



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Estudio Fisicoquímico de micelas poliméricas PEO-PPO-PEO
utilizadas para el aumento de la solubilidad del compuesto 2(N-(2-
hidroxifenil-2)-propilpentanamida)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

PRESENTA

CYNTHIA GIOVANA PADILLA BELTRÁN

ASESOR

XELHUA ELIHUT MARCOS BENITEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS

VOCAL: MA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SECRETARIO: XELHUA ELIHUT MARCOS BENITEZ

1er. SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO

2° suplente: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE BIO-FISICOQUÍMICA, EDIFICIO F-301

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. XELHUA ELIHUT MARCOS BENITEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUSTENTANTE:

CYNTHIA GIOVANA PADILLA BELTRÁN

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| Introducción | 2 |
| 1 Antecedentes..... | 4 |
| 1.1. Fármaco: 2(N-(2-hidroxifenil-2)-propilpentanamida) (VPA-F)..... | 4 |
| 1.2 Estado actual, logros y perspectivas futuras de las micelas poliméricas para administración de fármacos..... | 5 |
| 1.3 Importancia biológica de las micelas poliméricas..... | 6 |
| 1.3.1 Biodistribución | 6 |
| 1.3.2 Acumulación en tumores sólidos | 7 |
| 1.3.3 Estabilidad Micelar..... | 7 |
| 1.3.4 Tamaño y Distribución de micelas poliméricas | 7 |
| 1.3.5 Efecto de la temperatura | 9 |
| 1.4 Copolímeros Tribloque | 9 |
| 1.4.1 Síntesis, nomenclatura y propiedades físicas de los copolímeros de bloque 10 | |
| 1.4.2 Pluronic F-127 (Descripción) | 11 |
| 1.4.3 Pluronic P-123 (Descripción) | 12 |
| 1.5 Liberación de Fármacos | 13 |
| 1.5.2 Modelos de Cinética de Liberación de Fármacos..... | 13 |
| 1.6 Técnicas instrumentales de caracterización de sistemas micelares..... | 16 |
| 1.6.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)..... | 16 |
| 1.6.2 Técnicas para detectar la CMT | 17 |
| 1.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido | 20 |
| 1.6.4 Microscopía electrónica de transmisión | 23 |
| 2. HIPÓTESIS | 24 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 25 |
| 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 25 |
| 4 Materiales y Reactivos..... | 26 |
| 4.1 Materiales y Equipo | 26 |
| 4.2 Reactivos..... | 27 |
| 5 Metodología | 28 |
| 5.1 Caracterización Físicoquímica del fármaco | 28 |
| 5.1.1 Espectro UV-Visible de 2(N-(2hidroxifenil-2-propilpentanamida)..... | 28 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1.2 | Solubilidad en diferentes disolventes | 28 |
| 5.1.3 | Elaboración de una Curva Patrón | 28 |
| 5.1.4 | Solubilidad Intrínseca | 28 |
| 5.2 | Caracterización Fisicoquímica de micelas con y sin fármaco..... | 29 |
| 5.2.1 | Preparación de las soluciones Poliméricas. | 29 |
| 5.2.2 | Preparación de soluciones poliméricas con VPA-F..... | 29 |
| 5.3 | Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia | 29 |
| 5.4 | Determinación de tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DLS) . | 30 |
| 5.5 | Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) | 30 |
| 5.6 | Liberación del Fármaco (VPA-F)..... | 31 |
| 5.7 | Microscopia electrónica de Barrido | 32 |
| 6 | Resultados y Discusión..... | 33 |
| 6.1 | Caracterización Fisicoquímica del VPA-F | 33 |
| 6.1.2 | Espectro UV-Visible de 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida) | 33 |
| 6.1.3 | Solubilidad en diferentes disolventes | 34 |
| 6.1.4 | Relación H ₂ O-Etanol y elaboración de la curva patrón..... | 34 |
| 6.1.5 | Solubilidad Intrínseca y solubilidad en soluciones poliméricas de P123+H ₂ O y F127+H ₂ O | 37 |
| 6.2 | HPLC (Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) | 39 |
| 6.3 | Resultados de Tamaño de Partícula | 43 |
| 6.3.1 | Sistema P123+H ₂ O..... | 43 |
| 6.3.2 | Sistema F127+H ₂ O..... | 56 |
| 6.4 | Calorimetría Diferencial de Barrido | 64 |
| 6.5 | Liberación del VPA-F | 73 |
| 6.6 | Microscopia electrónica de Barrido y Microscopia electrónica de transmisión | 83 |
| 7 | CONCLUSIONES | 92 |
| 8 | BIBLIOGRAFIA..... | 93 |

INDICE DE FIGURAS

| N° Figura | Título | Página |
|-----------|---|--------|
| 1. | Síntesis del fármaco (VPA-F) | 4 |
| 2. | Derivados del ácido válproico | 4 |
| 3. | Micelas poliméricas nanoacarreadores de fármacos | 5 |
| 4. | Micelas poliméricas cargadas con fármaco | 8 |
| 5. | Síntesis de copolímeros de tribloque (PEO _a -PPO _b -PEO _a) | 10 |
| 6. | Estructura química de Pluronic F-127 | 11 |
| 7. | Estructura química de Pluronic P-123 | 12 |
| 8. | Ejemplo de resultados obtenidos por la técnica DLS | 17 |
| 9. | Microscopio electrónico de barrido (SEM) | 20 |
| 10. | Microscopio de transmisión (TEM) | 23 |
| 11. | Espectro de absorción en UV-visible para 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida) en agua | 33 |
| 12. | Espectro de absorción en UV-visible para 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida) en etanol-agua | 35 |
| 13. | Espectro de absorción en UV-visible para (VPA-F) en diferentes disolventes | 36 |
| 14. | Curva de calibración para (VPA-F) | 37 |
| 15. | Factor de aumento de solubilidad para las diferentes concentraciones de P-123 Y F-127 | 38 |
| 16. | Cromatograma de la solución (Etanol:Agua) | 39 |
| 17. | Cromatograma para P123+Agua | 40 |
| 18. | Cromatograma para F127-Agua | 40 |
| 19. | Cromatograma de VPA-F+Etanol | 41 |
| 20. | Cromatograma P123+VPA-F | 41 |
| 21. | Cromatograma F127+VPA-F | 42 |
| 22. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema P123+Agua a temperaturas 5, 10, 15 y 20 °C (Fig. 22 a, b, c y d) | 43 |
| 23. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema P123+Agua a temperaturas 35, 45, 55 y 60 °C (Fig. 23 e, f, g y h) | 47 |
| 24. | (DH) del sistema P123+Agua durante el barrido de temperatura (5°C – 60°C) | 49 |
| 25. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema P123+VPA-F a temperaturas 5, 10, 15 y 20 °C (Fig. 25 a, b, c y d) | 50 |
| 26. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema P123+VPA-F a temperaturas 35, 45, 55 y 60 °C (Fig. 26 e, f, g y h) | 52 |

