



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARGADAS DE
FENITOÍNA. EVALUACIÓN DE VARIABLES DE LA FABRICACIÓN.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
BETSABÉ GÓMEZ ROMERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



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: MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS

VOCAL: MA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

1er. SUPLENTE: ANDREA SAORI MAJLUF TREJO

2° SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA,
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

SUSTENTANTE:

BETSABÉ GÓMEZ ROMERO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual ha sido un segundo hogar a lo largo de mi formación académica. Gracias por permitirme ser parte de esta gran casa de estudios, por apoyarme y motivarme a ser cada día mejor.

A los proyectos PAPIIT 2019143, CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940 y PIAPI 001, por facilitar los recursos económicos para el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	6
Lista de figuras.....	7
Lista de tablas.....	8
1.0 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Epilepsia.....	9
1.2 Fenitoína.....	9
1.2.1 Propiedades físicas.....	10
1.3 Nanopartículas.....	11
1.4 Liposomas.....	12
1.5 Nanopartículas poliméricas.....	12
1.6 Nanopartículas magnéticas.....	13
1.7 Nanopartículas a base de lípidos.....	13
1.7.1 Acarreadores lipídicos nanoestructurados.....	14
1.7.2 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	15
1.8 Caracterización de nanopartículas.....	20
1.8.1 Tamaño de partícula (Dispersión dinámica de luz).....	20
1.8.2 Potencial zeta (ζ).....	21
1.8.3 Cuantificación de fármaco encapsulado.....	23
2.0 JUSTIFICACIÓN.....	24
3.0 HIPÓTESIS.....	25
4.0 OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos particulares.....	26
5.0 MATERIALES Y EQUIPOS.....	27
5.1 Materiales.....	27
5.2 Equipos e instrumentos.....	27
6.0 METODOLOGÍA.....	28
6.1 Fabricación de nanopartículas.....	28

6.1.1 Preparación de SLN.....	28
6.1.2 Formulaci3n.....	28
6.1.3 Preparaci3n de NLC.....	29
6.2 Desarrollo de m3todo anal3tico para la cuantificaci3n de PHT.....	29
6.3 Validaci3n de m3todo anal3tico.....	30
6.3.1 Linealidad.....	30
6.3.2 Precisi3n.....	30
6.3.3 Repetibilidad.....	30
6.3.4 Precisi3n intermedia.....	30
6.3.5 Exactitud.....	31
6.3.6 Especificidad.....	31
6.3.7 Estabilidad.....	31
6.3.8 L3mite de detecci3n y cuantificaci3n.....	31
6.4 Caracterizaci3n de nanop3rticulas.....	32
6.4.1 Determinaci3n de tama3o de part3cula.....	32
6.4.2 Determinaci3n de potencial ζ	32
6.4.3 Cuantificaci3n de f3rmaco encapsulado.....	32
7.0 RESULTADOS Y DISCUSI3N.....	33
7.1 Fabricaci3n de NP's.....	33
7.1.1 Formulaci3n.....	33
7.2 Desarrollo de m3todo anal3tico.....	35
7.3 Validaci3n de m3todo anal3tico.....	38
7.4 Caracterizaci3n de NP's.....	43
7.5 Eficiencia de encapsulaci3n y capacidad de carga de SLN.....	46
7.6 Efecto de centrifugaci3n y liofilizaci3n en el tama3o de part3cula.....	48
8.0 CONCLUSIONES.....	53
9.0 PERSPECTIVAS.....	54
10.0 BIBLIOGRAF3A.....	55
11.0 ANEXO I.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AED	Fármacos antiepilépticos	min	Minuto
b	Ordenada al origen	ml	Mililitro
BHE	Barrera Hematoencefálica	mV	Milivolts
CC	Capacidad de carga	NLC	Acarreadores lipídicos nanoestructurados
CV	Coefficiente de variación	nm	Nanómetros
DE	Desviación estándar	NM	Nanopartículas magnéticas
DLS	Dispersión dinámica de luz	NP's	Nanopartículas
EE	Eficiencia de encapsulación	NPP	Nanopartículas poliméricas
HPH	Homogenización a alta presión	PCS	Espectroscopía de correlación de fotones
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución	PHT	Fenitoína
IP	Índice de polidispersión	PVA	Alcohol polivinílico
LC	Límite de cuantificación	R²	Coefficiente de correlación
LD	Límite de detección	rpm	Revoluciones por minuto
m	Pendiente	SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
m/v	Masa/Volumen	TGCM	Triglicéridos de cadena media
MeCN	Acetonitrilo	ζ	Potencial zeta
MeOH	Metanol	μg	Microgramo
mg	Miligramo	μm	Micrómetro

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura química de la fenitoína (Thakur & Gupta 2006).....	10
Figura 2. Comparación de estructuras entre SLN y NLC (Beloqui et al. 2016).....	14
Figura3. Esquematización de las técnicas de fabricación de SLN (Geszke-Moritz & Moritz 2016).....	18
Figura 4. Esquema de la medición y análisis de la dispersión dinámica de luz (Minton 2016).....	21
Figura 5. Preparación de SLN por el método de homogenización a alta cizalla.....	28
Figura 6. Cromatograma utilizando tres diferentes mezclas de solventes (50:50) a 0.8ml/min.....	36
Figura 7. Cromatograma utilizando Metanol: Agua a diferentes proporciones a 0.8ml/min.....	37
Figura 8. Cromatogramas a diferentes velocidades de flujo utilizando Metanol: Agua (75:25).....	38
Figura 9. Linealidad del método analítico.....	39
Figura 10. A) Cromatograma de la solución de PHT; B) Cromatograma de PHT más los componentes de las SLN.....	42
Figura 11. Estabilidad de SLN y NLC a través del tiempo.....	45
Figura 12. Eficiencia de encapsulación a diferentes cantidades de PHT.....	47
Figura 13. Capacidad de carga de las SLN.....	48
Figura 14. Efecto de la centrifugación y la cantidad de crioprotector en el tamaño de partícula.....	50

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Principales propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de la fenitoína.....	11
Tabla 2. Ventajas y desventajas de las SLN como acarreadores de fármacos (Geszke-Moritz & Moritz 2016).....	19
Tabla 3. Efecto de las concentraciones de lípido y estabilizante en el tamaño de partícula.....	33
Tabla 4. Efecto del tiempo de agitación en el tamaño de partícula de las SLN.....	34
Tabla 5. Linealidad del método analítico.....	39
Tabla 6. Resultados del estudio de precisión.....	40
Tabla 7. Repetibilidad del método.....	40
Tabla 8. Resultados precisión intermedia.....	41
Tabla 9. Resultados de la exactitud del método.....	41
Tabla 10. Determinación de la estabilidad de las soluciones de fenitoína a través del tiempo.....	42
Tabla 11. Determinación de los límites de cuantificación y detección del método.....	43
Tabla 12. Comparación del tamaño de partícula y potencial ζ entre SLN y NLC.....	44
Tabla 13. Comparación de la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación en SLN y NLC.....	46
Tabla 14. Determinación de la capacidad de encapsulación en las SLN así como la eficiencia de encapsulación.....	46
Tabla 15. Determinación del tamaño de partícula antes y después de la liofilización.....	49
Tabla 16. Resultados del efecto de la centrifugación y la cantidad de crioprotector en el tamaño de partícula.....	51
Tabla 17. Tamaño de partícula de tres diferentes lotes a una misma concentración de manitol (10%).....	51
Tabla 18. Resultados del potencial ζ antes y después de la liofilización con 10% manitol.....	52

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.1 Epilepsia

La epilepsia es un desorden neurológico crónico degenerativo, el cual es uno de los más comunes afectando cerca del 1% de la población mundial. Este desorden es caracterizado por un estado de hiperactividad de las neuronas y circuitos cerebrales capaces de generar descargas eléctricas, las cuales se manifiestan de diferentes formas, en donde se puede afectar una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas) (Maranhão et al. 2011).

El tratamiento de la epilepsia con fármacos antiepilépticos (AED) por sus siglas en inglés (*Antiepileptic drugs*) es actualmente la terapia de elección, debido a que estos fármacos controlan la frecuencia con la que se presentan los episodios epilépticos aproximadamente en dos terceras partes de los pacientes. La mayoría de los tratamientos incluyen como primera elección AED's de primera generación como la fenitoína (PHT), carbamazepina (CBZ) o fenobarbital (PB), aunque también se pueden administrar AED's de segunda generación como oxcarbazepina (OXC) o lamotrigina (LTG) (Ferreira et al. 2014).

1.2 Fenitoína (PHT)

La fenitoína (5,5- difenilidantoina) es un fármaco anticonvulsivo el cual como se mencionó anteriormente, se utiliza para el tratamiento de la epilepsia, también se utiliza para el tratamiento de desorden bipolar aunque para éste es menos común (Villanelli et al. 2015). En la figura 1 se muestra la estructura química de la fenitoína.

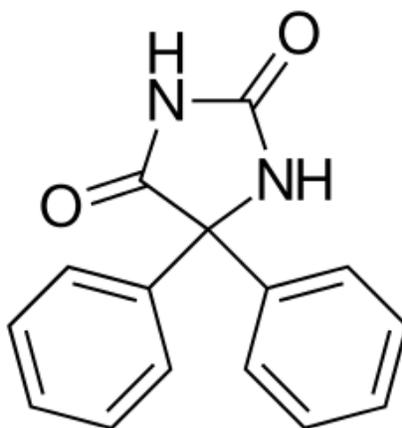


Figura 1. Estructura química de la fenitoína (Thakur & Gupta 2006).

La fenitoína es un bloqueador de los canales de Na^+ por lo que provoca un efecto estabilizador sobre las membranas excitables de diversas células, incluso neuronas y miocitos cardiacos. Puede reducir los flujos de reposo del Na^+ así como las corrientes de éste que fluyen durante los potenciales de acción o la despolarización inducida químicamente. La capacidad de la fenitoína para reducir la duración de las posdescargas así como limitar la propagación de la crisis es más pronunciada que su efecto sobre el umbral de estimulación, es decir, puede prevenir la diseminación del foco más que abolir su descarga convulsiva (Alcayaga et al. 2016).

Los niveles de este fármaco se deben mantener en un intervalo terapéutico muy estrecho. Niveles bajos pueden provocar que los pacientes presenten episodios epilépticos; niveles altos pueden provocar toxicidad (Villanelli et al. 2015), así como presentar efectos adversos entre los que se encuentran náuseas, insomnio y otros desordenes del sistema nervioso central (Thakur & Gupta 2006)

1.2.1 Propiedades físicas.

Aunque la fenitoína al ser administrada vía intravenosa o intramuscular llega rápidamente al sistema nervioso central controlando así las crisis epilépticas de una manera efectiva, ésta tiene numerosas características poco favorables. Debido a su baja solubilidad en agua, las formulaciones parenterales requieren del uso de propilenglicol al 40% y 10% de

alcohol ajustado a un pH de 12 con hidróxido de sodio, por lo que la administración de esta formulación provoca hipotensión, arritmias cardíacas y disminución del pulso. Por lo tanto, su administración por esta vía debe ser lenta para evitar dichas complicaciones (Wang & Patsalos 2004). En la tabla 1 se encuentran las principales características de la fenitoína.

Tabla 1. Principales propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de la fenitoína.

Propiedad	Valor teórico
Solubilidad en agua	32 mg/L a 22°C
Biodisponibilidad	> 80
pKa	8.33
Unión a proteínas	90 %
log P	2.47
Clasificación biofarmacéutica	Clase II

La disolución de fármacos poco solubles en agua es uno de los problemas más comunes en la industria farmacéutica, especialmente para los fármacos en los que la dosis terapéutica se encuentra cerca de la dosis tóxica. La reducción del tamaño de partícula es uno de los métodos más utilizados para mejorar la solubilidad así como la biodisponibilidad (Thakur & Gupta 2006).

Otro de los problemas en el tratamiento de muchas enfermedades es hacer que el fármaco llegue a su sitio de acción. La administración convencional de fármacos es caracterizada por la falta de selectividad y baja biodisponibilidad. Dichas limitaciones pueden ser mejoradas con sistemas de liberación controlada (Wilczewska et al. 2012).

1.3 Nanopartículas.

En los sistemas de liberación controlada el fármaco es transportado a su sitio de acción por lo tanto pueden aumentar las concentraciones de fármaco en el sitio de interés, así como protegerlo de una rápida degradación y disminuir los efectos no deseados (Nevozhay 2007)

Para poder hacer que un fármaco llegue a ciertas células o tejidos en específico se deben desarrollar acarreadores específicos para cada fármaco. Recientes estudios en nanotecnología han demostrado que las nanopartículas tienen un gran potencial como acarreadores de fármacos (Wilczewska et al. 2012).

Las nanopartículas están definidas como sistemas coloidales que varían en su tamaño de 1 a 1000 nm, en donde el principio activo se encuentra encapsulado, disuelto o adsorbido (Gan 2005). Existen diferentes tipos de nanopartículas entre los que se encuentran los liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas magnéticas y nanopartículas a base de lípidos.

