de Korsmeyer – Peppas.....	44
3.6.5 Modelo de Peppas – Fassihi.....	45
4. Objetivos.....	46
4.1 Objetivo general.....	46
4.2 Objetivos Particulares.....	46
4.3 Hipótesis.....	46
5. Materiales y métodos.....	47
5.1 Materiales.....	47
5.2 Metodología.....	47
5.2.1 Preparación de micelas poliméricas y solubilización del fármaco.....	47
5.2.2 Curva patrón de Econazol y α -tocoferol.....	48
5.2.3 Curvas de solubilidad.....	48
5.2.4 Determinación de los parámetros termodinámicos de formación de micelas poliméricas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido.....	49
5.2.5 Determinación del tamaño de partícula de las micelas poliméricas mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz.....	49
5.2.6 Estudios de liberación in vitro de fármaco.....	50
6. Resultados y Análisis de Resultados.....	51

6.1 Curvas patrón de Econazol y α -tocoferol.....	51
6.2. Solubilidad de Econazol y α -tocoferol en P123 y F127	52
6.2.1 Termodinámica de solubilidad.....	55
6.3 Proceso de micelización en solución acuosa seguido por Calorimetría Diferencial de Barrido.....	57
.....	61
.....	61
6.3.1 Pluronic P123 y F127 + Econazol.....	61
6.3.2 Pluronic P123 y F127 – α -tocoferol	66
6.4 Determinación del tamaño de partícula de las micelas	69
6.5 Estudios de liberación <i>In vitro</i> de Econazol y α -tocoferol.....	77
7. Conclusiones	82
ANEXO A.....	83
ANEXO B.....	90
8. Bibliografía	94

Introducción

Durante los últimos diez años el número de compuestos de tipo hidrofóbico con actividad farmacéutica ha aumentado considerablemente. En la actualidad se estima que un 70 % de los nuevos fármacos son poco solubles en agua y aproximadamente el 40 % de los medicamentos orales de liberación inmediata que se comercializan son considerados prácticamente insolubles (solubilidad en agua menor a 100 µg/mL) [1,2], lo que afecta su biodisponibilidad, vía de administración y por lo tanto, su efecto terapéutico [2]. La limitada solubilidad también constituye un obstáculo en el desarrollo de formulaciones parenterales e incluso tópicas. Entre mejor sea la solubilidad, generalmente se correlaciona con una mayor biodisponibilidad [3]. Varias estrategias nanotecnológicas se han desarrollado con el fin de garantizar la solubilización apropiada de los fármacos [4]. Entre otras cabe mencionar la ingeniería de nanopartículas y el diseño de nanovehículos tales como liposomas [4,5]. En las últimas décadas ha habido un creciente interés en el uso de nanopartículas para aplicaciones de solubilización y administración de fármacos, estas son partículas coloidales que poseen diámetros que oscilan entre 1 - 1000 nm, donde los fármacos se pueden encontrar encapsulados, adsorbidos o dispersos en ellas. Existe una gran variedad de nanopartículas compuestas de una gran gama de materiales incluyendo lípidos, polímeros y materiales inorgánicos, lo que resulta en sistemas de suministro que varían en sus propiedades fisicoquímicas y por lo tanto en sus aplicaciones [6].

Hasta la fecha se ha reportado en la literatura una gran variedad de sistemas de administración de fármacos en forma de nanopartículas como son: liposomas, nanoesferas, niosomas, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, microemulsiones, nanotubos de carbono y micelas poliméricas [6]. Las micelas poliméricas son estructuras coloidales que tienen particular importancia en farmacia debido a su capacidad para aumentar la solubilidad acuosa de sustancias poco solubles [3]. Por otro lado, también se han estudiado como sistemas de liberación de fármacos en un intento de minimizar la pérdida y degradación del mismo, prevenir los efectos secundarios y aumentar su biodisponibilidad [7–11]. Las micelas están formadas por moléculas anfifílicas

denominadas tensoactivos, caracterizados por tener dos distintas regiones en su estructura química una denominada hidrofílica y otra hidrofóbica. En soluciones acuosas, las moléculas anfifílicas se orientan de modo que los bloques hidrófobos se localizan en el centro de la micela, y los bloques hidrófilos se localizan externamente sirviendo de corona para las micelas.

De los tensoactivos poliméricos más estudiados se encuentran los copolímeros tribloque formados por cadenas de poli(óxido de etileno) - poli(óxido- propileno) - poli(óxido de etileno) ($PEO_a - PPO_b - PEO_c$), conocidos comercialmente como Pluronic. Estos compuestos forman micelas poliméricas, que han ganado considerable atención en los últimos años como sistemas de administración de fármacos, ya que ofrecen características atractivas tales como baja toxicidad, mínima respuesta inmune y un tamaño generalmente pequeño (10 -100 nm) [6]. El núcleo formado por las cadenas de óxido de propileno es incompatible con el agua y se separa del medio acuoso, la región hidrofílica está formada por las cadenas hidratadas de óxido de etileno.

Las micelas poliméricas comprenden un dominio básico denominado interior o núcleo y uno exterior o corona. Debido a la naturaleza hidrófoba del núcleo, estas entidades se adaptan particularmente para la solubilización de moléculas insolubles en agua y así protegerlas de agentes inestables, de la degradación química, metabolismo por agentes biológicos y a la liberación sostenida en diferentes formulaciones [7]. Dependiendo de la especificidad y las propiedades de los grupos funcionales presentes en ambos componentes, las micelas poliméricas son más seguras para la administración parenteral que agentes solubilizantes actualmente en uso, como el aceite de ricino polietoxilado o polisorbato 80 (Tween 80) [8].

Las micelas poliméricas son cinéticamente estables, de manera que se disocian lentamente, incluso a concentraciones por debajo de la CMC (concentración micelar crítica) por lo que extienden los tiempos de circulación en sangre. Además, muestran núcleos más grandes que las micelas de tensoactivos comunes, dando lugar a una mayor capacidad de solubilización [8]. Las micelas con bloques

hechos de poli (óxido de etileno) están estéricamente estabilizados por lo que se someten a menos opsonización y captación por los macrófagos del sistema reticuloendotelial (RES), permitiendo que las micelas puedan circular más tiempo en sangre [9].

En este proyecto se estudió el aumento de la solubilidad acuosa y parámetros fisicoquímicos asociados al proceso de solubilización de dos fármacos hidrófobos (Econazol y α -Tocoferol) en micelas de tensoactivos poliméricos, en particular F127 (PPO₂₀₀ - PEO₆₅ - PEO₂₀₀) y P123 (PPO₃₆ - PEO₆₃ - PEO₃₉). Se determinaron los parámetros fisicoquímicos del proceso de micelización en ausencia y en presencia del fármaco mediante la técnica experimental de calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Con la técnica de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) se determinaron los tamaños de los agregados presentes en disolución acuosa antes y después del encapsulamiento de los fármacos y se determinaron los perfiles de liberación de los fármacos empleando la técnica de celdas de Franz.

1. Generalidades

1.1 Tensoactivos

Los tensoactivos o surfactantes son compuestos con actividad superficial es decir, reducen la tensión superficial entre dos fases. Caracterizados por tener dos regiones distintas en su estructura química, una denominada *hidrofílica* (afinidad por el agua) y otra *hidrofóbica* (no afín al agua). La existencia de estas dos partes en la misma molécula los hace denominarse compuestos anfífilicos.

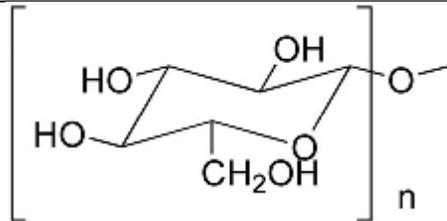
Las porciones hidrofóbicas son por lo general cadenas saturadas o insaturadas de hidrocarburos y menos comúnmente sistemas aromáticos o heterocíclicos (Tabla 1.1a). Las regiones hidrofílicas pueden ser aniónicas, catiónicas, anfotéricas o no iónicas (Tabla 1.1b)

Tabla 1.1a. Grupos hidrofóbicos comunes de tensoactivos

Grupo	Ejemplo	Fórmula
Alquilbenceno	Dodecil-benceno lineal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4)(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
Alquilos lineales ^a (saturados)	n-dodecil	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2-$
Alquilos ramificados (insaturados)	2- etil hexil	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_3)$
Alquilos lineales ^a (insaturados)	Oleíco	$(\text{cis-})\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7=\text{CH}(\text{CH}_2)\text{CH}_2-$
Alquil fenol	Nonil fenol	$(\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3)_n$
Polioxipropileno	---	$-\text{[OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)]_n-$
Polisiloxano	---	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}[\text{OSi}(\text{CH}_3)]_n\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$

^a Los grupos alquilo, ya sea lineal o ramificado / saturado o insaturados, por lo general son cadenas de longitud de C8 a C18.

Tabla 1.1b. Grupos hidrofílicos comunes de tensoactivos

Grupo iónico	Ejemplo	Estructura
Aniónico	Sulfato	$-\text{OSO}_2\text{O}^-$
	Sulfonato	$-\text{SO}_2\text{O}_4^-$
	Éter sulfato	$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_2\text{O}^-$
	Éter fosfato	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{P}(\text{O})\text{O}^-$
	Éter carboxilato	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CO}_2^-$
	Carboxilato	$-\text{COO}^-$
Catiónicos	Amonio primario	$-\text{N}^+\text{H}_3$
	Amonio secundario	$-\text{N}^+(\text{R})\text{H}_2$
	Amonio terciario	$-\text{N}^+(\text{R})_2\text{H}$
	Amonio cuaternario	$-\text{N}^+(\text{R})_3$
Anfotéricos	Óxido de amina	$-\text{N}^+(\text{R})_3\text{O}^-$
	Betaina	$-\text{N}^+(\text{R})_3(\text{CH}_2)_n\text{OH}$
	Aminocarboxilatos	$\text{N}^+\text{H}(\text{R})_2(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}^-$
No iónicos	Polioxietileno	$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$
	Acetilenico	$-\text{CH}(\text{OH})\text{C}\equiv\text{CH}(\text{OH})-$
	Monoetanolamina	$-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
	Dietanolamina	$-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$
	Poliglucósido	

1.2 Clasificación de los tensoactivos

La clasificación se basa en la carga iónica de la parte superficialmente activa de la molécula y de sus propiedades fisicoquímicas.

1.2.1 Tensoactivos aniónicos

El grupo hidrofílico o polar de estos tensoactivos tienen carga negativa como grupos carboxilato (COO^-), sulfato (SO_4^-), sulfonato (SO_3^-) y fosfato (PO_4^-). Su parte no polar o hidrófoba la conforman diferentes grupos alquilo. Representantes de este grupo son derivados del ión sulfato o de sulfonatos como es dodecil sulfato de sodio o dodecil bencen sulfonato de sodio (ver Tabla 1.2a) [10].

1.2.2 Tensoactivos catiónicos

Estos tensoactivos tienen en su molécula un grupo funcional cargado positivamente sin embargo, para mantener la neutralidad eléctrica este se asocia a un anión (ion negativo). El grupo polar está conformado por una amina o un grupo amonio cuaternario y la parte no polar por diferentes grupos alquilo. Ejemplo de este grupo se encuentran bromuro de cetil amonio (ver Tabla 1.2a) [10].

1.2.3 Tensoactivos no iónicos

No contienen grupos funcionales disociables (ionizables). Como tensoactivos se solubilizan mediante un efecto combinado de un cierto número de grupos funcionales (alcohol o éter). Los grupos polares suelen ser un grupo alcohol o éter solubilizantes débiles (hidrófilos) tales como enlace tipo éter ó grupos hidroxilos en su molécula. La parte no polar es principalmente una cadena alifática, aunque hay tensoactivos no iónicos no alifáticos. Los grupos polares suelen ser un grupo alcohol o éter. Este tipo de compuestos son normalmente usados para formulaciones parenterales ya que producen baja irritación y toxicidad, basados en su estructura neutral son mucho menos sensibles al cambio de pH del medio. Ejemplos de este tipo de tensoactivos se encuentran los Span o Tween, polisorbatos, poloxameros entre otros (ver Tabla 1.2a) [10].

1.2.4 Tensoactivos anfotéricos

Este tipo de tensoactivos poseen un grupo catiónico y aniónico además de una parte no polar, generalmente como parte no polar se suele tener un grupo alquilo, y como parte polar un grupo carboxilato ($R\text{-COO}^-$), junto con un grupo amonio cuaternario (R_4N^+). Este tipo de tensoactivos se usan en artículos de aseo, belleza. Ejemplos de estos están N-dodecil betaina y lecitina (ver Tabla 1.2a).

Tabla 1.2a Clasificación y ejemplos de tensoactivos

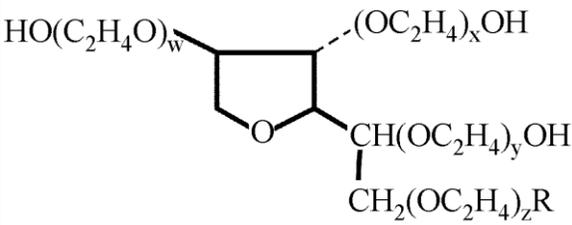
Clase de tensoactivo	Ejemplos	Fórmula
Aniónico	Estearato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-\text{Na}^+$
	Dodecil sulfato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
	Dodecil benzen sulfonato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$
Catiónico	Clorhidrato de laurilamina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$
	Cloruro de cetil trimetilamonio	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
	Bromuro de cetil trimetilamonio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
No iónicos	Poloxameros o Pluronic	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$
	Alquilfenol etoxilato	$\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$
	Polisorbato 80	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_w$ 
Anfotéricos	Dodecil betaina	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
	Lauramidopropil betaina	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$

Tabla tomada y modificado de referencia [10]

1.3 Copolímeros tribloque (PPO_a-PEO_b-PPO_c)

Son tensoactivos no iónicos, estos compuestos están formados por cadenas de monómeros de polióxido de propileno (PPO, insoluble en agua) y por polióxido de etileno (PEO, soluble en agua). A menudo se denotan como PPO_a-PEO_b-PPO_c. Son conocidos comercialmente como Pluronic o Poloxamero (Figura 1.3a).

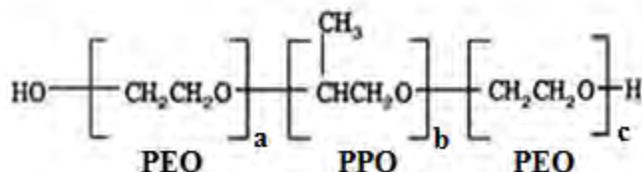


Figura 1.3a Estructura química de copolímero tribloque (PEO-PPO-PEO).

1.3.1 Síntesis y nomenclatura.

Los copolímeros de tribloque PEO_a-PPO_b-PEO_c se sintetizan por la adición secuencial primero de óxido de propileno (PO) y luego óxido de etileno (EO), a un propilenglicol de bajo peso molecular soluble en agua. Los pasos de oxialquilación se llevan a cabo en presencia de un catalizador alcalino, generalmente sodio o hidróxido de potasio. El catalizador se neutraliza y se retira del producto final. Las ecuaciones que representan los dos pasos en la síntesis de los copolímeros PEO_a-PPO_b-PEO_c se muestran en la Figura 1.3.1a [11].

La notación de los copolímeros Pluronic vienen dada por las letras “P” para los que se presentan en forma de pasta, “L” se utiliza para los líquidos y “F” (del inglés *flake*, escama) para los sólidos. El primer dígito, o los dos primeros en los números con tres dígitos, multiplicado por 300 es aproximadamente igual a la masa molecular relativa promedio de la parte lipofílica. El último dígito, multiplicado por 10, indica el porcentaje en masa aproximado de la parte hidrofílica. Así, por ejemplo, el Pluronic F68 es un copolímero sólido en el cual la masa molecular relativa aproximada de la parte hidrofóbica es 1,800 (6 × 300) y la proporción en masa de la parte hidrofílica es aproximadamente 80% (8 × 10) [12].

los requisitos específicos en diversas áreas de importancia tecnológica. Son una clase importante de agentes tensoactivos con aplicaciones en detergencia, estabilización de dispersiones, formación de espumas, emulsificación, lubricación, formulación de productos cosméticos y tintas. Con el tiempo se han especializado también en otras aplicaciones por ejemplo farmacéuticas (solubilización y liberación controlada), bioprocesamiento (protección de microorganismos contra daños mecánicos) y separaciones (solubilización de compuestos orgánicos en solución acuosa) entre otras [11-13].

Estos compuestos en los últimos años se han estudiado como vehículos para administración de fármacos y también para potenciar su solubilidad, debido a su baja toxicidad y mínima respuesta inmune [13]. El núcleo de estos agregados formado por cadenas de poli(óxido de propileno) (PPO) que es incompatible con el agua, se separa del compartimento acuoso formado por cadenas hidratadas de poli(óxido de etileno) (PEO) que sirven como un depósito para los compuestos hidrófobos. Otra característica importante de las micelas poliméricas que los hace buenos portadores para la administración de fármacos, es el tamaño (aproximadamente en el rango de 10 a 100 nm de diámetro). Esta variación de tamaño en nanoescala favorece fuertemente el tiempo de circulación en la sangre y la biodisponibilidad de los fármacos dentro del cuerpo [13,14].

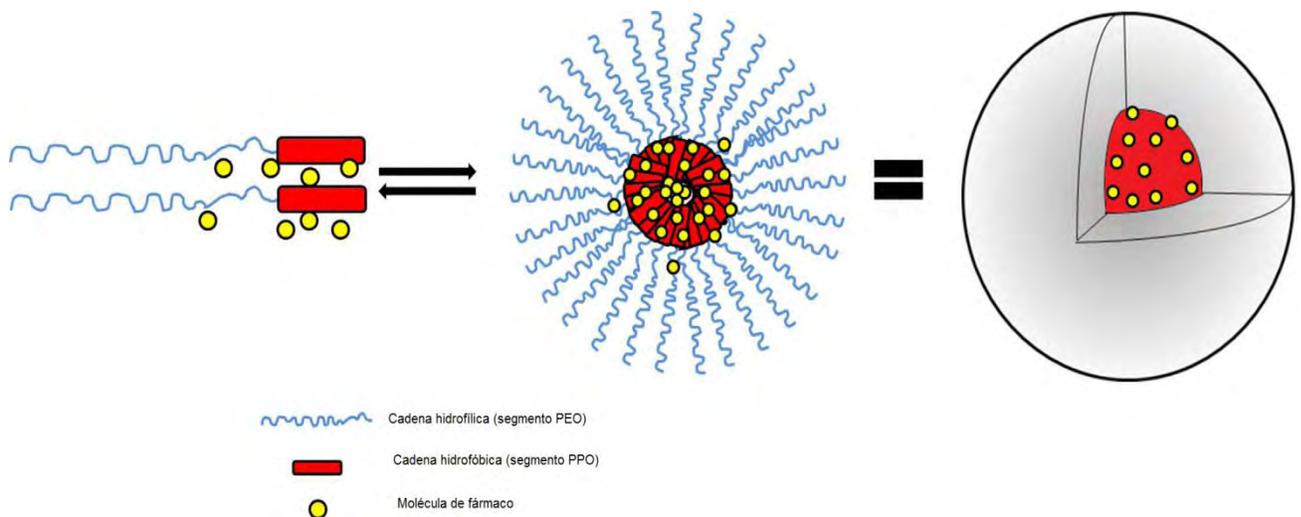


Figura 1.3.2 a. Esquema de representación de micela polimérica con fármaco encapsulado.

1.3.3 Micelización de copolímeros tribloque (PPO_a-PEO_b-PPO_c) en solución acuosa.

La micelización es un proceso de agregación de monómeros de tensoactivo por encima de una concentración micelar crítica (CMC), la cual representa una propiedad de agregación que consiste con el hecho de que por encima de esta concentración, la superficie de los monómeros en solución se asocian para formar unidades más grandes conocidas como micelas (Figura 1.3.3a) [10,15].

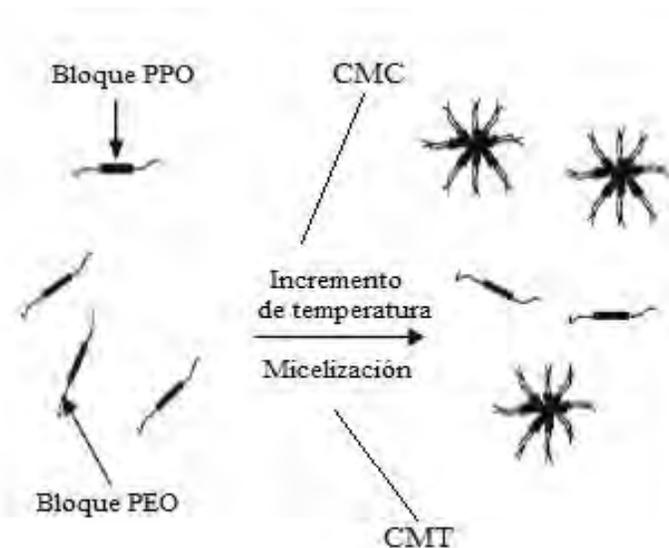


Figura 1.3.3a Esquema del proceso de micelización de copolímeros tribloque (PPO-PEO-PPO). Un incremento en la temperatura favorece la micelización y con ello también una disminución de la CMC y de la CMT (temperatura de micelización crítica). Figura tomada y modificada referencia [15].

La micelización de copolímeros de bloque en medio acuoso se ha estudiado desde hace algunos años, el creciente interés en los sistemas micelares acuosos de copolímeros de bloque se debe a la mejora de las técnicas de síntesis y de sus posibilidades de aplicación generalizada en las áreas técnicas y sobre todo biomédicas [16]. La micelización de copolímeros principalmente con estructuras di- y tribloque depende de varios factores como temperatura, composición, características ambientales, la presencia de electrolitos, la existencia de compuestos orgánicos y la presencia de un segundo líquido entre otras, formando micelas de diferentes formas (esféricas, rodillos o en forma de cono) [17-20]. Algunos factores se mencionan a continuación:

1.3.3.1 La composición: proporción EO / PO y peso molecular

Se ha demostrado que la formación de micelas es favorecida fuertemente por un aumento de la entropía y la energía libre de formación de micelas debido principalmente al bloque PPO [21]. Esta ganancia de entropía está relacionada con la liberación (tras el calentamiento) de moléculas de agua de hidratación ordenados alrededor del segmento hidrofóbico (PPO).

Se ha observado que cuanto más alto sea el contenido de PEO y menor el peso molecular del polímero, mayor es la temperatura micelar crítica (CMT) [22]. Por el contrario un aumento en el contenido de PPO disminuye los valores de CMC y CMT [23]. Ambos valores de CMC y CMT disminuyen al aumentar el peso molecular de los copolímeros que muestran relaciones EO / PO similares.

1.3.3.2 Temperatura

El efecto de la temperatura sobre la formación de micelas de PEO-PPO-PEO ha sido reportado por varios investigadores [24-26]. Copolímeros menos hidrófobos (mayor relación EO / PO) o de peso molecular más bajo comienzan a hacer agregados a temperatura ambiente, pero comienzan a formar micelas a temperaturas un poco más altas. Un ligero aumento de la temperatura conduce a una disminución de la CMC, el aumento en el número promedio de agregación y el tamaño micelar [24]. Una tendencia similar se observa con la CMT.

1.3.3.3 Fuerza iónica

Puesto que muchos fármacos tienen un carácter iónico y los medios utilizados para las formulaciones comprenden generalmente amortiguadores salinos para el equilibrio del pH y equilibrio de la fuerza iónica, estos parámetros pueden influir en el comportamiento de las moléculas de PEO-PPO en medios acuosos. La adición de electrolitos que tienen aniones y cationes de diferentes tamaños pueden conducir a: "salting in" y estabilizar el proceso o "salting out" y desestabilizar el proceso de micelización [11]. En general, se observa una disminución gradual en la CMC y CMT con el aumento de la concentración de sales neutras [27-29].

1.3.3.4 Moléculas orgánicas pequeñas

La influencia de moléculas orgánicas en soluciones de copolímeros tribloque, influyen variadamente en el proceso de micelización, el patrón de agregación y la estabilidad de las micelas. La mayoría de los trabajos actualmente realizados se centran más en la solubilidad de moléculas orgánicas pequeñas, como por ejemplo el estudiado como vehículos de administración de fármacos o de otro tipo de compuestos, y no tanto en el efecto recíproco de pequeñas moléculas en la estructura de los agregados. En trabajos ya reportados por ejemplo, en un estudio realizado por Alexandridis et al. informó que la urea aumentó la CMC y CMT [30]. En otro estudio el naproxeno e indometacina no afectaron la CMC del Pluronic F127, a pesar de que causó una ligera disminución en el tamaño de las micelas y una gran disminución en el número de agregación [31]; por su parte el clorhidrato de pilocarpina disminuye la CMC de 0.5% al 0.25% (m/m) [32]. Alcoholes de cadena corta (es decir etanol) impidieron la formación de micelas en agua [33], mientras que alcoholes de cadena media y alcoholes alifáticos hidrófobos es decir butanol favorecieron la agregación [34].

1.3.3.5 Concentración de copolímero

La concentración del polímero es otro aspecto a tomar en cuenta [35]. En general, cuanto mayor sea la concentración del polímero, menor es la temperatura requerida para alcanzar la formación de micelas [11, 36].

1.4 Solubilización micelar de fármacos

Una propiedad importante de las micelas que tiene un significado particular en farmacia es su capacidad para aumentar la solubilidad de sustancias poco solubles en agua. En este contexto, la solubilización se puede definir como la disolución espontánea de una sustancia debido a la interacción reversible con las micelas de un agente tensoactivo en agua, para formar una solución termodinámicamente estable [37].

Si se traza la solubilidad de un compuesto hidrófobo en función de la concentración de tensoactivo (Figura 1.4a), generalmente se observa que la

solubilidad es muy baja hasta que la concentración de tensoactivo alcanza su CMC. En concentraciones de tensoactivo por encima de la CMC la solubilidad aumenta linealmente con la concentración de tensoactivo, indicando que la solubilización se relaciona con la formación de micelas:

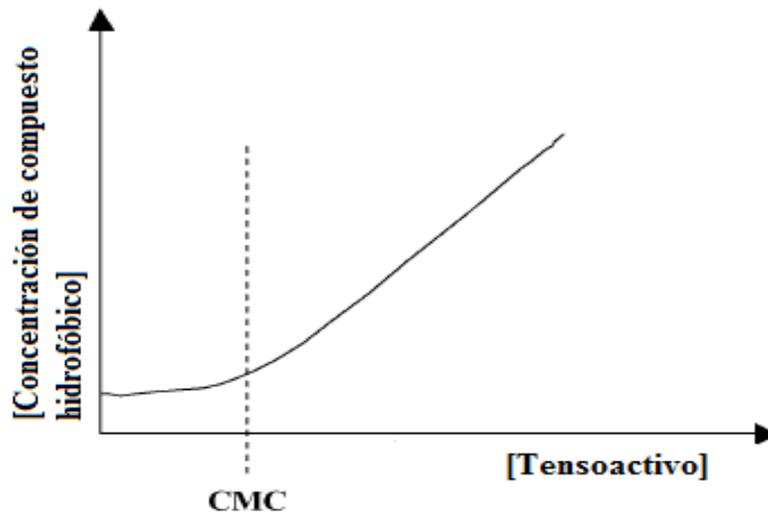


Figura 1.4a. Gráfico de concentración de compuesto hidrófobo vs concentración de tensoactivo. Se observa que por encima de la CMC, la concentración del compuesto hidrófobo es directamente proporcional a la concentración de tensoactivo. Figura tomada y modificada de referencia [37].

1. Los fármacos hidrófilos pueden ser adsorbidos sobre la superficie de la micela.
2. Los fármacos con solubilidad intermedia deben estar situados en posiciones intermedias dentro de la micela, tales como entre los grupos de la cabeza hidrófila de la micela, la capa entre los grupos hidrófilos y los primeros pocos átomos de carbono del grupo hidrófobo, que es el núcleo exterior.
3. Fármacos hidrófobos completamente insolubles pueden estar situados en el núcleo de la micela [38].

La existencia de diferentes sitios de solubilización en las micelas se debe a varios factores como las propiedades físicas, viscosidad, polaridad y grado de hidratación, que no son uniformes a lo largo de la micela. (Figura 1.4b)

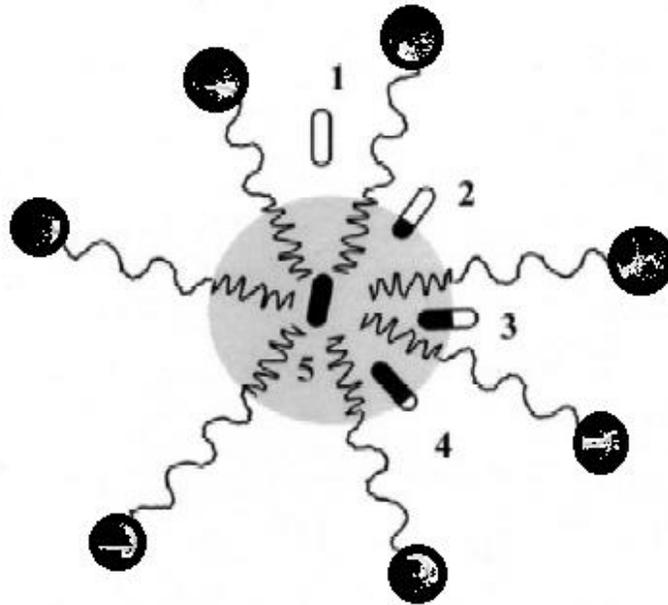


Figura 1.4b Posible patrón de asociación entre micela y fármaco. Dependiendo de la hidrofobicidad o hidrófilicidad del fármaco va a ser su ubicación. (1) Fármaco totalmente hidrófilo se va a localizar en la corona de la micela. (2,3,4) Fármacos medianamente hidrófilos se localizaran en la parte interna de la micela distribuidos en diferentes zonas . (5) Fármaco totalmente hidrófobo se localizara en el núcleo de la micela.