| | | |
|-----|--|----|
| 27. | (DH) del sistema P123+VPA-F durante el barrido de temperatura (5°C – 60°C) | 55 |
| 28. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema F127+Agua a temperaturas 5 y 20 °C (Fig. 28 a y b) | 56 |
| 29. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema F127+Agua con el barrido de temperaturas (5°C – 60°C) | 58 |
| 30. | Gráficos de distribución de tamaño para el sistema F127+VPA-F a temperaturas 5, 20, 55 y 60 °C (Fig. 30 a, b, c y d) | 59 |
| 31. | (DH) del sistema F127+VPA-F durante el barrido de temperatura (5°C – 60°C) | 62 |
| 32. | Potenciogramas de los sistemas P123+Agua y P123+VPA-F (A una concentración de 0.5% m/m) | 64 |
| 33. | Potenciogramas de los sistemas F127+Agua y F127+VPA-F (A una concentración de 0.5% m/m) | 65 |
| 34. | Parámetros termodinámicos (CMT, Tm) para el sistema P123+Agua, en una concentración del 0.5% m/m | 65 |
| 35. | Parámetros termodinámicos (CMT, Tm) para el sistema F127+Agua, en una concentración del 0.5% m/m | 66 |
| 36. | Potenciogramas del sistema P123+VPA-F (A una concentración de 0.5% m/m) | 69 |
| 37. | Potenciogramas del sistema F127+VPA-F (A una concentración de 0.5% m/m) | 69 |
| 38. | Potenciogramas del sistema P123+VPA-F (A una concentración de 1% m/m) | 70 |
| 39. | Potenciogramas del sistema F127+VPA-F (A una concentración de 1% m/m) | 70 |
| 40. | Potenciogramas del sistema P123+VPA-F (A una concentración de 5% m/m) | 71 |
| 41. | Potenciogramas del sistema F127+VPA-F (A una concentración de 5% m/m) | 71 |
| 42. | Perfiles de liberación de las soluciones poliméricas con fármaco en buffer fosfatos | 73 |
| 43. | Perfil cinéticos de liberación Korsmeyer-Peppas del sistema P123-VPA-F | 75 |
| 44. | Perfil cinético de liberación Weibul del sistema P123-VPA-F | 75 |
| 45. | Perfil cinético de liberación Logistic del sistema P123-VPA-F | 76 |
| 46. | Perfil cinético de liberación Gompertz del sistema P123-VPA-F | 76 |
| 47. | Perfil cinéticos de liberación Probit del sistema P123-VPA-F | 77 |
| 48. | Perfil cinéticos de liberación Korsmeyer-Peppas del sistema F127-VPA-F | 79 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 49. | Perfil cinéticos de liberación Weibull del sistema F127-VPA-F | 80 |
| 50. | Perfil cinéticos de liberación Logistic del sistema F127-VPA-F | 80 |
| 51. | Perfil cinéticos de liberación Gompertz del sistema F127-VPA-F | 81 |
| 52. | Perfil cinéticos de liberación Probit del sistema F127-VPA-F | 81 |
| | Microcopia del sistema F127+Agua: | |
| 53. | 53a) Utilizando la técnica de TEM | 83 |
| | 53b) Utilizando la técnica de SEM | |
| 54. | Microcopia del sistema P123+Agua utilizando la técnica de SEM | 84 |
| 55. | Microcopias del sistema P123+VPA-F utilizando la técnica de TEM (a y b) | 85 |
| 56. | Microcopias del sistema F127+VPA-F utilizando la técnica de TEM (a, b, c, d, e y f) | 86 |
| 57. | Microcopias del sistema P123+VPA-F utilizando la técnica de TEM (a, b, c y d) | 89 |

INDICE DE TABLAS

| N° Tabla | Título | Página |
|-----------------|--|---------------|
| 1. | Mecanismos de transporte de fármacos | 14 |
| 2. | Ventajas y desventajas de materiales para recubrimientos de muestra no conductoras | 22 |
| 3. | Soluciones poliméricas con y sin fármaco para medición del DLS | 30 |
| 4. | Prueba de solubilidad del VPA-F en distintos disolventes | 34 |
| 5. | Observaciones de aumento de la cantidad de etanol a una solución de VPA-F en agua | 35 |
| 6. | Resultados de absorbancias promedio de la curva patrón | 36 |
| 7. | Solubilización máxima del (VPA-F) y porcentaje de encapsulación eficaz | 38 |
| 8. | Diámetros hidrodinámicos para el sistema P123+Agua | 48 |
| 9. | Diámetros hidrodinámicos para el sistema P123+VPA-F | 54 |
| 10. | Diámetros hidrodinámicos para el sistema F127+Agua | 58 |
| 11. | Diámetros hidrodinámicos para el sistema F127+VPA-F | 61 |
| 12. | Parámetros termodinámicos para los sistemas P123 Y F127 con y sin fármaco a diferentes concentraciones | 72 |
| 13. | Parámetros calculados a partir del ajuste no lineal con los modelos de liberación del sistema P123+VPA-F | 77 |
| 14. | Parámetros calculados a partir del ajuste no lineal con los modelos de liberación del sistema F127+VPA-F | 82 |



| | |
|---|----------------------|
| Histona deacetilasa | HDAC |
| Ácido valproico | VPA |
| Ácido hidroxámico suberoilánilida | SAHA |
| Óxido de etileno | EO |
| Óxido de propileno | PO |
| 2(N-(2-hidroxifenil-2-propilpentanamida) | VPA-F |
| Pluronic F127 | F127 |
| Pluronic P123 | P123 |
| Dispersión dinámica de luz | DLS |
| Cromatografía líquida de alta eficiencia | HPLC |
| Sistema reticuloendotelial | RES |
| Concentración de asociación crítica | C.A.C |
| Concentración micelar crítica | C.M.C |
| Temperatura de micelización crítica | C.M.T |
| Permeación y retención | E.P.R. |
| Multiresistencia a los fármacos | M.D.R. |
| Copolimero de bloques pluronic | P.B.C. |
| Diámetro hidrodinámico | DH |
| Porcentaje de encapsulación eficaz | EE% |
| Microscopio de luz | MO |
| Microscopio Electrónico de transmisión | MET |
| Microscopio electrónico de barrido | MEB |
| Coefficiente de correlación | R² |

Suma de cuadrados

SSR

Tubo de rayos catódicos

TRC

Espectrómetro de dispersión de energía

EDS

Ecuación

E_c

RESUMEN

El fármaco 2(N-(2-hidroxifenil-2)-propilpentanamida) diseñado *in silico* es un fármaco que muestra propiedades fisiológicas contra el cáncer de mama triple negativo [1]. Sin embargo su baja solubilidad en agua disminuye su eficacia terapéutica. Como alternativa a esta problemática se usaron micelas poliméricas de copolimeros tribloque poli óxido de etileno - poli oxido de propileno - poli óxido de etileno (PEO_a-PPO_b-PEO_a; a=20, b=65 (P123); a=100, b=65 (F127)) que ayudan a aumentar la solubilidad del fármaco en agua y por tanto mejora la biodistribución en el organismo.