1.4 Liposomas.

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de bicapas de fosfolípidos, esteroides u otros tensoactivos. Su tamaño está en un intervalo de 80- 300nm (Silva et al. 2011). Se ha reportado que los liposomas incrementan la solubilidad de los fármacos así como mejorar sus propiedades farmacocinéticas, como la reducción de efectos secundarios y el incremento de actividad anti cancerígena (Santos et al. 2011).

En este tipo de sistemas el principio activo es incorporado por medio de un proceso de encapsulación y la liberación del mismo depende de la composición del liposoma, del pH, gradiente osmótico y del efecto del entorno.

1.5 Nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas (NPP) son estructuras con un diámetro en un intervalo de 10-100nm. Las NPP son obtenidas a base de polímeros sintéticos (poli- ϵ -caprolactona, poliacrilamida y poliacrilato) o de polímeros naturales (albúmina, quitosan y gelatina) (Wilczewska et al. 2012). Este tipo de nanopartículas son generalmente cubiertos con tensoactivos no iónicos, esto con la finalidad de reducir las interacciones inmunológicas así como interacciones intermoleculares con la superficie de las NPP.

La adición del fármaco se puede realizar inmovilizándolo en la superficie de las NPP por medio de una reacción de polimerización o puede ser encapsulado durante el proceso de

polimerización (Mora-Huertas et al. 2010). La liberación del fármaco se lleva a cabo por difusión, desorción o por la erosión de las NPP en el sitio de interés.

1.6 Nanopartículas magnéticas.

Las nanopartículas magnéticas (NM) tienen una gran variedad de beneficios lo que hace que sean buenos acarreadores de fármacos. Los beneficios de dicho sistema radica en la facilidad de éstas para adicionar un campo magnético, la posibilidad de utilizar estrategias tanto activas como pasivas en la liberación de fármacos, su habilidad de visualización (este tipo de nanopartículas son utilizadas en la resonancia magnética), así como el poder llegar a un sitio blanco específico dando como resultado un tratamiento efectivo a bajas dosis (Arruebo et al. 2007). Sin embargo, en varios de los casos en donde los acarreadores magnéticos fueron utilizados, han aparecido también muchas dificultades. Dichas dificultades están asociadas con características inapropiadas de las NM, ya que éstas tienden a agregarse lo que hace que pierdan ciertas propiedades asociadas con su reducido tamaño de partícula. Otra de las dificultades de las NM se debe a que el campo magnético no es lo suficientemente fuerte para superar la fuerza del flujo de la sangre y así poder llevar el fármaco a su sitio de acción (Neuberger et al. 2005).

Por lo mismo al diseñar sistemas de liberación magnéticos se debe tomar en cuenta diferentes factores como las propiedades magnéticas, el tamaño de partícula, la fuerza del campo magnético, la capacidad de encapsulación del fármaco, la accesibilidad que tiene el sitio de acción y el efecto del flujo de la sangre.

1.7 Nanopartículas a base de lípidos.

A principios de la década de los 90's se buscó desarrollar un tipo de acarreador alternativo a los liposomas, emulsiones y nanopartículas poliméricas, a las cuales se le denominó nanopartículas lipídicas sólidas (Gescke-Moritz & Moritz 2016).

Este tipo de nanopartículas son como su nombre lo dice, dispersiones compuestas de lípidos en una fase acuosa, los cuales son fisiológicamente tolerados. Su tamaño de partícula varía entre 80- 1000 nm. Existen diferentes tipos de esta clase de nanopartículas,

las cuales son nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) por sus siglas en inglés *solid lipid nanoparticles* y acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) *nanostructured lipid carriers* (Wilczewska et al. 2012).

1.7.1 Acarreadores lipídicos nanoestructurados.

Los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) son una variante de las SLN que se han desarrollado debido a las grandes limitaciones de éstas. La gran diferencia entre las SLN y los NLC radica en su composición, ya que éstas últimas están compuestas de lípidos sólidos y de lípidos líquidos, en donde el lípido líquido es incorporado en la matriz sólida, dicha combinación de lípidos provoca una gran deformación en el sistema, lo que permite encapsular cantidades mayores del principio activo (Beloqui et al. 2016). En la figura 2 se encuentra una representación de las dos diferentes estructuras de las nanopartículas.

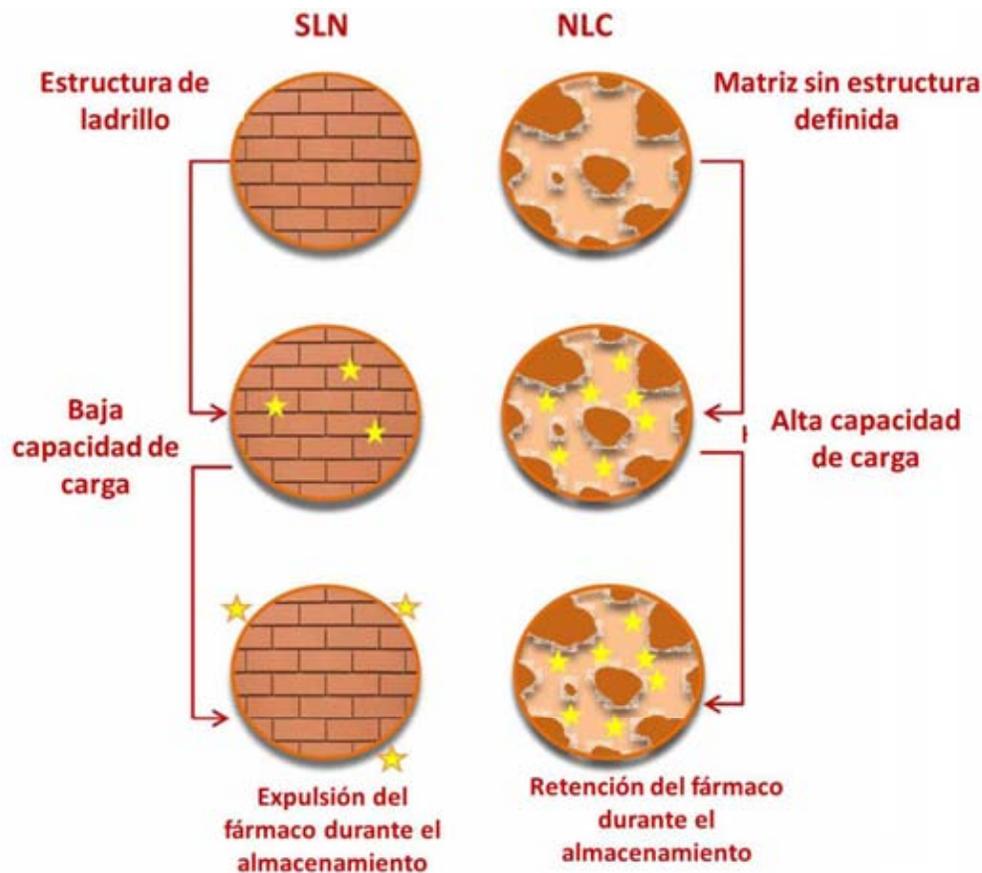


Figura 2. Comparación de estructuras entre SLN y NLC (Beloqui et al. 2016).

1.7.1.1 Composición de NLC.

Los NLC consisten de una matriz lipídica sólida hecha a base de lípidos sólidos y lípidos líquidos así como de una fase acuosa, la cual contiene un tensoactivo o la mezcla de varios tensoactivos. Normalmente las proporciones entre lípidos sólidos y líquidos van de 70:30 hasta 99.9:0.1 respectivamente, mientras que la concentración de tensoactivo está en un intervalo de 1.5%- 5%(m/v) (Pardeike et al. 2009).

1.7.2 Nanopartículas lipídicas sólidas.

Las SLN representan una clase de partículas coloidales compuestas de lípidos los cuales son sólidos a la temperatura corporal. En diferentes investigaciones se ha demostrado que aunque este tipo de nanopartículas tienen diversas limitaciones, el uso de lípidos sólidos en lugar de lípidos líquidos ayuda a controlar la liberación del fármaco debido a que la movilidad del fármaco en una matriz sólida es mucho menor que en una matriz líquida (Mehnert & Mäder 2012).

1.7.2.1 Fabricación de SLN.

Existen diferentes técnicas para la fabricación de SLN siendo la homogenización a alta presión y las microemulsiones las más comunes (Figura 3). A continuación, se mencionarán algunas de ellas.

- A. **Homogenización a alta presión (HPH):** Esta técnica es de las más viables para la preparación de SLN, la cual en contraste con otras técnicas el escalamiento a nivel industrial no es un problema. El fundamento de esta técnica es hacer pasar un líquido a alta presión (100- 2000 bar) a través de un orificio pequeño el cual mide pocos micrómetros. Esta técnica se puede realizar de dos formas las cuales son, homogenización en caliente y en frío, en ambos casos se requiere de un paso previo a la homogenización, en el cual se realiza la incorporación del fármaco ya sea disuelto o disperso en el lípido en su punto de fusión (Kumar & Randhawa 2013).

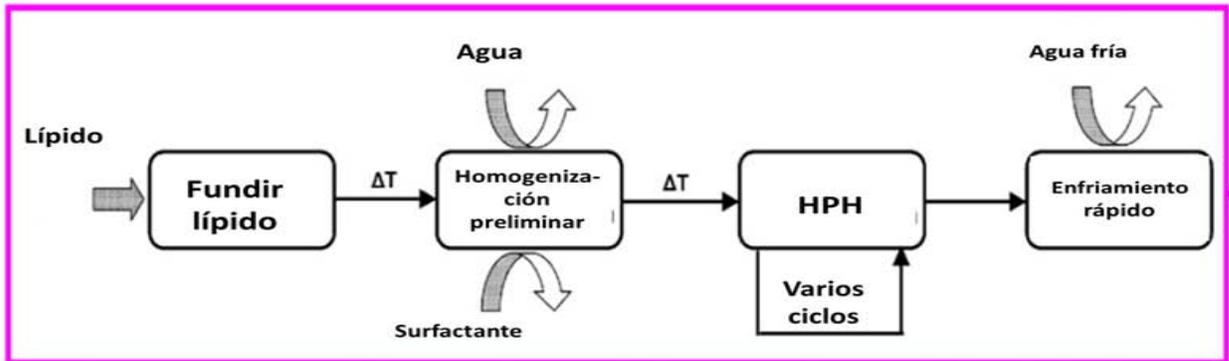
- B. **Microemulsión:** Las microemulsiones son dispersiones ligeramente turbias compuestas de una fase lipídica, un tensoactivo y en la mayoría de los casos también un co-tensoactivo. Las microemulsiones también pueden ser definidas como sistemas de dos fases compuestas de una fase interna y una externa, ya sea agua en aceite o aceite en agua. Para formar una microemulsión con un lípido el cual es sólido a temperatura ambiente, se debe realizar a una temperatura por encima del punto de fusión del lípido a utilizar. El lípido debe ser fundido para así poder disolver el fármaco en el lípido, la mezcla de agua con los tensoactivos y el co-tensoactivo deben estar a la misma temperatura que el lípido, dicha mezcla se agregará al lípido con el fármaco la cual estará en agitación constante, obteniendo así un sistema transparente y termodinámicamente estable. La microemulsión una vez formada se dispersará en un medio acuoso, el cual se encuentra bajo una leve agitación y a una temperatura de 2- 3 °C. Este proceso asegura que las nanopartículas se forman por precipitación y no mecánicamente debido al proceso de agitación (Keck et al. 2014)
- C. **Emulsión- Evaporación del disolvente:** En este método el material lipofílico y el fármaco son disueltos en un disolvente orgánico inmisible en agua, el cual es emulsificado en una fase acuosa. Posteriormente el disolvente orgánico es evaporado, por lo que se produce una dispersión de nanopartículas formada por la precipitación del lípido en la fase acuosa (Wissing et al. 2004).
- D. **Emulsión- Difusión del disolvente:** Para esta técnica se utilizan disolventes parcialmente miscibles en agua. Inicialmente el disolvente es saturado con agua para asegurar el equilibrio termodinámico. Posteriormente, el lípido y el fármaco son disueltos en el disolvente saturado en agua y se realiza la emulsión con el surfactante a temperaturas por encima del punto de fusión del lípido. Las nanopartículas precipitan después de la adición de un exceso de agua (comúnmente proporciones de 1:5–1:10), esto para provocar la difusión del

disolvente orgánico y así la emulsión formada quede libre del mismo (Shah et al. 2007)

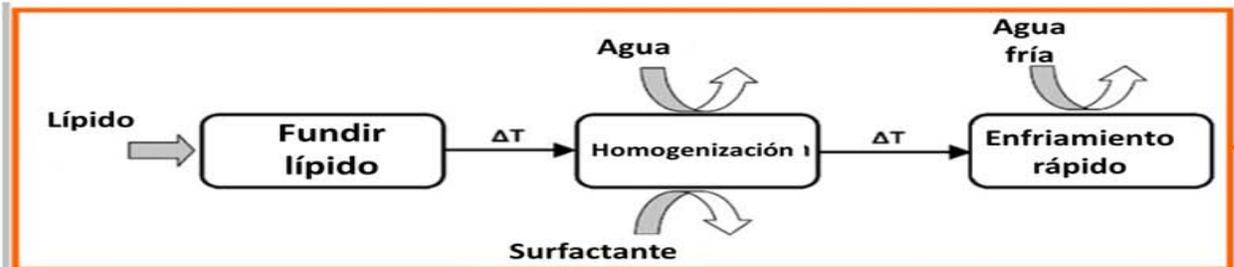
- E. **Homogenización a alta fuerza de corte y ultrasonido:** Son técnicas de dispersión, las cuales inicialmente fueron utilizadas para la fabricación de nanodispersiones lipídicas sólidas. Aunque estos métodos son fáciles de aplicar, la calidad de las dispersiones se ve comprometida por la presencia de micropartículas, es decir, partículas mayores a 1000nm (1 μ m), lo que provoca la inestabilidad del sistema. Esto puede ser mejorado utilizando estabilizantes a altas concentraciones. Además la contaminación por metales debe ser considerada si se utiliza el ultrasonido (Mehnert & Mäder 2012).