La capacidad de los tensoactivos en la solubilización de fármacos depende de numerosos factores, tales como la estructura química del agente tensoactivo, la estructura química del fármaco, la temperatura, el pH, fuerza iónica, etc [38]. Los tensoactivos no iónicos generalmente son mejores agentes de solubilizantes para fármacos hidrófobos que los tensoactivos iónicos, debido a que sus valores de CMC son muy inferiores. Para los fármacos no polares es más sencillo poder solubilizarlos en los agregados poliméricos, ya que normalmente se localizan en el núcleo de la micela, mientras que para los fármacos polares es más complicado

establecer una relación general entre el grado de solubilización y la estructura química del tensoactivo, ya que la solubilización puede ser tanto en el interior como en las regiones exteriores de la micela [37].

1.4.1 Núcleo de micelas poliméricas

El núcleo hidrófobo es un componente clave en la determinación de la capacidad de las micelas para solubilizar compuestos hidrófobos. Los bloques hidrófobos del polímero se asocian a través fuerzas de van der Waals, formando un “deposito” en el cual otros compuestos hidrófobos pueden solubilizarse. El núcleo también ofrece protección para los fármacos inestables a la degradación y el metabolismo de los agentes biológicos [39].

La capacidad del núcleo para encapsular el fármaco depende en gran medida de la compatibilidad de este con la molécula de fármaco [40]. En general, una buena indicación de la compatibilidad es la semejanza estructural entre la molécula de fármaco y la parte hidrófoba del polímero. La compatibilidad se puede estimar mediante la comparación de la polaridad del compuesto o fármaco poco soluble en agua y el segmento hidrófobo del polímero. Una regla general importante es que el fármaco y el bloque de formación de núcleo sean de polaridades similares, ya que los hace más compatibles que una combinación con diferencias más grandes de polaridad (Figura 1.4c).

Aunque la miscibilidad polímero-fármaco es uno de los parámetros más importantes para gobernar la encapsulación de fármacos dentro del núcleo micelar también el equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de un tensoactivo el cual es una medida del grado en el que es hidrófilo o lipófilo también es digno de mención, ya que entre más hidrófobo sea el copolímero, mayor será la capacidad de este para solubilizar compuestos hidrófobos.

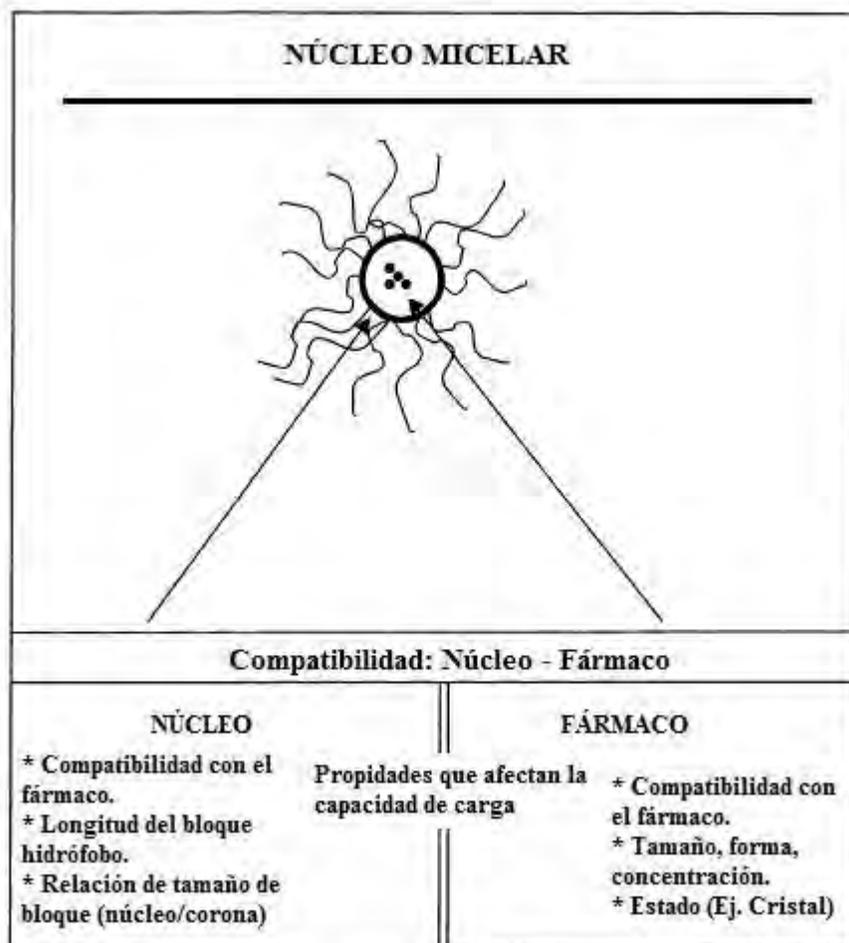


Figura 1.4c Factores que afectan la compatibilidad núcleo – fármaco tanto del fármaco como del núcleo de la micela así como la capacidad de carga. Figura tomada y modificada de la referencia [41].

Los polímeros hidrófobos comúnmente utilizados que forman el núcleo para la administración de fármacos se pueden clasificar en los siguientes grupos: poli (óxido de propileno) (PPO) en Pluronic; poli (ésteres) tales como poli (ácido láctico) (PLA), poli (- caprolactona) (PCL) y poli (L-aminoácidos) tales como poli (L-lisina) [39].

1.4.2 Corona de micelas poliméricas

Como se mencionó anteriormente, la corona de micelas poliméricas se compone de la porción hidrófila del copolímero. Actúa como una interface de estabilización entre el núcleo de la micela y el medio externo. Las propiedades de la capa exterior afectan predominantemente la biodistribución de la micela y por lo tanto, del fármaco incorporado así como sus parámetros farmacocinéticos [39].

En la mayoría de los casos, el bloque de formación de la corona es poli (óxido de etileno), sólido cristalino no iónico, termoplástico y soluble en agua con una longitud normalmente mayor o igual a la longitud del bloque de formación del núcleo [42,43]. Utilizado para aumentar la biocompatibilidad y mejorar la estabilidad coloidal de otros tipos de vehículos de administración de fármacos como nanopartículas [44], microesferas y liposomas [45]. La estabilidad impartida por el poli (óxido de etileno) es debido a un efecto denominado estabilización estérica, es decir limita la interacción con otras micelas (que conduce a la agregación) y proteínas (opsoninas), que promueven la absorción y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear.

1.4.3 Termodinámica de solubilidad

Por lo general, la solubilización de una molécula por un agente tensoactivo se puede evaluar en base a parámetros termodinámicos [13,46].

1.4.3.1 Capacidad molar de solubilización (χ), se define como la cantidad de mol de cierta molécula solubilizada por mol de tensoactivo.

$$\chi = \frac{S_{tot} - S_w}{C_{polimero} - CMC} \quad (1)$$

Donde S_{tot} representa el total de fármaco solubilizado; S_w es la solubilidad del fármaco en agua (ambas en concentración molar); $C_{polimero}$ es la concentración en molar del polímero y CMC la concentración micelar crítica del polímero.

1.4.3.2 Coeficiente de partición micela – agua (P) es la proporción de fármaco solubilizado entre la micela y la fase acuosa

$$P = \frac{S_{\text{tot}} - S_w}{S_w} \quad (2)$$

Desde el punto de vista termodinámico la solubilización se puede considerar como una partición del fármaco entre dos fases: micela y acuosa. La energía libre estándar de solubilización (ΔG_s°) puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_s^\circ = -RT \ln P \quad (3)$$

donde R representa la constante ideal de los gases, T la temperatura en Kelvin y P el coeficiente de partición micela – agua. Esta energía estándar de solubilización no está normalizada por lo tanto, va a depender de la concentración de copolímero que se tenga en solución.

Combinando las ecuaciones (1) y (2) podemos relacionar los dos descriptores de solubilidad para cierta concentración de tensoactivo dada:

$$P = \frac{\chi(C_{\text{copolímero}} - \text{CMC})}{S_w} \quad (4)$$

Como puede verse, P está relacionada con la solubilidad en agua del compuesto [47]. Con el fin de eliminar la dependencia de P de la concentración del copolímero, un coeficiente de partición micela-agua molar (P_M), correspondiente al coeficiente de partición cuando la concentración de copolímero se estandariza, $C_{\text{copolímero}} = 1 \text{ M}$, se puede definir como:

$$P_M = \frac{\chi(1 - \text{CMC})}{S_w} \quad (5)$$

1.4.4 Ejemplos de estudios de solubilidad empleando copolímeros PPO-PEO-PPO

A continuación se muestran algunos ejemplos de los estudios más importantes de solubilización (Tabla 1.1.4a) y estabilización de fármacos hidrófobos usando como base micelas poliméricas (PPO-PEO-PPO).

Tabla 1.4.4a. Ejemplo de algunos estudios importantes de solubilización y estabilización de fármacos hidrófobos usando de base micelas poliméricas (PEO-PPO-PEO). En especial F127 y P123

Fármaco	Actividad farmacológica	Copolímero	Administración	Observaciones
Tropicamida	Midriático/ciclopéjico	L-64, F127, P65, F87, P75, etc	Ocular	Aumenta la solubilidad linealmente conforme aumenta la concentración de polímero y el contenido de PEO [48]
Morfina	Analgesia (SNC)	F127	Ocular	Solubilización de fármaco. Suministro prolongado. [49]
Naproxeno	Analgésico	F127	Tópica, I.V.	Incrementa la solubilidad. Vida media más larga por vía I.V. [50,51]
Benzoporfirina	Anticancerígeno	P123	-----	Ninguna evaluación in vivo e in vitro hasta ahora. [52,53]
Paclitaxel (PTX)	Anticancerígeno	P123	I.V.	Solubiliza PTX Prolonga tiempo de circulación en sangre. Aumenta la absorción de PTX en plasma, ovario, útero, pulmón y riñón; pero disminuye su captación en hígado y cerebro. [54]
Piroxicam	AINE	F68, F127	Percutánea	Mejoro perfil de liberación [55]
Indometacina	AINE	F68, F127	Ocular	Gran solubilidad y estabilidad química. Prolongada difusión in vitro mostrando gran tolerancia fisiológica en ojos de conejo [56]

Tabla tomada de Referencia [14].

2. Fármacos

2.1 Nitrato de Econazol

El Econazol (1- {2 - [(4-clorofenil) metoxi] -2- (2,4-diclorofenil) etil} -1H-imidazol) de fórmula condensada $C_{18}H_{15}Cl_3N_2O$ y peso molecular de 444.7 g/mol. (Figura 2.1a), es un fármaco antifúngico de amplio espectro derivado del imidazol. Este fármaco al igual que otros presenta una muy baja solubilidad la cual es de 0.00148 mg/mL con un Log P de 5.35, lo cual indica una gran afinidad por lo no polar [57].

Al igual que otros imidazólicos tópicos, está indicado en el tratamiento de candidiasis cutáneas y en mucosas, pitiriasis versicolor y hongos dermatofitos productores de *tinea corporis*, *tinea capitis* o *tinea pedis*.

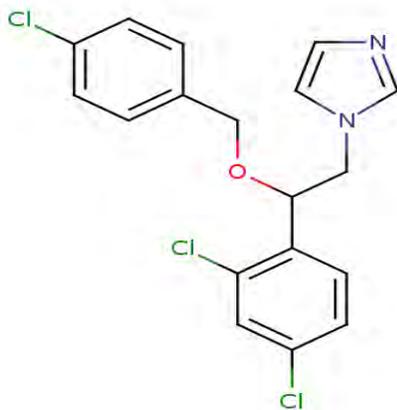


Figura 2.1a. Estructura química de Econazol. Figura tomada de referencia [57].

El Econazol interactúa con la 14- α desmetilaza, una enzima del citocromo P-450 necesaria para convertir lanosterol a ergosterol; como el ergosterol es un componente esencial de la membrana celular de los hongos, la inhibición de la síntesis da como resultado el aumento de la permeabilidad celular, causando la fuga del contenido celular. Este fármaco es eficaz sólo para infecciones causadas por organismos fúngicos y no trabaja para infecciones bacterianas o virales [57].

2.2 α -tocoferol (Vitamina E)

El α -tocoferol o vitamina E, es un antioxidante que posee la propiedad de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y otras estructuras celulares de la peroxidación lipídica. Posee una fórmula condensada $C_{29}H_{50}O_2$ y una masa molar de 430.71 g/mol (Figura 2.1b), con solubilidad acuosa nula y un Log P de 8.84, lo que lo hace prácticamente insoluble en agua.

Conocida por sus actividades antioxidantes, protege contra enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y también ha demostrado que aumenta la inmunidad. Presenta actividad, antitrombótica, anticoagulante, neuroprotectora, antiviral, inmunomoduladora, estabilizador de la membrana celular y acciones antiproliferativas [57].

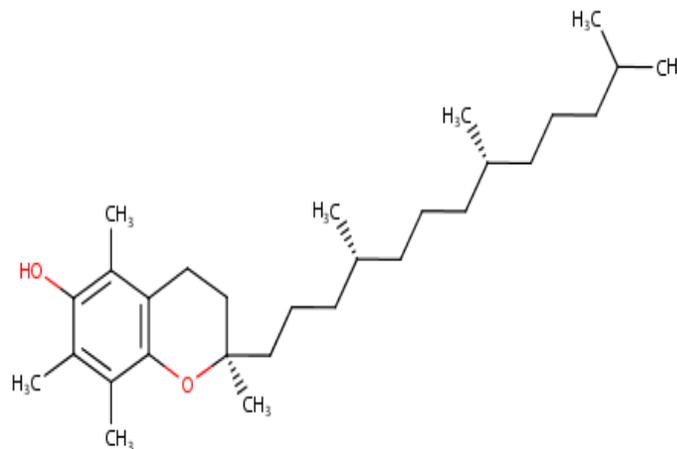


Figura 2.2a. Estructura química de α -tocoferol (Vitamina E). Figura tomada de referencia [57].

Esta vitamina, se puede encontrar en una variedad de alimentos, es inestable cuando se expone a factores ambientales tales como oxígeno, luz y temperatura. Es comúnmente añadida como estabilizador para fabricados de plástico, cosméticos y formas de dosificación de fármacos. En los tejidos del cuerpo humano (los niveles de α -tocoferol se regulan a través de proteínas y receptores de transporte específicos), se absorbe rápidamente desde el lumen intestinal y

distribuye fácilmente entre lípidos y proteínas en las membranas celulares, protegiendo las células de lisis oxidativa y otras reacciones de radicales libres [58].

Esta vitamina liposuble, se utiliza a menudo por vía oral, en cremas y lociones para la piel, ya que se cree que juega un papel en el fomento de la curación de la piel para reducir las cicatrices después de lesiones como quemaduras. La deficiencia de esta vitamina se caracteriza generalmente por problemas neurológicos debido a la mala conducción nerviosa. Los bajos niveles de vitamina E también se han relacionado con una mayor incidencia de cáncer de mama y de colón [57].

2.3 Pluronic P123 y F127

Estos Pluronic se han usado en diversas formulaciones farmacéuticas con el fin de potenciar la solubilidad acuosa de los fármacos, dar estabilidad entre otras, como se mencionó anteriormente en la tabla 1.4.4a. A continuación se muestra en la tabla 2.3a características fisicoquímicas de Pluronic P123 y F127

Tabla 2.3 a. Características fisicoquímicas de Pluronic P123 y F127

Pluronic	PM^(a) (g/mol)	Formula Química^(a)	HLB^(a)	CP ^(a) a 1% (°C)	CMC^(b) a 25°C (M)
P123	5750	EO ₃₉ PO ₆₉ EO ₃₉	7 - 9	90	4.34 × 10 ⁻⁶
F127	12600	EO ₂₀₀ PO ₆₅ EO ₂₀₀	18- 23	>100	2.77 × 10 ⁻⁶

PM: Peso Molecular; HLB: Balance lipofílico – hidrofílico; CP: Cloud Point (punto de enturbiamiento); CMC: concentración micelar crítica.

^(a) Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 66 (2007) 303-317

^(b) Determinado por el método de Pireno (Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 83 (2011) 49–57)

3. Técnicas experimentales

3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

3.1.1 Fundamento

La calorimetría, es una técnica primaria para medir las propiedades térmicas de materiales y establecer una conexión entre la temperatura y las propiedades físicas específicas de las sustancias. Es el método más comúnmente utilizado para la determinación directa de la entalpía asociada con el proceso de interés [59,60].

Entre los diferentes tipos de calorimetría se encuentra la Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry). La cual es una técnica termodinámica que se emplea para la evaluación directa de la absorción de energía térmica que se produce en una muestra dentro de un aumento regulado de la temperatura, aplicada particularmente para monitorear los cambios de transiciones de fase. La calorimetría se usa frecuentemente en química, bioquímica, biotecnología, farmacología y recientemente en nanociencia para medir las propiedades termodinámicas de biomoléculas y materiales de tamaño nanométrico [59,60].

En un experimento básico de DSC (Figura 3.1.1a), la energía (calor) se introduce simultáneamente en una celda de muestra (que contiene una solución con el compuesto de interés) y una celda de referencia (que contiene sólo el disolvente). Ambas celdas se calientan a cierta rapidez de calentamiento y presión constante; la diferencia en la energía de entrada necesaria para que coincida la temperatura de la muestra con la de la referencia será la cantidad de calor absorbido o liberado por la molécula en la muestra (durante un proceso endotérmico o exotérmico, respectivamente). La temperatura de la muestra y la referencia aumentan a una tasa constante [59,60].

3.1.2 Definición de capacidad calorífica (Cp)

El flujo de calor está dado en unidades de calor (q) suministrada por unidad de tiempo (t). La velocidad de calentamiento es el incremento de temperatura T por unidad de tiempo, t:

$$\frac{\text{calor}}{\text{tiempo}} = \frac{q}{t} = \text{flujo de calor}$$

$$\frac{\text{incremento de temperatura}}{\text{tiempo}} = \frac{\Delta T}{t} = \text{rapidez de calentamiento}$$

Al dividir el flujo de calor (q/t) entre la rapidez de calentamiento ($\Delta T/t$) tenemos el calor suministrado, dividido entre el aumento de temperatura. La respuesta del sistema al flujo de calor se describe mediante una importante propiedad termodinámica denominada capacidad térmica que es una propiedad extensiva definida mediante la relación

$$C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{q}{T_f - T_i} = \frac{dq}{dT} \quad (6)$$

Si se transfiere una cierta cantidad de calor al sistema (dq) su temperatura va a aumentar por una cantidad (dT), y la cantidad de calor que se transfiere para conseguir un cierto aumento de la temperatura se denomina capacidad térmica.

El valor de la capacidad térmica depende de las condiciones experimentales bajo las cuales se determina. Las condiciones más comunes son volumen constante o presión constante, para las cuales la capacidad térmica se denota mediante C_v y C_p respectivamente, que también pueden denotarse por [74]:

$$C_v = \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_v \quad y \quad C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (7)$$

La temperatura de ambos, la muestra y la referencia, incrementan a una tasa constante, ya que el DSC trabaja a presión constante, el flujo de calor es equivalente al cambio de entalpía:

$$Cp = \left(\frac{dH}{dT}\right)_p \quad (8)$$

Donde dH/dT es el calor medido en función de la temperatura.

El cambio de entalpia puede ser positivo o negativo. En un proceso endotérmico, tal como en los sistemas aquí estudiados, el calor es absorbido y por lo tanto, el calor de la muestra es mayor que el de la referencia, entonces dH/dT es positivo. Otros procesos endotérmicos incluyen las transiciones en el DNA, desnaturalización de proteínas, deshidratación, reacciones de reducción y algunas reacciones de descomposición. En un proceso exotérmico, tal como la cristalización, algunos procesos de entrecruzamiento, reacciones de oxidación y algunas reacciones de descomposición, el dH/dT es negativo.

3.3.1.1 Entalpia (ΔH)

Es la cantidad de calor cedida o absorbida por un sistema termodinámico, es decir la cantidad de energía que intercambia con su entorno. La capacidad calorífica (Cp) a presión constante es derivada de la función $Cp = (\Delta H/\Delta T)_p$ por lo tanto, la entalpia se puede calcular con la integral

$$\Delta H = \int Cp dT \quad (10)$$

La entalpia es el calor transferido a presión constante, en un proceso el signo de la variación de la entalpia indica:

Si $\Delta H < 0$ que el proceso es exotérmico.

Si $\Delta H > 0$ que el proceso es endotérmico.

3.3.1.2 Temperatura media de transición (T_m)

Se define como la temperatura donde el 50 % del copolímero está en forma de monómeros y el otro 50% ha pasado a formar micelas.

3.3.1.2 Cooperatividad del sistema ($T_{1/2}$)

Esta temperatura nos indica la cooperatividad del sistema, es decir con qué facilidad el sistema pasa de una fase a otra, en nuestro caso con qué facilidad ocurre la transición de monómeros a micelas. Este parámetro es inversamente proporcional a la cooperatividad, es decir a mayor temperatura menos cooperable y a menor temperatura más cooperable.

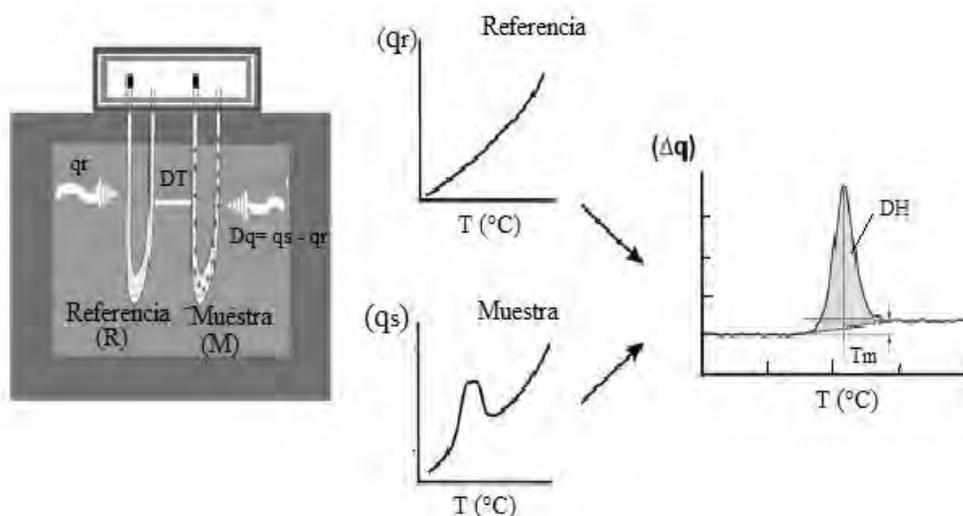


Figura 3.3.1a Arreglo experimental de DSC. La cantidad de calor necesaria para aumentar la temperatura por el mismo incremento (ΔT) de una celda de muestra (q_s) es mayor que la requerida para la celda de referencia (q_r) por el exceso de calor absorbido por las moléculas en la muestra (Δq). Figura tomada y modificada de referencia [59].

3.1.2 Instrumentación

El equipo que se utilizó fue un calorímetro VP – DSC MicroCalorimeter de la compañía MicroCal Incorporated (Figura 3.2.1a).

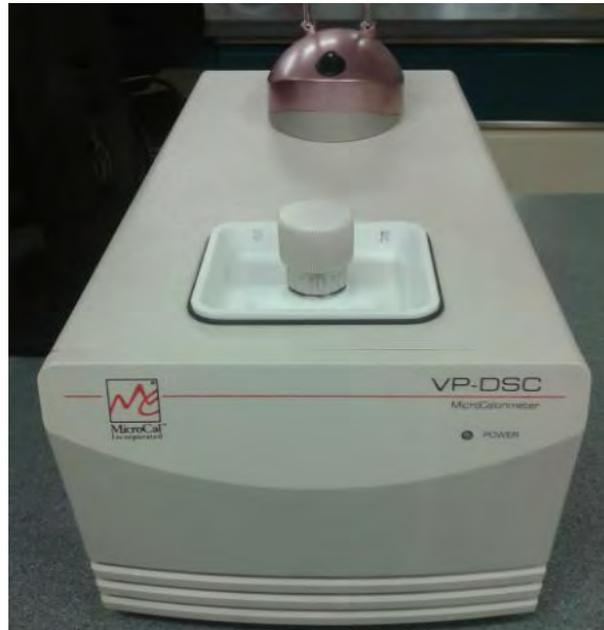


Figura 3.1.2a. Imagen del equipo empleado VP-DSC Microcal

3.2 Dispersión dinámica de luz

3.2.1 Fundamento

Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) es una técnica dispersiva no invasiva, bien conocida para medir tamaño de partículas y macromoléculas de la región nanométrica hasta micrométrica. Utilizada para medir muestras que contienen partículas suspendidas en un líquido, por ejemplo: proteínas, polímeros, micelas, hidratos de carbono, nanopartículas, dispersiones coloidales y emulsiones [61,62]. El principio de esta técnica se basa en el movimiento Browniano causado por las colisiones inducidas entre las partículas en suspensión y las partículas de disolvente. Las partículas son iluminadas con un

láser, la intensidad de la luz dispersada fluctúa en escalas de tiempo muy cortas a una rapidez que depende del tamaño de las partículas; partículas más pequeñas son mayormente desplazadas por las moléculas de disolvente y se mueven más rápidamente [61,62].

Una temperatura conocida con precisión es necesaria para un experimento de DLS, porque se requiere el conocimiento de la viscosidad (debido a que la viscosidad de un líquido está relacionada con su temperatura). La temperatura también tiene que ser estable, de lo contrario las corrientes de convección en la muestra provocarán movimientos no aleatorios que arruinarían la correcta interpretación de tamaño [61,62]. El tamaño de una partícula se calcula a partir de la difusión traslacional, con el análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la rapidez del movimiento browniano y por lo tanto, el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (11)$$

Donde:

$d(H)$ = Diámetro hidrodinámico

D = Coeficiente de difusión traslacional

k = constante de Boltzman

T = Temperatura absoluta

η = Viscosidad

El coeficiente de difusión de traslación dependerá no sólo del tamaño de la partícula "núcleo", sino también en cualquier estructura de la superficie, así como la concentración y el tipo de iones en el medio.

La distribución del tamaño es obtenida mediante un gráfico de la intensidad relativa de la luz dispersada por las partículas en varias clases de tamaño y por lo tanto, se conoce como una distribución de tamaño de intensidad; sin embargo los resultados de distribución de tamaño también se pueden obtener con gráficos de volumen y número (Figura 3.2.1a).

3.2.2 Parámetros de distribución: Intensidad, Volumen y Número

Para entender estos conceptos, supóngase que se tiene una muestra que contiene sólo dos tamaños de partícula, 5 nm y 50 nm, pero con números iguales de cada tamaño de partícula.

- Numero: Muestra los resultados de un número de distribución, con dos picos del mismo tamaño, ya que hay igual número de partículas.
- Volumen: El área del pico para las partículas de 50 nm es 1,000 veces mayor que el pico de 5 nm (relación 1:1000). Esto es debido a que el volumen de una partícula de 50 nm es 1,000 veces más grande que la partícula de 5 nm.

$$V = 4/3 \pi (d/2)^3 \quad (12)$$

- Intensidad. El área del pico de las partículas de 50 nm es ahora 1,000,000 veces más grande que el pico de 5 nm (relación 1: 1,000,000). Esto es porque las partículas más grandes dispersan mucho más la luz que las partículas pequeñas, la intensidad de la dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro (aproximación de Rayleigh).

$$I = I_0 \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6 \quad (13)$$

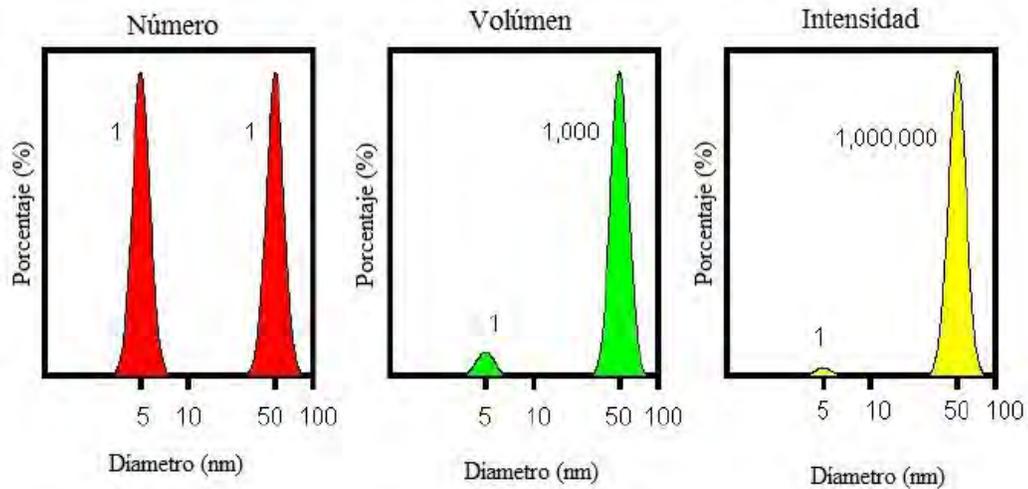


Figura 3.2.2a. Representación de resultados de tamaño de partícula en número, volumen, intensidad para una mezcla bimodal de partículas de 5 y 50 nm de diámetro, presentes en igual número, en términos generales el orden de importancia va $d(\text{nm})$ intensidad $>$ $d(\text{nm})$ volumen $>$ $d(\text{nm})$ número. Figura tomada y modificada Ref. [62].