En este trabajo se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de los complejos formados entre la micela polimérica y el fármaco (F127+VPA-F, P123+VPA-F). Se evaluó el aumento de la solubilidad en agua del VPA-F con las micelas poliméricas, logrando aumentarla 17 veces con micelas de P123 y 12 veces en micelas de F127. Después se estudió la estabilidad de los sistemas con respecto a la temperatura determinando el diámetro hidrodinámico (DH), encontrando tamaños de alrededor de 30 nm para las micelas cargadas con fármaco, estables a temperaturas entre 22°C-60°C en ambos casos. La morfología de los agregados se confirmó mediante Microscopia electrónica de Barrido (SEM) y Microscopia electrónica de Transmisión (TEM). La interacción micela-fármaco se estudió mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), encontrando que la entalpia de agregación (ΔH_{agg}) disminuye por la presencia del VPA-F. Por último se determinaron los perfiles de liberación *in vitro* donde ambos sistemas se ajustaron al modelo farmacocinético de Weibull, indicando que el fármaco libera de manera sostenida. Con los resultados obtenidos se concluye que las micelas poliméricas aumentan la solubilidad del VPA-F formando agregados estables. Ambos sistemas poseen propiedades fisicoquímicas similares, capaces de albergar y liberar el VPA-F.

Introducción

El carcinoma de mama constituye la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres, es un problema creciente de salud pública donde las células de la mama se multiplican sin control. El cáncer es el resultado de las mutaciones, o cambios anómalos, en los genes que regulan el crecimiento de las células. Normalmente, las células del cuerpo se renuevan mediante un proceso específico llamado crecimiento celular: las células nuevas y sanas ocupan el lugar de las células viejas que mueren. Pero con el paso del tiempo, las mutaciones pueden “activar” ciertos genes y “desactivar” otros en una célula. La célula modificada adquiere la capacidad de dividirse sin ningún tipo de control u orden, por lo que produce más células iguales y genera un tumor. [1]

Las alteraciones epigenéticas están asociadas con el cáncer, por lo cual el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos ha incrementado rápidamente en los últimos años. Entre los fármacos epigenéticos actuales están los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC), los cuales inducen cambios en la expresión génica que pueden conducir a la muerte celular en los tumores. El ácido valproico (VPA) es un inhibidor de HDAC que tiene actividad antitumoral. Sin embargo se sabe que el VPA es un fármaco hepatotóxico. Por lo tanto se ha diseñado un conjunto de derivados de VPA añadiendo el núcleo arilamida del ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) con diferentes sustituyentes en su grupo carboxilo, el compuesto 2(N-(2-hidroxifenil-2)-propilpentanamida) (VPA-F) es un ejemplo de fármacos diseñados vía computacional que muestran propiedades biológicas contra el cáncer humano difícil de tratar como el cáncer de mama triple negativo (lleva su nombre por la ausencia de expresión de receptores de estrógenos, progesterona y Her2-Neu) . Este tipo de compuestos por lo general tiene una baja solubilidad en agua disminuyendo su biodisponibilidad en el cuerpo. [2]

Las micelas de copolímeros de bloques, son sistemas de escala nanométrica con capacidad de transporte de fármacos. Tienen varias ventajas, tales como la liberación controlada del fármaco, la capacidad de penetración del tejido y una reducida toxicidad tal como el síndrome mano-pie (efecto secundario de algunos tratamientos para el cáncer generando enrojecimiento, hinchazón y dolor en las palmas de las manos y/o las plantas de los pies), y la reacción de hipersensibilidad. Por lo tanto, las micelas poliméricas son sistemas portadores de fármacos basados en nanotecnología que pueden ejercer la actividad de potentes componentes bioactivos de forma dirigida, garantizando su eficacia y seguridad en el uso clínico. [3], [4]

Se han estudiado micelas formadas por copolímeros de tribloque, poli óxido de etileno (PEO) – poli óxido de propileno (PPO) – poli óxido de etileno (PEO), (PEO_a-PPO_b-PEO_a). Las cuales tienen la capacidad de auto ensamblarse en soluciones acuosas a concentraciones por arriba de su CMC, formando agregados multimoleculares con morfologías esféricas (micelas).

El núcleo hidrofóbico de tales agregados sirve como un microambiente para la incorporación de compuestos lipófilos, mientras que la corona hidrofílica mantiene la estabilidad de dispersión de los agregados. Por lo tanto, la incorporación no covalente de los fármacos en el núcleo PPO hidrófobo de las micelas, da como resultado un aumento en la solubilidad del fármaco y en el tiempo de circulación.
[4]

Este proyecto muestra el estudio del aumento de solubilidad del compuesto 2(N-(2-hidroxifenil-2)-propilpentanamida) con actividad anticancerígena, utilizando micelas poliméricas de copolímeros tribloque, Pluronic (F-127) y (P-123) los cuales son biocompatibles y económicos, además de ser ampliamente utilizados como nano acarreadores de compuestos hidrofóbicos.

1.2 Estado actual, logros y perspectivas futuras de las micelas poliméricas para administración de fármacos.

Las micelas muestran diversas características de interés como: tamaño de partícula, estabilidad térmica, capacidad de carga y cinética de liberación de fármacos, pueden ser moduladas por las estructuras y propiedades fisicoquímicas de los copolímeros de bloques constituyentes. [4]

Un ejemplo del uso y las características de las micelas poliméricas se ilustra en la Figura 3. En la que se muestra cómo diferentes compuestos pueden ser albergados en el centro hidrofóbico. El centro se forma debido al carácter anfifílico de los copolímeros que se ensamblan espontáneamente en micelas poliméricas tanto en medios acuosos como orgánicos. Las micelas poliméricas tienen una estructura núcleo-envoltura que sirve como nano-acarreador de fármacos hidrófobos, está rodeada por una capa exterior del bloque hidrofílico del polímeros tales como poli (etilenglicol) (PEG). [4]

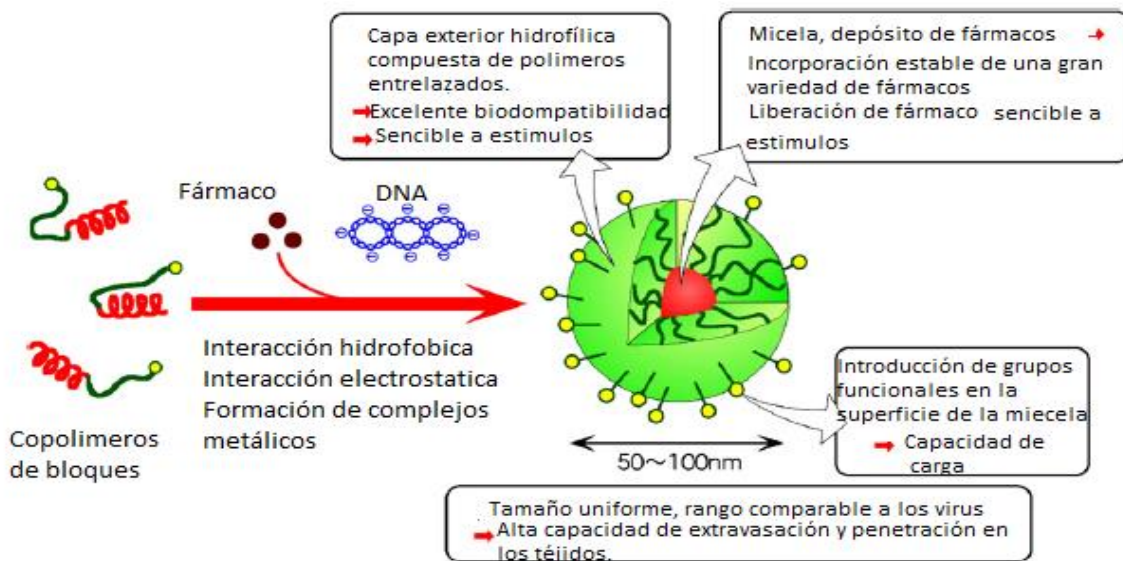


Figura 3. Micelas poliméricas como nano acarreadores inteligentes para la administración de fármacos y genes. [4]