Para este método se necesita de un ULTRA TURRAX®, el cual es un sistema de rotor/estator que es utilizado para producir emulsiones y dispersiones. En esta técnica la solución acuosa de estabilizante debe ser calentada a la temperatura de fusión del lípido a utilizar, posteriormente el lípido debe estar fundido para poder adicionar el fármaco. Una vez que ambas mezclas están a la misma temperatura, el lípido que contiene el fármaco es adicionado a la fase acuosa y con ayuda del equipo anteriormente mencionado se realice la homogenización del sistema para así obtener las nanopartículas (Camacho, 2010)

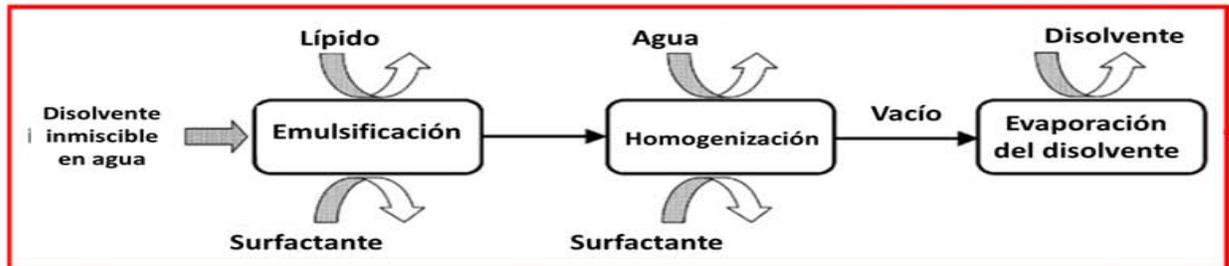
Homogenización a alta presión (HPH)



Microemulsión



Emulsión – Evaporación del disolvente



Emulsión – Difusión del disolvente

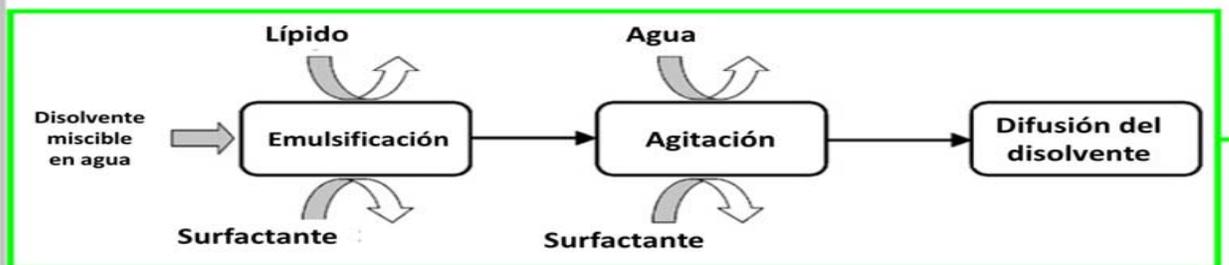


Figura 3. Esquematización de las técnicas de fabricación de SLN (Geszke-Moritz & Moritz 2016).

1.7.2.2 Propiedades de las SLN.

Al ser utilizadas como acarreadores de diferentes principios activos, las SLN pueden proveer varias ventajas comparado con los sistemas de administración convencionales. En la tabla 2 se muestran tanto las ventajas como las desventajas de utilizar SLN como acarreadores de fármacos

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las SLN como acarreadores de fármacos (Geszke-Moritz & Moritz 2016).

Aspectos farmacéuticos	Ventajas	Desventajas
Tecnológicos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Protección del fármaco de la degradación química y enzimática. ✓ Estabilidad física. ✓ Facilidad de incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. ✓ La producción puede ser escalable a nivel industrial ✓ Evita el uso de solventes orgánicos. ✓ Posibilidad de acarrear dos principios activos (co-liberación). ✓ Tamaño de partícula pequeño. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Expulsión del fármaco después de la transición polimórfica durante el almacenamiento. ✓ Baja capacidad de carga del fármaco. ✓ Polidispersidad. ✓ Aglomeración ✓ Operación a temperaturas por encima del punto de fusión del lípido a utilizar. $T > 90^{\circ}\text{C}$
Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Administración por diferentes vías. ✓ Son biodegradables. ✓ Control en la liberación del fármaco. ✓ Biocompatibilidad. ✓ Incremento de la biodisponibilidad del fármaco incorporado. ✓ Reducción de efectos adversos o tóxicos del fármaco. ✓ Cruzan fácilmente barreras biológicas. ✓ Reducción en la frecuencia de la dosis. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ El fármaco incorporado tiene un efecto inicial muy rápido. ✓ Tiempo de circulación relativamente bajo.

1.8 Caracterización de nanopartículas.

1.8.1 Tamaño de partícula (Dispersión dinámica de luz).

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés “*Dynamic light Scattering*”) o espectroscopía de correlación de fotones PCS (*Photon Correlation Spectroscopy*) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución, tales como proteínas o polímeros (Cuadros-Moreno et al. 2014).

El movimiento browniano se define como: “El movimiento aleatorio de las partículas en un líquido debido al bombardeo por las moléculas que las rodean”. Es conocido que las partículas pequeñas se mueven rápidamente en un líquido a comparación de las partículas grandes las cuales tienen un movimiento más lento. De esta manera es posible determinar el tamaño de las partículas en función de su capacidad de incidir la luz (Minton 2016).

Debido al movimiento browniano de las partículas la PCS mide la variación de la intensidad de la luz dispersada y la relaciona al tamaño de partícula a través de una función de correlación, esto lo hace con un tubo multiplicador de fotones (PMT) el cual mide las señales de la luz dispersa en un punto fijo. Posteriormente, las señales medidas son procesadas por correlacionadores digitales esto para obtener las funciones de autocorrelación intensidad tiempo (figura 4). Finalmente se obtiene una campana gaussiana para poder observar la distribución del tamaño de partícula, dicho parámetro no se define por la media del tamaño obtenido, sino por la amplitud de la curva o la presencia de diferentes poblaciones. Para garantizar un resultado preciso, el tiempo de adquisición debe ser entre decenas de segundos hasta varios minutos (Xu et al. 2015).

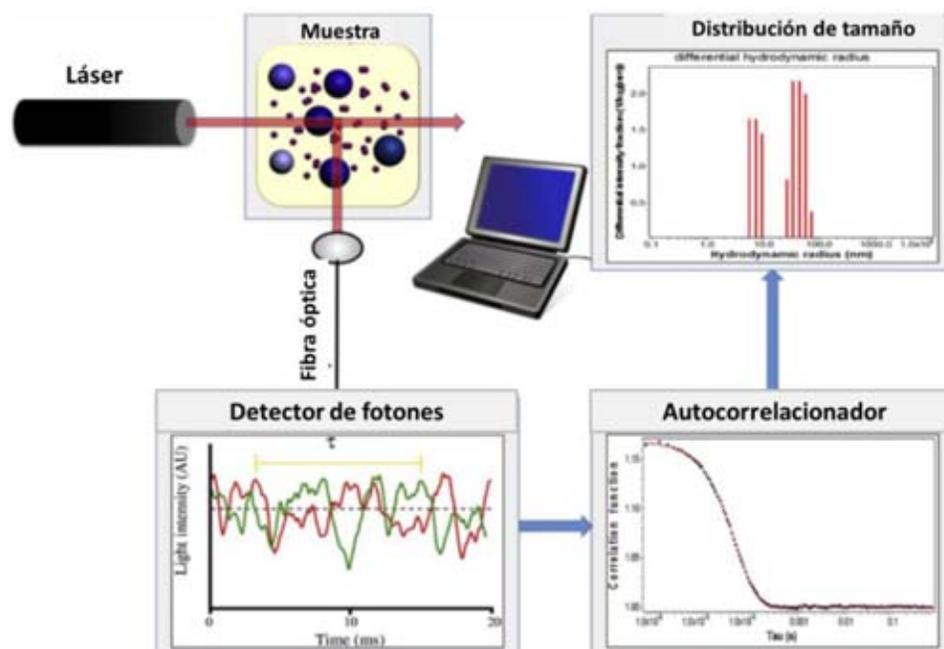


Figura 4. Esquema de la medición y análisis de la dispersión dinámica de luz. (Minton 2016)

1.8.2 Potencial zeta (ζ)

Debido a la gran magnitud del área superficial de las nanopartículas, se crea una alta energía superficial la cual es termodinámicamente poco favorable. Cada nanopartícula contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre las nanopartículas vecinas. Si la carga es suficientemente elevada las nanopartículas permanecen dispersas y en suspensión. Al reducir o eliminar estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión (Wu et al. 2011)

El potencial zeta está definido como el potencial eléctrico del plano de corte, el cual se genera en la doble capa eléctrica que rodea una partícula en un medio acuoso (Sides & Prieve 2016). Dicho potencial es un parámetro el cual puede predecir la estabilidad de una dispersión acuosa, en donde valores absolutos mayores a 60mV hablan de una excelente estabilidad de la dispersión, valores de 30 indican una buena estabilidad, mientras que

valores de 20 y hasta menos de 5 mV generalmente resultan en una buena estabilidad a corto plazo (Wu et al. 2011).

Para la medición del potencial zeta se utiliza la electroforesis Doppler con láser (LDE), cuyo fundamento radica en la aplicación de un campo eléctrico que genera un fenómeno de migración de partículas en solución según sea la carga eléctrica que posee la partícula, moviéndose hacia el electrodo de carga opuesta, la velocidad con la que migran se mide y se expresa en unidades de campo de fuerza como su movilidad. (Chávez, 2013)

Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de un electrolito, las partículas cargadas son atraídas hacia los electrodos a una velocidad constante que depende del gradiente del voltaje, la viscosidad del medio, el potencial zeta y la constante dieléctrica del medio. Conociendo la velocidad de la partícula en un campo eléctrico, es posible conocer el valor del potencial zeta de la partícula aplicando la ley de Henry. (Thomas et al. 2016)

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Donde:

Z: Potencial zeta

U_E : Movilidad electroforética

ε : constante dieléctrica

η : Viscosidad aparente

$f(ka)$: Función de Henry. Se utilizan dos valores: 1.5 aproximación de Smoluchowski (medio acuoso, partículas grandes) o aproximación de Huckel (medio no acuoso, partículas pequeñas)

1.8.3 Cuantificación de fármaco encapsulado.

Una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de fármacos es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés *High performance liquid chromatography*). Las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides y gran variedad de sustancias inorgánicas.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es comúnmente una columna con partículas porosas muy pequeñas (1-5 μm de diámetro), y la fase móvil es líquida la cual pasa a través de la columna con la ayuda de bombas que trabajan a alta presión. Los analitos se inyectan con la fase móvil en la parte superior de la columna cromatográfica. Mientras la fase móvil fluye a través de la columna, los analitos van saliendo de la columna los cuales pueden ser detectados por varios procedimientos dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas (absorción UV, índice de refracción, fluorescencia, entre otros) (Moldoveanu & David 2013).

2.0 JUSTIFICACIÓN.

La fenitoína es uno de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia. Aunque la biodisponibilidad del fármaco es mayor al 80%, su absorción es lenta debido a su baja solubilidad, esto aunado a la necesidad de que la fenitoína atraviese la barrera hematoencefálica (BHE) para ejercer su efecto terapéutico limitan su llegada al sitio de acción. Una estrategia comúnmente utilizada para evitar esta limitante es el empleo de nanopartículas lipídicas, por su composición este tipo de sistemas tienen la capacidad de atravesar membranas fácilmente debido a su reducida talla, así como atravesar la BHE. La capacidad de las SLN de atravesar la BHE, permitirían que una mayor cantidad de fármaco llegue al sitio de acción, por lo que se mejoraría el efecto anticonvulsivo, utilizando así menores dosis para obtener el mismo efecto lo que evitaría los efectos adversos que comúnmente se pueden presentar.