3.2.3 Instrumentación

Un instrumento de dispersión dinámica de luz convencional (ver Figura 3.2.3a), consta de una fuente de luz (láser) **(1)**, que converge a un foco en la muestra **(2)**, usando una lente. La luz es dispersada por las partículas en todos los ángulos y un solo detector **(3)** tradicionalmente colocado a 90° o 173° con respecto al haz de láser, recoge la intensidad de luz dispersa. Las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada se convierten en impulsos eléctricos, que alimentan a un correlador digital **(4)**. Esto genera la función de autocorrelación, de la que se calcula el tamaño de partícula, y el resultado es transferido finalmente a una computadora **(5)** [61,62].

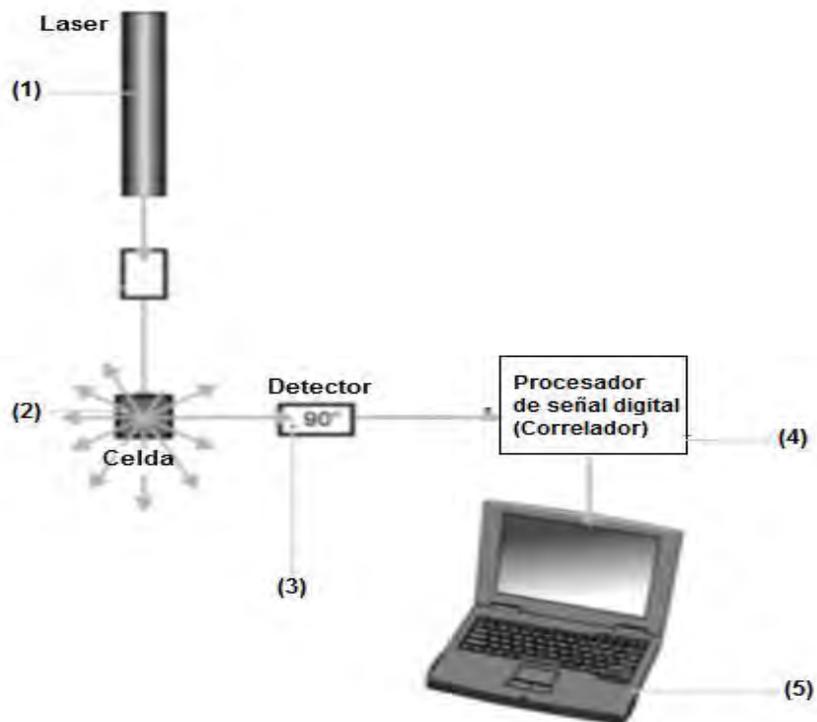


Figura 3.2.3a. Instrumentación de un equipo para medir tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. Se muestran enumeradas las partes que conforman el equipo. (1) Laser, (2) Celda, (3) Detector, (4) Procesador de señal digital, (5) Computadora. Figura tomada y modificada de referencia [62].

3.3 Preparación de micelas poliméricas.

Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del copolímero de bloques, existen dos maneras principales de preparación de soluciones micelares, método de disolución directa y método de diálisis. La elección del método a utilizar depende principalmente de la solubilidad del copolímero de bloques en agua [41,63]. Si el copolímero es soluble en agua, se emplea el método de disolución directa, mientras que si el copolímero es poco soluble en agua, se emplea por lo general el método de diálisis [41,63].

3.3.1 Método de disolución directa

La disolución directa implica añadir el copolímero en el agua u otro medio acuoso tal como amortiguador de fosfatos. Las micelas de los copolímeros PEO-PPO-PEO se forman de forma espontánea, pero en algunos casos el copolímero y el agua se mezclan a temperaturas elevadas para garantizar la formación de micelas (Figura 3.3a) [41,63].

3.3.2 Método de diálisis

El método de diálisis se utiliza a menudo cuando las micelas se forman a partir de un copolímero que no es fácilmente soluble en agua. En este caso, el copolímero se disuelve primero en un disolvente orgánico común que es miscible con agua tal como dimetilformamida, tetrahidrofurano o dimetilacetamida. La mezcla de disolventes y copolímero se agita y después se dializa con agua bidestilada. Durante el proceso de formación de micelas la diálisis se induce y se elimina el disolvente orgánico (Figura 3.3a) [41,63].

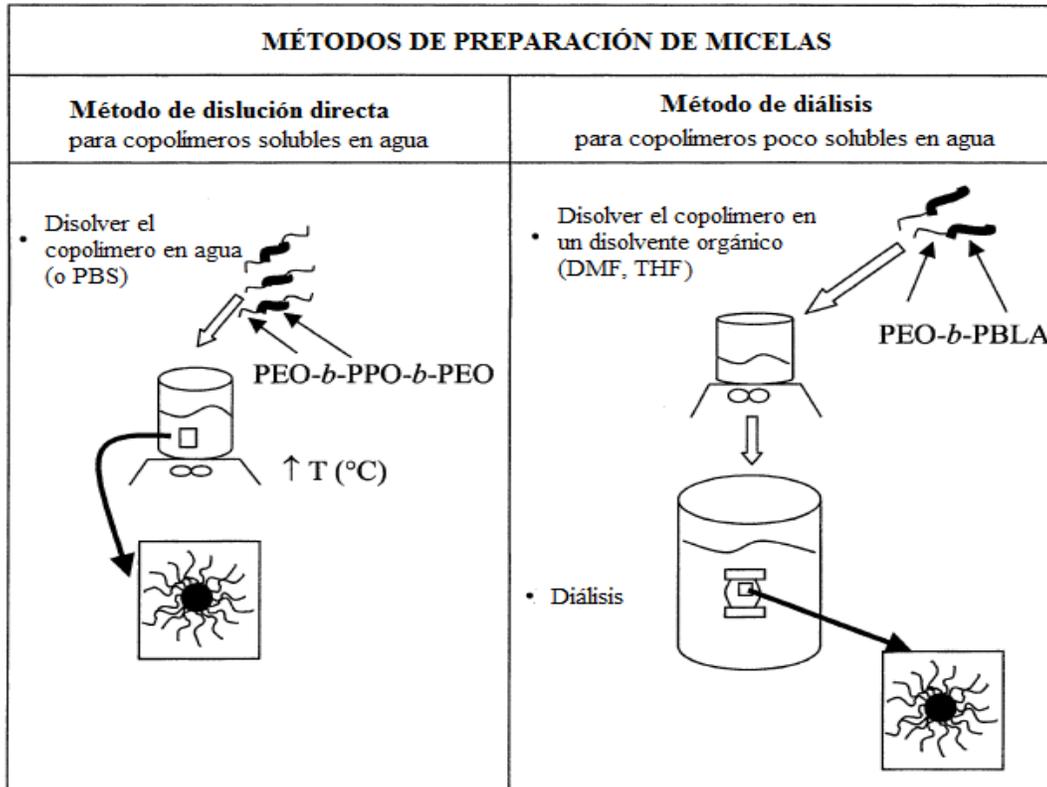


Figura 3.3a Esquema de métodos de preparación de micelas poliméricas. Método de disolución directa y Método de diálisis. Figura tomada y modificada de referencia [41].

3.4 Incorporación de fármaco en micelas poliméricas

En la actualidad existen varios métodos para solubilizar fármacos en micelas poliméricas, de los cuales se pueden mencionar los siguientes:

3.4.1 Disolución directa

En un método de disolución directa, el polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente acuoso, lo que conduce a la formación de micelas, como se ilustra en la Figura 3.4a. Esta técnica, que se utiliza principalmente para polímeros moderadamente hidrófobos, tales como PEO-PPO, se puede aplicar calentamiento a la solución para promover la formación de micelas, el mecanismo por el cual se produce la formación de micelas es la deshidratación del núcleo hidrófobo [64].

3.4.2 Diálisis

Disolver en fármaco mediante esta técnica requiere disolver el polímero y el fármaco en un disolvente orgánico miscible en agua, seguido de la lenta eliminación del disolvente a través de una membrana de diálisis frente a agua destilada. Ejemplos de disolventes orgánicos utilizados en el método de diálisis son etanol, acetona, N-N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO) entre otros (Figura 3.4 a) [64].

3.4.3 Emulsión solvente en agua

También llamada emulsión aceite-en-agua (O / W), en este método se emplea un disolvente orgánico inmiscible en agua para formar una emulsión de gotitas pequeñas de disolventes orgánicos que sirven como una plantilla para el montaje de las micelas. En primer lugar, el polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico posteriormente se añade agua [64]. Después la mezcla se emulsiona por sonicación o agitación, el proceso de emulsificación crea gotitas de tamaño nanométrico dispersas por toda la fase acuosa. El fármaco hidrófobo se mantiene encapsulado dentro de la fase orgánica mientras que el polímero se

encuentra montado en la interfase acuosa-orgánica con los bloques hidrófobos agrupados junto con el fármaco en el núcleo de la gota y los bloques hidrófilos se extiende dentro de la fase acuosa por tal, la emulsión se estabiliza. El disolvente orgánico se elimina posteriormente por evaporación, dejando atrás las micelas cargadas de fármaco. Los disolventes comúnmente usados en este método incluyen acetato de etilo, diclorometano y cloroformo (Figura 3.4a) [64].

3.4.4 Evaporación del disolvente

El método de evaporación del disolvente es similar al método de emulsión, excepto que el disolvente orgánico es miscible en agua. Puesto que no hay separación de fases, no se forma la emulsión y por lo tanto, la formación de micelas se produce por un mecanismo diferente. Debido a que el disolvente orgánico se elimina a través de evaporación, el cambio de la calidad del disolvente y en consecuencia, la selectividad desde la fase orgánica a la acuosa es gradual; el polímero y el fármaco son capaces de agregarse en micelas en vez de precipitar la solución. La acetona es generalmente el disolvente de elección, debido a su miscibilidad en agua y baja presión de vapor, lo que simplifica su eliminación (Figura 3.4a) [64].

3.4.5 Fundición de la solución

También se conoce como el método de secado hacia abajo. El polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico a continuación, se elimina el disolvente, típicamente en atmósfera de nitrógeno. Se crea una película delgada en la que el fármaco interactúa preferentemente con el bloque hidrofóbico del polímero; a continuación se añade agua caliente mientras se agita. Las interacciones hidrófobas entre el fármaco y el bloque hidrófobo se mejoran tras la adición de agua, mientras que el bloque hidrófilo se hidrata y se disuelve. Ejemplos de disolventes orgánicos utilizados con este método reportado en la literatura son acetonitrilo y dimetilformamida (Figura 3.4 a) [64].

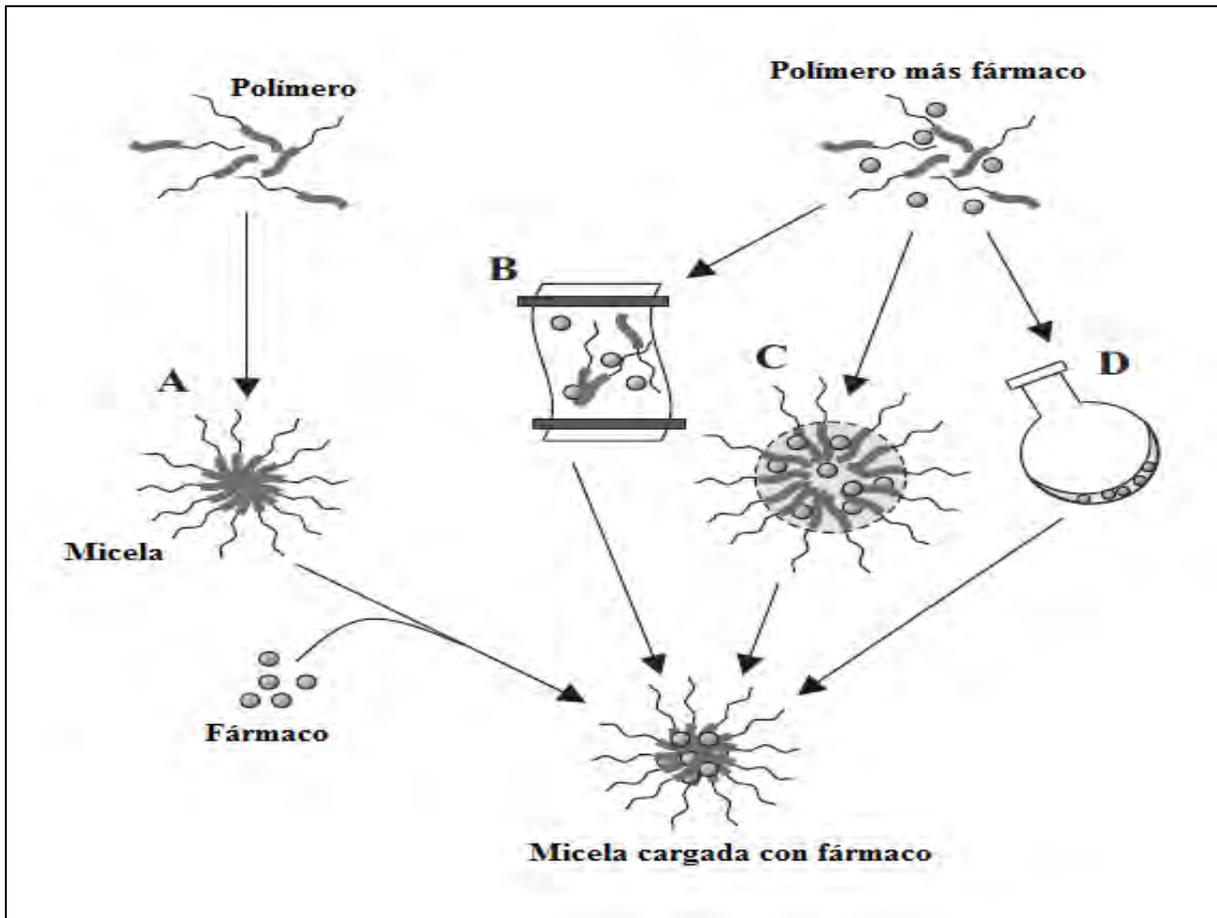


Figura 3.4a. Métodos incorporación de fármacos en micelas poliméricas. (A) Disolución directa. (B) Diálisis (C) Emulsión solvente en agua (D) Fundición de la solución. Figura tomada y modificada de referencia [63]

3.5 Celda de Franz

La celda de Franz representa uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y, a partir de los últimos años, la liberación de fármacos [65,66]. Esta técnica permite evaluar la cinética de liberación a partir de diferentes sistemas farmacéuticos, especialmente aquellos de liberación controlada de moléculas biológicamente activas, como por ejemplo, parches transdérmicos, cremas, geles, matrices, entre otras [66].

Constituida por un sistema de dos cámaras una donadora y otra receptora, la cual está dentro de una chaqueta en la cual se da un flujo constante de agua a temperatura constante, lo que permitirá mantener una temperatura controlada. Ambas cámaras se encuentran separadas por una membrana de origen animal,

humano o sintético que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra. En el compartimento superior se adiciona una solución o dispersión que contiene el compuesto activo, en el inferior se coloca una solución receptora, la cual puede ser por ejemplo agua, un amortiguador salino de fosfatos (PBS) o alguna otra solución biológica en donde difundirá el fármaco (Figura 3.5a).

El tiempo y periodo de muestreo dependerá del sistema que se esté manejando, las muestras tomadas posteriormente se analizan por espectroscopia UV-Vis, HPLC o cualquier otra técnica que sirva para cuantificar la cantidad de compuesto activo. Entre los parámetros que influyen en la difusión de dicho compuesto, están la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y naturaleza de la membrana y el medio del compartimento receptor [67].



Figura 3.5a. Imagen de composición de una celda de Franz. Imagen tomada y modificada de referencia [66].

3.6 Modelos cinéticos de liberación

Como ya se mencionó anteriormente las micelas poliméricas pueden funcionar como sistemas de liberación de fármacos (SLF). Aunque existen muy pocos estudios en este sentido, es importante conocer el mecanismo por el cual se lleva a cabo la liberación del fármaco. Para dicho estudio se han buscado modelos para conocer cómo se lleva a cabo el transporte del fármaco desde los agregados hacia el exterior, en nuestro caso de micelas poliméricas en solución acuosa. A continuación se describen los modelos empleados en nuestro estudio preliminar.

3.6.1 Orden Cero

La liberación del fármaco se da a partir de formas farmacéuticas que no se disgregan y el fármaco se libera lentamente (suponiendo que el área no cambia y no se obtienen condiciones de equilibrio), se representan por la ecuación

$$f_t = k_0 t$$

Donde f_t representa la fracción de fármaco liberado al tiempo t (representada también como Mt/M^∞), k_0 es la constante de liberación expresada en unidades de concentración/tiempo y t es el tiempo. Para estudiar la cinética de liberación, los datos obtenidos se representan gráficamente como la cantidad acumulada de fármaco vs tiempo. Esta relación puede ser utilizada para describir la liberación de fármaco de varios tipos de formas de dosificación farmacéutica de liberación modificada, como en el caso de algunos sistemas transdérmicos, así como sistemas matriciales con fármacos poco solubles, sistemas osmóticos, entre otros [68,69].

3.6.2 Primer Orden

Este modelo es usado para describir la absorción y/o eliminación de algunos fármacos, representado por la ecuación de Noyes – Whitney:

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C)$$

Donde dC/dt representa la variación de concentración del soluto por unidad de tiempo, k es una constante de rapidez dependiente de las condiciones experimentales, C_s es la concentración de saturación del soluto en el medio de disolución y C es la concentración del soluto en el tiempo t . Los datos obtenidos pueden ser graficados como: $\log \% \text{ de fármaco remanente vs } \log \text{ tiempo}$ donde se obtendrá una línea recta con pendiente de $-k / 2.303$. Esta relación puede ser usada para describir la liberación del fármaco desde formas de dosificación que contienen fármacos solubles en agua en una matriz porosa [68,69].

3.6.3 Modelo de Higuchi

Higuchi desarrollo varios modelos teóricos para para estudiar la liberación de los fármacos solubles y poco solubles en agua, incorporados en matrices semi-sólidos y / o sólidos [68,69]. Inicialmente esta ecuación fue concebida para sistemas planares, pero posteriormente fue extendida hacia otros sistemas de diferentes formas geométricas y sistemas porosos. De manera general se puede expresar el modelo de la siguiente manera (conocido como el modelo de Higuchi simplificado):

$$f_t = k_H t^{1/2}$$

Donde f_t es la fracción de fármaco liberado y k_H es la constante de Higuchi. Los datos obtenidos pueden ser graficados como: $\% \text{ del fármaco liberado vs raíz cuadrada del tiempo}$. Esta relación puede ser usada para describir la liberación de fármaco desde diferentes formas de dosificación farmacéutica como son el caso de sistemas transdérmicos, sistemas matriciales, entre otros [68,69].

3.6.4 Modelo de Korsmeyer – Peppas

Korsmeyer et al. desarrollaron esta ecuación que describe la liberación del fármaco desde sistemas poliméricos [68,69]. Para determinar el mecanismo de liberación del fármaco una condición establecida es que sólo hasta el 60% del fármaco se libere. La ecuación que representa este modelo es la siguiente:

$$f_t = kt^n$$

Donde f_t es la fracción de fármaco liberado al tiempo t , k es la constante de liberación y n es el exponente de liberación que explica que tipo de mecanismos de liberación sigue el fármaco de acuerdo a la siguiente tabla:

Valor de exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte de fármaco
0.5	Difusión de Fick
$n < 1.0$	Transporte no Fickiano o anómalo
$n = 1$	Trasporte caso II (transporte desde una matriz hinchable)
$n < 0.5$	Existe una liberación por la presencia de poros, acompañada de liberación por hinchamiento.

Este modelo es generalmente usado para analizar la liberación desde formas farmacéuticas poliméricas, cuando el mecanismo de liberación no es bien conocido o cuando hay presencia de más de un tipo de fenómeno de liberación [68,69].

3.6.5 Modelo de Peppas – Fassih

Con este modelo podemos investigar si la liberación desde una matriz polimérica tiene un efecto estallido (burst), es decir, que la liberación sea inicialmente rápida y conforme pase el tiempo, esta disminuya y se vuelva constante [68,69]. El modelo se describe con la ecuación.

$$f_t = at^n + b$$

Donde el parámetro de estallido es representado por la variable b , cuando se carece de dicho efecto el valor de b es cero, a es el coeficiente de difusión, n representa el tipo de difusión tomando los valores $n = 0.5$ cuando es difusión tipo Fick, $n < 0.1$ si es anómala y $n = 0.1$ si es caso II, f_t es la fracción de fármaco al tiempo t [68,69].

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Caracterizar fisicoquímicamente la promoción de la solubilización de compuestos de interés biológico o farmacéutico (Econazol y α -tocoferol) que poseen muy baja solubilidad acuosa, mediante micelas poliméricas.

4.2 Objetivos Particulares

- Encapsular compuestos de interés biológico (Econazol y α - tocoferol) dentro de agregados poliméricos de Pluronic P123 y F127.
- Comprobar el aumento de la solubilidad acuosa de Econazol y α - Tocoferol en micelas poliméricas de Pluronic P123 y F127.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y de autoagregación del sistema micelar y micela más fármaco mediante calorimetría diferencial de barrido.
- Determinar el tamaño de partícula del sistema micelar y micela más compuesto mediante la técnica de dispersión dinámica de luz.
- Estudiar la posible cinética de liberación que tienen los fármacos desde las micelas poliméricas empleando la técnica de celdas de Franz.

4.3 Hipótesis

Econazol y α -tocoferol son dos fármacos que presentan nula solubilidad acuosa y por lo tanto, poca biodisponibilidad. Utilizar micelas poliméricas puede potenciar la solubilidad acuosa de estos compuestos. Estudiar las propiedades fisicoquímicas de los copolímeros con y sin presencia del fármaco podrá ayudar a emplearlos posteriormente como posibles vehículos para administración de fármacos.

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales

Todos los reactivos usados fueron grado analítico y se usaron sin ninguna purificación.

- Pluronic P-123, Pluronic F-127, sal de nitrato de Econazol, (\pm)- α -tocoferol $\geq 96\%$ (HPLC), comprados a Sigma Aldrich.
- Alcohol Etilico Anhidro absoluto (JT Baker).
- Buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 preparado en el laboratorio con los siguientes reactivos y concentraciones: NaCl (JT Baker) (138 mM), KCl (JT Baker) (3 mM), Na₂HPO₄ (JT Baker) (8.1 mM), KH₂PO₄ (Sigma Aldrich) (1.5 mM). Todos con pureza $\geq 98\%$
- Agua desionizada obtenida a partir del equipo Simplicity de Millipore con una resistividad de 16.6 m Ω y temperatura de 24.1°C

5.2 Metodología

5.2.1 Preparación de micelas poliméricas y solubilización del fármaco.

El método empleado para la preparación de las micelas fue el de disolución directa, el cual se describe a continuación:

Se prepararon soluciones de Pluronic tanto de P123 como de F127 en buffer salino de fosfatos (PBS) pH = 7.4 a concentraciones de 1, 5, 10 y 15 % (m/m), para lo cual se pesó en un vial de vidrio limpio y seco la cantidad adecuada de Pluronic, posteriormente se agregó el buffer y se dejaron en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez solubilizado el Pluronic se procedió a agregar el fármaco (Econazol o α -tocoferol) poco a poco hasta saturar la solución, y estas se dejaron en agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. Las soluciones fueron filtradas para remover el exceso de fármaco mediante filtros de jeringa de celulosa regenerada de 0.45 μ m de diámetro.

5.2.2 Curva patrón de Econazol y α -tocoferol

Se realizaron dos curvas patrón en etanol absoluto para cada uno de los fármacos.

- Para los puntos de la curva patrón de Econazol se realizaron 8 soluciones a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 $\mu\text{g/mL}$.
- Para α -tocoferol las soluciones se realizaron a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 hasta 120 $\mu\text{g/mL}$.

Se obtuvo la absorbancia para cada punto de las curvas (Econazol a 271 nm y α -tocoferol a 291 nm) por espectrofotometría UV-VIS empleando un equipo Cary 50 Bio (Varian). Para cada gráfico se obtuvo sus respectivas ecuaciones de la recta y coeficiente de correlación. Para tener una mayor confiabilidad las curvas se realizaron por triplicado para obtener promedio y desviación estándar.

5.2.3 Curvas de solubilidad

Una vez solubilizados los fármacos y filtradas las disoluciones de Pluronic P123 y F127 a concentraciones de 1, 5, 10 y 15 % m/m, se procedió a determinar la absorbancia de fármaco para cada concentración de Pluronic mediante espectrofotometría UV-Vis a longitudes de onda de 271 nm para Econazol y 291 nm para α -tocoferol, para lo cual se tomaron alícuotas de entre 50 y 100 μL de cada solución y se diluyeron en una cierta cantidad de etanol absoluto para que los valores de absorbancia obtenido entraran dentro de los parámetros de la curva patrón. Posteriormente, con el factor de dilución y la curva patrón se cuantificaron las concentraciones de fármaco en cada solución. Las curvas se realizaron por triplicado para obtener un promedio y desviación estándar.

5.2.4 Determinación de los parámetros termodinámicos de formación de micelas poliméricas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido.

Se realizaron barridos para cada concentración de Pluronic (tanto puro como con fármaco) empleando el equipo VP-DSC MicroCal. Los barridos para todas las muestras se realizaron empleando los siguientes parámetros de barrido:

Temperatura inicial	5°C
Temperatura final	70°C
Velocidad de calentamiento	60°C h ⁻¹
Tiempo de termoestabilización	15 min
Tiempo de filtrado	2 s

5.2.5 Determinación del tamaño de partícula de las micelas poliméricas mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz

Se determinó el tamaño de partícula (diámetro en nanómetros) para cada sistema empleando en todas las muestras la concentración de Pluronic al 1% con y sin fármaco, previo a la medición cada solución fue filtrada mediante filtros de jeringa de celulosa regenerada de 0.45 µm de tamaño de poro para evitar la contaminación con algún otro tipo de partícula.

Como ya se ha reportado el tamaño y formación de las micelas poliméricas dependen de la temperatura, por lo tanto, las mediciones se realizaron a temperaturas de 10, 25 y 40°C. Se empleó el equipo Zetasizer Nano-ZS de Malvern con las siguientes características:

Tipo de laser	Láser rojo a 4mV 632.8 nm
Rango de tamaño (diámetro)	0.3 nm – 10 µm

Para cada muestra a cada temperatura se realizaron tres mediciones.

5.2.6 Estudios de liberación in vitro de fármaco

Los perfiles de liberación para cada fármaco, se realizaron mediante el uso de celdas de Franz empleando las soluciones de Pluronic P123 y F127 ambos a concentraciones del 10%. Las características físicas de las celdas empleadas son:

- Volumen de compartimento receptor: 16.0 mL
- Volumen de muestra colocado en el compartimento donador: 3.0 mL
- Área efectiva de difusión: 122 mm²
- Volumen de muestra tomado en cada muestreo: 1.0 mL

La toma de muestra se realizó con una micropipeta de 1.0 mL, el volumen de cada muestreo fue de 1.0 mL con remplazo de volumen empleando Buffer salino de fosfatos pH 7.4. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada sistema a 37°C con periodos de muestreo establecidos, para dicho estudio se emplearon membranas de diálisis Spectra/Por® RC 12-14,000 Da y así, evitar el paso de los agregados de Pluronic y que solo permeación del fármaco.

6. Resultados y Análisis de Resultados

6.1 Curvas patrón de Econazol y α -tocoferol

Se realizaron curvas patrón de Econazol y α -tocoferol (Figuras 6.1a) obteniendo su ecuación de Lambert – Beer que describe la dependencia de la absorbancia con concentración y el coeficiente de correlación.

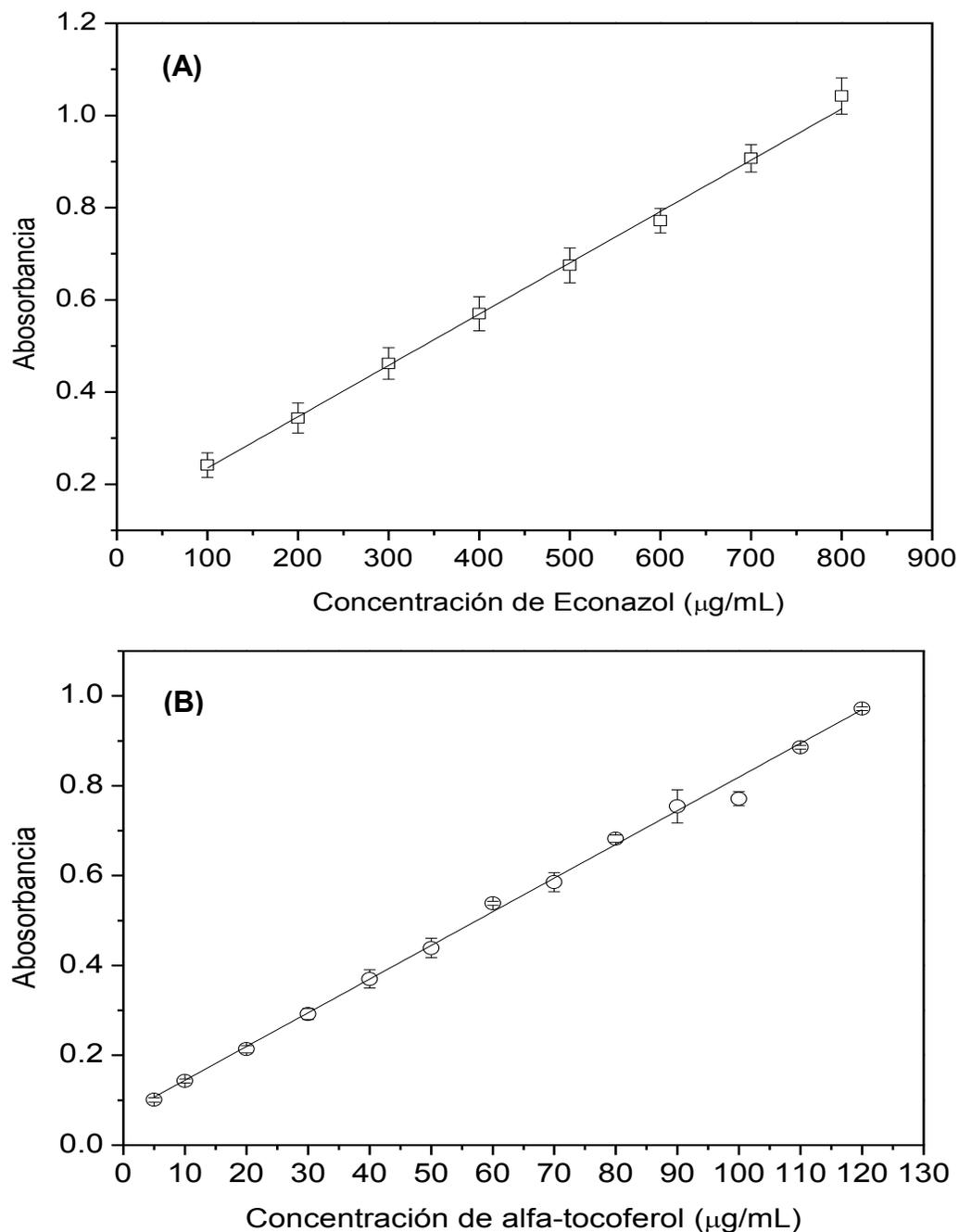


Figura 6.1a. Curvas patrón de Econazol (A) y α -tocoferol (B), en Etanol absoluto.