1.3 Importancia biológica de las micelas poliméricas

1.3.1 Biodistribución

El objetivo principal de usar micelas poliméricas como vehículo de fármacos es regular la liberación del fármaco en el organismo con el objetivo de mejorar la eficacia terapéutica, por lo que es muy importante la adecuada incorporación de fármacos para lograr una prolongada circulación sanguínea de las micelas. Los portadores poliméricos son entregados al sitio blanco a través del torrente sanguíneo donde el proceso de extravasación se considera generalmente lento. Sin embargo, hay varios obstáculos para la larga circulación de los portadores poliméricos, que incluyen la excreción glomerular por el riñón y el reconocimiento por el sistema reticuloendotelial (RES) localizado en el hígado, el bazo y el pulmón.

Por otra parte, el reconocimiento de RES puede ser evitable diseñando portadores poliméricos que tengan un tamaño menor de 200 nm, así como una excelente biocompatibilidad. [4]

Las micelas poliméricas se caracterizan por un tamaño micelar entre 20-30 nm. Los copolímeros de bloques constituyentes son excretados en la orina debido a que su masa molar es inferior al umbral de filtración glomerular, lo que sugiere que las micelas poliméricas tienen un bajo riesgo de acumulación crónica en el cuerpo. [4]

El beneficio de las propiedades farmacocinéticas que se derivan de la encapsulación de fármacos en micelas poliméricas es doble. En primer lugar, evitando la eliminación prematura y el aclaramiento, se consigue un apreciable aumento en el tiempo de circulación del fármaco en la sangre. En segundo lugar, junto con la entrega precisa de fármacos a los tejidos diana, la dosis administrada puede reducirse; evitando así toxicidad en órganos no específicos (por ejemplo cardiotoxicidad inducida por doxorubicina) asociadas con la alta exposición a agentes citotóxicos. [6]

1.3.2 Acumulación en tumores sólidos

En cuanto a la actividad antitumoral, las micelas poliméricas pueden encapsular una elevada cantidad de fármacos incluyendo fármacos muy hidrófobos, la liberación del fármaco se lleva a cabo de una manera sostenida o específica del sitio. Se ha demostrado que los sistemas poliméricos nano acarreadores de circulación larga pueden acumular preferencial y efectivamente en tumores sólidos. Este fenómeno se explica por la hiperpermeabilidad micro vascular a las macromoléculas circulantes y se denomina el efecto "permeabilidad y retención mejoradas". [4]

1.3.3 Estabilidad Micelar

Para que una micela sea termodinámicamente estable cuanto mayor sea la concentración de copolímero, menor será la temperatura requerida para alcanzar la formación de micelas.

La corona de las micelas poliméricas se compone de la porción hidrófila del copolímero la cual actúa como una interface de estabilización entre el núcleo de la micela y el medio externo, el bloque de formación de la corona es poli (óxido de etileno), sólido cristalino no iónico y soluble en agua cuya función es aumentar la biocompatibilidad y mejorar la estabilidad coloidal, efecto conocido como estabilización estérica (limita la interacción con otras micelas) lo cual conduce a la agregación. [7]

1.3.4 Tamaño y Distribución de micelas poliméricas

El tamaño y su distribución son propiedades importantes de las micelas poliméricas. El tamaño de una micela polimérica depende de varios factores incluyendo la masa molar del copolímero, la proporción relativa o longitud de bloques hidrófobos e hidrófilos, la capacidad de carga de fármaco (concentración) y parámetros ambientales tales como la temperatura y el número de agregación de micelas. [8]

Las distribuciones de gran tamaño, que a menudo surgen de la auto-agregación de micelas individuales en solución, son un problema común para muchos sistemas micelares poliméricos, típicamente se encuentran en el intervalo de tamaño de 20-200 nm, y son lo suficientemente grandes para evitar la eliminación prematura mediante filtración glomerular en los riñones, pero son lo suficientemente pequeñas para entrar en los vasos sanguíneos, y para aumentar

la permeación y retención (EPR), efecto de acumulación pasiva en los tejidos tumorales.

A nivel celular, el pequeño tamaño de las micelas cargadas de fármaco no sólo facilita la captación, sino que también proporciona una vía alternativa de internalización a través de la vía endosomal, para eludir los mecanismos de reflujo de fármacos asociados con la multi-resistencia a los fármacos (MDR). [4]

Por ejemplo, las partículas de menos de 200 nm tienden a acumular en el hígado, mientras que los agregados mayores que 7 μm tienen la tendencia a ser físicamente atrapados en los pulmones. Por lo que mejorar la estabilidad micelar, a través de la estabilización del bloque de PEO, puede ayudar a prevenir la auto-agregación de micelas, que es impulsada por la interacción hidrofóbica entre los núcleos de micelas individuales. La figura 4 ilustra la acumulación pasiva de micelas de copolímeros cargadas de fármaco en los tejidos tumorales mediante el efecto EPR. [6]