En este proyecto se llevará a cabo la fabricación de nanopartículas lipídicas sólidas y acarreadores lipídicos nanoestructurados cargadas de fenitoína para su posterior aplicación en pruebas preclínicas. Así mismo, se llevará a cabo la caracterización de los sistemas obtenidos, evaluándose el tamaño de partícula, potencial ζ y la cantidad encapsulada de fármaco. Adicionalmente se determinará el efecto que tiene el proceso de fabricación y almacenamiento sobre algunos de estos parámetros.

3.0 HIPÓTESIS.

Si es posible encapsular fenitoína en nanopartículas lipídicas sólidas con la cantidad suficiente para su uso como agente anticonvulsivo entonces se podrá obtener una alternativa para el tratamiento de trastornos epilépticos.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

- Fabricar nanopartículas lipídicas sólidas cargadas de fenitoína por el método de homogenización a alta fuerza de corte con la finalidad de obtener una alta eficiencia de encapsulación. Determinando el tamaño de partícula, potencial ζ , estabilidad, así como capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

4.2 Objetivos particulares.

- a) Proponer una formulación que permita la obtención de nanopartículas lipídicas sólidas por el método de homogenización a alta cizalla para la encapsulación de fenitoína.
- b) Determinar el tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz de los sistemas preparados con la finalidad de saber el efecto que tiene la proporción de lípido, agente estabilizante y tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula.
- c) Desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la cuantificación de la fenitoína encapsulada en SLN.
- d) Realizar la caracterización de SLN y NLC cargadas con fenitoína: Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz, potencial ζ por electroforesis capilar y cuantificación de fármaco encapsulado por HPLC, para determinar qué tipo de nanopartícula puede encapsular una mayor cantidad de fenitoína.
- e) Determinar la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación de los sistemas desarrollados por HPLC, con la finalidad de saber la cantidad máxima de fenitoína que el lípido a utilizar (Compritol) puede encapsular.
- f) Determinar el efecto de los procesos de centrifugación y liofilización, así como el efecto que tiene la utilización de un crioprotector a diferentes proporciones sobre el tamaño de partícula determinada por dispersión dinámica de luz.

5.0 MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 Materiales.

- Acetonitrilo HPLC, Fermont Lote: 549267
- Agua destilada obtenida de un sistema Elix® Millipore®
- Agua ultra pura obtenida de un sistema Milli-Q® Millipore®
- Alcohol polvinílico, Mowiol® 4-88, Aldrich Chemistry, Alemania. Lote BCBH5854V
- Compritol 888 ATO, Lyontec Químicos. Lote 134059
- Fenitoína (5,5- Difenilidantoina), Sigma Aldrich, Holanda. Lote: S60947V
- Manitol polvo, Baker, México. Lote: 39121
- Metanol HPLC, Fermont. Lote: 64216164.
- Triglicéridos de cadena media, Captex 355; Watson Phillips, México. Lote: 100730UT13

5.2 Equipos e instrumentos.

- Agitador Ultra-Turrax T25; IKA, Alemania.
- Balanza analítica BBC32; Boeco, Alemania.
- Columna analítica Waters C18 5µm 4.5X250mm
- HPLC Varian ProStar
- Liofilizadora, Labconco
- Nanosizer N4 Plus; Coulter Corporation, EE. UU.
- Parrilla eléctrica con agitación magnética Nouva™; Thermo Scientific, EE. UU.
- Ultracentrífuga preparativa Optima™ LE-80K; Beckman EE. UU.
- Zetasizer ZEN3600; Malvern Instruments, Reino Unido.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Fabricación de Nanopartículas.

6.1.1 Preparación de SLN.

Para la obtención de las SLN se preparó una disolución acuosa de PVA a la proporción establecida, la cual se calentó hasta 80°C para alcanzar la temperatura de fusión del lípido (Compritol). Posteriormente se pesó la cantidad adecuada de lípido el cual fue fundido también a 80°C. Una vez fundido el lípido, éste se adicionó a la fase acuosa (PVA) y con ayuda de un agitador de alta velocidad (Ultra-Turrax T25) se homogenizó la mezcla anterior a 11,000 rpm durante 5 minutos. En la figura 5 se encuentra la representación esquemática del proceso de preparación de las SLN.

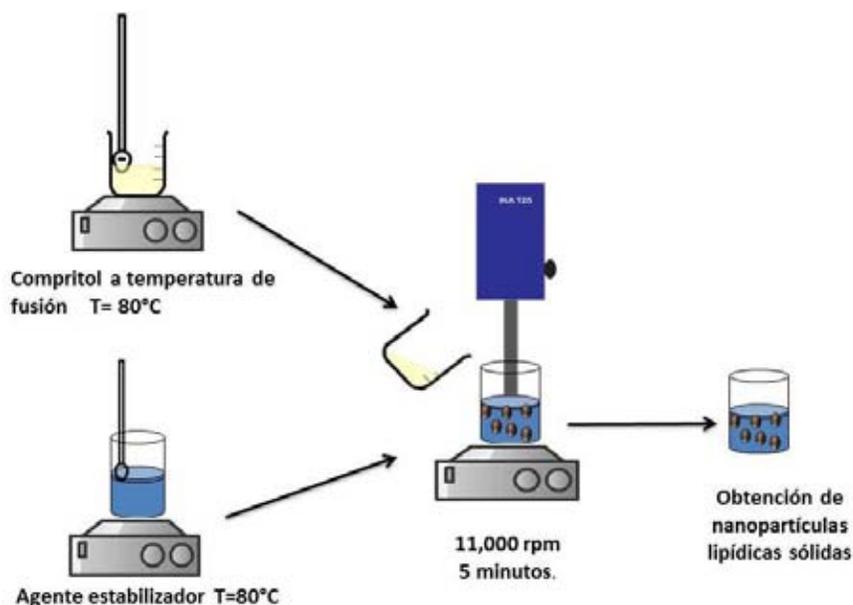


Figura 5. Preparación de SLN por el método de homogenización a alta cizalla

6.1.2 Formulación.

Se realizó la preparación de las SLN variando la concentración de estabilizante PVA a 1%, 2%, 3% y 5% a una concentración fija de Compritol (8%). Tomando en cuenta el menor tamaño de partícula se eligió la mejor concentración de PVA. Posteriormente se prepararon diferentes lotes variando la concentración de Compritol (4%, 6% y 8%) y así

determinar la mejor concentración de lípido para obtener el menor tamaño de partícula. Finalmente, utilizando las concentraciones ideales tanto de lípido como de estabilizante, se tomó una muestra de las SLN cada 5 minutos para determinar cuántos ciclos de 5 minutos son necesarios para obtener el menor tamaño de partícula posible. Una vez obtenida la mejor formulación se realizaron lotes de nanopartículas cargadas de fenitoína.

6.1.3 Preparación de NLC.

Con la formulación anterior se fabricaron acarreadores lipídicos nanoestructurados, en donde la fenitoína se adicionó al lípido líquido a utilizar (TGCM), éste se llevó a una temperatura de 80°C dicha mezcla se agregó al lípido sólido el cual se fundió a 80°C. Posteriormente, se agregó la fase oleosa a la fase acuosa para proceder a la homogenización del sistema.

6.2. Desarrollo de método analítico para la cuantificación de PHT

La cuantificación de la fenitoína se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC (Varian ProStar) con una columna C18 (tamaño de partícula de 5µm con dimensiones de 4.5X250mm).

Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de un anticonvulsivo (Fenitoína) en el cual se realizaron diversas pruebas para encontrar las condiciones óptimas para la cuantificación de dicho fármaco. Todas las pruebas fueron realizadas con una solución de fenitoína a una concentración de 300µg/ml. Como fase móvil se utilizó metanol, acetonitrilo y agua grado HPLC. Para encontrar la mejor mezcla de disolventes, se hicieron tres pruebas de combinación (Acetonitrilo: Metanol; Acetonitrilo: Agua; Metanol: Agua) todas a las mismas proporciones (50:50) y a la misma velocidad de flujo (0.8ml/min). Una vez encontrada la mejor mezcla de disolventes se realizaron pruebas variando la proporción de la mezcla, se utilizaron las siguientes proporciones (60:40; 65:35; 70:30 y 75:25) donde la mayor concentración es del disolvente orgánico, todas a la misma velocidad de flujo (0.8 ml/min) y con la misma mezcla de disolventes. Posteriormente, se realizaron pruebas a tres diferentes velocidades de flujo (0.6ml/min; 1ml/min y

1.4ml/min) con la finalidad de encontrar la mejor velocidad de flujo para obtener cromatogramas adecuados. Finalmente, se validó el método analítico desarrollado anteriormente.

6.3 Validación de método analítico

6.3.1 Linealidad

Se construyó una curva patrón de seis puntos por triplicado con las siguientes concentraciones: 1, 5, 20, 75, 150 y 200 µg/ml. Para cada curva se calculó el coeficiente de correlación. Donde R^2 debe ser mayor o igual a 0.98.

6.3.2 Precisión.

Se analizó por triplicado una concentración de 150 µg/ml de fenitoína. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el % CV. El % CV debe ser menor a 1.5%.

6.3.3 Repetibilidad

Se preparó por triplicado tres disoluciones de fenitoína que se encuentran dentro de la curva patrón (200, 75 y 20 µg/ml). Se obtuvieron las áreas de cada una de las series para calcular la concentración que representan. Se calculó también el CV, éste debe ser menor a 2%

6.3.4 Precisión intermedia

Se prepararon por quintuplicado tres disoluciones de fenitoína a concentraciones diferentes las cuales representan el 5%, 75% y 150% de la concentración mayor de la curva patrón (200 µg/ml). Se obtuvieron las áreas para cada una de las series en dos días diferentes y se calculó la concentración que representan. Posteriormente, se calculó el CV para cada una de las series, el cual debe ser menor a 2%.

6.3.5 Exactitud.

Se prepararon por quintuplicado tres disoluciones de fenitoína a las concentraciones de 300, 150 y 10 µg/ml, se obtuvieron las áreas de cada disolución para así calcular la concentración que representan. Posteriormente se calculó el % de recobro de cada una de las series. El % de recobro no debe ser menor a 98%.

6.3.6 Especificidad

Se preparó una disolución de fenitoína en metanol correspondiente a 20 µg/ml y una disolución de SLN cargadas de fenitoína para determinar si los componentes de las nanopartículas afectan en la medición del fármaco. Se compararon ambos cromatogramas, La adición de los componentes de las NP's no debe afectar el pico cromatográfico de la fenitoína.

6.3.7 Estabilidad

Para determinar la estabilidad del fármaco se determinó el área de una concentración conocida (200 µg/ml) a diferentes tiempos (1 día, 7 días, 3 meses, 6 meses y 8 meses), con la finalidad de determinar el tiempo en que la muestra puede almacenarse sin afectar su medición. Se calculó el % de recobro para cada determinación. El % de recobro no debe ser menor a 98%.

6.3.8 Límites de detección y cuantificación.

Para determinar los límites de detección y cuantificación se determinó la concentración que da la misma señal que el blanco (Metanol). Posteriormente se determinó el área del blanco diez veces. Se calculó la desviación estándar y se calcularon cada uno de los límites con la concentración anteriormente mencionada.

6.4 Caracterización de NP's

6.4.1 Determinación de tamaño de partícula.

El tamaño de partícula de los sistemas preparados se determinó utilizando el equipo Nanosizer. Se prepararon muestras de la suspensión obtenida diluidas en agua destilada con la finalidad de obtener una intensidad adecuada para la medición de las mismas. Las mediciones se realizaron por triplicado con un ángulo de dispersión de 90°.

6.4.2 Determinación de potencial ζ .

El potencial zeta de las suspensiones de SLN preparadas se determinó utilizando el equipo Zetasizer (ZEN3600, Malvern). Las muestras se diluyeron en agua destilada y las determinaciones se realizaron por triplicado a una temperatura de 25°C.

6.4.3 Cuantificación de fármaco encapsulado.

Los lotes preparados de SLN y NLC se centrifugaron con la finalidad de separar el exceso de PVA de las nanopartículas utilizando una ultracentrífuga preparativa (Optima™ LE-80K; Beckman) a 30,000rpm durante dos ciclos de 30 min c/u a 15°C en un rotor tipo 50.2 Ti, el producto obtenido se liofilizó durante 24 horas utilizando una liofilizadora (Labconco) para eliminar el agua del sistema y obtener un polvo. Se tomó una cantidad de dicho polvo y se disolvió en una cantidad adecuada de metanol. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de fenitoína encapsulada por el método anteriormente desarrollado y validado.