Para la curva patrón de Econazol el coeficiente de correlación fue de 0.9985 y la ecuación de la recta la siguiente:

$$y = 0.0012x + 0.0746$$

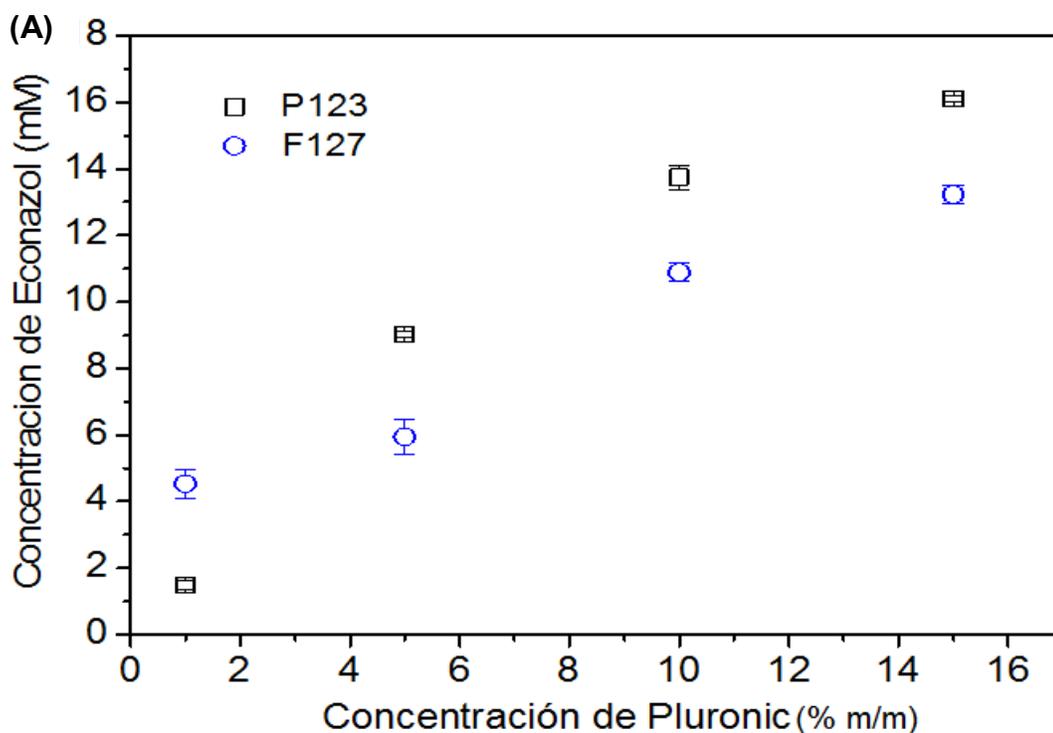
Para α -tocoferol el coeficiente de correlación fue de 0.9945 y la ecuación de la recta:

$$y = 0.0076x + 0.0542$$

Estas ecuaciones se usaron posteriormente para el cálculo de las concentraciones de Econazol y α -tocoferol en las curvas de solubilidad.

6.2. Solubilidad de Econazol y α -tocoferol en P123 y F127

Las curvas de solubilidad obtenidas de Econazol y α -tocoferol demuestran que los copolímeros empleados si aumentan la solubilidad acuosa de dichos fármacos (Figuras 6.2 A y B). Por lo tanto, un incremento gradual en la concentración de polímero conduce a concentraciones micelares más altas y por consiguiente, a una mayor cantidad de fármaco solubilizado.



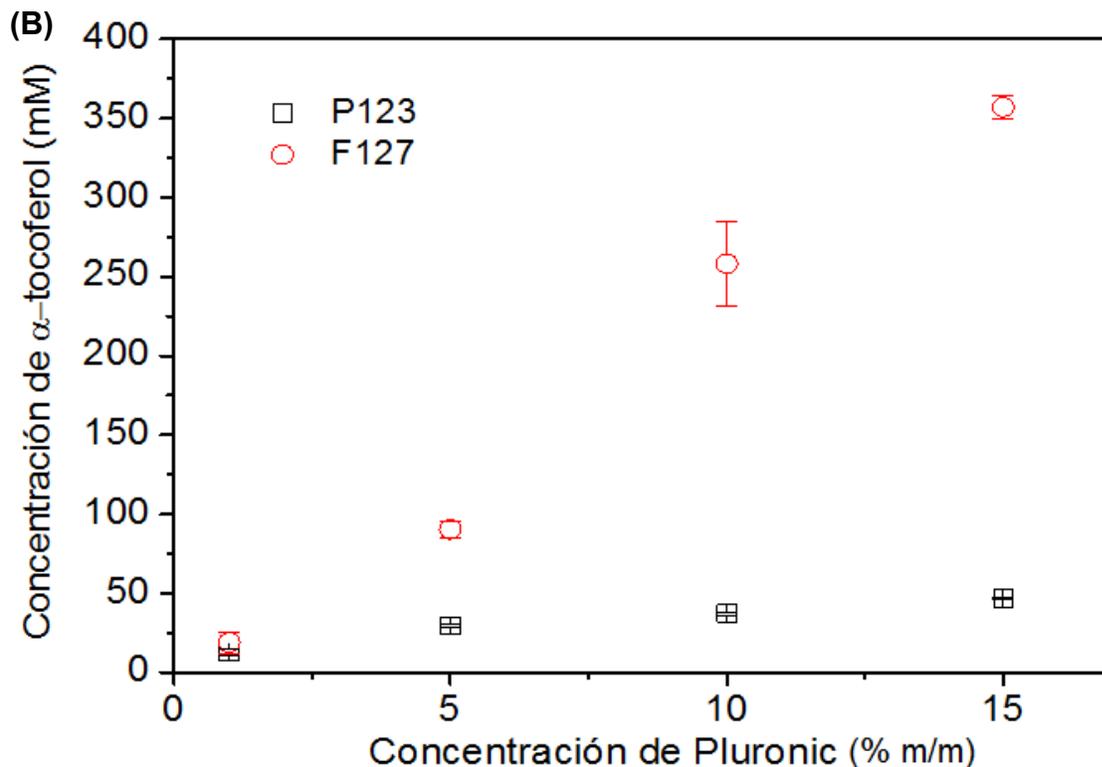


Figura 6.2a. Curvas de solubilidad de α -tocoferol y Econazol en copolímeros tribloque P123 y F127. **(A)** Econazol en P123 y F127 **(B)** α -tocoferol en P123 y F127 (se presenta promedio y desviación estándar, n=3)

En la Figura (A) se observa que el Pluronic P123 “captura” una mayor cantidad de Econazol que Pluronic F127, lo cual nos indica una posible mayor afinidad del fármaco por los agregados de F127. En la Figura (B) se observa el caso contrario, aquí el α -tocoferol muestra mayor solubilidad en agregados de F127.

Los resultados obtenidos comprueban como ya se ha mencionado anteriormente, que los copolímeros tribloque si aumentan la solubilidad acuosa de fármacos poco solubles. La capacidad de los copolímeros para solubilizar fármacos depende de numerosos factores, tales como la estructura química del agente tensoactivo, del fármaco, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, etc. Los tensoactivos no iónicos generalmente son mejores agentes solubilizantes que los tensoactivos iónicos para fármacos hidrófobos, debido a que sus valores de CMC son inferiores. Desde el punto de vista farmacológico los hace ser mas estables, ya que por ejemplo teniendo en cuenta una administración intravenosa la dilución en un gran volumen de la sangre, sólo existirán las micelas de tensoactivo con valor bajo de CMC,

mientras que micelas de tensoactivo con un alto valor de CMC pueden disociarse en monómeros y su contenido llegar a precipitar en sangre [37].

En cuanto a la influencia de la estructura del fármaco, sólidos cristalinos generalmente muestran menor solubilidad en micelas que los líquidos de estructura similar [70]. La profundidad de penetración del fármaco en la micela varía conforme a su estructura. Por lo general, para los fármacos más polares (o de más débil interacción, ya sea con la cabeza polar del tensoactivo o con la interface agua-micela) es menor su grado de solubilización, ya que se refleja su penetración menos profunda dentro de la micela, en comparación a los fármacos poco polares, los cuales pueden tener una mejor localización dentro del núcleo micelar [70,71]. Por lo tanto, se espera que Econazol y α -tocoferol por ser fármacos hidrófobos, es decir poco polares, su penetración dentro de los agregados poliméricos sea alta y por lo tanto, se localicen dentro del núcleo.

Es importante destacar que la composición hidrófoba para este tipo de tensoactivos es muy importante, sobre todo para la solubilización de fármacos hidrófobos. En un estudio realizado, la solubilización de acetato de timobesone (corticoesteroide utilizado en la terapia inflamatoria) en soluciones de tensoactivos no iónicos, observaron que la capacidad de solubilización aumentó conforme al aumento de longitud de la cadena hidrófoba de los agentes tensoactivos; por lo tanto, se asumió que este compuesto se solubiliza en el núcleo hidrófobo de la micela [37]. Pluronic P123 y F127 son de los copolímeros tribloque con cadenas hidrófobas más largas (P123 = 69 de PPO y F127= 65 PPO) lo que es un factor favorable para el aumento de la solubilidad de Econazol y α -tocoferol.

La temperatura también juega un rol importante en la solubilización de fármacos en las micelas. Por lo general, un aumento gradual en la temperatura favorece la deshidratación de los grupo PPO, por lo que las estructuras se reacomodan de manera que en la capa exterior se localizan los grupos hidrófilos (PEO) y en el núcleo formado los grupos hidrófobos (PPO). Esto favorece así la formación de micelas y por lo tanto, el aumento de la solubilidad de fármacos hidrófobos.

En general, una buena indicación de la compatibilidad es la semejanza estructural entre la molécula de fármaco y la parte hidrófoba del polímero. La compatibilidad también se puede estimar mediante la comparación de la polaridad del fármaco y el segmento hidrófobo del polímero, por lo tanto si el polímero y el fármaco son de polaridad similar, este se disolverá mejor en las micelas.

6.2.1 Termodinámica de solubilidad

Para entender mejor la interacción fármaco-micela, se determinaron los parámetros termodinámicos como: capacidad de solubilidad molar (χ), coeficiente de partición micela-agua (P) y la energía libre estándar de solubilización (ΔG°_s) tanto dependiente como independiente de la concentración de copolímero para ambos fármacos (Tablas 6.2.1a y 6.2.1b)

Tabla 6.2.1a. Parámetros termodinámicos de solubilidad obtenidos para Econazol en función de la concentración de Pluronic P123 y F127 a 25°C

Concentración de Pluronic (% m/m)	Capacidad de solubilidad molar (χ) (M)	Coeficiente de partición micela – agua (P)	ΔG°_s ⁽¹⁾ (kJ/mol)	ΔG°_s ⁽²⁾ (kJ/mol)
P123				
1	0.63	3.47	-3.015	-19.022 ± 0.564
5	0.99	26.16	-7.719	
10	0.79	40.2	-8.975	
15	0.61	47.51	-9.367	
F127				
1	4.67	4.59	-3.699	-21.299 ± 1.709
5	1.25	6.33	-4.447	
10	1.36	12.43	-6.114	
15	1.26	16.97	-6.689	

(1) Energía libre de solubilización dependiente de la concentración de Pluronic

(2) Energía libre de solubilización independiente de la concentración de Pluronic

Tabla 6.2.1b. Parámetros termodinámicos de solubilidad obtenidos para α -tocoferol en función de la concentración de Pluronic P123 y F127 a 25°C

Concentración de Pluronic (% m/m)	Capacidad de solubilidad molar (χ) (M)	Coefficiente de partición micela – agua (P)	ΔG°_s ⁽¹⁾ (kJ/mol)	ΔG°_s ⁽²⁾ (kJ/mol)
P123				
1	7.15	0.80	-33.529	-47.059 ± 1.507
5	8.38	1.81	-35.540	
10	2.20	2.28	-36.117	
15	1.80	2.87	-36.674	
F127				
1	23.72	1.16	-34.443	-52.397 ± 0.521
5	22.05	5.54	-38.297	
10	34.87	15.8	-40.885	
15	29.99	21.8	-41.685	

⁽¹⁾ Energía libre de solubilización dependiente de la concentración de Pluronic

⁽²⁾ Energía libre de solubilización independiente de la concentración de Pluronic

La **capacidad de solubilidad molar (χ)**, es un parámetro que indica la cantidad de fármaco (en mol) solubilizado por mol de copolímero. En los resultados obtenidos se observa que este valor aumenta en las concentraciones de 1 y 5%, sin embargo estos disminuyen a las concentraciones más altas (10 y 15%). De acuerdo a la fórmula de capacidad de solubilidad molar:

$$\chi = \frac{S_{\text{tot}} - S_w}{C_{\text{polímero}} - \text{CMC}}$$

la solubilidad total (S_{tot}) debe aumentar conforme aumenta la concentración de copolímero ($C_{\text{polímero}}$), pero el aumento de la concentración de fármaco solubilizado a las concentraciones de 10 y 15% ya no es directamente proporcional, debido a que la concentración de polímero es mucho mayor en comparación a lo que alcanzó a solubilizar. Esto explica porque el coeficiente de solubilidad molar a mayores concentraciones de polímero sufre una disminución.

Las propiedades de solubilización de las micelas poliméricas se expresan generalmente en términos de coeficiente de partición micela-agua, definido como la relación entre la concentración de fármaco solubilizado en el interior de la micela y la concentración solubilizada dispersada molecularmente en la fase acuosa, siendo la concentración en molaridad. Como se observa en las tablas 6.2.1 a y b, el coeficiente de partición aumenta conforme aumenta la concentración de Pluronic, indicando que estos compuestos si aumentan la solubilidad acuosa de Econazol y α -tocoferol.

La energía libre de solubilización dependiente de la concentración ($\Delta G_s^{(1)}$), demuestra que conforme aumenta la concentración de polímero y por lo tanto, la de fármaco, este valor se vuelve más negativo es decir, el proceso se vuelve más espontáneo, y crece la afinidad del fármaco por la micela, se necesita menos energía para formación del complejo. Por otra parte, la energía de solubilización que no depende de la concentración de copolímero ($\Delta G_s^{(2)}$), en donde la concentración de copolímero se estandariza a 1 M, se puede hacer un comparativo entre ambos Pluronic. Para el caso de P123 y F127 en presencia de Econazol las energías libres de solubilización son similares entre sí (P123 = -19.022 ± 0.564 kJ/mol; F127 = -21.279 ± 1.709 kJ/mol) de igual manera para α -tocoferol (P123= -47.059 ± 1.507 kJ/mol; F127= -52.397 ± 0.521 kJ/mol) la diferencia entre ellos es pequeña, por lo que ambos procesos son de igual manera espontáneos para ambos fármacos y polímeros.

6.3 Proceso de micelización en solución acuosa seguido por Calorimetría Diferencial de Barrido.

La asociación de los sistemas de copolímeros tribloque (F127 y P123) tanto puros como con los fármacos (Econazol y α -tocoferol) en soluciones acuosas para formar micelas, es endotérmica. En la Figura 6.3 a y b se muestran los termogramas para Pluronic P123 al 1% y F127 al 1% respectivamente. Ya que la formación de micelas es un proceso espontáneo, en las condiciones del estudio, la energía libre de formación de las micelas se origina a partir de una contribución de entropía positiva (relacionado con un aumento de entropía por el agua al momento

de la asociación del copolímero y a una disminución de la polaridad de los segmentos EO y PO a medida que aumenta la temperatura) capaces de superar el cambio de entalpía positiva.

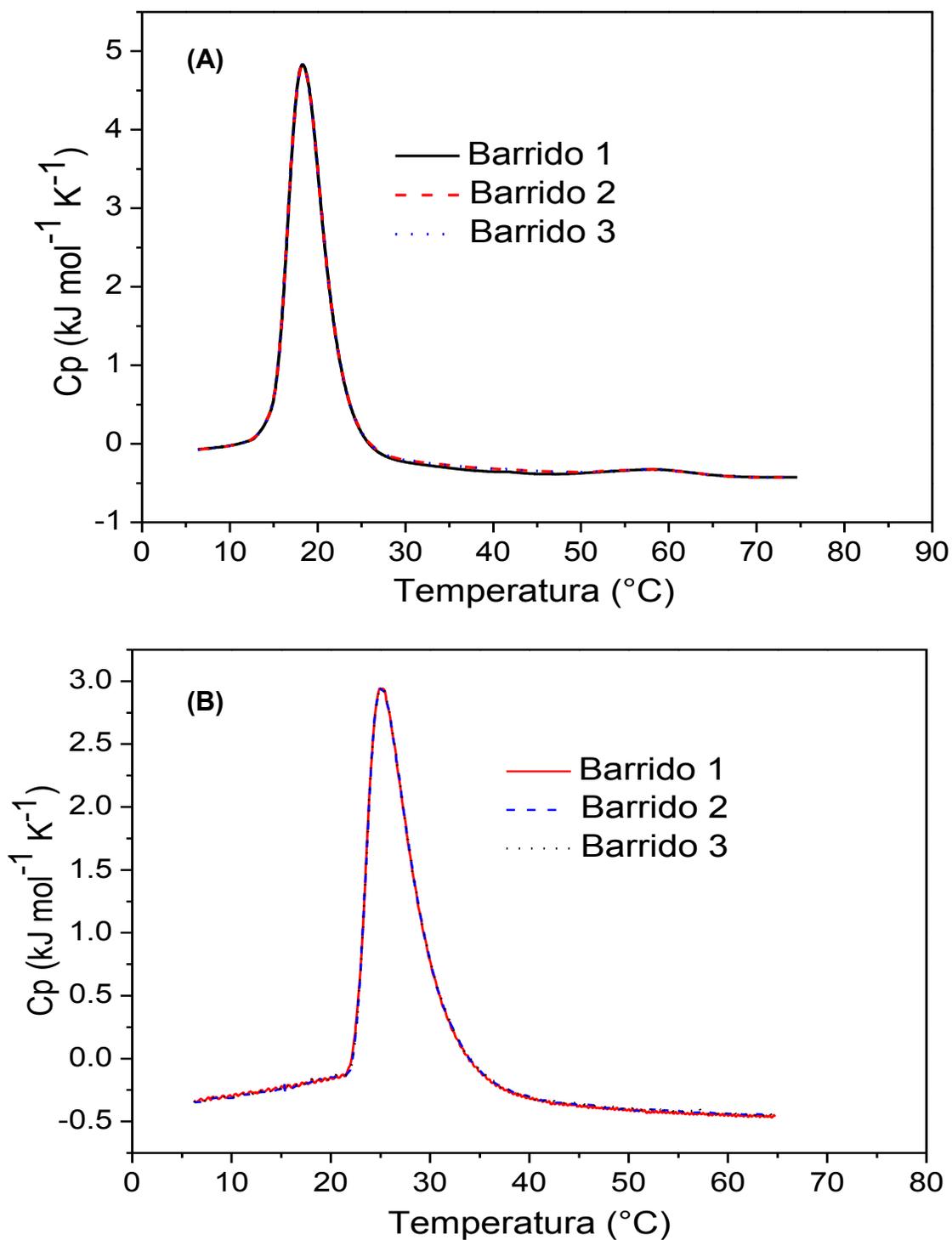


Figura 6.3 a y b. Calorimetría Diferencial de Barrido de Pluronic P123 1% (A) y Pluronic F127 1% (B) puros en solución acuosa. El pico endotérmico indica el proceso de formación de los agregados micelares.

El modelo que se ha empleado para explicar este proceso es el de la corona de PEO con un núcleo de PPO, esto debido a que conforme aumenta la temperatura por encima de la temperatura de micelización crítica (CMT), los grupos PEO muestran un aumento de hidrofobicidad [72,73]. Los segmentos polares interactúan favorablemente con agua a temperaturas bajas, mientras que los segmentos menos polares se ven favorecidos a temperaturas más altas. Por lo tanto, los grupos PPO se agregan para formar la separación de fases a una temperatura superior [72,73]. Además, la diferencia en la distribución del peso molecular y las impurezas presentes en los productos comerciales de Pluronic puede provocar cambios en los datos obtenidos [72,73].

En el caso de los Pluronic en solución acuosa (Figuras 6.3 a y b), al realizar varios barridos con la misma muestra se observó que los termogramas no cambiaban, se sobreponen uno sobre otro indicando que el proceso es reversible y aparentemente, tanto la formación como la estructura de los agregados poliméricos, no se modifican con la temperatura. Se obtuvieron para cada sistema los parámetros de entalpía del proceso de micelización (ΔH°), la temperatura media de transición (T_m) y temperatura de cooperatividad ($T_{1/2}$) (Tabla 6.3). El cambio de entalpía relacionada con el proceso de formación de micelas puede calcularse a partir de la integración de los datos C_p vs T obtenidos en los experimentos de DSC.

Comparando los resultados obtenidos para los Pluronic P123 y F127 (Tabla 6.3) en solución acuosa a diferentes concentraciones (1, 5 y 10% m/m). Pluronic P123 al 1% presenta un mayor calor de asociación, sin embargo T_m es menor, demostrado que este copolímero comienza a formar agregados a menores temperaturas, $T_{1/2}$ de igual manera es menor indicando que el sistema es más cooperable en la transición de monómeros a micelas.

Tabla 6.3.1 Parámetros termodinámicos obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido. (A) Pluronic P123 1% en solución acuosa (B) Pluronic F127 a 1, 5 y 10% puro en solución acuosa. Entalpia de micelizacion (ΔH°), Temperatura media de transición (T_m) y Temperatura de cooperatividad ($T_{1/2}$).

ΔH° (kJ/mol)*	T_m (°C)*	$T_{1/2}$ (°C)*
P123 1%		
447.15 ± 5.478	18.3 ± 0.0062	4.57 ± 0.034
F127 1 %		
319.09 ± 2.761	25.13 ± 0.097	5.092 ± 0.0009
F127 5 %		
338.30 ± 0.34	20.74 ± 0.01	4.82 ± 0.001
F127 10 %		
337.66 ± 1.00	19.14 ± 0.02	4.74 ± 0.02

* Promedio y desviación estándar obtenidos a partir de un numero de barridos (n=4) para la misma muestra en ambos sistemas.

Algo interesante a destacar para estos copolímeros es la influencia de la concentración en el proceso de micelización; tomando como ejemplo Pluronic F127 a las distintas concentraciones (Figura 6.3c) se observa en los termogramas que conforme aumenta la concentración los agregados comienzan a formarse a menor temperatura, esto se comprueba con el valor de T_m (Tabla 6.3.1) ya que conforme aumenta la concentración, se necesita una menor temperatura para la formación de micelas poliméricas.

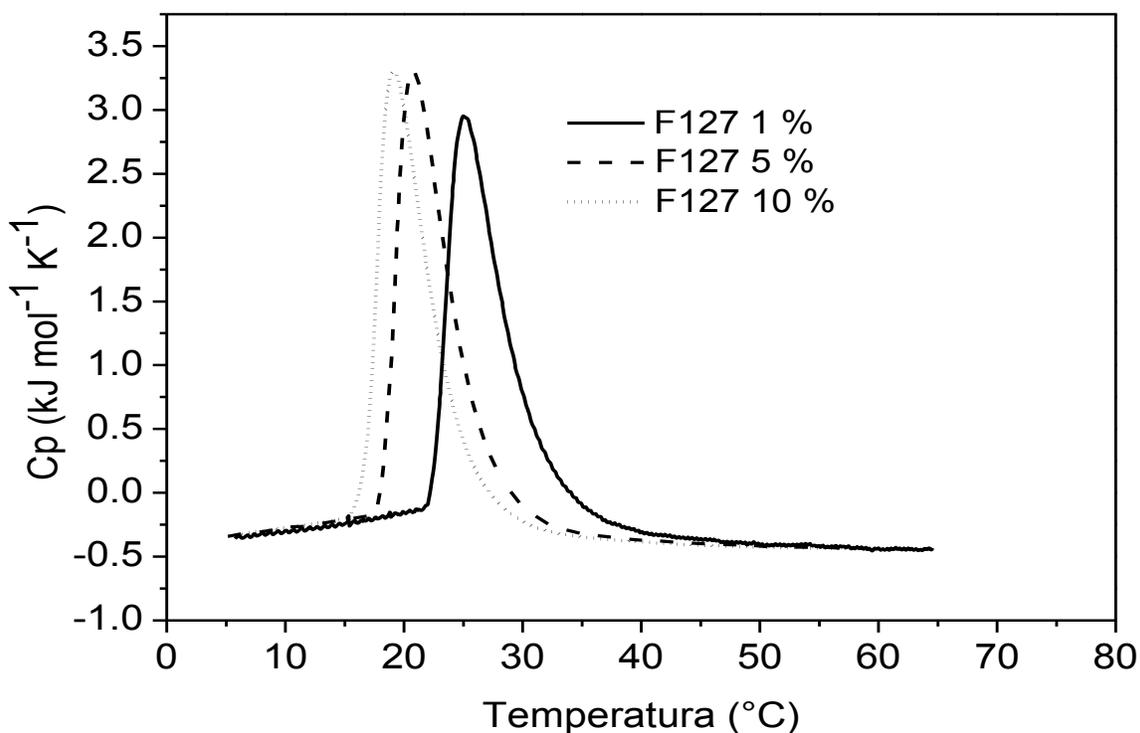
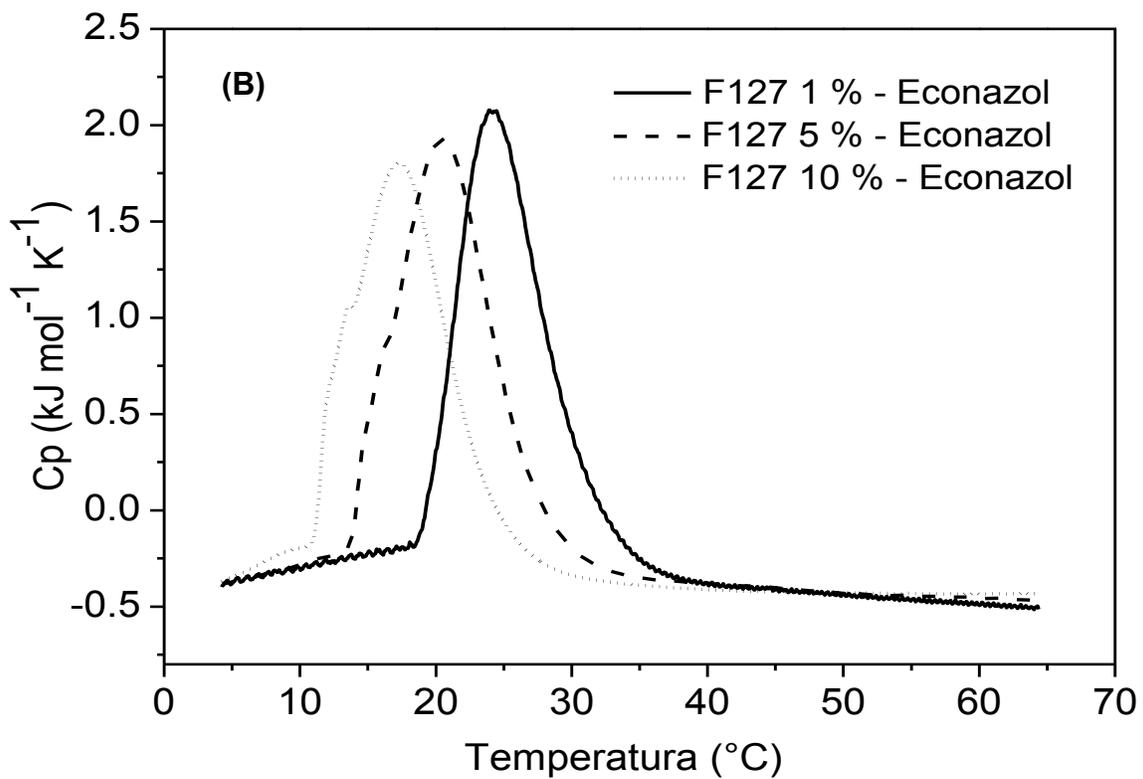
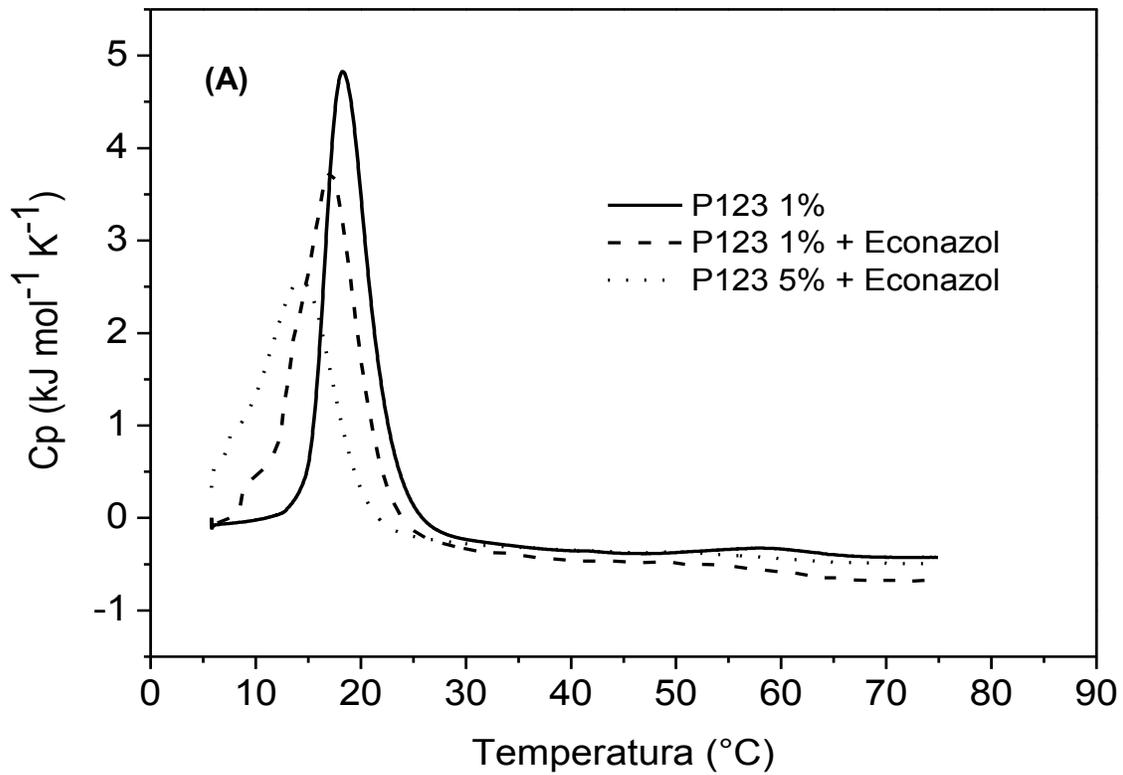


Figura 6.3c. Calorimetría Diferencial de Barrido realizada a Pluronic F127 puro en solución acuosa a concentraciones de 1, 5 y 10 (% m/m)

6.3.1 Pluronic P123 y F127 + Econazol

Para los sistemas de Pluronic P123 y F127 a concentraciones de 1, 5 y 10 % en presencia de Econazol, se observa que cambia la forma de los termogramas (Figura 6.3.1a). Esto demuestra que el fármaco tiene un efecto sobre la estructura conformacional de los agregados poliméricos. Los picos se vuelven más anchos, indicando un aumento en la polidispersidad de la muestra. En el termograma de P123 a la concentración de 5% + Econazol se observa que la transición no inicia desde abajo o con una pretransición, ya que el fármaco modifica el sistema de manera que comienza a formar agregados a menores temperaturas para lo cual el equipo empleado no tuvo el suficiente alcance y no permitió detectar el inicio exacto de la transición.