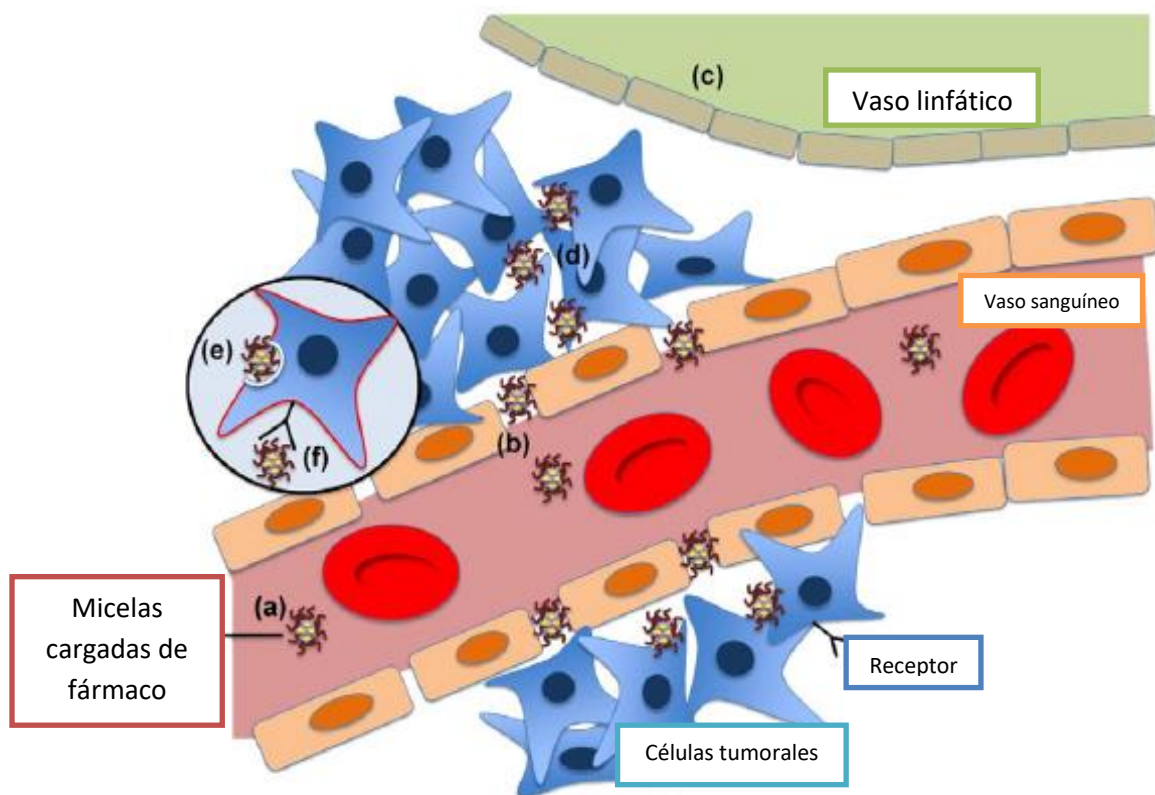


Figura 4. Micelas poliméricas cargadas con fármaco en tejidos tumorales.

El esquema muestra como las micelas poliméricas evaden efectivamente mecanismos de depuración innata, lo que da como resultado un tiempo prolongado de circulación sanguínea (a) ; estas micelas son de tamaño nanométrico, típicamente alrededor de 20-200 nm de diámetro, extravasan eficientemente a través de la evacuación del tumor, donde las uniones de la abertura endotelial varían entre 400-600 nm (b) ; el drenaje linfático deteriorado ocurre en los tejidos tumorales (c); (d) se mantiene una alta concentración intersticial de micelas cargadas de fármaco en el tumor; se efectúa la internalización no específica (e) o (f) específica mediada por receptor de micelas cargadas de fármaco. [6]

1.3.5 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la formación de micelas de PEO-PPO-PEO ha sido reportado por varios investigadores. Un aumento de la temperatura produce una reducción de hidratación del grupo hidrofílico. Este efecto es aquel que produce el punto de turbidez de los tensoactivos no-iónicos y por lo tanto tiende a favorecer la micelización, es decir producir micelas a menor concentración (la CMC disminuye). [7]

1.4 Copolímeros Tribloque

El copolímero de bloques comercializados bajo la marca Pluronic, consiste en bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO) dispuestos en una estructura EO_x-PO_y-EO_x básica (a menudo abreviada como PEO-PPO-PEO). Son compuestos no iónicos comercialmente disponibles como agentes tensoactivos. [7]. Son relativamente hidrófobos, el poli (óxido de etileno) (PEO) es la parte estructural empleada más frecuentemente para el componente hidrófilico de los copolímeros de bloques debido a su alta solubilidad y baja toxicidad en ambientes acuosos. Forman una envoltura acuosa alrededor del núcleo cargado de fármaco hidrófobo, proporciona capacidades de estabilización estérica y de protección de carga para prevenir la adsorción no específica de proteínas de suero y / o complemento y anticuerpos, un proceso comúnmente conocido como opsonización, que de otra manera podría predisponer a partículas extrañas a la rápida eliminación de macrófagos y / o células endoteliales del sistema reticuloendotelial (RES) en el hígado, el bazo y la médula ósea . [6]

1.4.1 Síntesis, nomenclatura y propiedades físicas de los copolímeros de bloque

Los copolímeros de tribloque PEO-PPO-PEO se sintetizan mediante la adición secuencial de primer óxido de propileno (PO) y después óxido de etileno (EO) a un propilenglicol soluble en agua de masa molar pequeña. Las etapas de oxialquilación se llevan a cabo en presencia de un catalizador alcalino, generalmente hidróxido sódico o potásico. El catalizador se neutraliza y se retira del producto final. [7]

Las ecuaciones que representan los dos pasos en la síntesis de los copolímeros PEO-PPO-PEO se muestran en la Figura 5. Así, se puede generalizar la estructura de los copolímeros tribloque en la fórmula general PEO-PPO-PEO en la cual x y y varían dependiendo la masa molar del copolímero, Figura 5. [8]

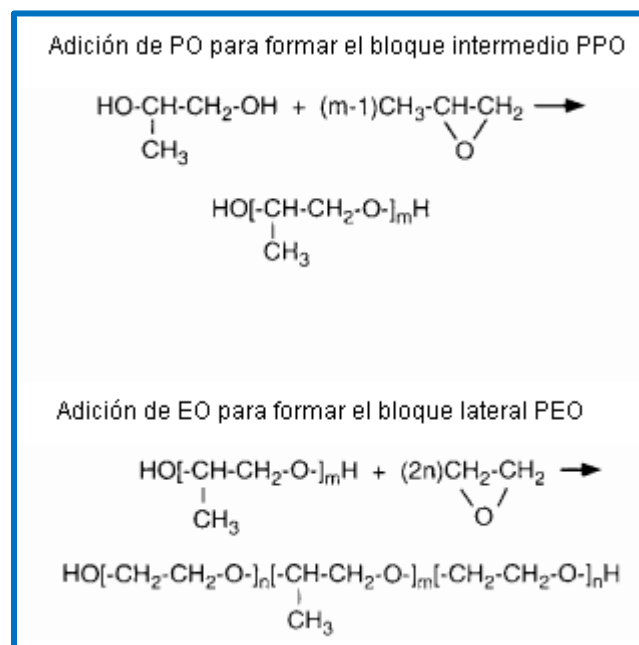


Figura 5. Ecuaciones representativas de la síntesis de copolímeros de tribloque PEO-PPO-PEO. [9]

1.4.2 Pluronic F-127 (Descripción)

El F-127 (figura 6), es un poliol tensoactivo no iónico (masa molar aproximadamente de 12,500 g/mol), se ha observado que facilita la solubilización de compuestos no solubles en agua y en medios fisiológicos.

Sinónimo: Poloxámero

INCI: Poloxamer 407

Fórmula molecular: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$

Características físicas: Polvo céreo, micro perlas céricas, o copos céreos, blancos o casi blancos.

Solubilidad: Muy soluble en agua y etanol al 96 por ciento, prácticamente insoluble petróleo ligero (50-70°C).

Punto de fusión: aprox. 50°C.

Valor de pH: 4-8

Conservación: En envases bien cerrados. Proteger de la luz.

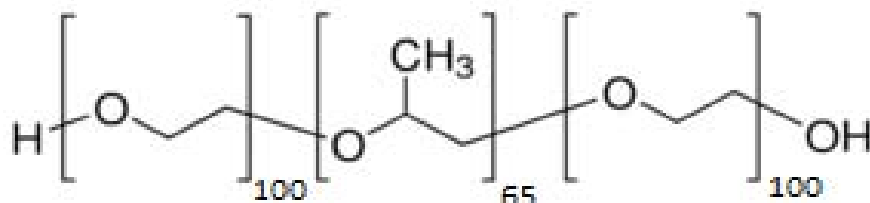


Figura 6. Estructura química general del copolímero de bloque pluronic (F127).