7.0 Resultados y Discusión.

7.1 Fabricación de NP's

7.1.1 Formulación

Una de las principales dificultades para el tratamiento de la epilepsia es lograr que el fármaco atraviese la barrera hematoencefálica (BHE), para así lograr los niveles terapéuticos deseados. Recientes estudios han demostrado que las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) pueden mejorar la absorción a través de la BHE y liberar el fármaco en su sitio de acción (Leyva-Gómez et al. 2014). En cuanto al tamaño de partícula, es importante obtener el tamaño más pequeño posible, debido a que se ha reportado que tamaños de partícula pequeños facilitan el paso a través de barreras biológicas (Wilczewska et al. 2012). Para encontrar la mejor formulación, se prepararon diferentes lotes de SLN donde se varió tanto la concentración de Compritol como de PVA.

Las diferentes formulaciones se encuentran en la tabla 3, a medida que se disminuye la concentración de PVA (F1-F4) el tamaño disminuye, debido a que el PVA es un polímero el cual forma redes, a mayor concentración de éste mayor será la cantidad de redes formadas, por lo tanto, el Compritol tendrá más dificultad de difundir a través de la dispersión. Un efecto similar se puede observar con la variación de la concentración de Compritol, donde a menor cantidad de lípido menor es el tamaño obtenido (F4-F6), esto se debe a la aglomeración de las partículas consecuencia de la gran cantidad adicionada de lípido, por lo que la mejor formulación para la preparación de SLN es la F6.

Tabla 3. Efecto de las concentraciones de lípido y estabilizante en el tamaño de partícula.

Formulación	% PVA (m/v)	% Compritol (m/v)	TP promedio (nm) ± DE (nm)	IP ± DE
F1	5	8	1785.9 ± 99.9	0.95± 0.01
F2	3	8	779.9 ± 13.5	0.56± 0.02
F3	2	8	775.0 ± 9.5	0.41±0.05
F4	1	8	757.4 ± 1.1	0.21± 0.02
F5	1	6	748.5 ± 20.61	0.88± 0.02
F6	1	4	674.0 ± 24.8	0.77±0.03

Para determinar si existe un efecto significativo al cambio de formulación se realizó un análisis de varianza (Anexo I, 11.1) donde se demostró que existe una diferencia significativa en el tamaño de partícula obtenido por las diferencias entre cada formulación. Por lo tanto, al utilizar una menor concentración tanto de PVA como de Compritol sí se obtiene una disminución en el tamaño de las partículas.

Las dispersiones de nanopartículas tienden a ser polidispersas, esto quiere decir que la distribución del tamaño así como de la forma es muy variable (Pecora 2000). El índice de polidispersión (IP) indica la distribución del tamaño de partícula, es por esto que se debe tomar en cuenta al obtener nanopartículas, para asegurar una distribución estrecha el valor de IP debe estar entre 0.1-0.25, ya que un valor arriba de 0.5 indica una distribución amplia. Igualmente, en la tabla 3 se tienen los valores de IP y aunque a menor concentración de Compritol menor es el tamaño de partícula el IP es mayor a 0.5, por lo que la distribución del sistema es amplia, es por esto que se necesita tomar en cuenta otro parámetro, el cual es el tiempo de agitación.

Para determinar el efecto del tiempo de agitación en el tamaño de partícula, así como en el IP, se tomó una muestra de SLN cada cinco minutos utilizando la F6 con la cual se obtuvo un tamaño reducido de partícula. Observando la tabla 4 se puede afirmar que a mayor tiempo de agitación, menor será el tamaño de partícula y menor será el IP, es decir la distribución de la dispersión es estrecha teniendo un valor final de 0.205. Una vez obtenidos estos resultados la formulación a utilizar será la F6.5 donde el tamaño obtenido fue de 386.8 nm con un IP de 0.205.

Tabla 4. Efecto del tiempo de agitación en el tamaño de partícula de las SLN.

F6	# Ciclos 5min. c/u	TP promedio (nm) ± DE (nm)	IP ± DE
F6.1	1	1108.0 ± 51.7	0.91 ± 0.01
F6.2	2	674.0 ± 24.8	0.77 ± 0.02
F6.3	3	526.2 ± 12.3	0.43 ± 0.07
F6.4	4	425.5 ± 9.1	0.36 ± 0.01
F6.5	5	386.8 ± 12.1	0.21 ± 0.01

Se realizó igualmente un análisis de varianza para determinar si el efecto del tiempo de agitación es significativo, en el anexo I, 11.2 se encuentra el análisis estadístico donde se demuestra que existe una diferencia significativa en el tamaño obtenido a diferentes tiempos de agitación. Esto se debe a que a mayor tiempo de agitación, las partículas estarán expuestas mayor tiempo al efecto de corte que se realiza utilizando el método de homogenización a alta fuerza de corte, lo que provoca una disminución del tamaño de partícula.

7.2 Desarrollo de método analítico

Para poder realizar la cuantificación del fármaco a utilizar (PHT) se desarrolló un método analítico por HPLC, donde a partir de bases teóricas se realizaron diversas pruebas para encontrar las condiciones óptimas para la cuantificación de dicho fármaco. Se utilizaron como disolventes acetonitrilo (MeCN), metanol (MeOH) y agua con la finalidad de encontrar la mejor mezcla de disolventes, se hicieron tres corridas (Figura 6) diferentes con cada una de las mezclas a las mismas proporciones y a una misma velocidad de flujo, para asegurar que la única variable sea el cambio de mezcla. Comparando las tres corridas en un mismo cromatograma, se puede afirmar que la mejor mezcla de disolventes es MeOH: Agua, ya que en dicha mezcla se obtiene un mejor pico.

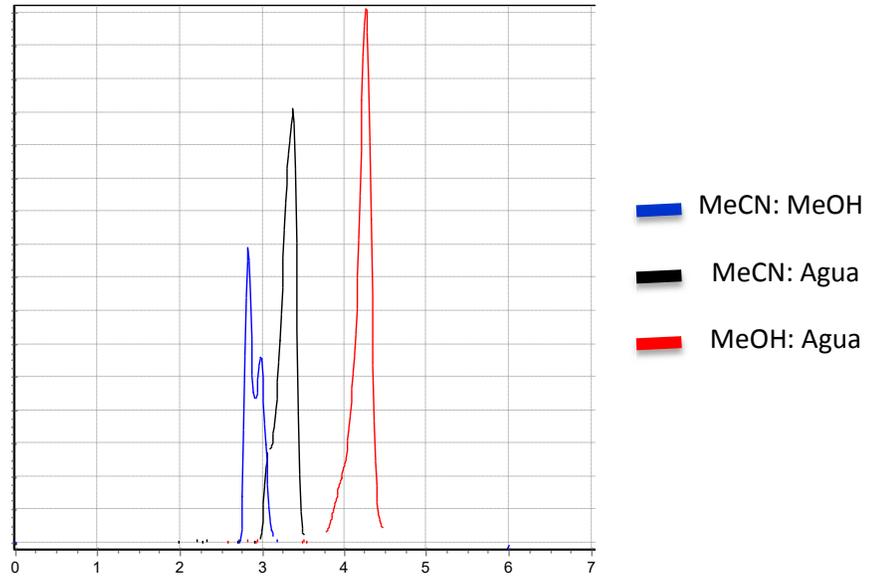


Figura 6. Cromatograma utilizando tres diferentes mezclas de disolventes (50:50) a 0.8ml/min

Una vez seleccionada la mejor mezcla de disolventes, se realizaron corridas variando la proporción de cada uno de los solventes (Figura 7). Al ser una columna de fase reversa, la fase estacionaria es no polar, a menor polaridad de la fase móvil mayor será la interacción de ésta con la fase estacionaria. El agua es más polar que el metanol, por lo tanto, ésta permanece menor tiempo interaccionando con la columna y debido a que la fenitoína es más afín al metanol a menor cantidad de metanol el tiempo de retención será mayor, ya que como se dijo el metanol interaccionará más tiempo con la columna reteniendo consigo el fármaco. Es por esto que se eligió la proporción de 75 MeOH: 25 agua.

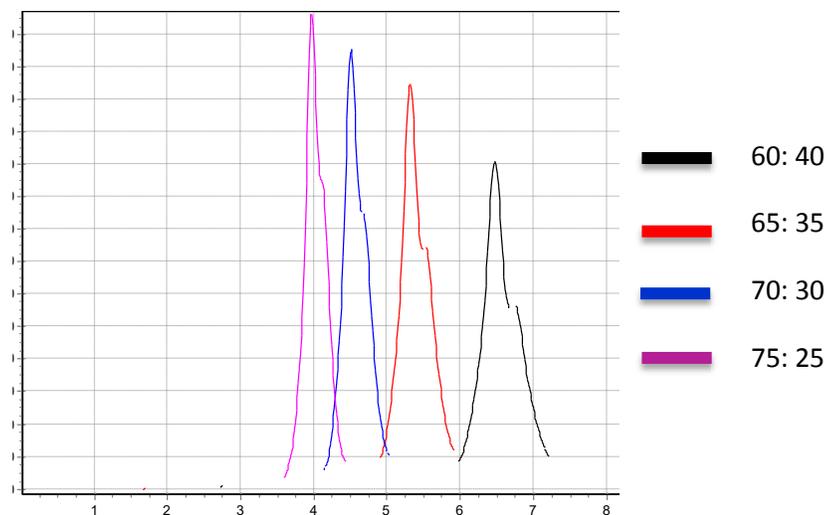


Figura 7. Cromatograma utilizando Metanol: Agua a diferentes proporciones a 0.8 ml/min

Una vez seleccionada la mejor mezcla de disolventes, así como la mejor proporción de éste se hicieron varias corridas cambiando el flujo de dicha fase móvil, en la figura 8 se muestran los diferentes picos a diferentes velocidades de flujo y se puede observar que a menor velocidad de flujo mayor será el tiempo de retención, esto se debe a que la fase móvil recorre la columna más lentamente y retiene el compuesto en la misma durante más tiempo. Por lo mismo a velocidades de flujo bajas (0.6 ml/min) el pico se empieza a descomponer debido a la competencia entre la fase móvil y la fase estacionaria por el fármaco a analizar. Por lo tanto, se eligió una velocidad de flujo de 1.0 ml/min, con la cual se obtienen tiempos de retención de 3.5 minutos.

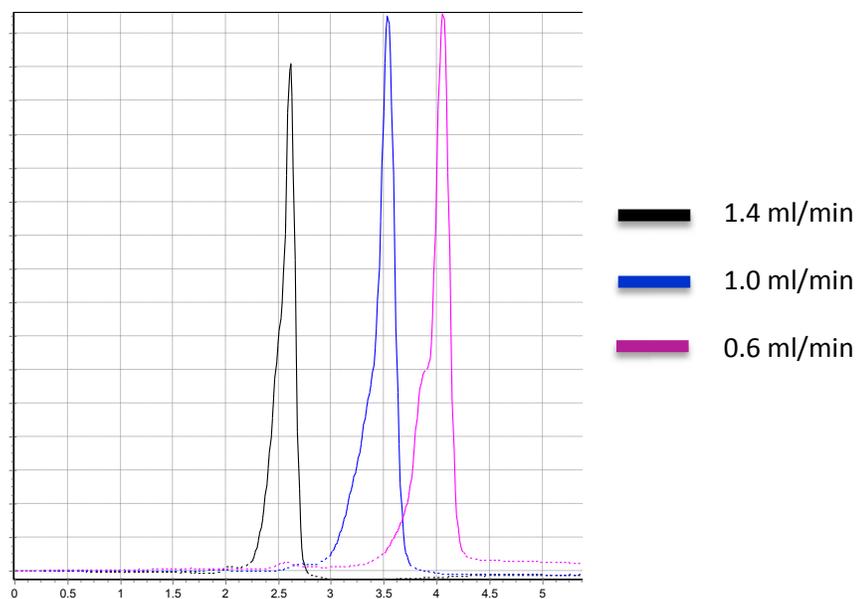


Figura 8. Cromatogramas a diferentes velocidades de flujo utilizando Metanol: Agua (75:25)

7.3 Validación del método analítico.

Se llevó a cabo la validación del método anteriormente desarrollado, con la finalidad de demostrar que éste es apto para la cuantificación de fenitoína en SLN. En la tabla 5 se muestran los resultados del estudio de la linealidad del método analítico, donde el criterio de aceptación establecido para este parámetro es un coeficiente de correlación mayor a 0.98. En dicha tabla se puede observar que los coeficientes calculados de cada una de las curvas, así como la del promedio cumplen con este criterio. La representación gráfica de la linealidad del método, así como la ecuación de la recta que será utilizada para la determinación de las concentraciones posteriormente evaluadas se encuentran en la Figura 9.

Tabla 5. Linealidad del método analítico.