Figuras 6.3.1 a. Calorimetría Diferencial de Barrido realizado a Pluronic P123 y F127 en presencia de Econazol. **(A)** P123 al 1% y P123 al 1 y 5 % más Econazol. **(B)** Pluronic F127 (1,5 y 1 0 %) más Econazol. Para cada concentración se muestra el primer barrido realizado a cada muestra.

En las tablas 6.3.2 se muestran los parámetros termodinámicos de P123 y F127 con Econazol. La entalpia de micelización (ΔH°) disminuye en comparación con el del valor obtenido para Pluronic puro en solución acuosa. Conforme aumenta la concentración de copolímero y de fármaco, el proceso de asociación se hace menos endotérmico, la temperatura media de transición (T_m) también se ve disminuida en presencia de Econazol, es decir el proceso de transición para pasar de monómeros a micelas es más favorecido. La $T_{1/2}$ aumenta, debido a la dependencia de la temperatura sobre la cantidad de monómeros en equilibrio con las micelas (cuando la temperatura aumenta ocurren más cambios en el copolímero cuando pasa del estado de monómeros al estado micelar), así como la polidispersidad en el tamaño de los agregados.

Los resultados de entalpia de micelización (ΔH°), T_m y $T_{1/2}$ (Tabla 6.3.2) donde se muestra un promedio y desviación estándar se obtuvieron a partir del segundo al cuarto barrido realizados a la misma muestra, ya que se observó que los barridos posteriores al primero eran muy similares entre ellos (se sobreponían uno sobre otro) (Figura 6.3e). Estos resultados se atribuyen a un posible rearrreglo conformacional en las micelas poliméricas después de efectuado el primer barrido (para observar esto consultar Anexo B).

Tablas 6.3.2 Parámetros termodinámicos obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido. (A) Pluronic P123 al 1% y 5% más Econazol en solución acuosa. (B) Pluronic F127 a 1, 5 y 10% más Econazol en solución acuosa. Se muestran los parámetros de entalpía de micelización (ΔH°), temperatura media de transición (T_m) y temperatura de cooperatividad ($T_{1/2}$).

(A)	ΔH° (kJ/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
P123 1% + Econazol			
1° barrido	408.13	17.05	6.48
Promedio (barrido 2-4)*	414.77 ± 22.32	15.93 ± 0.24	7.86 ± 0.09
P123 5% + Econazol			
1° barrido	390.94	14.32	6.43
Promedio (barrido 2-4)*	435.01 ± 12.80	14.40 ± 0.10	8.99 ± 0.35

(B)	ΔH° (kJ/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
F127 1% + Econazol			
1° barrido	312.10	23.95	7.01
Promedio (barrido 2-4)*	307.89 ± 1.80	23.96 ± 0.03	7.58 ± 0.12
F127 5% + Econazol			
1° barrido	328.48	20.55	8.21
Promedio (barrido 2-4)*	353.22 ± 2.09	20.17 ± 0.24	8.35 ± 0.20
F127 10% + Econazol			
1° barrido	310.25	17.24	8.54
Promedio (barrido 2-4)*	321.99 ± 10.94	17.25 ± 0.14	8.53 ± 0.09

* Promedio ± Desviación estándar obtenidos a partir del 2° al 4° barrido de la misma muestra, ya que son similares entre sí.

En la Figura 6.3.1 b se observa como ejemplo los barridos realizados a la misma muestra de Pluronic F127 al 5 % más Econazol. Se aprecia que el 1° barrido es diferente a los posteriores (2° al 4°), esto se atribuye a que en presencia del fármaco las micelas poliméricas sufren un re arreglo conformacional en estructura.

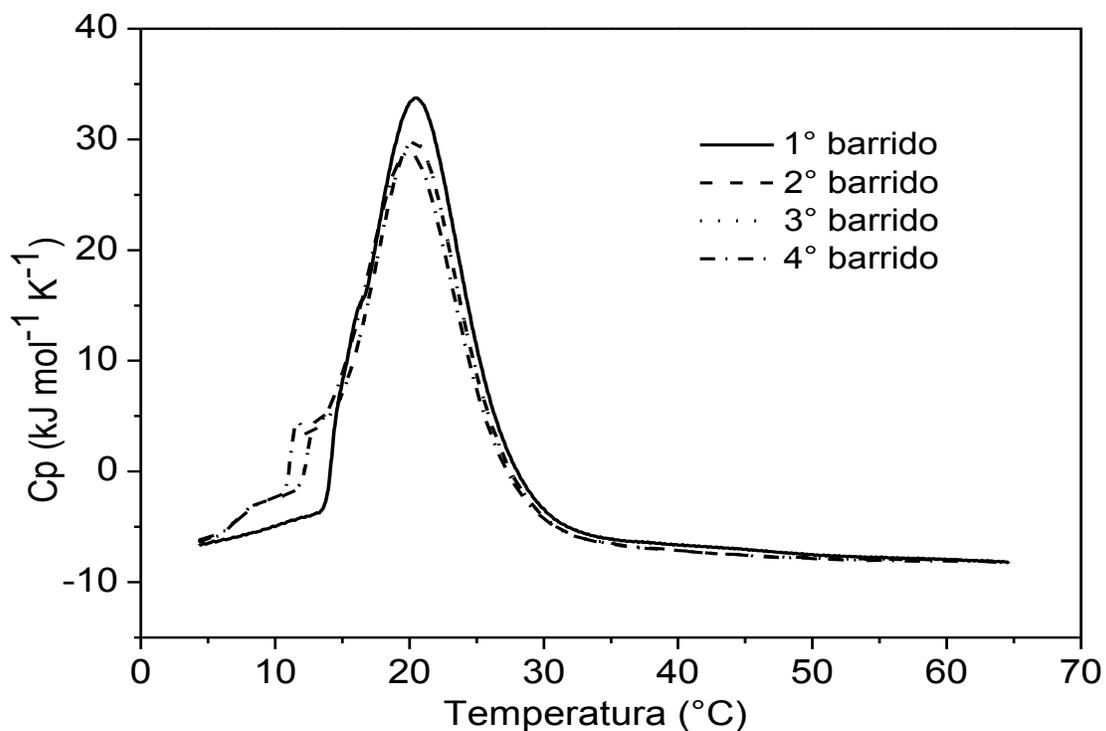
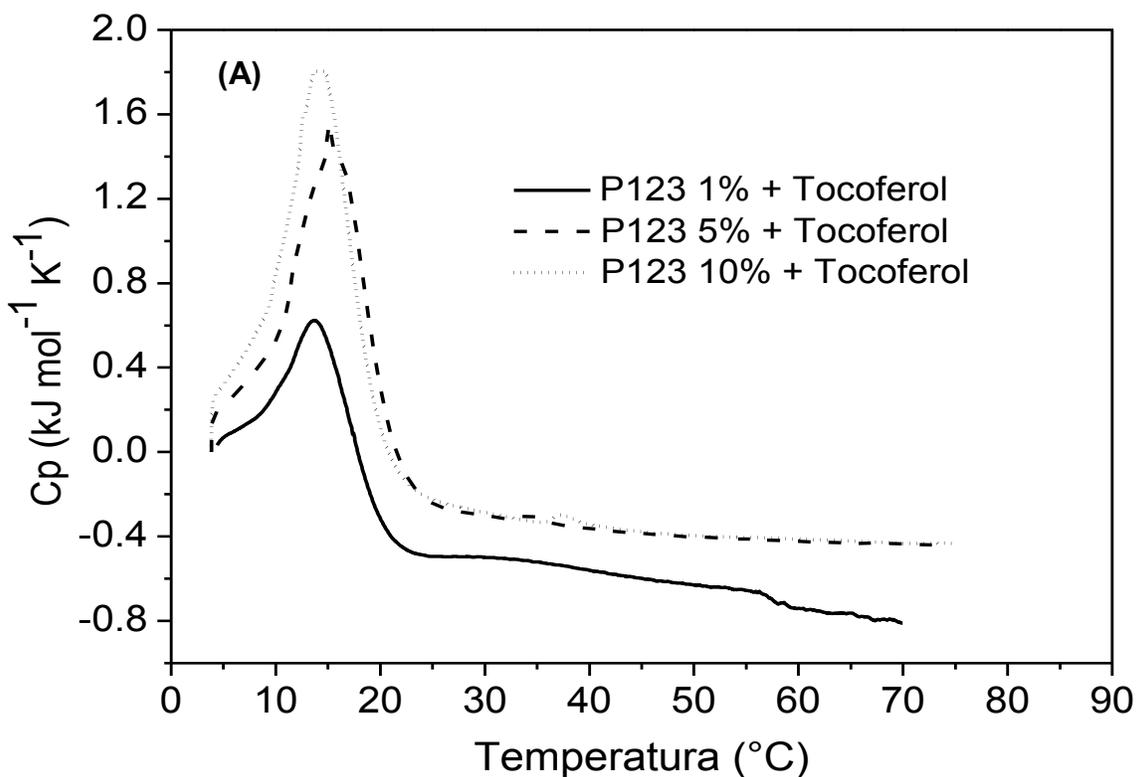


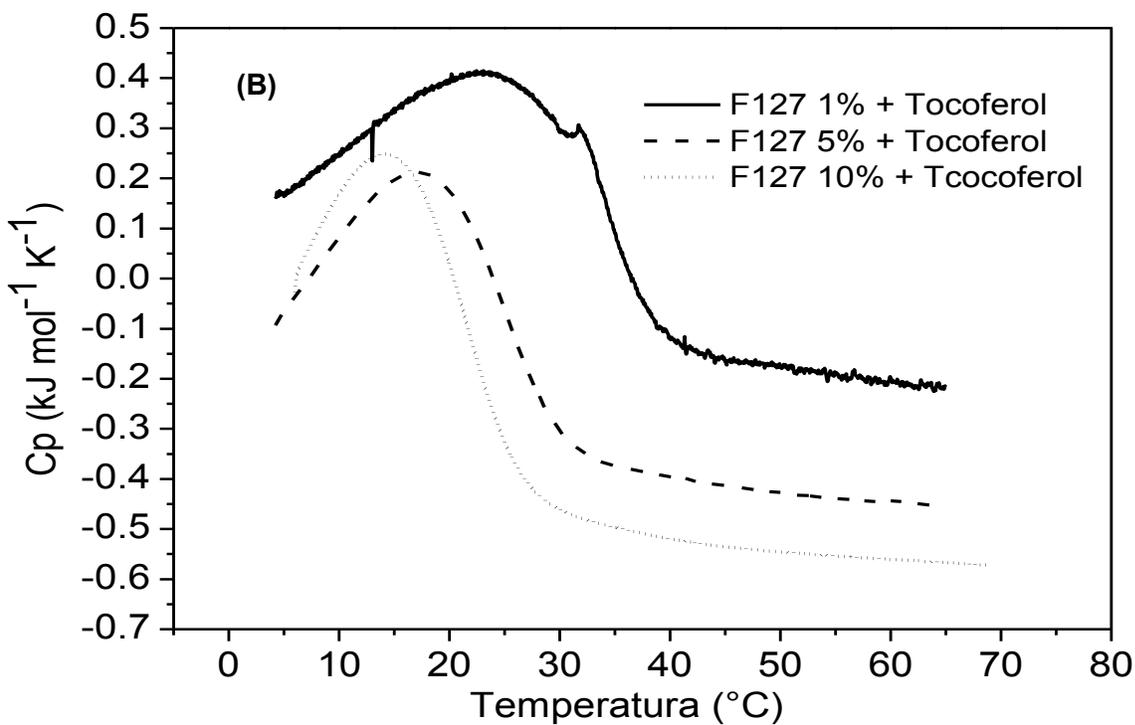
Figura 6.3.1 b. Calorimetría diferencial de barrido realizada a la muestra de Pluronic F127 al 5 % más Econazol en solución acuosa. Se presentan cuatro barridos realizados a la misma muestra.

Nota: Para consultar a detalle los termogramas obtenidos para cada muestra de Pluronic P123 y F127 puros en solución acuosa y con Econazol a las distintas concentraciones empleadas. Consultar Anexo B.

6.3.2 Pluronic P123 y F127 – α -tocoferol

La presencia de α -tocoferol modifica más a los agregados poliméricos de P123 y F127, (Figura 6.3.2a). La forma de los termogramas cambia totalmente respecto a lo observado en el caso de los Pluronic sin fármaco. Como se observa en la imagen el inicio del termograma no se da con una pre- transición, sino que se observan cuando ya el proceso de micelización ha comenzado, debido a que en presencia de α -tocoferol los agregados poliméricos comienzan su formación a menores temperaturas de las cuales el equipo nos permitió realizar (temperatura de inicio programada en el equipo 5 °C).





Figuras 6.3.2a. Calorimetría Diferencial de Barrido realizado a Pluronic P123 y F127 en presencia de α -tocoferol a diferentes concentraciones (se muestra en cada figura el primer barrido realizado para cada muestra). **(A)** P123 - α -tocoferol. **(B)** F127 - α -tocoferol.

Los parámetros termodinámicos obtenidos para este sistema (Tabla 6.3.3) muestran que la entalpía de micelización también disminuye en presencia de α -tocoferol, así como el valor de T_m . La $T_{1/2}$ aumenta en este caso hasta más de 10 $^{\circ}\text{C}$. Esta última observación se ha atribuido al hecho de que los copolímeros no son compuestos puros y también a la presencia de solutos que modifican la conformación de los agregados de manera que se produce una mayor dispersidad en la población de los mismos [72,73].

Tablas 6.3.3 Parámetros termodinámicos obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido. **(A)** Pluronic P123 al 1,5 y 10% más α -tocoferol en solución acuosa. **(B)** Pluronic F127 al 1, 5 y 10% más α -tocoferol en solución acuosa. Se muestran los parámetros de Entalpia de micelización (ΔH°), Temperatura media de transición (T_m) y Temperatura de cooperatividad ($T_{1/2}$).

(A)	ΔH° (kJ/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
P123 1% + α-tocoferol			
1° barrido	192.37	13.71	11.78
Promedio (barrido 2-4)*	221.99 \pm 0.73	13.39 \pm 0.03	11.63 \pm 0.38
P123 5% - α-tocoferol			
1° barrido	274.58	15.12	7.61
Promedio (barrido 2-4)*	280.04 \pm 0.95	15.40 \pm 0.20	8.45 \pm 0.19
P123 10% - α-tocoferol			
1° barrido	292.61	14.83	7.39
Promedio (barrido 2-4)*	306.77 \pm 1.86	14.48 \pm 0.36	7.38 \pm 0.05

(B)	ΔH° (kJ/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
F127 1% + α-tocoferol			
1° barrido	219.33	23.70	27.10
Promedio (barrido 2-4)*	213.82 \pm 2.08	22.60 \pm 0.25	24.71 \pm 0.09
F127 5% + α-tocoferol			
1° barrido	152.85	17.40	17.87
Promedio (barrido 2-4)*	156.09 \pm 1.32	17.33 \pm 0.12	18.10 \pm 0.12
F127 10% + α-tocoferol			
1° barrido	106.41	13.68	17.28
Promedio (barrido 2-4)*	100.81 \pm 0.58	14.10 \pm 0.02	17.45 \pm 0.03

* Promedio \pm Desviación estándar obtenidos a partir del 2° al 4° barrido de la misma muestra, ya que son similares entre si.

6.4 Determinación del tamaño de partícula de las micelas

Se obtuvieron los tamaños de partícula para los agregados poliméricos en solución tanto puros como con Econazol y α -tocoferol a distintas temperaturas. Esto con el objetivo de demostrar que el tamaño y formación de las micelas poliméricas dependen de la temperatura, como se observó en los datos obtenidos por calorimetría.

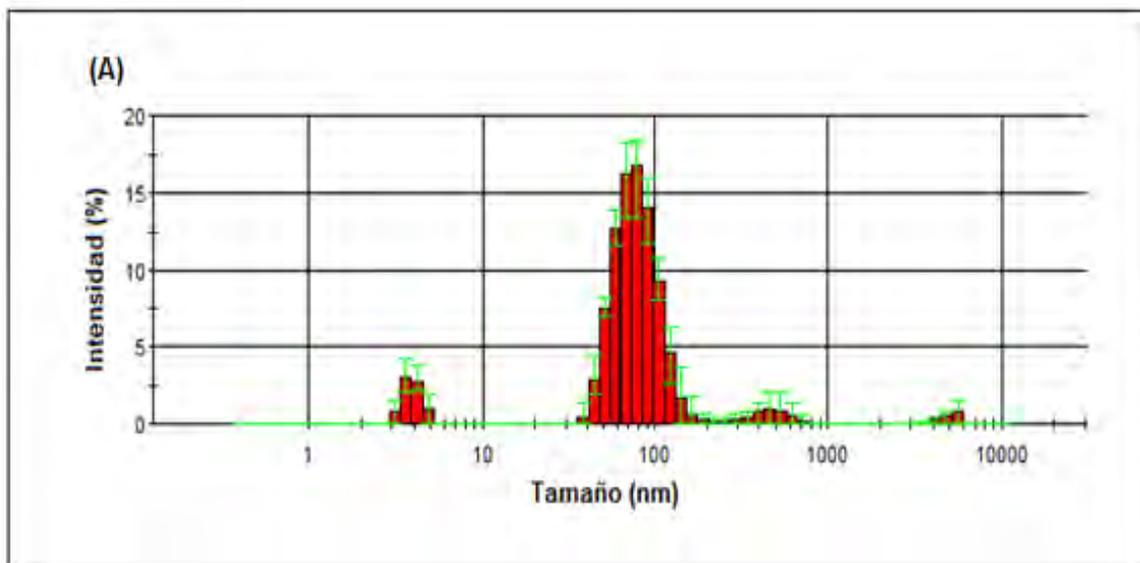
En los resultados ya reportados en la literatura de los polímeros sin presencia de fármaco, los agregados no tienen un tamaño único ya que están reportados tamaños que van de 20 – 100 nm de diámetro debido a su composición. La cual es variable de acuerdo a la fabricación de cada polímero, la temperatura, las condiciones de solución, la presencia de alguno otro compuesto o soluto. Todos estos factores afectan el tamaño de los agregados [4,7,14].

En la tabla 6.4.1 se muestran los diámetros hidrodinámicos obtenidos para cada sistema a la temperatura de 10 °C (la concentración de Pluronic empleada en todos los casos fue al 1%, debido a que a mayores concentraciones se satura el detector del equipo. A esta temperatura se observa que los agregados poliméricos se encuentran en tamaños muy variables que van desde de los 7.09 nm (F127 1%) hasta los 319.20 nm (F127 1% + Econazol) debido a que los grupos hidrófobos (PPO) interactúan más favorablemente con el medio acuosa, lo cual hace que no se encuentren en forma de micelas, sino desarticulados.

Tabla 6.4.1 Diámetros hidrodinámicos obtenidos para cada sistema en solución acuosa mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) a la temperatura de 10°C.

Diámetro hidrodinámico (nm)		
10 °C		
Sistema	Poblaciones	% Intensidad
P123 1%	71.74 ± 22.10	57.8
	387 ± 129.77	31.7
P123 1 % + Econazol	37.02 ± 13.42	58.1
	166.17 ± 53.77	41.9
P123 1 % + α-tocoferol	284.23 ± 197.03	93.47
	77.90 ± 18.49	6.53
F127 1 %	7.09 ± 2.18	53.97
	175.33 ± 161.71	35.5
F127 1 % + Econazol	319.20 ± 110.01	100
F127 1 % + α-tocoferol	125.49 ± 73.28	70.53
	25.22 ± 9.33	29.47

En la Figura 6.4a se observan las poblaciones existentes para cada sistema a esta temperatura (ejemplificadas con P123). En los resultados hay más de una población, es decir la muestra es polidispersa.



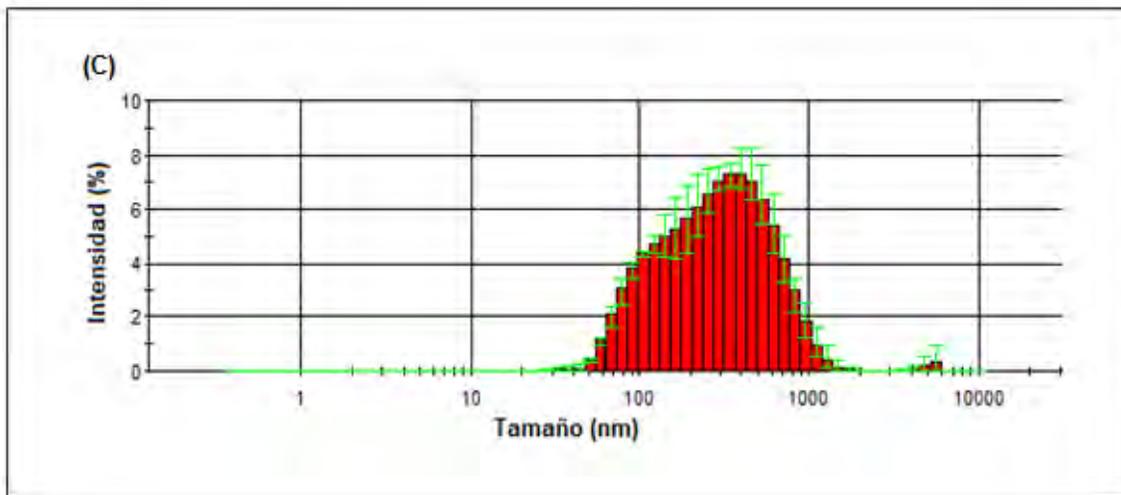
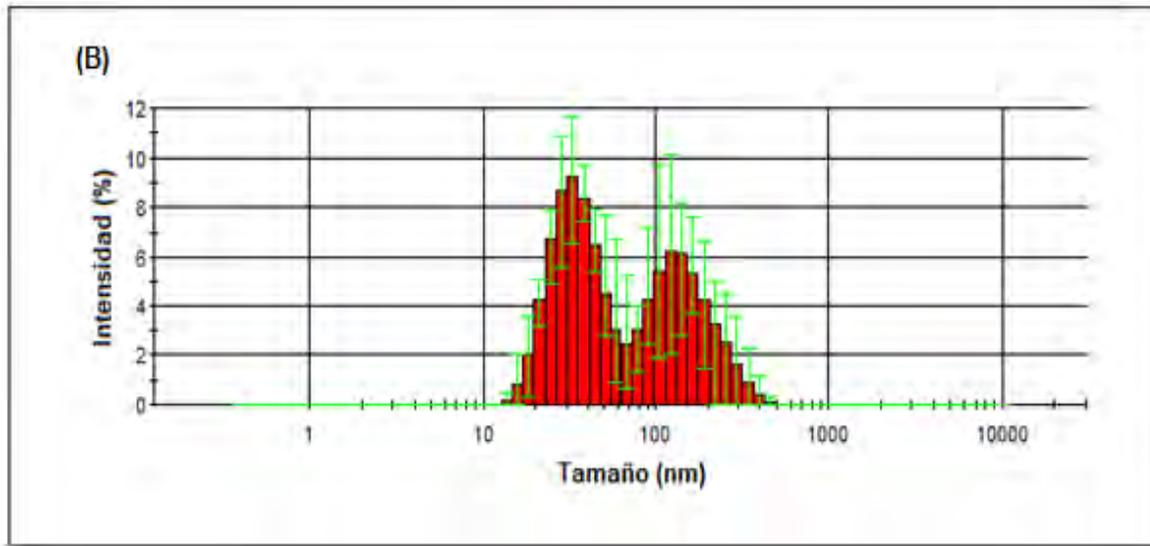
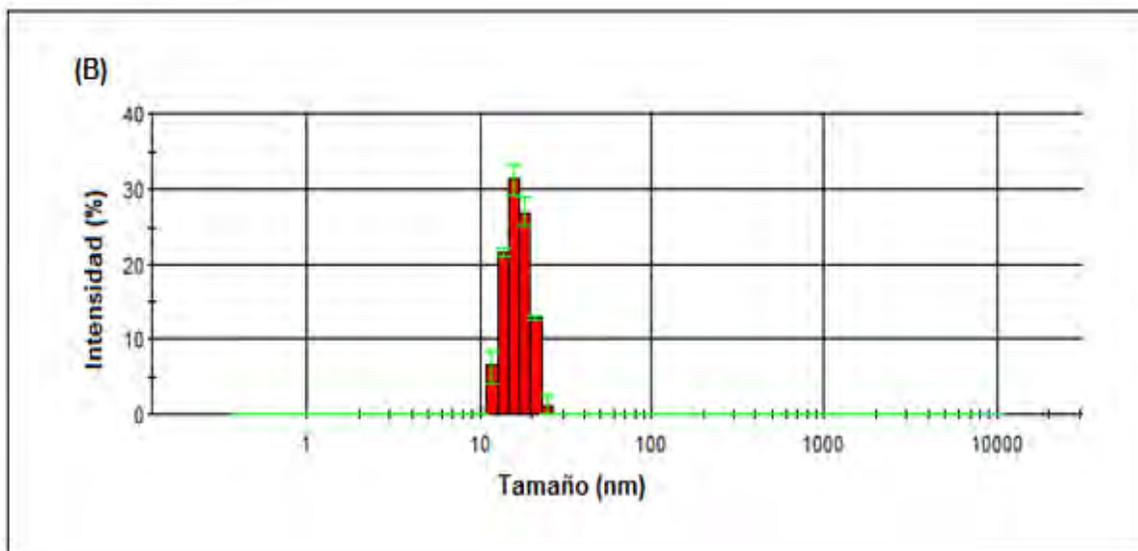
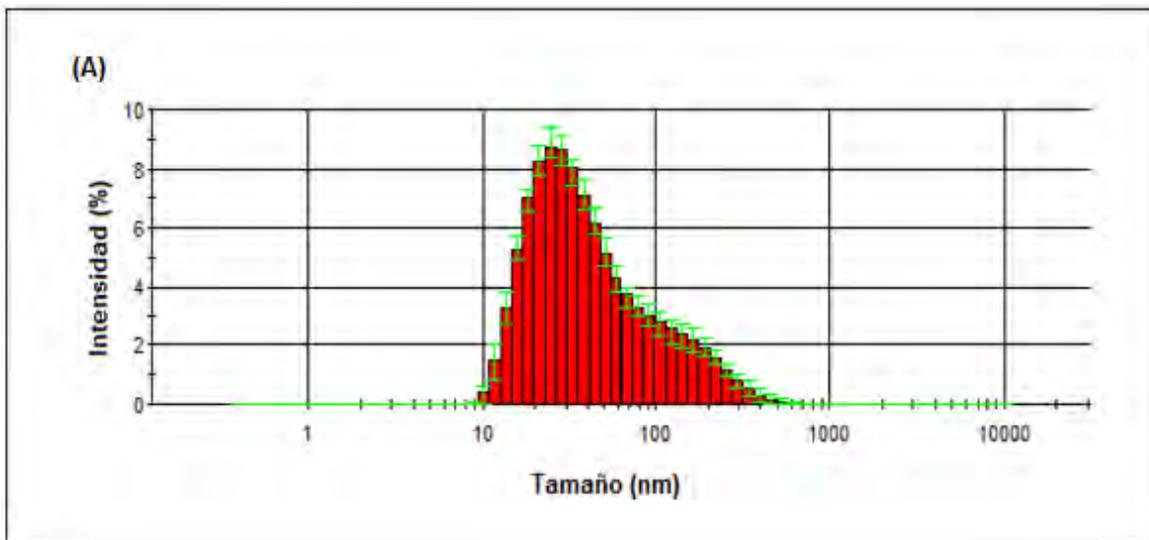


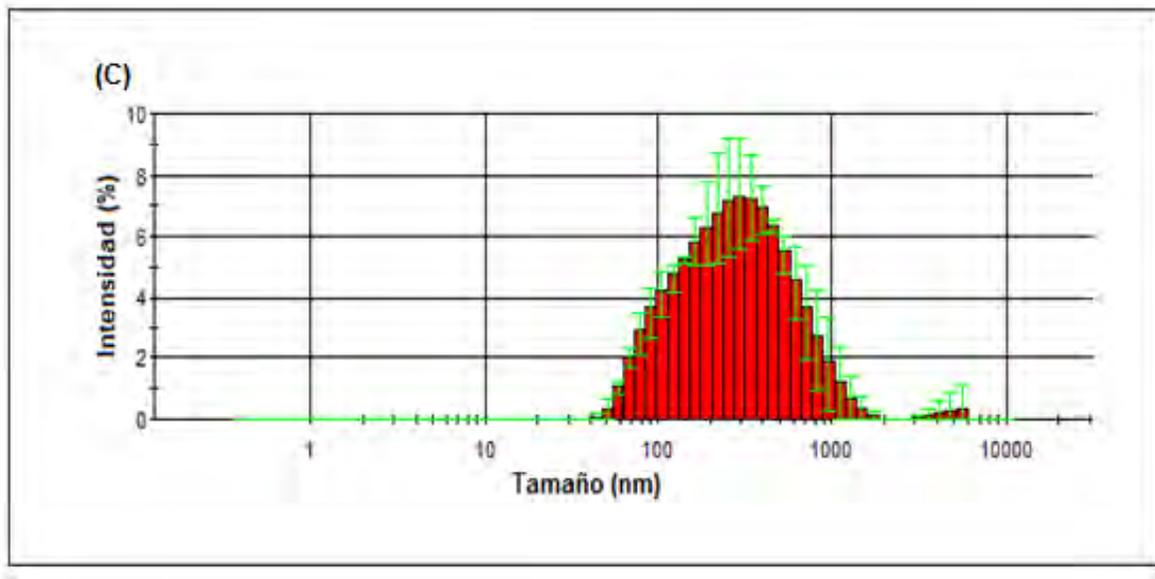
Figura 6.4a. Gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) a 10°C, mostrados en una gráfica de frecuencias. **(A)** P123 al 1% puro en solución acuosa. **(B)** P123 1% + Econazol. **(C)** P123 1% + α -tocoferol. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 mediciones realizadas. Nota: para consultar los gráficos de los demás sistemas a esta temperatura consultar Anexo B.