[10]

1.4.3 Pluronic P-123 (Descripción)

El copolímero tribloque simétrico PEO-PPO-PEO (Pluronic P123) se constituye de poli (óxido de etileno) (PEO) y poli (óxido de propileno) (PPO), (figura 7). La característica única del bloque PPO es que muestra hidrofobicidad a temperaturas por encima de 288 K y solubilidad en agua a temperaturas por debajo de 288 K lo que conduce a la formación de micelas. Se utiliza en limpiadores de superficies duras y blandas, antiespumantes en revestimientos, se utiliza en la preparación y el revestimiento de nano partículas, es un material activo cuyas propiedades dependen de la relación hidrófila (EO)/hidrófoba (PO), un alto contenido de bloques EO da mejores estabilizadores de O/W.

Fórmula molecular: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}-\text{OH}$.

Forma: Pasta

Olor: suave a poliol

Color: ligeramente lechoso, turbio

Masa molar: 5800 g/mol

Valor de pH: 5-7.5

Punto de solidificación: aprox. 32°C

Solubilidad en agua: soluble

HLB: 7-9

Densidad: 1.018 g/mol a 25°C

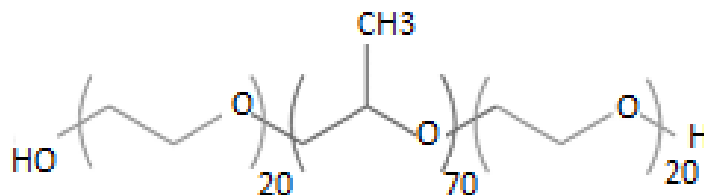


Figura 7. Estructura química del copolímero de bloque pluronic (P-123). [11]

1.5 Liberación de Fármacos

El mecanismo por el cual se da la liberación del fármaco es influenciado por diversos factores como el material del nano transportador (composición, estructura y degradabilidad), el medio en el cual se da la liberación (fuerza iónica, temperatura) y el tipo de fármaco (hidrofobicidad, estabilidad e interacción con la matriz)

La membrana que contiene el fármaco debe ser permeable, permitiendo así la liberación del fármaco desde su interior, esta liberación se da principalmente por difusión y por ende es controlada por las diferencias de concentración del fármaco entre el nano transportador y el medio. [12]

El método para la determinación de la velocidad de liberación realizada en este trabajo se basa en una técnica de diálisis en la cual el fármaco encapsulado en las micelas poliméricas se coloca en una bolsa de diálisis elaborada con una membrana especial o material de celofán. La bolsa se coloca en un vaso de precipitado de boca ancha que contiene un volumen conocido de agua destilada y la concentración del fármaco fuera de la bolsa se mide en función del tiempo.

1.5.2 Modelos de Cinética de Liberación de Fármacos

La selección de un modelo adecuado para analizar los datos de liberación es esencial, no sólo para la evaluación cuantitativa de las características de liberación del fármaco, sino también para la comparación de los perfiles de disolución de ambos polímeros que se estudiaron en este trabajo (P123 Y F127) .

Las micelas poliméricas funcionan como sistemas de liberación de fármacos, por lo que es importante conocer el mecanismo por el cual se lleva a cabo la liberación de fármacos, actualmente existen diversos modelos que expresan por medio de ecuaciones matemáticas la relación entre la fracción liberada de fármaco (%) con respecto al tiempo, dichos modelos cinéticos explican el funcionamiento de los sistemas de estudio con el cálculo de los parámetros correspondientes.

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer *et al* (1938) derivó una relación simple que describía la liberación del fármaco a partir de un sistema polimérico. Para descubrir el mecanismo de liberación del fármaco, los primeros datos de liberación (60%) se ajustan en el modelo de Korsmeyer-Peppas, Ec. (1).

$$F=F_0+k_{KP} \cdot t^n \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde, F es la fracción (%) del fármaco liberado en el tiempo t. F0 es la fracción inicial del fármaco en la solución resultante de una liberación de estallido y k_{KP} es la constante de liberación que incorpora características estructurales y geométricas de la forma de dosificación de fármaco; n es el exponente difusional que indica el mecanismo de liberación del fármaco como se indica en la Tabla 1.

| Valor del exponente de Liberación (n) | Mecanismo de transporte de fármaco |
|---------------------------------------|---|
| 0.5 | Difusión de Fick |
| $n < 0.1$ | Transporte no Fickiano o anómalo |
| $n = 1$ | Transporte caso II (transporte desde una matriz hinchable) |
| $n < 0.5$ | Existe una liberación por la presencia de poros, acompañada de liberación por hinchamiento. |

Tabla 1. Mecanismos de transporte de Fármaco. [13]

Modelo de Weibull

El modelo Weibull es más útil para comparar los perfiles de liberación de la administración de fármacos de tipo matriz. La ecuación (2) representa el modelo.

$$F = F_{\max} \left[1 - e^{-\frac{t^\beta}{\alpha}} \right] \quad \text{Ec. (2)}$$

En donde, F_{\max} es la fracción máxima del fármaco liberado a tiempo infinito α es el parámetro de escala que define la escala de tiempo del proceso; β es el parámetro de forma que caracteriza la curva como exponencial ($\beta = 1$, caso 1), sigmoide, en forma de S, con curvatura ascendente seguida de un punto de inflexión ($\beta > 1$, caso 2), o parabólica, con una mayor Pendiente inicial y después de eso consistente con el exponencial ($\beta < 1$, caso 3).

Modelo de Logistic

Representado por la ecuación (3)

$$F = F_{\max} \cdot \frac{e^{\alpha + \beta \log(t)}}{1 + e^{\alpha + \beta \log(t)}} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde F_{max} es la fracción máxima del fármaco liberado a tiempo infinito. α es el factor de escala en el modelo logístico y β es el factor de forma.

Modelo Gompertz

El perfil de liberación *in vitro* se describe a menudo por un modelo exponencial conocido como modelo de Gompertz expresado por la ecuación (4).

$$F = F_{max} \cdot e^{-\alpha e^{-\beta \log(t)}} \quad \text{Ec. (4)}$$

Dónde, F_{max} es la fracción máxima del fármaco liberado a tiempo infinito. α es el factor de escala en los modelos Gompertz, β es el factor de forma

Nota: Este modelo denota un aumento abrupto al inicio y converge lentamente a la liberación máxima asintótica.

Modelo de Probit

Representado por la ecuación 5.

$$F = F_{max} \cdot \Phi [\alpha + \beta \cdot \log(t)] \quad \text{Ec. (5)}$$

En la cual, F_{max} es la fracción máxima del fármaco liberado a tiempo infinito. Φ es la distribución normal estándar; α es el factor de escala en el modelo Probit; β es el factor de forma. [13], [30].