Concentración [µg/ml]	Área bajo la curva (µAU.min)			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
200.0	135823.4	133808.0	134239.9	134623.8
150.0	103200.2	102278.2	103339.3	102939.2
75.0	52908.7	52878.0	52886.9	52891.2
20.0	13707.1	13711.3	13847.7	13755.4
5.0	3164.6	3142.4	3158.8	3155.3
1.0	734.2	751.8	727.9	738.0
m	682.1	672.9	676.5	677.2
b	315.8	516.4	514.0	448.7
r	0.9998	0.9996	0.9995	0.9996

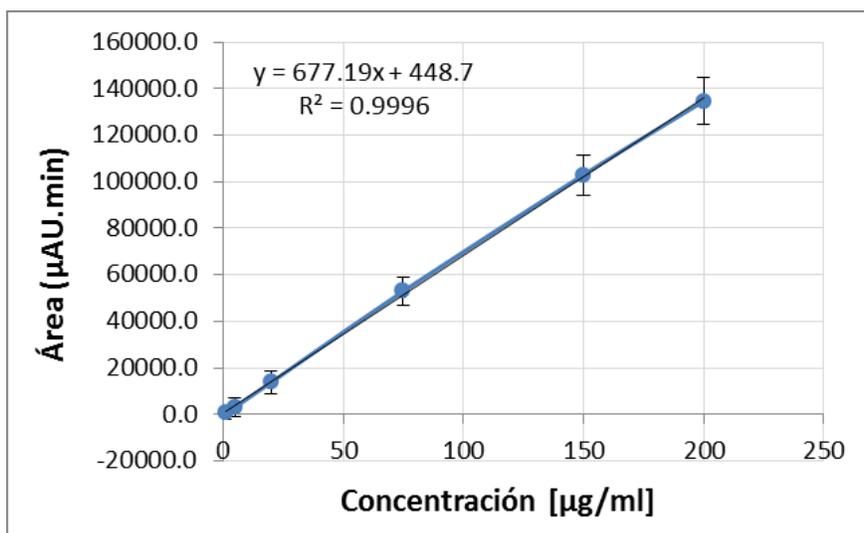


Figura 9. Linealidad del método analítico.

Para el estudio de precisión se obtuvo un coeficiente de variación (% CV) para todas las mediciones de tres muestras preparadas. El criterio de aceptación para este parámetro es $\% CV \leq 1.5\%$ al ser un método cromatográfico, en la tabla 6 se puede observar que el % CV obtenido se encuentra dentro del criterio de aceptación.

Tabla 6. Resultados del estudio de precisión.

Concentración nominal (150 µg/ml)			
Repetición	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	150.18	150.89	150.06
2	150.20	151.45	150.96
3	150.91	150.13	150.61
4	151.40	151.08	150.36
5	150.05	150.15	150.98
6	150.64	151.12	150.25
Promedio	150.62		
DE	0.47		
%CV	0.31		

La repetibilidad se determinó por medio del cálculo del % CV para tres diferentes niveles de concentración realizado por triplicado, para este parámetro el valor de % CV debe ser menor o igual a 2%. En la tabla 7 se encuentra el %CV obtenido para cada nivel de concentración y se puede observar que éste se encuentra dentro del criterio de aceptación, por lo tanto se puede decir que el método es repetible.

Tabla 7. Repetibilidad del método.

Concentración nominal (µg/ml)	Concentración experimental (µg/ml)					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio	DE	%CV
200.0	199.91	196.93	197.57	198.14	1.57	0.79
75.0	77.47	77.42	77.43	77.44	0.02	0.03
20.0	19.58	19.58	19.79	19.65	0.12	0.60

Con los resultados de precisión intermedia se calculó un solo coeficiente de variación correspondiente a las mediciones de los dos días diferentes de cada nivel de concentración, cada valor no debe ser mayor a 2%, observando la tabla 8 los tres valores de % CV son menores al criterio de aceptación.

Tabla 8. Resultados precisión intermedia

Repetición	Concentración (µg/ml)			Repetición	Concentración (µg/ml)		
	Día 1				Día 2		
	300	150	10		300	150	10
1	304.87	150.18	9.92	1	298.92	150.2	9.89
2	298.53	150.36	9.92	2	305.94	150.91	9.89
3	301.51	150.05	9.87	3	303.16	151.4	9.94
4	297.58	150.94	9.88	4	298.07	150.13	9.9
5	304.81	150.64	9.89	5	304.55	151.08	9.88
Concentración (µg/ml)							
	300	150	10				
Promedio	301.79	150.59	9.9				
DE	3.26	0.47	0.02				
%CV	1.08	0.31	0.23				

Para decir que el método es exacto el % de recobro no debe ser menor a 98 %, es por esto que se realizó la medición por quintuplicado de tres niveles de concentración. En la tabla 9 se encuentran los porcentajes de recobro obtenidos para cada nivel, los cuales están dentro del criterio de aceptación, por lo tanto se puede afirmar que el método es exacto.

Tabla 9. Resultados de la exactitud del método

Concentración nominal (µg/ml)	Concentración experimental (µg/ml)						%Recobro
	C1	C2	C3	C4	C5	Promedio	
300.0	298.53	297.58	298.92	303.16	304.55	300.55	99.82
150.0	150.18	150.36	150.94	150.64	151.40	150.71	99.53
10.0	9.87	9.88	9.89	9.94	9.88	9.89	98.94

La especificidad del método se determinó comparando los cromatogramas del analito y el analito más los componentes de las NP's, esto para observar si existe alguna interferencia de los componentes de las NP's en la medición del analito. En la figura 10 se encuentran ambos cromatogramas y como se puede observar la adición de los componentes de las NP's no afecta en la medición de la PHT, por lo tanto el método es específico para la medición de PHT.

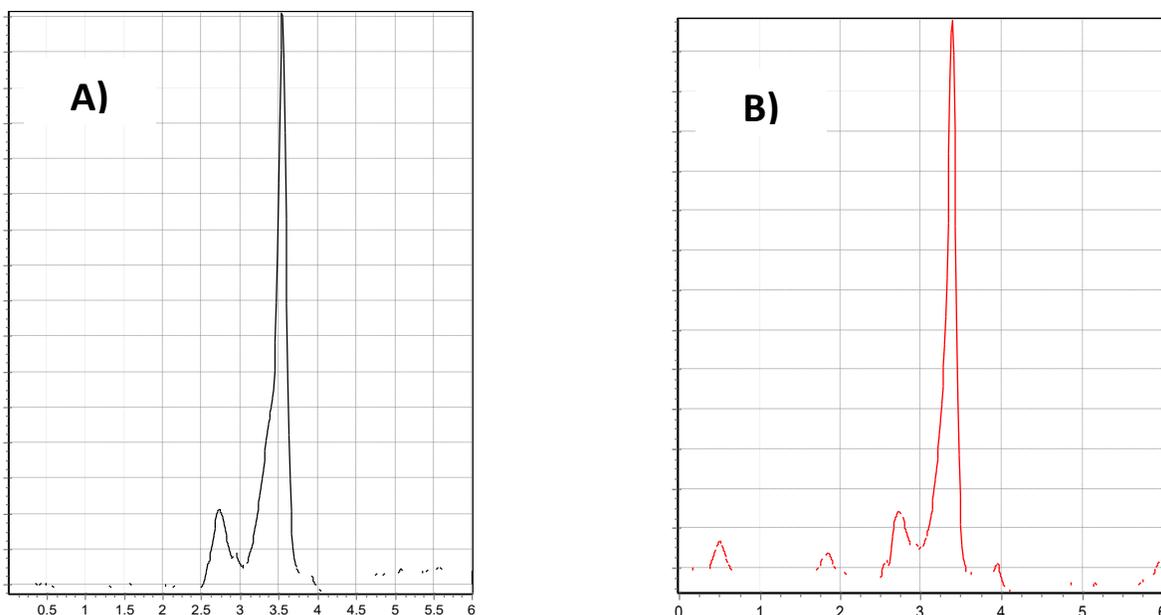


Figura 10. A) Cromatograma de la solución de PHT; B) Cromatograma de PHT más los componentes de las SLN

El almacenamiento de la muestra provoca la degradación del analito en este caso PHT, por lo tanto, se debe realizar un estudio de estabilidad para saber cuánto tiempo se puede almacenar la muestra sin afectar su medición, es por esto que se realizó la medición de una solución de PHT (200 $\mu\text{g/ml}$) a diferente tiempo determinando el % de recobro, éste al igual que en el estudio de exactitud no debe ser menor a 98 %. En la tabla 10 se puede observar que el tiempo máximo que se puede almacenar la muestra es no mayor a 3 meses, ya que después de este tiempo el analito se encuentra degradado a tal punto de afectar su medición.

Tabla 10. Determinación de la estabilidad de las soluciones de fenitoína a través del tiempo.

Concentración nominal (200 $\mu\text{g/ml}$)				
Tiempo (meses)	Área ($\mu\text{AU}\cdot\text{min}$)	Concentración experimental ($\mu\text{g/ml}$)	DE ($\mu\text{g/ml}$)	%Recobro
0.03	135921.9	200.05	0.63	99.97
0.2	133961.2	197.16	1.15	98.58
3	133557.2	196.56	0.76	98.28
6	124178.3	182.71	1.27	91.36
8	109514.4	161.06	1.34	80.53

La determinación tanto del límite de cuantificación como de detección se llevó a cabo mediante la respuesta analítica del blanco (MeOH) y la concentración de PHT a la cual se obtiene una respuesta analítica similar al blanco (0.70 µg/ml). Ambos límites son un cálculo en el que se utiliza la desviación estándar de la concentración obtenida del blanco donde:

$$LD = (\text{Concentración con respuesta similar al blanco}) + (3 * DE)$$

$$LC = (\text{Concentración con respuesta similar al blanco}) + (10 * DE)$$

En la tabla 11 se encuentran los valores obtenidos para cada uno de los límites, es decir la mínima cantidad que el método desarrollado puede detectar y cuantificar es 0.72 µg/ml y 0.77 µg/ml respectivamente.

Tabla 11. Determinación de los límites de cuantificación y detección del método.

Concentración experimental del blanco (µg/ml)	DE (µg/ml) blanco	Concentración con respuesta parecida al blanco (µg/ml)	LD (µg/ml)	LC (µg/ml)
0.67	0.01	0.70	0.72	0.77

7.4 Caracterización de NP's

Una vez obtenida la mejor formulación para la obtención de SLN, se fabricaron diferentes lotes para su caracterización. También se realizó la fabricación de NLC, dicho sistema necesita la adición de un lípido líquido, se utilizaron TGCM (Triglicéridos de cadena media) para su preparación. Tanto los NLC como las SLN fueron cargadas con fenitoína. Como se puede observar en la tabla 12 el tamaño de partícula de SLN aumentó respecto al tamaño de partícula obtenido sin adicionarle el fármaco (386.8 nm± 12.1 nm), esto se debe a la incorporación del fármaco en la matriz lipídica lo que provoca un aumento de tamaño (Laserra et al. 2015). Comparando entre los dos diferentes sistemas (SLN y NLC) el tamaño de los NLC es menor debido a la diferencia estructural entre ambos (Aditya et al. 2014).

Como se mencionó anteriormente el potencial zeta es un parámetro con el cual se puede predecir la estabilidad de una dispersión (Wu et al. 2011). Para decir que la dispersión tiene una buena estabilidad el valor absoluto del potencial zeta debe ser mayor o igual a 30mV, mientras que valores menores a éste hablan de una buena estabilidad a corto plazo. Igualmente, en la tabla 12 se encuentran los valores obtenidos de potencial zeta para cada uno de los sistemas, con los cuales se puede predecir que las SLN son más estables que los NLC.

Tabla 12. Comparación del tamaño de partícula y potencial ζ entre SLN y NLC.

Nanopartícula	TP (nm) \pm DE (nm)	ζ promedio \pm DE (mV)
SLN	428.2 \pm 22.6	-34.4 \pm 1.2
NLC	374.5 \pm 17.4	-25.4 \pm 1.1

Para afirmar lo anteriormente dicho, se realizó un estudio comparativo de estabilidad. Las características que resultan afectadas por la inestabilidad de las NP's son principalmente las propiedades físicas como el tamaño de partícula (Beloqui et al. 2016). Es por esto que el estudio se realizó midiendo el tamaño de partícula inicial y cómo se afecta éste al almacenar las NP's. En la figura 11 se encuentra una representación gráfica de la variación del tamaño de partícula a través del tiempo, como se predijo anteriormente las SLN son más estables al sólo aumentar 132nm en 18 días respecto al tamaño inicial, mientras que los NLC aumentaron 352nm en 18 días, es decir cerca del doble de su tamaño inicial.