Se realizaron las mismas mediciones para cada sistema pero ahora a temperatura de 25 °C, se observa notoriamente que la distribución de tamaño de partícula cambia y se vuelven más uniforme. Por ejemplo se observa que en pluronic P123 al 1% presenta aun varias poblaciones, pero ya observan tamaños más cercanos a los reportados en la literatura (19.77 nm con un porcentaje de intensidad del 67.87%, Tabla 6.4.2). En presencia de Econazol es más notorio el cambio ya que se vuelve a observar sólo una población con un diámetro de 16.41 ± 2.76 nm y un porcentaje de intensidad de 100%, con lo cual podemos decir que tanto la temperatura como el fármaco ayudan a homogenizar el tamaño de los agregados. Sin embargo, esto no ocurre para el sistema en presencia de α -tocoferol ya que el tamaño para el caso de P123 se va hasta 307.85 nm y con F127 es menor con 51.19 nm. La presencia de α -tocoferol modifica más a los agregados por ser una molécula de mayor tamaño que se entrelaza de manera particular en los agregados haciendo que su tamaño cambie considerablemente.

Tabla 6.4.2 Resultados de diámetro hidrodinámico obtenidos mediante Dispersión Dinámica de Luz de los diferentes sistemas a temperatura de 25°C. Los diámetros fueron obtenidos mediante promedio y desviación estándar de 3 mediciones realizadas.

Diámetro hidrodinámico (nm)		
25 °C		
Sistema	Población	% Intensidad
P123 1 %	19.77 ± 4.91	67.87
	67.87± 20.18	32.13
P123 1 % + Econazol	16.41 ± 2.76	100
P123 1 % + α -tocoferol	307.85± 250.90	100
F127 1 %	33.97± 18.62	91.3
	5.44 ± 1.31	4.43
F127 1 % + Econazol	30.14 ± 12.58	100
F127 1 % + α -tocoferol	51.19 ± 26.79	97



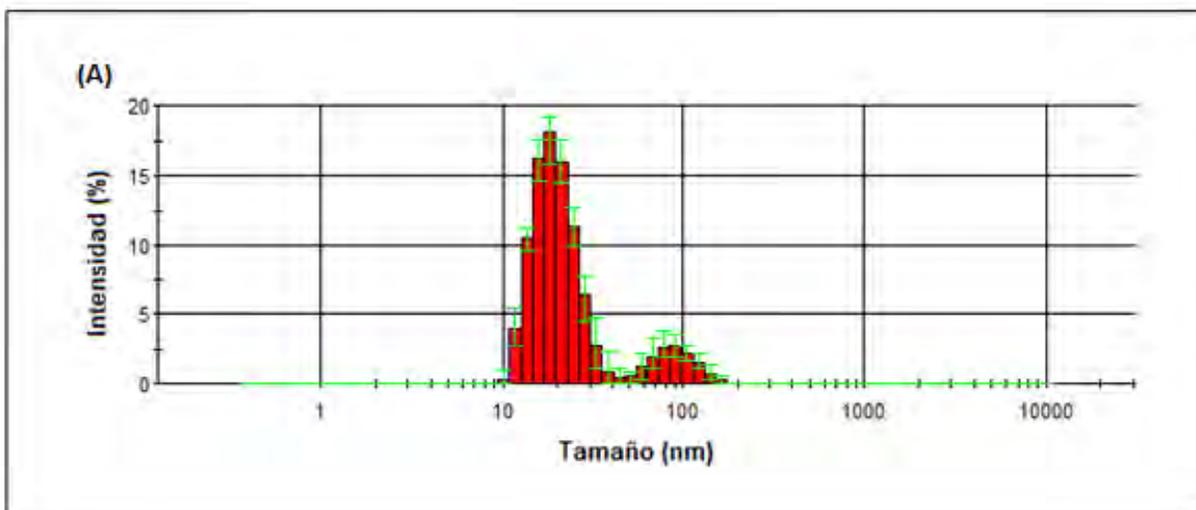


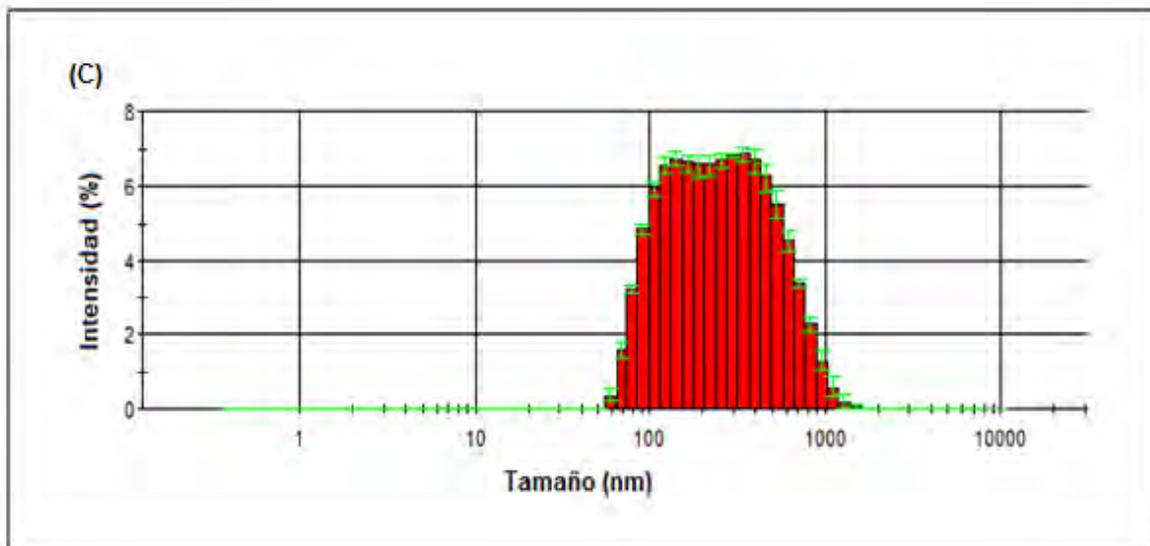
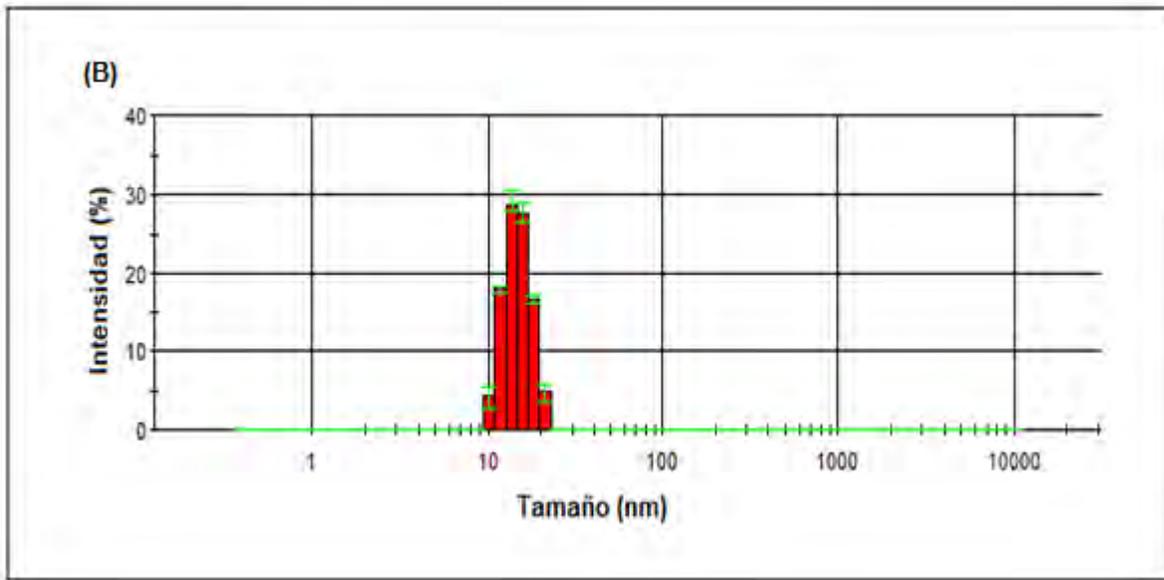
Figuras 6.4b. Gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) a 25°C, mostrados en una gráfica de frecuencias. **(A)** P123 al 1% puro en solución acuosa. **(B)** P123 1% + Econazol. **(C)** P123 1% + α -tocoferol. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 mediciones realizadas. Nota: para consultar los gráficos de los demás sistemas a esta temperatura consultar Anexo B.

Finalmente, se determinó el tamaño de los agregados a la temperatura de 40 °C, que de acuerdo a los termogramas obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido el mayor porcentaje de monómeros ha pasado a formar agregados. En los resultados de la Tabla 6.4.3 se observa que los tamaños son más homogéneos, incluso en algunos casos se observa ya sólo una población como en los sistemas P123 1% + Econazol, F127 1 %, F127 1 % + Econazol y F127 1 % + α -tocoferol, los tamaños obtenidos para estos sistemas van desde los 19 nm hasta los 27 nm, siendo tamaños que entran dentro de los rangos reportados en la literatura [7,14]. Pluronic P123 + α -tocoferol es un caso particular ya que el tamaño encontrado fue de más de 100 nm lo cual indica que el α -tocoferol hace un particular reacomodo de este sistema.

Tabla 6.4.3 Resultados de diámetro hidrodinámico obtenidos mediante Dispersión Dinámica de Luz de los diferentes sistemas a la temperatura de 40 °C. Los diámetros fueron obtenidos mediante promedio y desviación estándar de varias mediciones.

Diámetro hidrodinámico (nm)		
40 °C		
Sistema	Población	% Intensidad
P123 1 %	19.73 ± 5.55	86.6
	91.52 ± 23.68	13.4
P123 1 % - Econazol	19.03 ± 4.02	100
P123 1 % - α-tocoferol	328.7 ± 201.87	71.4
	136 ± 41.59	28.6
F127 1 %	25.98 ± 6.64	100
F127 1 % - Econazol	27.14 ± 7.09	100
F127 1 % - α-tocoferol	37.57 ± 13.93	100





Figuras 6.4c Gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) a 40 °C, mostrados en una gráfica de frecuencias. **(A)** P123 1% puro en solución acuosa. **(B)** P123 1% + Econazol. **(C)** P123 1% + α -tocoferol. Las barras de error en color verde representan la desviación estándar de 3 mediciones realizadas. Nota: para consultar los gráficos de los demás sistemas a esta temperatura consultar Anexo B.

6.5 Estudios de liberación *In vitro* de Econazol y α -tocoferol

Se realizaron estudios exploratorios de liberación *in vitro* de Econazol y α -tocoferol desde los agregados poliméricos, empleando la técnica de celdas de Franz a una temperatura de 37 °C. Se aplicaron diferentes modelos farmacocinéticos para identificar cual se acopla y reproduce mejor los datos experimentales obtenidos. Los modelos empleados fueron el de Orden Cero, Primer Orden, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, y Peppas–Fassihi. A partir de estos modelos se puede identificar el mecanismo de liberación de cada fármaco.

Para Econazol encapsulado en los agregados de P123 y F127 se muestra el perfil de liberación de % de Econazol liberado vs Tiempo (Figura 6.5a). Se observa que los porcentajes obtenidos son muy bajos alrededor del 3.0% de fármaco, en un tiempo aproximado de 33 horas, lo cual nos indica que la liberación se da muy lentamente para este sistema y la técnica empleada. Cabe mencionar que estos experimentos realizados son preliminares y sólo estamos demostrando que existe una liberación del fármaco desde los agregados poliméricos a pesar de que el sistema no es una formulación y por lo tanto, no está estandarizada.

En la Figura 6.5a se observa que la liberación de Econazol es mayor desde los agregados poliméricos de F127, el cual podría ser usado posteriormente como un vehículo para administrar este fármaco donde se pueda liberar en mayor porcentaje.

En la Tabla 6.5.1 se presentan los parámetros obtenidos para cada modelo. Para este sistema el modelo que mejor se acopla a los resultados es Peppas–Fassihi. Esto se demuestra por el valor de coeficiente de correlación (P123 + Econazol, $R^2 = 0.939$; F127-Econazol, $R^2 = 0.9754$) por lo tanto, el mecanismo de liberación se debe a que los agregados sufren un efecto estallido (burst), es decir, que la liberación se da inicialmente rápida y conforme pase el tiempo esta disminuye y se vuelve constante.

El parámetro de estallido es representado por el parámetro b en donde sí se carece de dicho efecto b es cero. El valor de n representa el tipo de difusión para este caso el valor es menor a 1.0 indicando un tipo de difusión anómala.

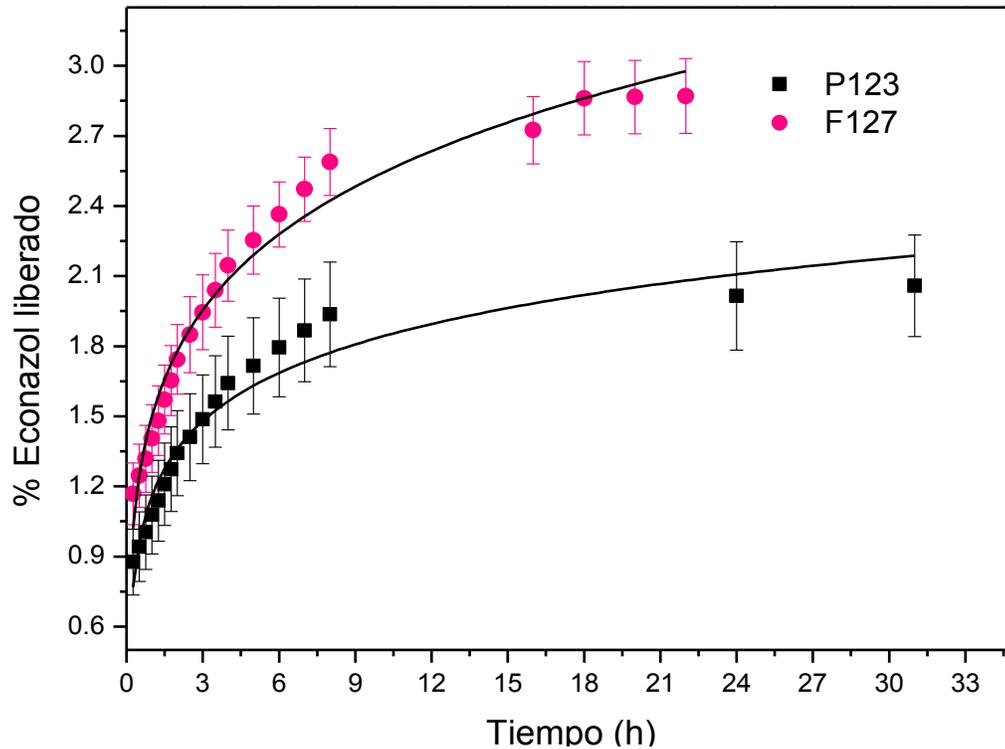


Figura 6.5a. Perfil de liberación de Econazol desde los agregados poliméricos de P123 y F127 a 37 °C empleando la técnica de las celdas de Franz. El promedio y desviación estándar son obtenidos a partir de una $n = 3$. Las líneas en negro muestran el acoplamiento de los datos al modelo de Peppas – Fassihi.

Tablas 6.5.1. Modelos y parámetros farmacocinéticos obtenidos para los sistemas Econazol en P123 y F127 a 37°C

P123 10 % + Econazol (37°C)				
Orden cero	k₀	R²		
	5.6 x 10 ⁻⁴	0.523		
Primer Orden	k₁	R²		
	-0.00301	0.933		
Modelo de Higuchi	k_H	R²		
	0.03206	0.766		
Modelo de Korsmeyer- Peppas	k_P	n	R²	
	0.5459	0.1883	0.905	
Modelo de Peppas-Fassihi	k	n	b	R²
	514.18	5.759	-514.23	0.939
F127 10 % + Econazol (37°C)				
Orden cero	k₀	R²		
	0.0122	0.773		
Primer Orden	k₁	R²		
	-0.00458	0.967		
Modelo de Higuchi	k_H	R²		
	0.0550	0.920		
Modelo de Korsmeyer – Peppas	k_P	n	R²	
	0.6034	0.223	0.972	
Modelo de Peppas - Fassihi	k	n	b	R²
	1.794	0.1279	-1.533	0.975

El porcentaje de liberación de α -tocoferol encapsulado en los mismos copolímeros es mucho menor en comparación con Econazol (Figura 6.5a), los porcentajes máximos van hasta 0.29 % lo cual es casi nulo, debido a una posible liberación muy lenta o también que α -tocoferol se arraiga fuertemente en los agregados poliméricos que impide su liberación. En un estudio realizado α -tocoferol encapsulado en Tetronic 1107 también realizaron experimentos de liberación, demuestran que ese fármaco se libera en muy poco porcentaje posiblemente debido a su gran hidrofobicidad que lo hace ser más afín al núcleo hidrófobo de la micela [58].

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos (Tabla 6.5.2) demuestran que el modelo que se acopla mejor a los resultados en ambos sistemas es el de Korsmeyer-Peppas (P123 + tocoferol $R^2 = 0.969$; F127 + tocoferol $R^2 = 0.908$). El valor de n es menor a uno en ambos casos, lo cual indica un tipo de difusión anómala o no fickiana.

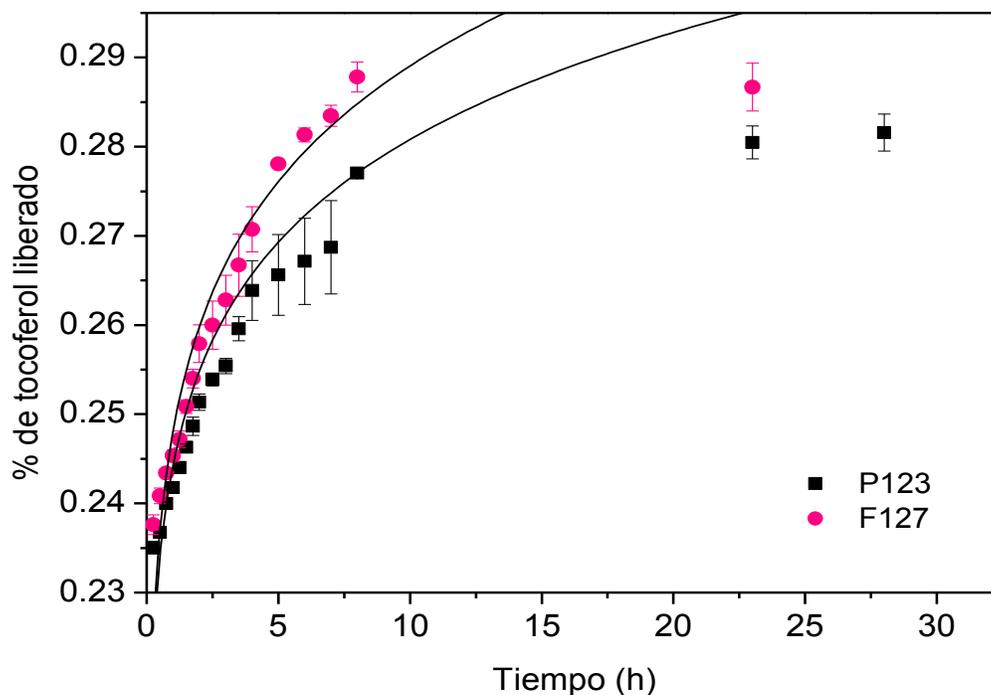


Figura 6.5b Perfil de liberación de α - tocoferol desde los agregados poliméricos de P123 y F127 a 37°C empleando la técnica de las celdas de Franz. El promedio y desviación estándar son obtenidos a partir de una $n = 3$. Las líneas en negro representan el acoplamiento de los datos al modelo de Korsmeyer–Peppas.

Tablas 6.5.2. Modelos empleados y parámetros farmacocinéticos obtenidos para los sistemas de α -tocoferol en P123 y F127 a 37°C

P123 10 % + α-tocoferol (37 °C)				
Orden cero	k₀	R²		
	4.03 × 10 ⁻⁵	0.896		
Primer Orden	k₁	R²		
	-5.05 × 10 ⁻⁵	0.955		
Modelo de Higuchi	k_H	R²		
	6.42 × 10 ⁻⁴	0.856		
Modelo de Korsmeyer – Peppas	k_P	n	R²	
	0.0936	0.0751	0.969	
Modelo de Peppas - Fassihi	k	n	b	R²
	0.0495	0.0751	0.0485	0.955

F127 10 % + α-tocoferol (37°C)				
Orden cero	k₀	R²		
	1.811 × 10 ⁻⁵	0.515		
Primer Orden	k₁	R²		
	-8.96 × 10 ⁻⁴	0.903		
Modelo de Higuchi	k_H	R²		
	9.87 × 10 ⁻⁴	0.745		
Modelo de Korsmeyer – Peppas	k_P	n	R²	
	0.0141	0.0492	0.908	
Modelo de Peppas - Fassihi	k	n	b	R²
	1.284	6.95 × 10 ⁻⁴	-1.271	0.906

7. Conclusiones

Se logró demostrar que los copolímeros tribloque P123 y F127 lograron aumentar la solubilidad acuosa los fármacos hidrófobos Econazol y α -tocoferol mediante curvas de solubilidad a temperatura de 25 °C.

Mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido se logró obtener los termogramas del proceso de micelización de estos copolímeros sin y con presencia de los fármacos. Demostrando como los fármacos si modifican el proceso de micelización. También se obtuvieron los parámetros de entalpia de micelización, temperatura media de transición y temperatura de cooperatividad para cada sistema a distintas concentraciones y con y sin presencia del fármaco.

Se obtuvieron los diámetros hidrodinámicos para cada sistema y así corroborar la presencia de los agregados en solución, los cuales concuerdan con lo ya reportado en la literatura.

Finalmente, se obtuvieron estudios preliminares de los perfiles de liberación del fármaco en cada sistema, demostrando que si hay un mínima liberación de los fármacos a pesar de que los sistemas no están aún bien estandarizados como una formulación.