Calculo de la eficiencia de encapsulación (% EE)

El porcentaje de encapsulación para cada uno de los polímeros tribloque fue calculado mediante la siguiente ecuación.

$$\%EE = \left(\frac{m_c}{m_e} \right) \times 100$$

Donde m_c corresponde a la masa (mg) del fármaco (VPA-F) encapsulado, y m_e es la masa (mg) del VPA-F que se disolvió en las soluciones poliméricas al 0.5%, 1% y 5%. [14]

1.6 Técnicas instrumentales de caracterización de sistemas micelares.

1.6.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) también conocida como espectroscopia de fotón correlación, mide el movimiento Browniano (colisiones inducidas entre las partículas en suspensión y las partículas del disolvente) y lo relaciona con el tamaño de la partícula. Dicha técnica es utilizada para la caracterización de tamaño de partícula de proteínas, polímeros y dispersiones coloidales y la distribución de tamaños de moléculas y partículas típicamente de la región nanométrica hasta micrométrica. [15]

Esto se hace mediante la iluminación con láser de las partículas que se encuentran suspendidas en un líquido y el análisis de las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada produce la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula. En la práctica, las partículas suspendidas en un líquido nunca son estacionarias, se encuentran en constante movimiento Browniano. Una característica de dicho movimiento para DLS es que las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes lentamente. [16]

Las distribuciones de tamaño se obtienen en gráficos respecto a tres parámetros de distribución (intensidad, volumen y número).

La distribución obtenida mediante un gráfico de intensidad está relacionada con la luz dispersada por las partículas y se traduce en la obtención de diversas clases de tamaño. Un gráfico expresado en términos de volumen se verá reflejado en el área del pico, es decir el área del pico será mayor para partículas de tamaño más grande y un gráfico expresado en número mostrara los resultados de un número de distribución con dos picos del mismo tamaño (el número de partículas es el mismo). [7]

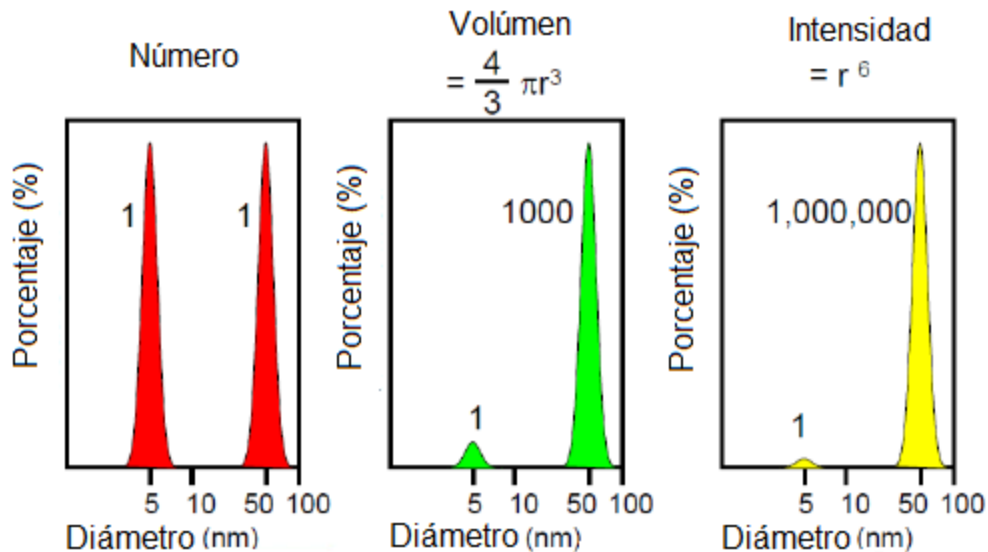


Figura 8. Las gráficas muestran un ejemplo de los resultados que se obtienen por la técnica de DLS en tres distintos parámetros (número, volumen e intensidad). [7]

La tecnología dinámica de difusión de luz de Malvern Instruments ofrece las siguientes ventajas:

Análisis preciso, confiable y repetible del tamaño de partícula en uno o dos minutos. El tamaño medio sólo requiere conocimiento de la viscosidad del líquido. Se pueden medir directamente muestras diluidas, concentradas y turbias. [16].

1.6.2 Técnicas para detectar la CMT

La temperatura micelar crítica CMT, nos indica la dependencia de la formación de micelas poliméricas con la temperatura, puede ser determinada con experimentos de calorimetría diferencial de barrido. En dichos experimentos, la aparición de un pico endotérmico en el potenciograma, indica que el proceso de micelización de los copolímeros de PEO_a-PPO_b-PEO_a en el agua está impulsado por una disminución de la polaridad de los segmentos óxido de etileno (OE) y óxido de propileno (OP). [17]

1.6.2.1 Calorimetría Diferencial de Barrido para Líquidos

La calorimetría diferencial de barrido, o DSC , es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. Tiene un elevado grado de sensibilidad y rápida velocidad de análisis.

En la técnica experimental de Calorimetría Diferencial de Barrido se dispone de dos celdas, una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra esta generalmente vacía y es la llamada celda de referencia. Se usan calefactores diferentes para cada celda y mediante un sistema de control se puede saber si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia, de ser así los calefactores corrigen la temperatura a manera que se mantenga igual en ambas celdas, en otras palabras cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas celdas.

En general todas las transformaciones o reacciones donde se produce un cambio de energía, pueden medirse por DSC. [18]

Entre las diversas utilidades de la técnica de DSC podemos destacar lo siguiente:

Estudia sistemas moleculares, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y, por consiguiente, susceptibles a experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al calentar o enfriar en un intervalo de temperatura experimentalmente entre -20°C a 130°C . Siendo una técnica adecuada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares, biopolímeros y complejos. [17]

En general hay tres tipos de información que se pueden obtener a partir del DSC:

- 1.-La capacidad calorífica parcial absoluta del compuesto de interés.
- 2.- Los parámetros termodinámicos globales estudiados en este trabajo (los cambios de entalpia (ΔH), y la capacidad calorífica (ΔC_p) asociados a la transición inducida por la temperatura.

Capacidad calorífica (Cp): La capacidad calorífica es una propiedad que indica la capacidad de un material de absorber calor de su entorno, y puede expresarse como:

$$C = \frac{dQ}{dT}$$

Donde dQ es la energía necesaria para producir un cambio dT en la temperatura. Normalmente la capacidad calorífica se expresa así (J/mol-K; cal/mol-K). [19]

Entalpia (ΔH): Entalpia de transición: es la cantidad de energía absorbida para que tenga lugar el cambio de fase. El valor de la entalpia calorimétrica para la transición de fase se determina integrando el área bajo el pico de la transición.

$$\Delta H_{cal} = \int C_p dT$$

En un proceso el signo de la variación de la entalpia nos indica si $\Delta H < 0$ el proceso es exotérmico, si $\Delta H > 0$ el proceso es endotérmico. Las áreas de los termogramas se transforman en entalpias calorimétricas. [7], [20]

Temperatura media de Transición (Tm)

Es la temperatura media del cambio de fase: corresponde a la temperatura en la que se alcanza el valor máximo de Cp (cantidad de calor (por gramo o por mol) requerido para elevar la T de la muestra 1°C. temperatura a la cual el 50% del copolímero se encuentra en forma de monómeros y el 50% restante ha formado micelas poliméricas. [7], [20]

1.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido

El área de la Microscopia electrónica incluye básicamente dos tipos de microscopios electrónicos (Figura 9 y 10): El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) y el Microscopio Electrónico de Transmisión (MET). [21]

1.6.3.1 Fundamento

El Microscopio Electrónico de Barrido convencional (MEB) es un instrumento cuyo funcionamiento se basa en el barrido de la superficie de una muestra, por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido (entre 4nm y 200 nm).