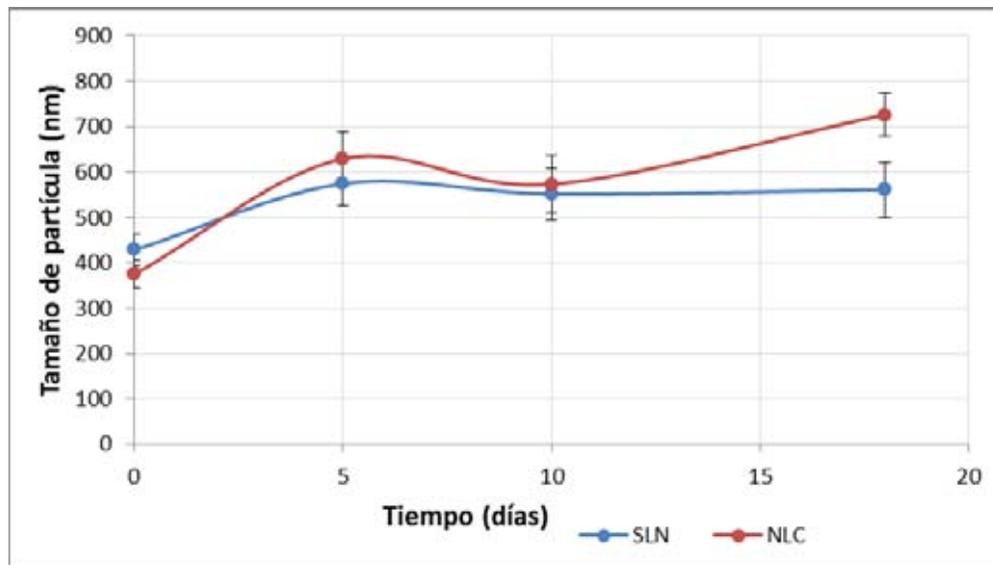


Figura 11. Estabilidad de SLN y NLC a través del tiempo.

Para determinar cuál es el tipo de nanopartícula capaz de encapsular una mayor cantidad de fármaco se determinó tanto la eficiencia de encapsulación (% EE) como la capacidad de carga (% CC) dichos parámetros fueron calculados con siguientes ecuaciones:

$$\% EE = \left(\frac{\text{Cantidad de fármaco encapsulada}}{\text{Cantidad de fármaco adicionada}} \right) * 100$$

$$\% CC = \left(\frac{\text{Cantidad de fármaco en SLN}}{\text{Cantidad de SLN}} \right) * 100$$

Con la finalidad de que la única variable entre ambos sistemas sea su diferencia estructural, se adicionó la misma cantidad de PHT tanto a las SLN como a los NLC. Teóricamente los NLC tienden a tener una mayor encapsulación del fármaco debido a la combinación de lípidos líquidos y sólidos. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 13 esto no sucede ya que las SLN encapsulan una mayor cantidad de PHT, esto se debe a la baja estabilidad de los NLC, ya que al ser una dispersión menos estable el fármaco puede ser expulsado fácilmente de la matriz lipídica.

Tabla 13. Comparación de la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación en SLN y NLC.

Nanopartícula	PHT adicionada (mg)	mg de PHT en 1g de NP's	%CC	%EE
SLN	60	3.090	0.309	5.150
NLC	60	1.790	0.018	2.650

7.5 Eficiencia de Encapsulación y Capacidad de carga de SLN

Debido a la baja estabilidad, así como baja capacidad de carga de los NLC comparado con las SLN, se decidió utilizar sólo SLN para los siguientes estudios.

La encapsulación del fármaco en la matriz lipídica se debe por la solubilidad del fármaco a utilizar en el lípido, al ser la fenitoína un fármaco poco soluble tanto en la fase acuosa como en la fase oleosa, se realizó un estudio en el que se adicionó diferentes cantidades de PHT para saber si la saturación del fármaco con el lípido resultaba en una mayor cantidad encapsulada (Tabla14).

Tabla 14. Determinación de la capacidad de encapsulación en las SLN así como la eficiencia de encapsulación.

PHT adicionada (mg)	mg de PHT en 1g de SLN	%EE ± DE	%CC ± DE
12	0.535	4.460 ± 0.110	0.054 ± 0.001
32	1.555	4.860 ± 0.079	0.156 ± 0.003
60	3.090	5.150 ± 0.075	0.309 ± 0.005
80	5.051	6.313 ± 0.035	0.505 ± 0.003
120	8.316	6.930 ± 0.079	0.830 ± 0.010
160	11.579	7.237 ± 0.045	1.160 ± 0.007
180	11.106	6.170 ± 0.079	1.110 ± 0.014

A menor cantidad de PHT adicionada es menos probable que el fármaco pueda ser encapsulado. Sin embargo, al adicionar una cantidad mayor de PHT éste tiene más probabilidad de ser encapsulado. Aun así, al agregar cada vez más cantidad de fármaco no

significa que se estará encapsulando más cantidad ya que el lípido tiene una máxima capacidad de carga, es decir, existe una máxima cantidad de fármaco que el lípido podrá encapsular.

En la figura 12 se puede observar que a medida que se aumenta la cantidad de PHT adicionada, la eficiencia de encapsulación aumenta, es decir, se está encapsulando una mayor cantidad. Sin embargo, se llega a un límite en donde la eficiencia de encapsulación empieza a disminuir. Esto no significa que a grandes cantidades de PHT se encapsula menos cantidad de la misma, lo que significa es que se ha adicionado una cantidad mayor a la que el lípido es capaz de encapsular.

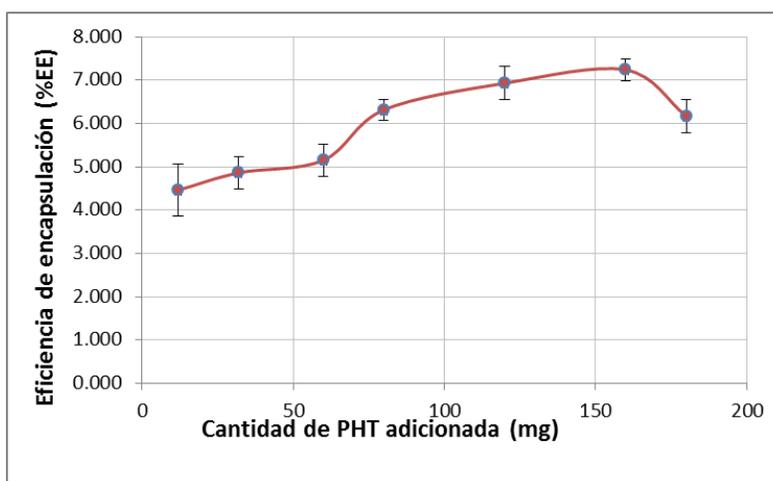


Figura 12. Eficiencia de encapsulación a diferentes cantidades de PHT.

Lo anteriormente dicho se puede ver claramente en la figura 13 donde la capacidad de carga aumenta también conforme se aumenta la cantidad de PHT adicionada, hasta que se llega al límite en donde, aunque se adicionen cantidades mayores de PHT el lípido ya no es capaz de encapsular una cantidad mayor. Por lo tanto, por cada gramo de Compritol se puede encapsular como máximo 11.1mg de PHT obteniendo una eficiencia de encapsulación de 7.2%.

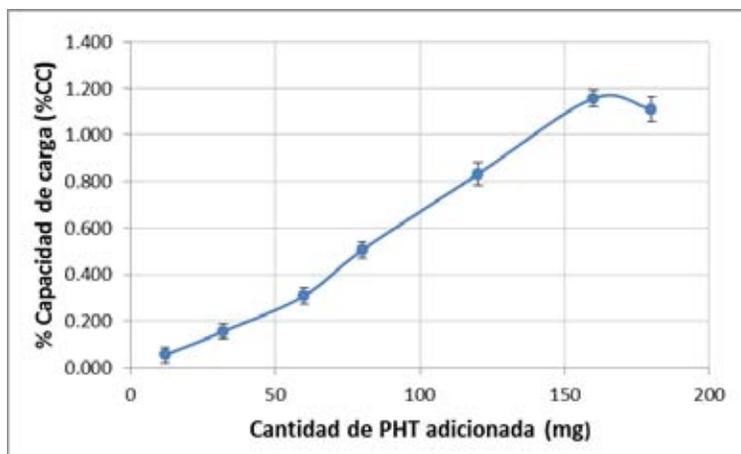


Figura 13. Capacidad de carga de las SLN.

Para poder utilizar PHT como agente anticonvulsivo, se necesita una dosis de mantenimiento de 5-7 mg/Kg. Tomando en cuenta la capacidad de carga de las SLN es posible realizar un estudio *in vivo*, en roedores de un peso entre 30-250g para los cuales se necesitaría una máxima cantidad de 100mg de SLN.

7.6 Efecto de la centrifugación y liofilización en el tamaño de partícula.

La liofilización es un proceso de deshidratación utilizado para mejorar la estabilidad de las nanopartículas en suspensión, incrementando el tiempo de vida de las nanopartículas así como facilitando su almacenamiento (Fonte et al. 2016).

Durante el proceso de liofilización, la muestra se congela para que se produzca la separación de hielo y un crio-concentrado el cual está compuesto de las nanopartículas así como otros componentes de la formulación. La alta concentración de las nanopartículas puede producir la agregación de las mismas. Además, la cristalización del hielo puede someter a las nanopartículas a una desestabilización (Abdelwahed et al. 2006). Por esta razón, existen excipientes utilizados para la protección de las nanopartículas, los cuales se llaman crio-protectores.

Al no utilizar un crio-protector el efecto de la liofilización en el tamaño de partícula es evidente al aumentar el tamaño de las SLN más de cinco veces respecto a su tamaño inicial (tabla 15), al igual que el tamaño el índice de polidispersión aumenta, por lo que la

distribución de las partículas es amplia, es decir, existen poblaciones de nanopartículas de diferentes tamaños.

Tabla 15. Determinación del tamaño de partícula antes y después de la liofilización.

NP's	Sin liofilizar			Liofilizadas		
	TP _i (nm)	DE (nm)	IP±DE	TP _L (nm)	DE (nm)	IP±DE
Vacías	386.8	12.1	0.21±0.05	1795.5	105.1	1.02±0.90
Cargadas	428.2	2.6	0.25±0.11	2376.6	205.9	1.75±0.25

Los crio-protectores más comunes son los azúcares como la trehalosa, sacarosa, glucosa y manitol. Los crio-protectores ayudan a la inmovilización de las nanopartículas lo que previene la agregación de las partículas, así como el estrés mecánico que los cristales de hielo provocan. Un reciente estudio demuestra que el manitol es un buen agente crioprotector comparado con la sacarosa, maltosa y glucosa (Kumar et al. 2016).

Como se explicó anteriormente, la adición de manitol ayudará a la inmovilización de las nanopartículas. Por lo tanto, a mayor cantidad de manitol mayor será la cantidad de SLN protegidas del efecto de la liofilización, es decir, a mayor concentración de manitol menor será el tamaño de partícula obtenido (figura 14). Posteriormente, se realizó un análisis de varianza, esto con la finalidad de determinar si la adición de diferentes concentraciones de manitol tiene un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, en el Anexo I, 11.3 se encuentra el análisis en el que se demuestra lo anteriormente dicho.

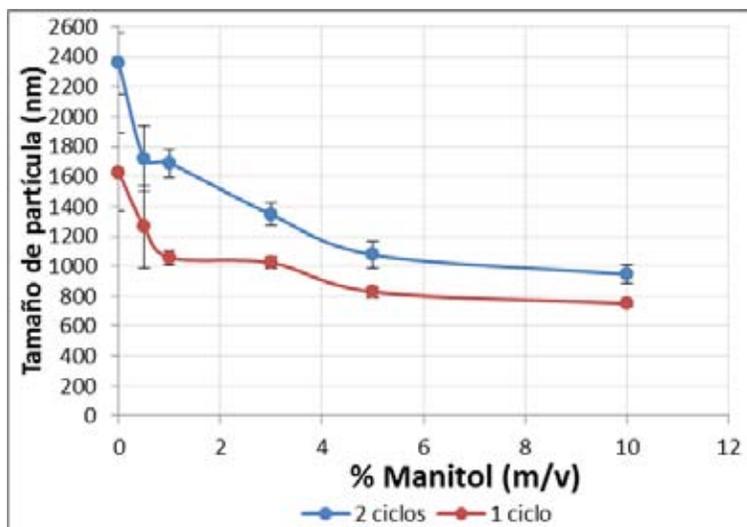


Figura 14. Efecto de la centrifugación y la cantidad de crioprotector en el tamaño de partícula.

Para poder separar las nanopartículas fabricadas del resto de los componentes de la formulación, se necesita de la centrifugación, en donde las partículas son separadas con base a su densidad. Al aplicarse una fuerza centrífuga sobre las nanopartículas éstas pueden formar agregados lo que provoque un aumento en el tamaño de partícula (Pshenichnikov et al. 2017). Por lo tanto entre más tiempo las nanopartículas sean sometidas a dicha fuerza, mayor será la formación de agregados y por consiguiente mayor será el tamaño de partícula.