ANEXO A
PROCESO DE MICELIZACIÓN SEGUIDO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO EN SOLUCIÓN ACUOSA PARA PLURONIC P123 Y F127 CON Y SIN FÁRMACO

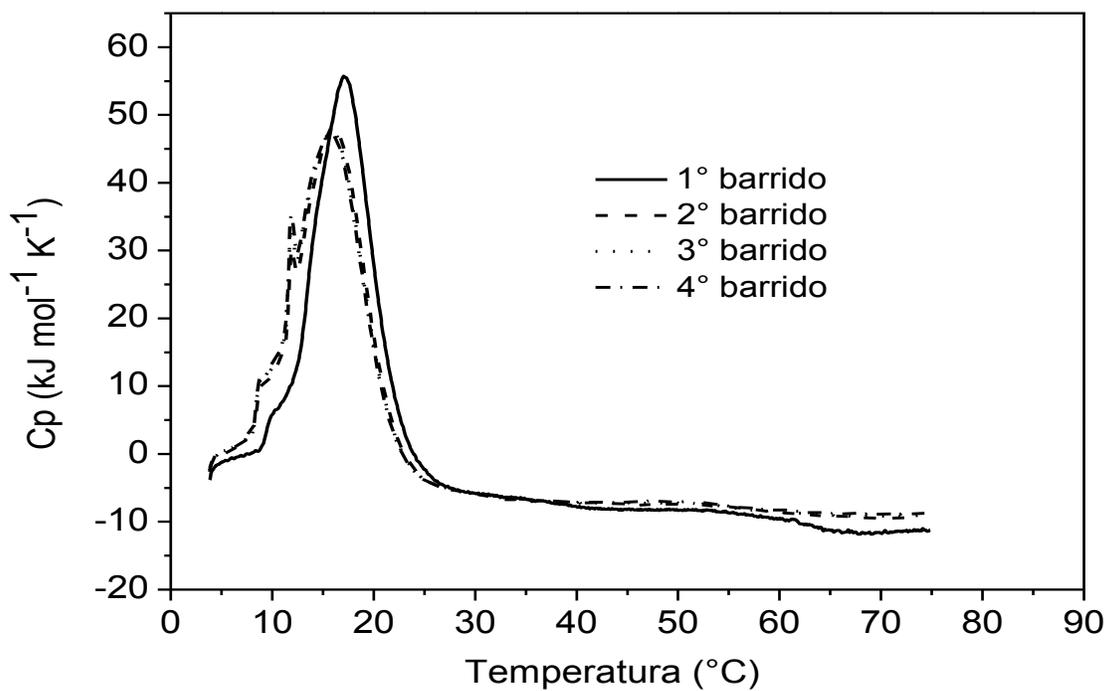


Figura A1.1 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic P123 al 1 % más Econazol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

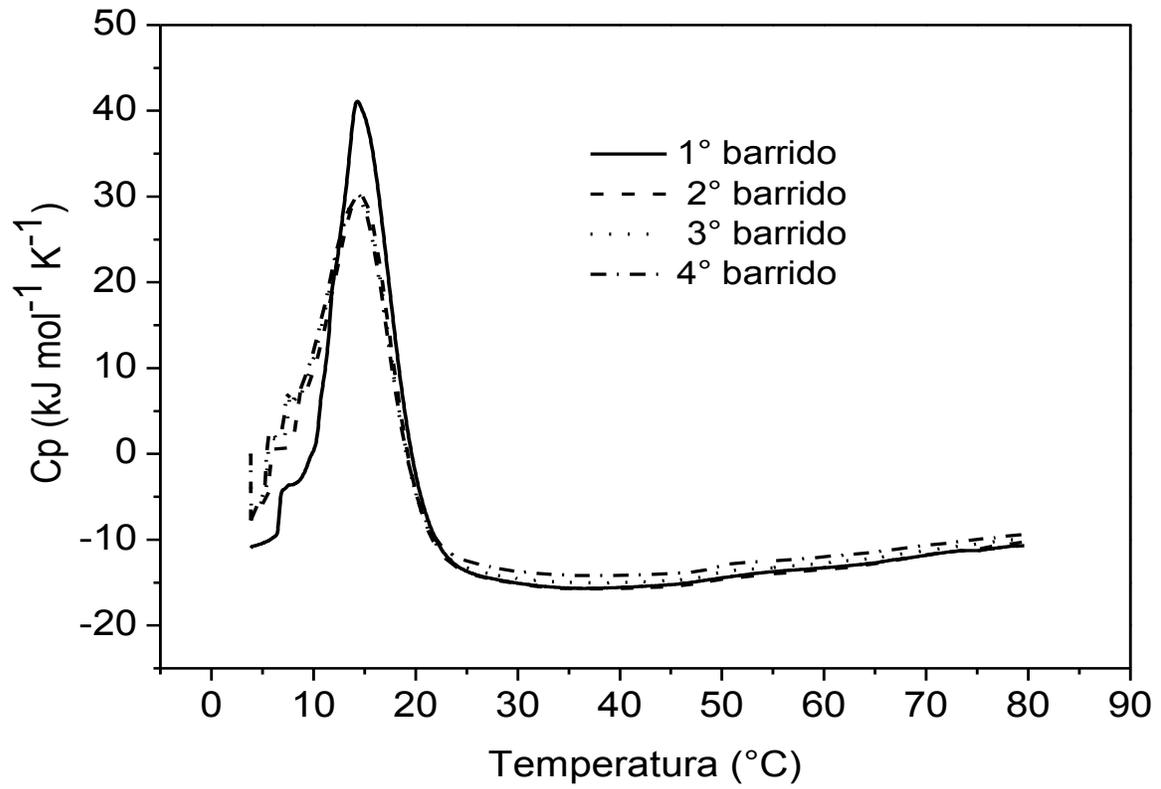


Figura A1.2 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic P123 al 5 % más Econazol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

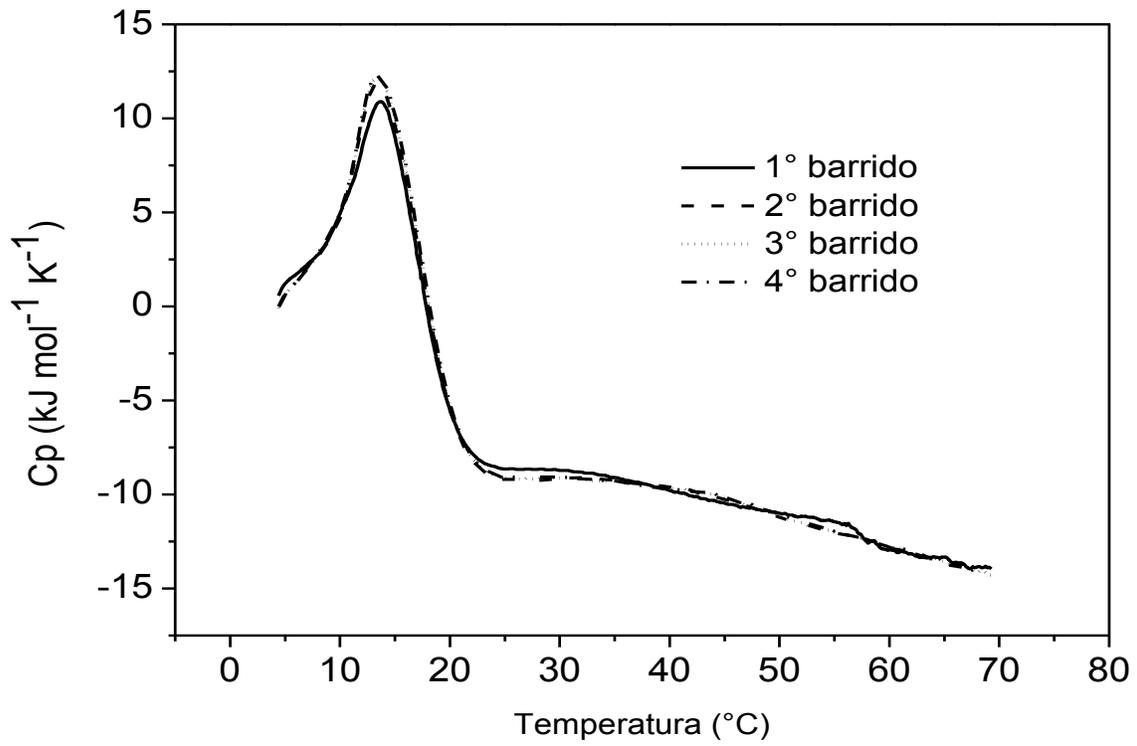


Figura A1.3 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic P123 al 1 % más α -tocoferol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

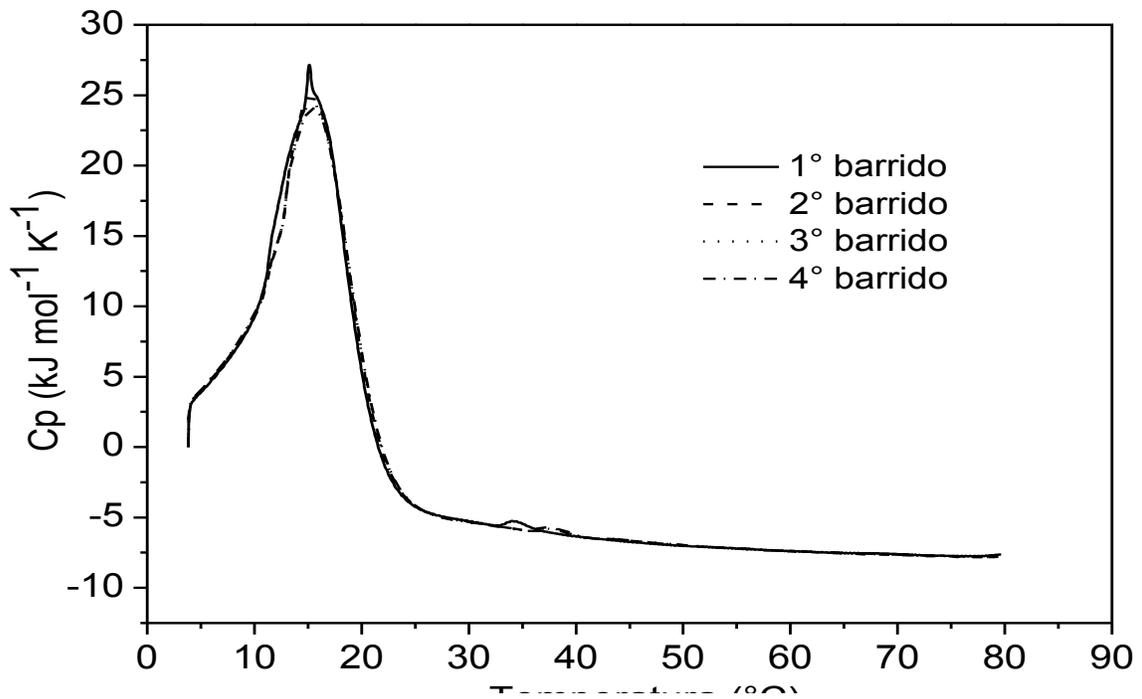


Figura A1.4 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic P123 al 5 % más α -tocoferol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

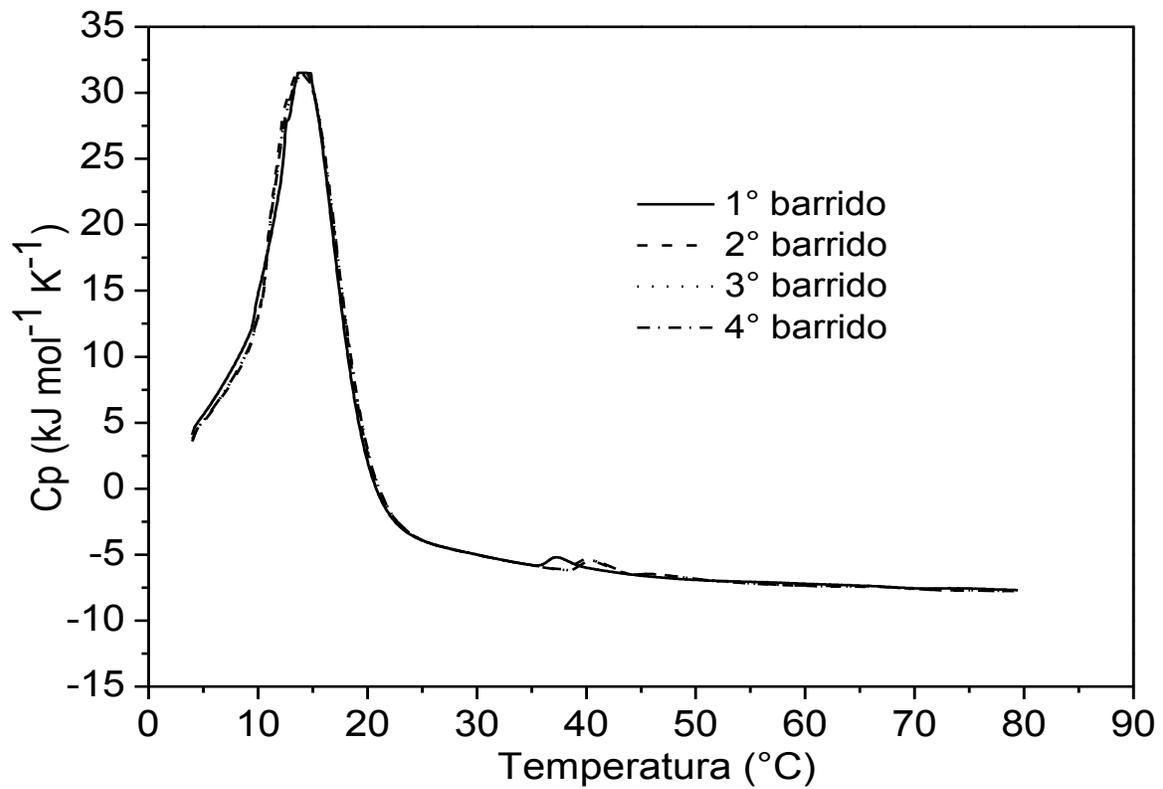


Figura A1.5 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic P123 al 10 % más α -tocoferol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

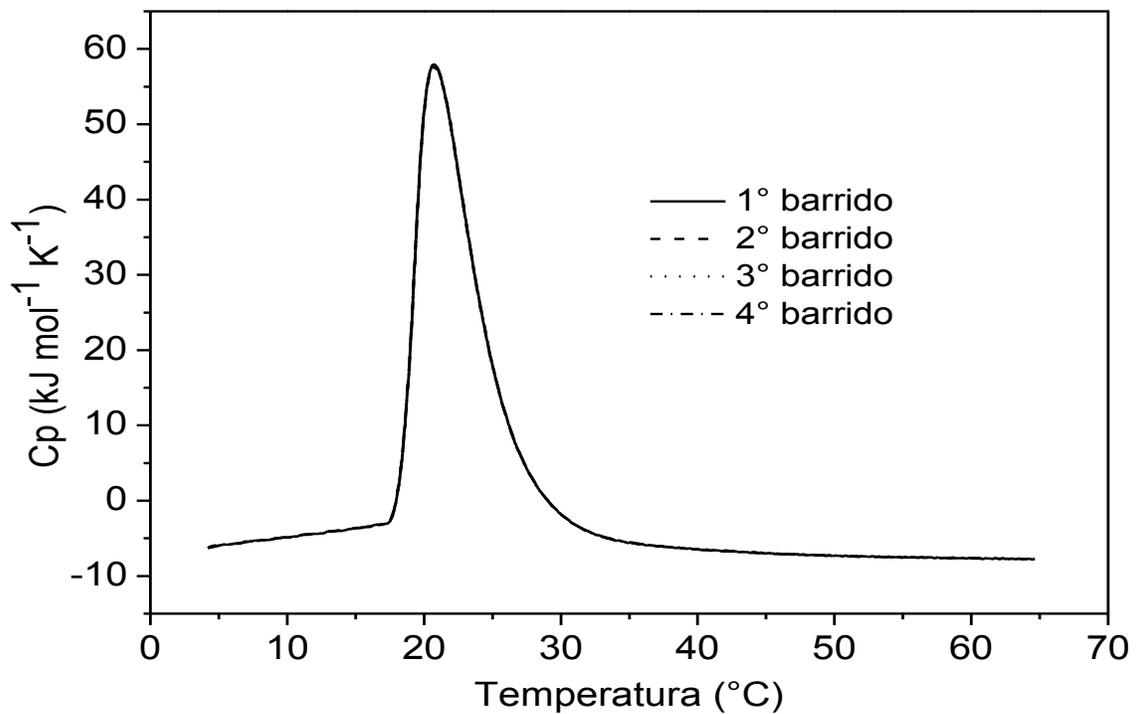


Figura A1.6 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 5 % en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

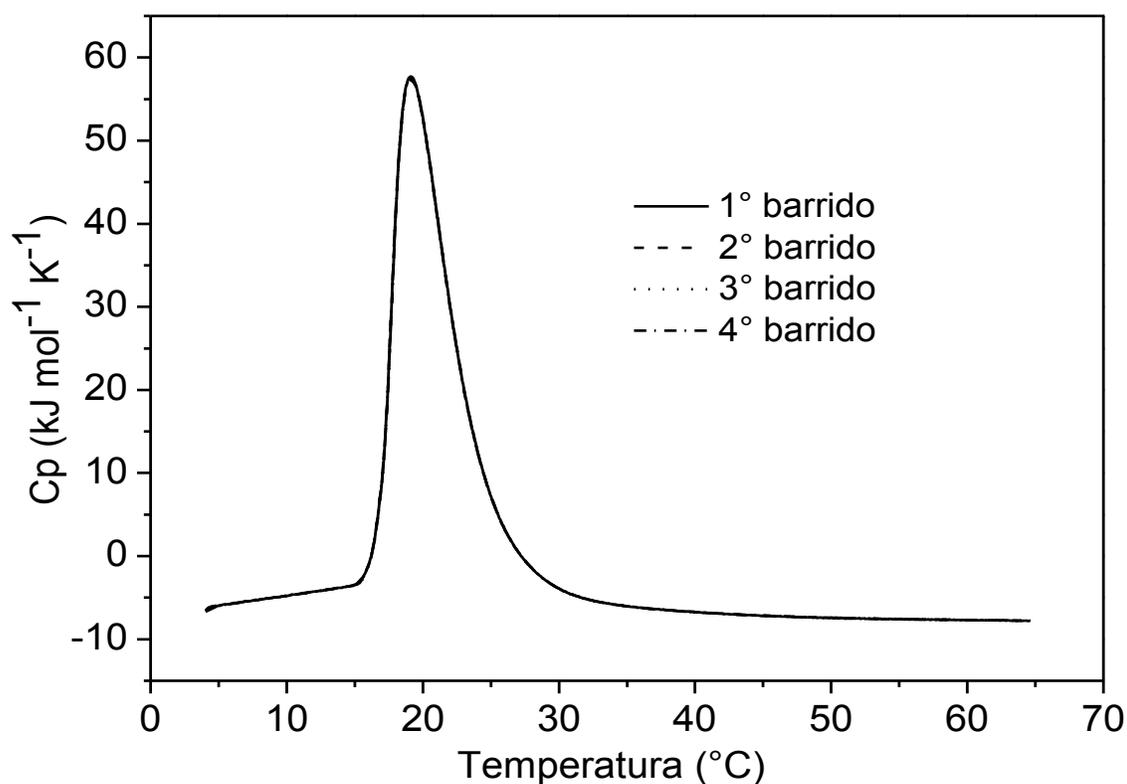


Figura A1.7 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 10 % en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

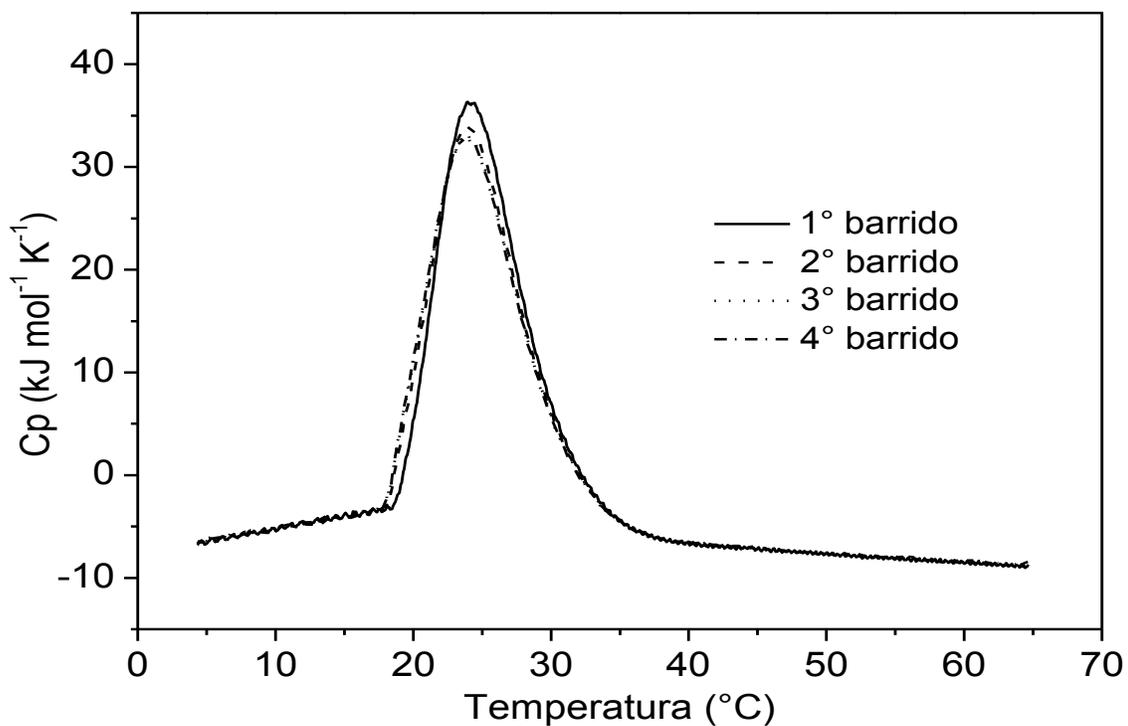


Figura A1.8 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 1 % más Econazol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

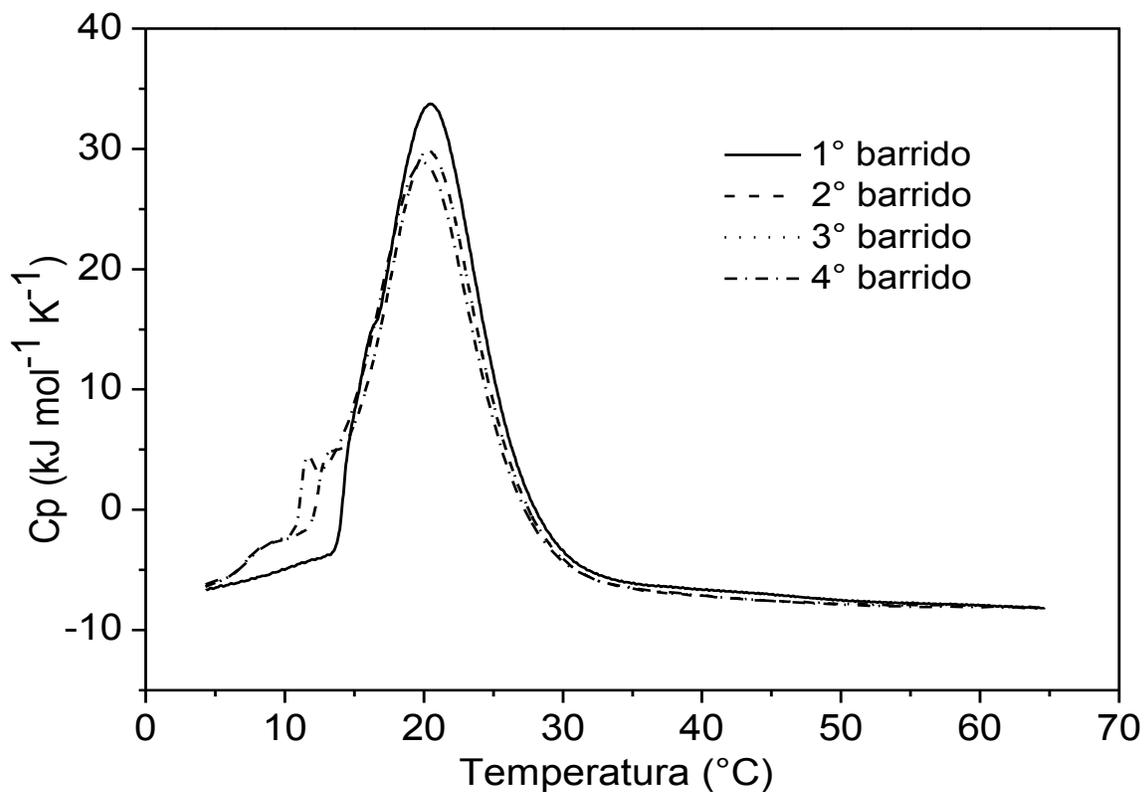


Figura A1.9 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 5 % más Econazol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

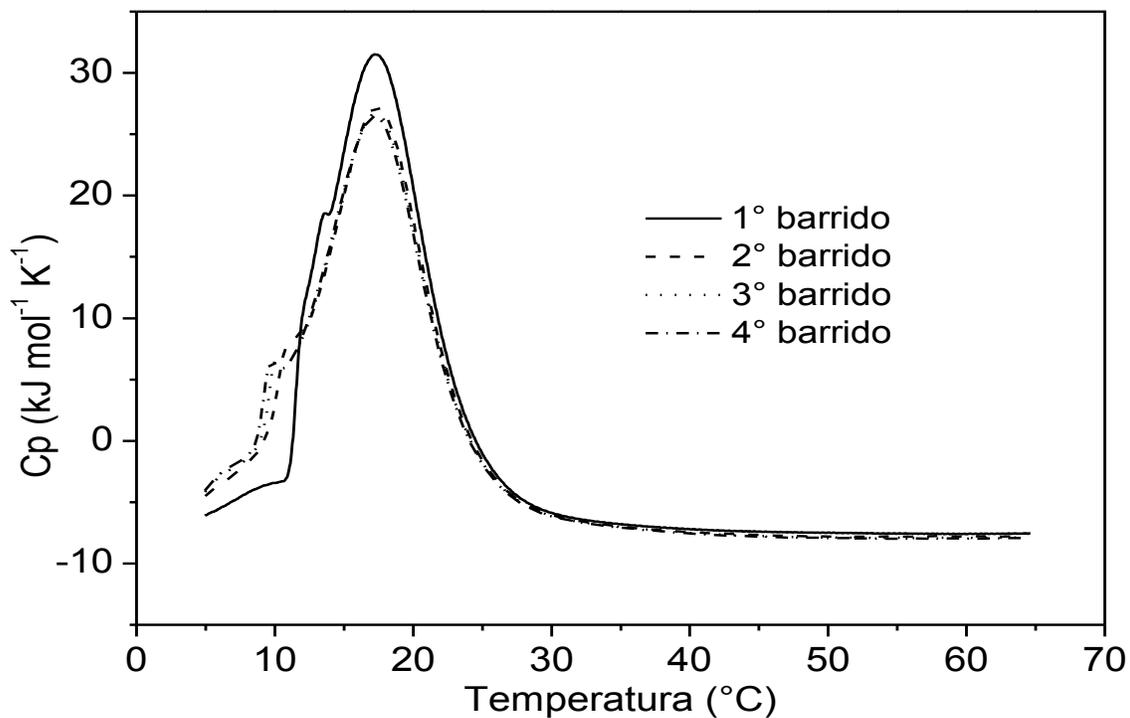


Figura A1.10 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 10 % más Econazol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

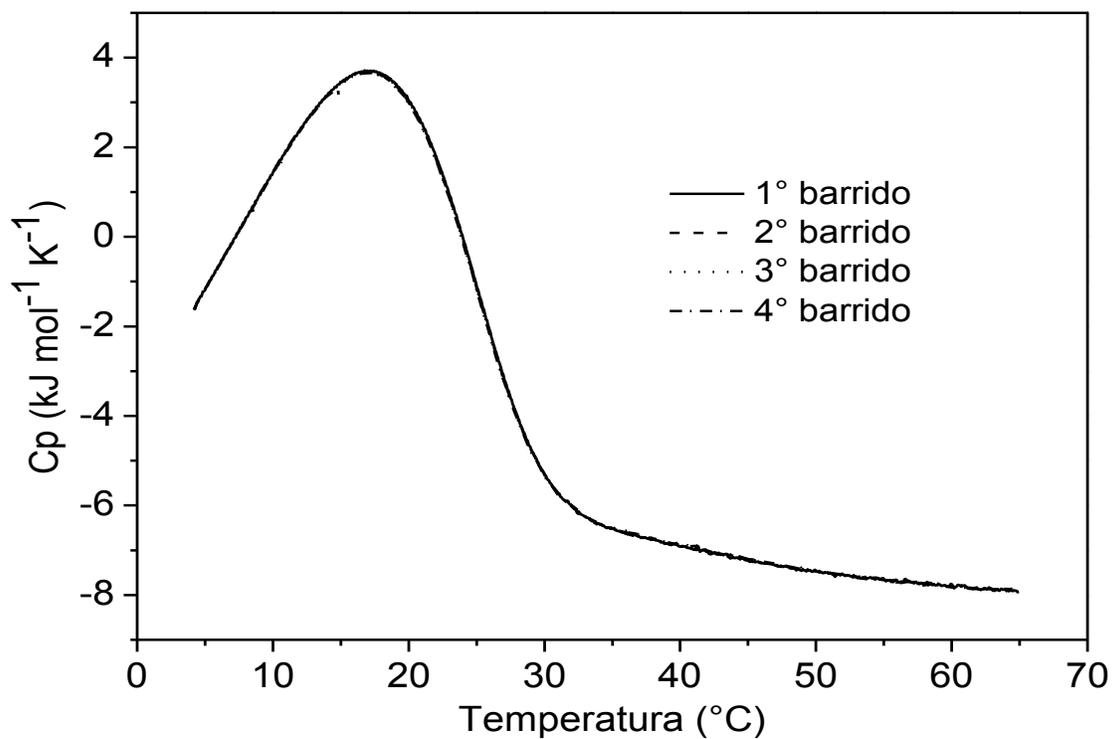


Figura A1.11 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 5 % más α -tocoferol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

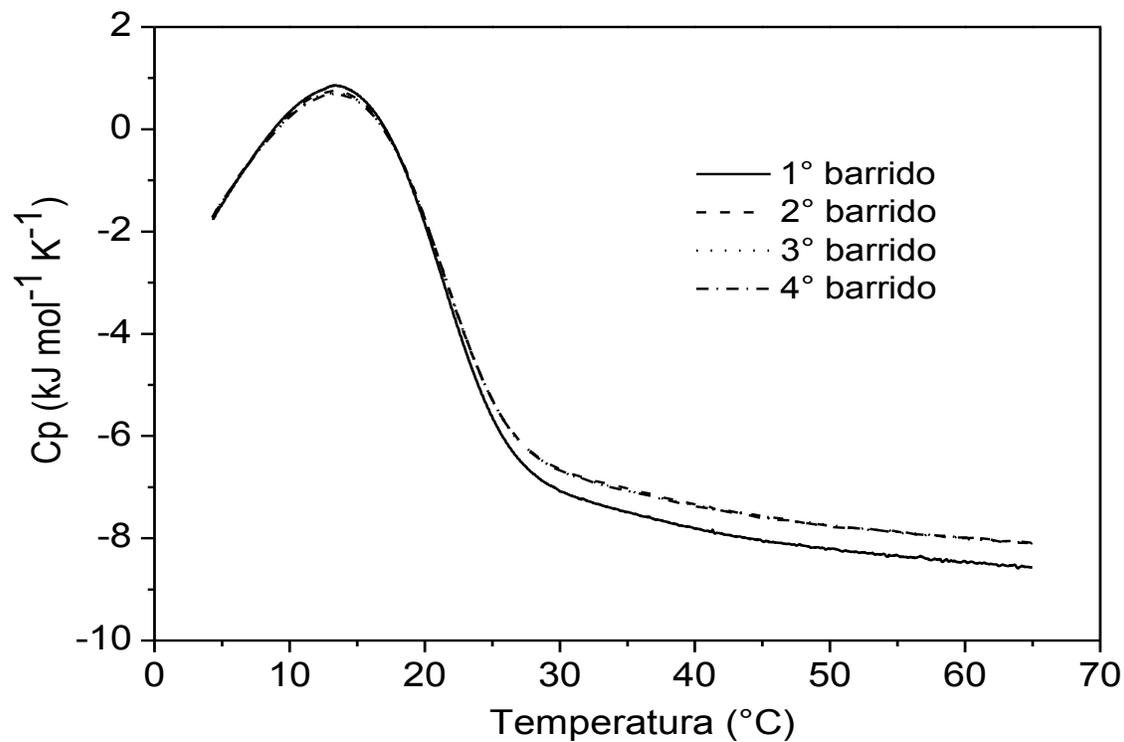
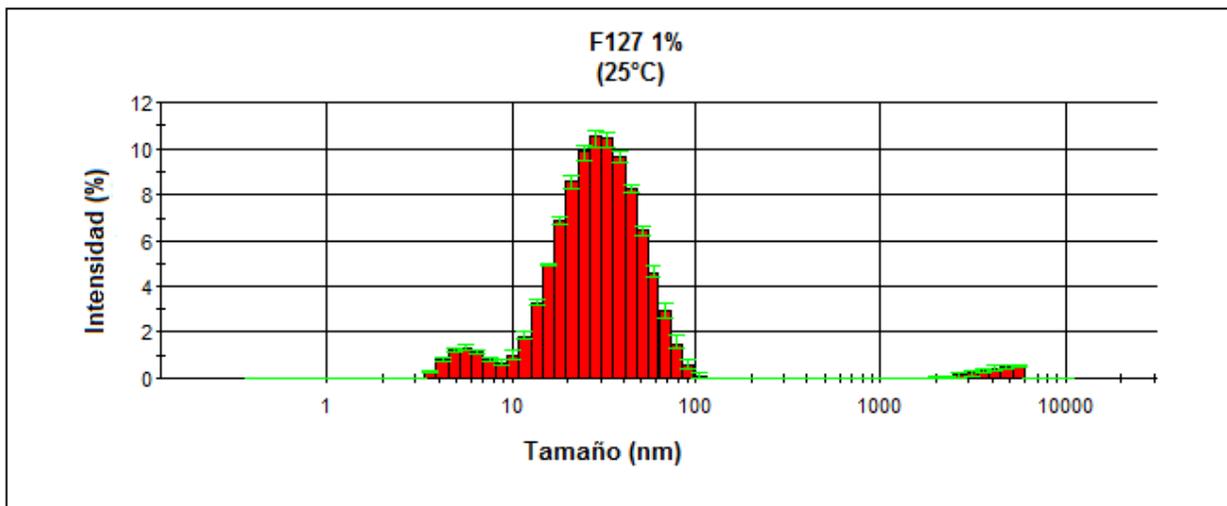
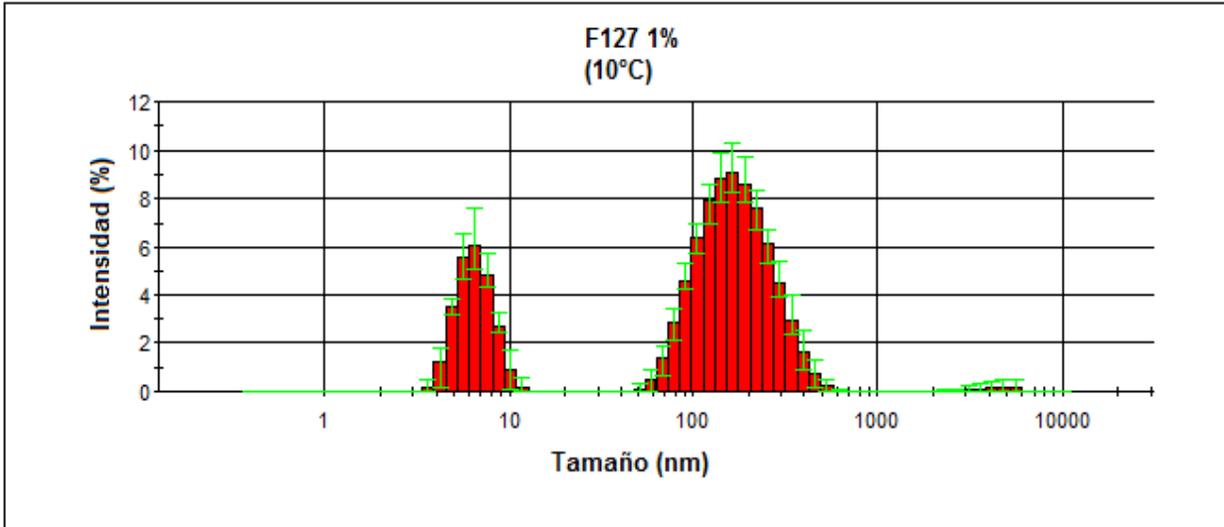
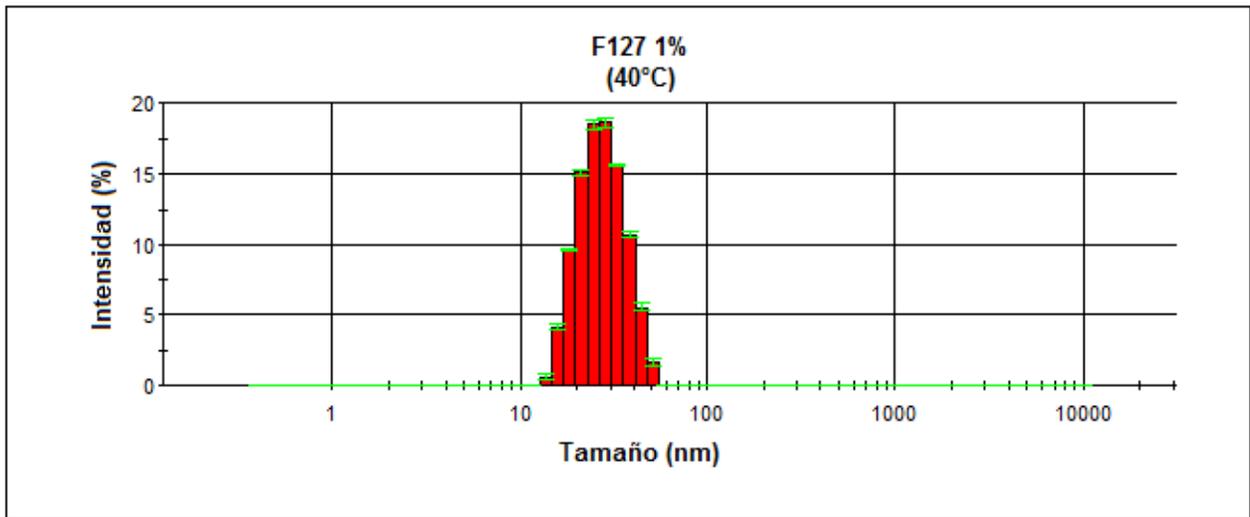


Figura A1.12 Calorimetría diferencial de barrido realizada a Pluronic F127 al 10 % más α -tocoferol en solución acuosa. Se muestran los cuatro barridos realizados a la misma muestra.

ANEXO B
Dispersión dinámica de luz (Tamaño de partícula)

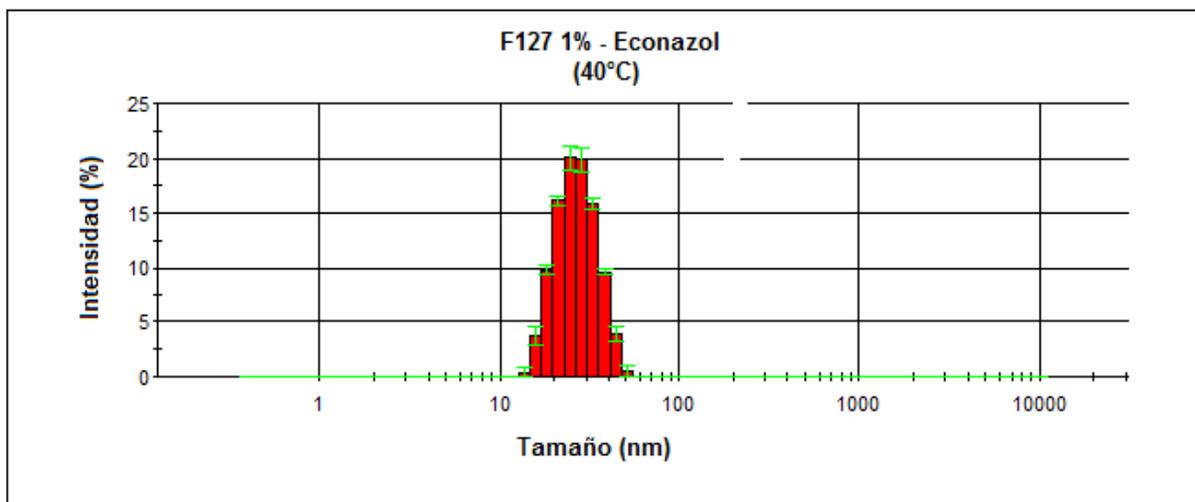
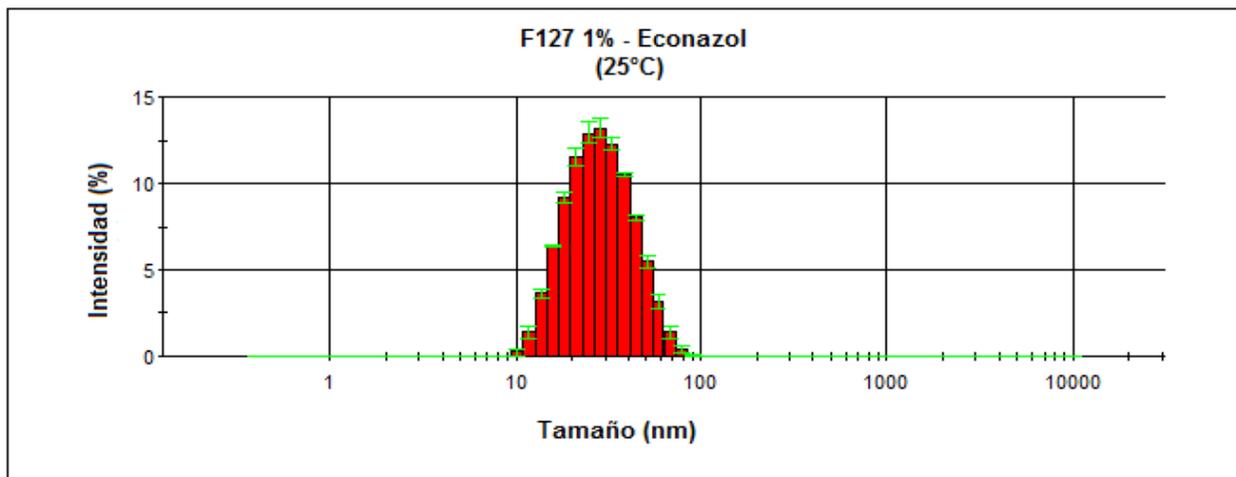
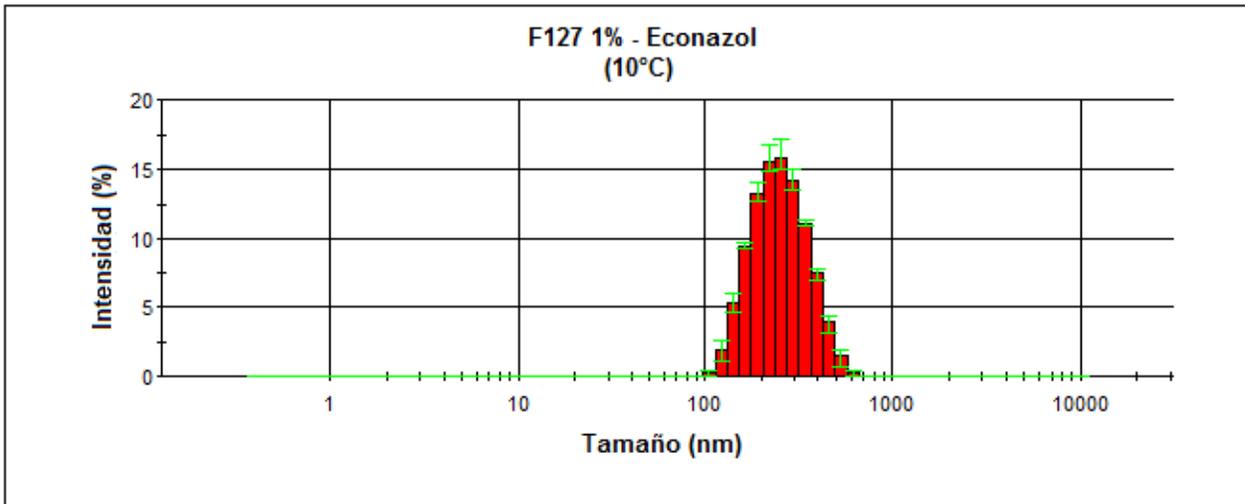
Sistema F127 puro





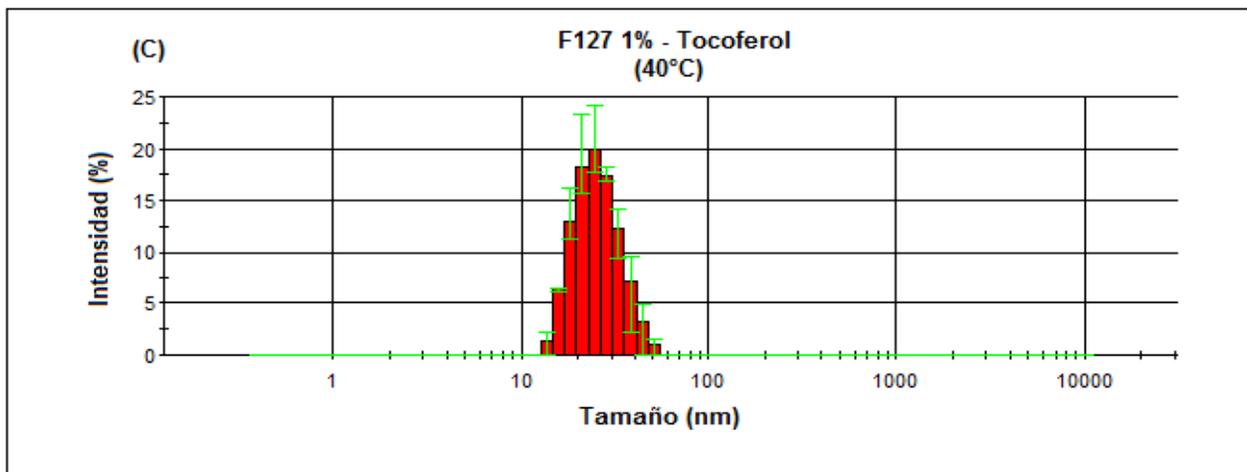
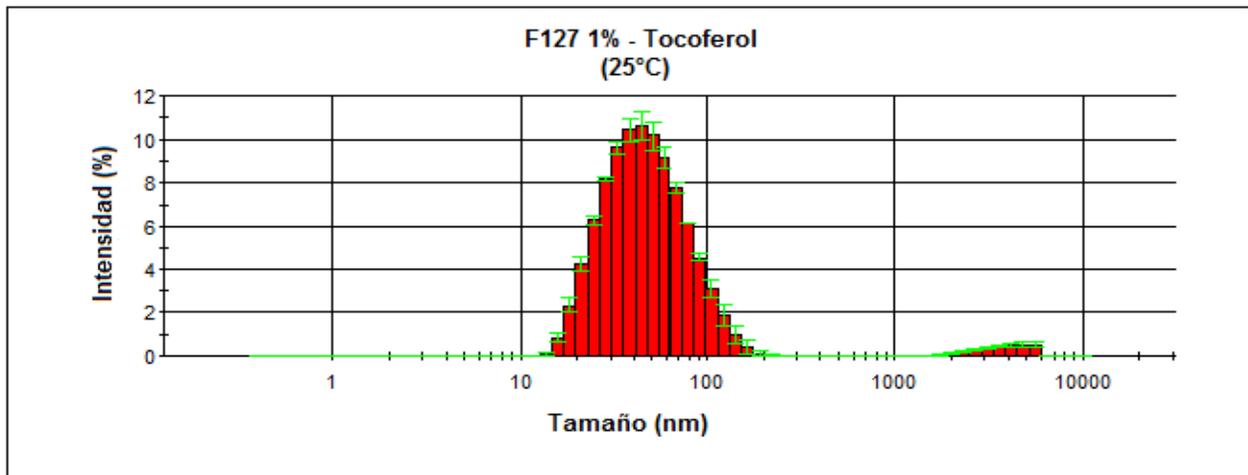
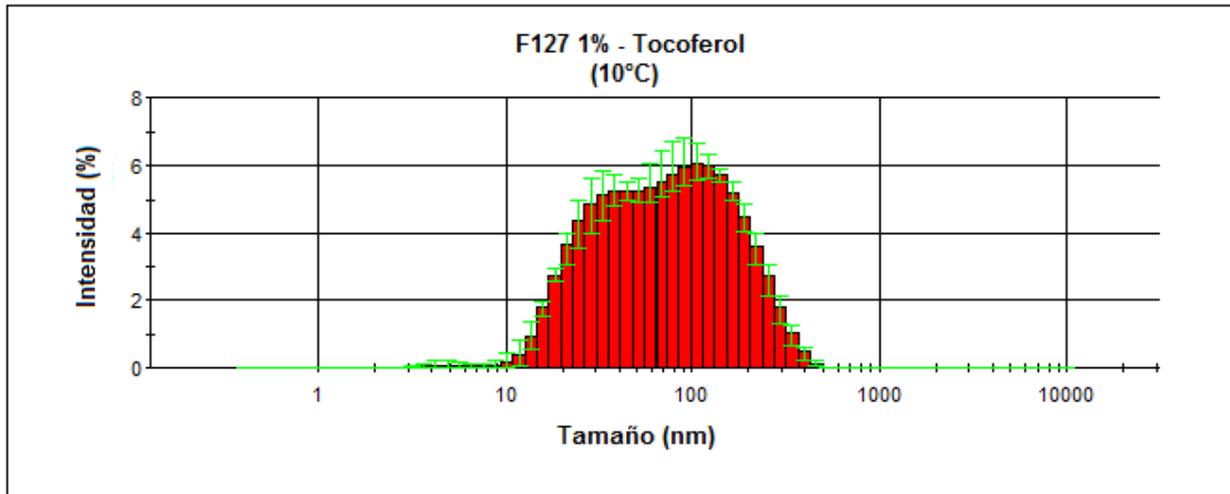
Figuras B1.1. Gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) para Pluronic F127 puro en solución acuosa a 10, 25 y 40 °C, mostrados en una gráfica de frecuencias. Las barras de error en color verde representan la desviación estándar de 3 mediciones realizadas.

Sistema F127 1% - Econazol



Figuras B1.2. Gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) para Pluronic F127 - Econazol en solución acuosa a 10, 25 y 40 °C, mostrados en una gráfica de frecuencias. Las barras de error en color verde representan la desviación estándar de 3 mediciones realizadas.

Sistema F127 1% - α -tocoferol



Figuras B2.3. Gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) para Pluronic F127 – α -tocoferol en solución acuosa a 10, 25 y 40 °C, mostrados en una gráfica de frecuencias. Las barras de error en color verde representan la desviación estándar de 3 mediciones realizadas.

8. Bibliografía

- (1) Lipinski, C. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, **(2000)** 235–249.
- (2) Merisko-Liversidge, E.M., Liversidge, G.G. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol. Pathol.* 36, **(2008)** 43–48.
- (3) Amidon, G.L, Lennerna's H, Shah V.P, Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.* 12, **(1995)** 413–420.
- (4) Hu J, Johnston K.P. Williams III R.O. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, **(2004)** 233–245.
- (5) Kipp J.E. The role of nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs, *Int. J. Pharm.* 284, **(2004)** 109–122.
- (6) Letchford, K., Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *E. Journal Pharm. and Biopharm.* 65, **(2007)**, 259-269.
- (7) Croy S.R, Kwon G.S. Polymeric micelles for drug delivery, *Curr. Pharm. Design* 12, **(2006)** 4669–4684.
- (8) Kwon G.S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 20 **(2003)**, 357–403.
- (9) Barratt G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 **(2003)** 21–37.
- (10) J. Farm Richard. *Chemistry and Technology of Surfactants*. Edit. Backwell Publishing. U.K. 2006. pp 1-23.
- (11) Alexandridis, P. Hatton, A. Poly(ethylene oxide) – poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* **(1995)** 96, 1-46.
- (12) Pasqualli C.R., Chiappetta A.D., Bregni C. Los copolímeros en bloques anfífilos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farm. Bonarense* **(2005)**, 24, 610-618.
- (13) Kadam Y., Yerramilli U., Bahadur A., Bahadur, P. Micelles from PEO–PPO–PEO block copolymers as nanocontainers for solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. *Colloids and Surfaces B: Bionterfaces.* 83 **(2011)** 49-57

- (14) Chiapetta, A.D., Sosnik, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (2007) 303–317.
- (15) Devi, R., Sandhya P. Vedha B.N. Poloxamer: A novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. *J. Pharm. Sci. & Res.* (2013) 8, 159-165.
- (16) Riess, Gerard. Micellization of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1107–1170
- (17) Chu B, Zhou Z. Physical chemistry of polyoxyalkylene block copolymer surfactants. In: Nace VM, editor. *Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers. Surfactant science series 60*, New York: Marcel Dekker; (1996) p. 67–143.
- (18) Almgren M, Brown W, Hvidt S. Self-aggregation and phase behavior of PEO–PPO–PEO block copolymers in aqueous solution. *Colloid Polym Sci* (1995); 273: 2–15.
- (19) Booth C, Attwood D. Effect of block architecture and composition on the association properties of poly(alkylene) copolymers in aqueous solution. *Macromol Rapid Commun* (2000), 21 501–27
- (20) Wanka G, Hoffmann H, Ulbricht W. The aggregation behavior of PEO–PPO–PEO block copolymers in aqueous solution. *Colloid Polym Sci* (1990) 268:101–17.
- (21) Alexandridis P., Holzwarth J.F. Hatton T.A. Micellization of poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* 27 (1994) 2414–2425.]
- (22) Alexandridis P., Athanassiou V., Fukuda S., Hatton T.A., Surface activity of poly(ethylene oxide)-block–poly(propylene oxide)-block– poly(ethylene oxide) copolymers, *Langmuir* 10 (1994) 2604–2612.].
- (23) Wanka G.,Hoffmann H., Ulbricht W., Phase-diagrams and aggregationnbehavior of poly(oxyethylene)–poly(oxypropylene)–poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules* 27 (1994) 4145–4159.
- (24) Alexandridis P., Nivaggioli T., Hatton T. Temperature effects on structural properties of Pluronic P104 and F108 PEO–PPO–PEO block copolymer solutions, *Langmuir* 11 (1995) 1468–1476.

- (25) Linse P., Malmsten M. Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions, *Macromolecules* 25 (1992) 5434–5439.
- (26) Yu G., Deng Y., Dalton S., Wang Q., Attwood D., Price C. Booth, Micellization and gelation of triblock copoly(oxyethylene/ oxypropylene/oxyethylene), F127, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88 (1992) 2537–2544.
- (27) Jain N.J., Aswal V.K., Goyal P.S., Bahadur P. Salt induced micellization and micelle structures of PEO/PPO/PEO blockcopolymers in aqueous solution, *Colloids Surf. A* 173 (2000) 85–94.
- (28) Elisseeva O.V., Besseling N.A.M., Koopal L.K., Cohen Stuart M.A. Influence of NaCl on the behavior of PEO–PPO–PEO triblock copolymers in solution, at interfaces, and in asymmetric liquid films, *Langmuir* 21 (2005) 4954–4963.
- (29) Nakashima K., Bahadur P. Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends, *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 75–96.
- (30) Alexandridis P., Athanassiou V., Hatton T.A. Pluronic-P105 PEO–PPO–PEO block copolymer in aqueous urea solutions: micelle formation, structure, and microenvironment, *Langmuir* 11 (1995) 2442–2450.
- (31) Sharma P.K., Bhatia S.R. Effect of anti-inflammatories on Pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 361–377.
- (32) I. Pepić, N. Jalsćenjak, I. Jalsćenjak, Micellar solutions of triblock copolymer surfactants with pilocarpine, *Int. J. Pharm.* 272 (2004) 57–64.
- (33) Armstrong J., Chowdhry B., Mitchell J., Beezer A., Leharne S. Effect of cosolvents and cosolutes upon aggregation transitions in aqueous solutions of the poloxamer F87 (poloxamer P237): a high sensitivity differential scanning calorimetry study, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 1738–1745.
- (34) Caragheorgheopol A., Caldararu H., Dragutan I., Joela H., Brown W. Micellization and micellar structure of a poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) triblock copolymer in water solution, as studied by the spin probe technique, *Langmuir* 13 (1997) 6912–6921.
- (35) Pandya K., Bahadur P., Nagar T.N., Bahadur A. Micellar and solubilizing behaviour of Pluronic L-64 in water, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 70 (1993) 219–227.

- (36) Mata J.P., Majhi P.R., Guo C., Liu H.Z., Bahadur. Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media, *J. Colloid Interf. Sci.* 292 **(2005)** 548–556.
- (37) Rangel-Yagui C. O., Pessoa-Jr A., Costa Tavares L. Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci* 8(2) **(2005)** 147-163.
- (38) Torchilin, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-base drug delivery systems. *J Control Rel*, 73 **(2001)** 137-172.
- (39) Lu Ying, Park Kinam. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int. J. of Pharm.* 453 **(2013)** 198-214.
- (40) Nagarajan, R., Barry, M. Unusual selectivity in solubilization by block copolymer micelles. *Abstr. Pappars Amer. Chem. Soc.* 1991 **(1986)**, 287-290.
- (41) Allen C., Maysinger D., Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 16 **(1999)** 3–27.
- (42) Elbert D.L., Hubbell J.A., *Ann. Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility Rev. Mater. Sci.* 26 **(1996)** 365.
- (43) Lee J.H., Lee H.B. Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Prog. Polym. Sci.* 20 **(1995)** 1043.
- (44) Gref R., Minamitake Y., Peracchia V., Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263 **(1994)** 1600.
- (45) Allen T.M. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13 **(1994)** 285.
- (46) Parmar V. Arpan, Bahadur A., Kuperkar K., Bahadur P., PEO-PPO based star-block copolymer T904 as pH responsive nanocarriers for quercetin: Solubilization and release study. *E. Polymer Journal.* 49 **(2013)** 12-21.
- (47) Alvarez-Núñez, F.A., Yalkowsky, S.H. Relationship between polysorbate 80 solubilization descriptors and octanol-water partition coefficient of drugs. *Int J Pharm*, 200 **(2000)** 217-222.

- (48) Saettone M.F., Giannaccini B., Delmonte G., Campigli V., Tota G., La Marca F. Solubilization of tropicamide by poloxamers: physicochemical data and activity data in rabbits and humans, *Int. J. Pharm.* 43 (1988) 67–76.
- (49) Dumortier G., Groissord J.L., Zuber M., Couarraze G., Chaumeil J.C. Rheological study of a thermoreversible morphine gel. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17 (1991) 1255–1265.
- (50) Suh H., Jun H.W. Physicochemical and release studies of naproxen in poloxamer gels, *Int. J. Pharm.* 129 (1996) 13–20.
- (51) Suh H., Jun W., Dziminaski M.T., Lu G.W. Pharmacokinetic and local tissue disposition studies of naproxen following topical and systemic administration in dogs and rats, *Biopharm. Drug Dispos.* 18 (1997) 623–633.
- (52) Hioka N., Chowdhary R.K., Chansarkar N., Delmarre D., Sternberg E., Dolphin D. Studies of a benzoporphyrin derivative with Pluronic, *Can. J. Chem.* 80 (2002) 1321–1326.
- (53) Chowdhary R.K., Chansarkar N., Sharif I., Hioka N., Dolphin D. Formulation of benzoporphyrin derivatives in Pluronic, *Photochem. Photobiol.* 77 (2003) 299–303.
- (54) Han L.M., Guo J., Zhang L.J., Wang Q.S., Fang X.L. Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles of paclitaxel with Pluronic P123, *Acta Pharmacol. Sin.* 27 (2006) 747–753.
- (55) Shin S.C., Cho C.W., Oh I.J. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats, *Int. J. Pharm.* 193 (2000) 213–218.
- (56) Dimitrova E., Bogdanova S., Mitcheva M., Tanev I., Minkov E. Development of model aqueous ophthalmic solution of indomethacin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 1297–1301.
- (57) www.drugbank.ca
- (58) Ribeiro A. et al. Poloxamine micellar solubilization of α -tocopherol for topical ocular treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103 (2013) 550–557.
- 59 Gill P., Moghadam T., Ranjbar., Bijan R. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *J Biomol Tech.* (2010), 21(4), 167–193.
- (60) Spink C.H., Differential Scanning Calorimetry. *Methods Cell Biol.* (2008), 84, 115–41.

(61) Malvern Instruments Limited, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK. WR14 1XZ. A Basic Guide to Particle Characterization. www.malver.com/contact.

(62) Malvern Instruments Limited, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK. WR14 1XZ. Technical note. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. www.malver.com/contact.

(63) Gaucher G., Dufresne M-H., et. al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 109 **(2005)** 169–188.

(64) Tyrrell Z., L., Shen Y., Radosz M., Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers. *Progress in Polymer Science* 35 **(2010)** 1128–1143.

(65) Villarino N., Landoni M. Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica, *Analecta Veterinaria* **(2006)** 26, 28-37

(66) Chattaraj S., Swarbrick J., Kanfer I. A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms, *Int. J. Pharm* **(2005)** 120, 119-124.

(67) Ng Shioh-Fern., Rouse Jennifer J., Sanderson Francis D., Validation of Static Franz Cell Diffusion System For In vitro Permeation Studies. *Pharm. Sci. Teh Vol II.* **(2010)** 3, 1432-1441.

(68) Costa P., Sousa J.M., Modeling and comparison of dissolution profiles. *E.Journal of Pharm. Sci.* **(2001)**, 13, 123-133.

(69) Dash S., Narashima, P., Nath, L., Chowdhury, P., Kinetic modeling drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug, Research.* **(2010)** 67,3, 217-223.

(70) Rosen, M.J. *Surfactants and interfacial phenomena*, 2ed., John Wiley & Sons, New York, 1989.

(71) Florence, A.T., Attwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 3rd ed. The MacMillan Press, London, 2003.

(72) Tsui H-W., Wang J-H., Hsu Y-H., Study of heat of micellizaion and phase separation for Pluronic aqueous solutions by using a high sensitivity differential scanning calorimetry. Colloid Polym Sci. **(2010)** 288; 1687-1696.

(73) Alexandridis P., Holzwart J.F., Differential Scanning Calorimetry investigation of the effect of salts on aqueous solutions properties of an amphiphilic block copolmer (Ploxamer). Langmuir **(1997)** 13, 6074-6082.

(74) Engel, T., Reid, P. Química Física. Pearson Addison Wesley. 2006.