Para afirmar esto se realizó la centrifugación de las SLN a 30 minutos y una hora con la misma cantidad de crio-protector con la finalidad de que la única variable sea el tiempo de centrifugación. En la tabla 16 se puede observar que como se predijo anteriormente, a mayor tiempo de centrifugación mayor es el tamaño de partícula obtenido después de la liofilización. Igualmente, para demostrar que el efecto del tiempo de centrifugación tiene un efecto significativo sobre el tamaño de partícula se realizó un análisis de varianza (Anexo I, 11.4).

Por lo tanto, para elegir la mejor concentración de manitol así como el tiempo de centrifugación se tomó en cuenta el menor tamaño de partícula obtenido así como un índice de polidispersión dentro de los valores deseados para poder decir que la población

de SLN obtenidas es estrecha. En la tabla 16 se puede observar que el menor tamaño obtenido fue de 737.3nm con un IP de 0.16, utilizando una concentración del 10% (m/v) de manitol con un tiempo de centrifugación de 30 minutos.

Tabla 16. Resultados del efecto de la centrifugación y la cantidad de crioprotector en el tamaño de partícula.

(30 min c/u)	2 CICLOS DE CENTRIFUGACIÓN			1 CICLO DE CENTRIFUGACIÓN		
	%Manitol (m/v)	TP (nm)	DE (nm)	IP±DE	TP (nm)	DE (nm)
0	2356.6	205.8	1.75±0.25	1627.3	260.3	0.88 ± 0.42
0.5	1720.2	220.3	1.26±0.95	1263.4	275.9	1.09 ± 0.23
1.0	1688.3	94.5	0.71± 0.39	1058.2	26.0	0.52 ± 0.03
3.0	1345.5	74.5	0.96±0.23	1024.3	17.2	0.57 ± 0.20
5.0	1076.9	91.6	0.71±0.57	828.4	36.4	0.37 ± 0.02
10.0	945.1	60.5	0.76±0.56	737.3	20.0	0.16 ± 0.02

Una vez elegida tanto la concentración de manitol necesaria como el mejor tiempo de centrifugación para obtener el menor tamaño de partícula posible, se fabricaron tres lotes diferentes usando las mismas condiciones, para así demostrar que el método es repetible (tabla 17). Con esto se puede afirmar que al utilizar manitol al 10% y centrifugando las muestras durante 30 minutos se obtiene un tamaño promedio de 752.3nm ± 12.7nm con un IP de 0.15 ± 0.01.

Tabla 17. Tamaño de partícula de tres diferentes lotes a una misma concentración de manitol (10%)

Medición	Tamaño de partícula (nm)			Índice de polidispersión (IP)		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1	759.7	784.1	740.9	0.16	0.13	0.14
2	730.9	737.9	772.8	0.19	0.19	0.15
3	721.2	741.4	772.3	0.15	0.12	0.14
Promedio	751.3			0.15		
DE	12.7			0.011		
%CV	1.7					

Con la adición de nuevos componentes a la formulación (manitol) se debe volver a realizar la medición del potencial zeta para determinar si estos nuevos componentes afectan la estabilidad de las nanopartículas. En la tabla 18 se puede observar la diferencia de potencial zeta antes y después de la adición del manitol y aunque el valor del potencial disminuye, sigue estando dentro de los valores necesarios para poder predecir una buena estabilidad de la resuspensión de SLN obteniendo un valor de 30.33 mV.

Tabla 18. Resultados del potencial ζ antes y después de la liofilización con 10% manitol.

	Sin liofilizar	Liofilizadas (10% manitol)
	ζ_i promedio \pm DE (mV)	ζ_L promedio \pm DE (mV)
SLN Cargadas	34.43 \pm 1.17	30.33 \pm 0.25

8.0 Conclusiones.

- a) Se desarrolló y validó satisfactoriamente un método analítico para la cuantificación de fenitoína, determinando que el método es lineal, preciso, repetible, exacto, específico para PHT y con límites de cuantificación y detección de 0.77 µg/ml y 0.72 µg/ml respectivamente.
- b) Se propuso una formulación para la obtención de SLN y NLC obteniendo un tamaño de partícula de 428.2 ± 22.6 nm y 374.5 ± 14.4 nm respectivamente
- c) Se caracterizó cada uno de los lotes fabricados tanto de SLN y NLC, demostrando que las SLN son más estables que los NLC y también pueden encapsular una cantidad mayor de PHT comparado con los NLC.
- d) A mayor cantidad de PHT adicionada aumenta la eficiencia de encapsulación, así como la capacidad de carga, hasta llegar al límite en donde 1g de lípido es capaz de encapsular 11.1 mg de PHT con una máxima eficiencia de encapsulación de 7.2%.
- e) La cantidad de PHT encapsulada en las nanopartículas es suficiente para dosificar y así realizar un estudio *in vivo* en roedores con un peso entre 30-250 g.
- f) Tanto la liofilización como el tiempo de centrifugación producen un aumento en el tamaño de partícula de aproximadamente cinco veces respecto al tamaño inicial.
- g) Para mantener la estabilidad de la resuspensión de SLN así como un tamaño de partícula adecuado, se necesita de la adición de manitol al 10% (m/v) antes de la liofilización.

9.0 Perspectivas

- a) Debido a la baja solubilidad de la Fenitoína tanto en soluciones acuosas como en lípidos se propone buscar más métodos que ayuden a la solubilidad del mismo, para así obtener mejores porcentajes de encapsulación.
- b) Ya que la encapsulación de la fenitoína en las SLN es suficiente para su aplicación como agente anticonvulsivo se propone proseguir con un estudio *in vivo* en roedores con un peso entre 30-250 g.
- c) Se propone también hacer estudios comparativos en donde se pueda verificar realmente si la administración del fármaco encapsulado en nanopartículas lipídicas mejora la biodisponibilidad del mismo.

10.0 BIBLIOGRAFÍA.

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713.

Aditya, N. P., Macedo, A. S., Doktorovova, S., Souto, E. B., Kim, S., Chang, P. S., & Ko, S. (2014). Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 115–121.

Alcayaga, J., Oyarce, M. P., & Del Rio, R. (2016). Chronic phenytoin treatment reduces rat carotid body chemosensory responses to acute hypoxia. *Brain Research*, 1649, 38–43.

Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2, 22–32.

Beloqui, A., Solinís, M. Ángeles, Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Préat, V. (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(1), 143–161.

Camacho O. E. A. Evaluación del uso de nanopartículas lipídicas sólidas como modificadores de las propiedades de recubrimientos farmacéuticos acuosos. (Tesis) UNAM, 2010.

Chávez R. D. S. Preparación y caracterización de clonazepam encapsulado en micelas mixtas y evaluación de su efecto en las crisis convulsivas inducidas con pentilentetrazol en ratones *Swiss webster*. (Tesis) UNAM, 2013.

Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., San Martín-Martínez, E., & Fernandez, J. Y. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Am. J. Phys. Educ*, 8(4), 1–5.

Ferreira, A., Rodrigues, M., Oliveira, P., Francisco, J., Fortuna, A., Rosado, L., Alves, G.

(2014). Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine, phenobarbital, phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10,11-epoxide and licarbazepine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 971, 20–29.

Fonte, P., Reis, S., & Sarmiento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 225, 75–86.

Gan, Q. W. (2005). Modulation of surfacecharge, particle size and morphological properties of chitosan-TPPnanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, 65–73.

Geszke-Moritz, M., & Moritz, M. (2016). Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Materials Science and Engineering C*, 68, 982–994.

Jose, S., Anju, S. S., Cinu, T. A., Aleykutty, N. A., Thomas, S., & Souto, E. B. (2014). In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1–2), 6–13.

Keck, C. M., Kovačević, A., Müller, R. H., Savić, S., Vuleta, G., & Milić, J. (2014). Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1–2), 33–41.

Kumar, L., Reddy, M. S., Verma, R., & Koteshwara, K. B. (2016). Selection of cryoprotective agent for freeze drying of valsartan solid lipid nanoparticles. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35(2), 284–290.

Kumar, S., & Randhawa, J. K. (2013). High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 33(4), 1842–1852.

Laserra, S., Basit, A., Sozio, P., Marinelli, L., Fornasari, E., Cacciatore, I., ... Di Stefano, A. (2015). Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl-memantine codrug: Preparation and

characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1–2), 183–191.

Leyva-Gómez, G., González-Trujano, M. E., López-Ruiz, E., Couraud, P. O., Wekslerg, B., Romero, I., Quintanar-Guerrero, D. (2014). Nanoparticle formulation improves the anticonvulsant effect of clonazepam on the pentylenetetrazole-induced seizures: Behavior and electroencephalogram. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(8), 2509–2519.

Maranhão, M. V. M., Gomes, E. A., & de Carvalho, P. E. (2011). Epilepsia e Anestesia. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 232–254.

Mehnert, W., & Mäder, M. (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83–101.

Minton, A. P. (2016). Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. *Analytical Biochemistry*, 501, 4–22.

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013). Basic Information about HPLC. *Essentials in Modern HPLC Separations*.

Mora-Huertas, C., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, 385, 113–142.

Neuberger, T., Schopf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & Rechenberg, B. von. (2005). Superpara-magnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Magn Mater*, 483–496.

Nevozhay, D. (2007). Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. *Postepy High Med Dows*, 13(2), 350–360.

Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1–2), 170–184.

Pecora, R. (2000). Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 123–131.

Pshenichnikov, A., Lebedev, A., Lakhtina, E., & Kuznetsov, A. (2017). Effect of centrifugation on dynamic susceptibility of magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 432, 30–36.

Santos, G. C. dos, Oliveira, R. de, Ribeiro, R., Leite, E., Lacerda, R., Ramaldes, G., & Oliveira, M. de. (2011). Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *J Liposome Res*, 21, 60–69.

Shah, K. A., Date, A. A., Joshi, M. D., & Patravale, V. B. (2007). Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1–2), 163–171.

Sides, P. J., & Prieve, D. C. (2016). On the streaming potential arising from flows having axial symmetry and the determination of zeta potential therefrom. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 24, 91–98.

Silva, R., Ferreira, H., & A, C.-P. (2011). Sonoproduction of liposomes and protein particles as templates for delivery purposes. *Biomacromolecules*, 12, 3353–3368.

Thakur, R., & Gupta, R. B. (2006). Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. *International Journal of Pharmaceutics*, 308(1–2), 190–199.

Thomas, T. E., Aani, S. Al, Oatley-Radcliffe, D. L., Williams, P. M., & Hilal, N. (2016). Laser Doppler Electrophoresis and Electro-osmotic Flow Mapping: a novel methodology for the determination of membrane surface zeta potential. *Journal of Membrane Science*, 523(October 2016), 524–532.

Villanelli, F., Giocaliere, E., Malvagia, S., Rosati, A., Forni, G., Funghini, S., ... la Marca, G. (2015). Dried blood spot assay for the quantification of phenytoin using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 440, 31–35.

Wang, X., & Patsalos, P. N. (2004). A comparison of central brain (cerebrospinal and extracellular fluids) and peripheral blood kinetics of phenytoin after intravenous phenytoin and fosphenytoin. *Seizure: The Journal of the British Epilepsy Association*, 13(2), 129–135.

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020–1037.

Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257–1272.

Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 456–469.

Xu, C., Cai, X., Zhang, J., & Liu, L. (2015). Fast nanoparticle sizing by image dynamic light scattering. *Particuology*, 19, 82–85.

11.0 ANEXO I

11.1 Resultados del análisis de varianza de las diferentes formulaciones

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	F_0	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	20475.036	4	5118.759	19.5146052	0.00010259	3.4780496
Dentro de los grupos	2623.04	10	262.304			
Total	23098.076	14				

H_0 : $\sigma_1 = \sigma_2$

H_1 : $\sigma_1 \neq \sigma_2$

$F_0 > F$ por lo tanto se rechaza H_0 para $\alpha = 0.05$

11.2 Resultados del análisis de varianza del efecto del tiempo de agitación.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	F_0	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1025901.92	4	256475.481	349.584522	1.0766E-10	3.4780496
Dentro de los grupos	7336.58	10	733.658			
Total	1033238.5	14				

H_0 : $\sigma_1 = \sigma_2$

H_1 : $\sigma_1 \neq \sigma_2$

$F_0 > F$ por lo tanto se rechaza H_0 para $\alpha = 0.05$

11.3 Resultados del análisis de varianza del efecto de la concentración de crioprotector.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1593127.91	5	318625.58	11.78	0.000272712	3.11
Dentro de los grupos	324619.773	12	27051.65			
Total	1917747.68	17				

H_0 : $\sigma_1 = \sigma_2$

H_1 : $\sigma_1 \neq \sigma_2$

$F_0 > F$ por lo tanto se rechaza H_0 para $\alpha = 0.05$

11.4 Resultados del análisis de varianza del efecto de la centrifugación.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	64771.26	1	64771.26	31.87	0.0048473	7.71
Dentro de los grupos	8128.45333	4	2032.11			
Total	72899.7133	5				

H_0 : $\sigma_1 = \sigma_2$

H_1 : $\sigma_1 \neq \sigma_2$

$F_0 > F$ por lo tanto se rechaza H_0 para $\alpha = 0.05$