Después de que el haz de electrones interacciona con la muestra, se generan varios tipos de señales, las cuales son colectadas por un detector específico para cada una de ellas. Finalmente se produce una imagen en el monitor que puede ser almacenada en una placa fotográfica o digitalmente. [22]

Se necesita una máquina con tres componentes: (1) la columna del microscopio, incluyendo el cañón de electrones en la parte superior, (2) la columna, por la que se desplaza el haz de electrones, y (3) la cámara de la muestra en la base. [22]



Figura 9. Microscopio Electrónico de Barrido multifuncional JEOL JSM-5900-LV, resolución: 0.3 nm (SEI) HV / 0.5nm (BEI) LV, amplificación: 18x - 300000x. [22]

1.6.3.2 Preparación de muestras

Los requisitos principales son que la muestra no contenga contaminantes como aceite, polvo, alúmina o volátiles; que sea resistente al alto vacío y al haz de electrones; que esté libre de agua; que sea conductor y que tenga buena capacidad para producir electrones secundarios.

Las muestras biológicas, minerales, cerámicos, etc., no son conductoras y requieren una cubierta de material conductor (<10 nm). Para no tener problema de traslape de picos en EDS, el carbón (sin Au u otro metal) es el material frecuentemente empleado, que se aplica por medio de una evaporadora de metales, así se elimina la carga y posibles errores en el análisis. [21]

1.6.3.3 Procesamiento de muestras para su observación en el MEB

- A. Limpieza de la superficie por observar. En algunos casos es necesario realizar una limpieza con ultrasonido, sumergiendo la pieza por limpiar en alcohol, acetona o algún otro solvente orgánico para eliminar las sustancia contaminantes.
- B. La muestra no debe contener agua por lo que la eliminación del agua no debe modificar la morfología original de la muestra, para lo cual, en caso de muestras biológicas, es necesario realizar previamente un tratamiento de fijación, deshidratación y secado. Este último puede realizarse por sublimación o usando la técnica de secado a punto crítico.
- C. La muestra debe ser conductora. Cuando no sucede esto, es necesario recubrirlo con algún material conductor como Ag, Al, Au, Pd-Au, C, etc., debido a que cuando el haz de electrones irradia la muestra, algunos electrones como los secundarios son emitidos o retro dispersados, pero el resto de los irradiados son absorbidos por la muestra, si este no es conductor, se cargará eléctricamente, lo que ocasionará problemas en su observación. [21]

Selección del material conductor

Al seleccionar el material conductor para recubrir una muestra no conductora, deben tenerse en cuenta características como: que sea un buen emisor de electrones secundarios, que sea un buen conductor, que forme una capa uniforme en la superficie de la muestra y que no tenga un tamaño de grano demasiado grande que pueda interferir con la observación de su detalle.

Sin embargo, un solo material no reúne todas las cualidades, por esta razón a veces es necesario utilizar una mezcla, ej. C-Au. Las ventajas y desventajas de los materiales con los que se recubren las muestras se encuentran resumidas en la Tabla 2.

| Material | Ventaja | Desventaja |
|----------|--|---|
| Ag | Alto coeficiente de emisión de e^- secundarios | Tamaño de grano grande |
| Au | Buen conductor | Tiende a acumularse y formar aglomerados. No crea una cubierta uniforme |
| C | Forma una capa uniforme sobre el espécimen | Es semiconductor |
| Al | Alta conductividad igual que el oro | Tamaño de grano grande |
| Au-Pd | Tiene menor tendencia a acumularse | Forma aleaciones con la canastilla de tungsteno de la evaporadora |
| C-Au | Juntos forman una capa uniforme y conductora | No es recomendable para microanálisis por posible traslape con picos del Au |

Tabla 2. Ventajas y desventajas de materiales comúnmente utilizados para recubrir muestras no conductoras.

La plata tiene un alto coeficiente de emisión de electrones secundarios y es una de las mejores sustancias para observar los contornos de la superficie.

El oro posee también un alto coeficiente de emisión de electrones secundarios, y es fácilmente evaporado desde la canastilla de tungsteno, pero tiene la tendencia a crear aglomerados durante el recubrimiento, por lo que, para formar una capa uniforme sobre la superficie del espécimen, es necesario formar una cubierta bastante gruesa de oro para asegurar que se forme una película continua. [21]

1.6.4 Microscopía electrónica de transmisión

Un microscopio electrónico de transmisión (TEM) es una herramienta analítica que permite la visualización y análisis de muestras en el ámbito del micro espacio (1 micrón / $1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) a (1 nanómetro / $\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$), Figura 10.

Las partes del microscopio son: pistola de electrones, columna de electrones, sistema de lentes electromagnéticas detectores, sistema de enfriamiento de agua, cámara de muestras / muestras, panel de control principal y controles operativos y captura de imagen. [22]

El TEM revela niveles de detalle y complejidad inaccesibles por la microscopía de luz porque utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía. Permite un examen microestructural detallado mediante imágenes de alta resolución y alta magnificación. Se utiliza para producir imágenes de una muestra iluminándola con electrones (es decir, el haz de electrones) dentro de un alto vacío y detectando los electrones que se transmiten a través de la muestra. [22]



Figura 10. Microscopio electrónico de Transmisión multifuncional JEOL JEM-2010, resolución: 0.14nm, amplificación: 3000 – 1500k. [22]

2. HIPÓTESIS



Se sabe que los copolímeros tribloque $PEO_a-PPO_b-PEO_a$ en solución acuosa, forman micelas poliméricas cuyo centro es capaz de albergar compuestos hidrofóbicos. El VPA-F, es un compuesto hidrofóbico con actividad anticancerígena y baja solubilidad en agua. Por lo anterior, se plantearon las siguientes hipótesis:

- A) Si mezclamos el VPA-F en una solución polimérica de $PEO_a-PPO_b-PEO_a$, entonces el VPA-F se albergará en el centro hidrofóbico aumentando su solubilidad en agua y modificando el ΔH , ΔH_{agg} de la micela polimérica.
- B) Si se logran formar las micelas cargadas con VPA-F, al diluirlas en un medio acuoso las micelas tendrán a disgregarse y permitirán liberar el fármaco.

3. OBJETIVO GENERAL



Analizar fisicoquímicamente la formación de agregados moleculares entre los polímeros tribloque P123 y F127 con el fármaco 2(N-(2-hidroxifenil-2)-propilpentanamida) (VPA-F), que permitan el aumento de la solubilidad en agua del VPA-F compuesto con actividad anti cancerígena.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Mejorar la solubilidad el VPA-F en agua utilizando micelas poliméricas.
- Calcular la solubilidad máxima del VPA-F en soluciones poliméricas de P123 y F127, así como el % de encapsulación eficaz.
- Determinar compuestos de degradación en los sistemas estudiados mediante HPLC.
- Conocer la dependencia del radio hidrodinámico de P123 y F127 con la temperatura en presencia y ausencia de VPA-F.
- Determinar los parámetros termodinámicos ΔH_{agg} , y T_m por calorimetría diferencial de barrido de los sistemas.
- Estudiar el perfil de liberación farmacocinético de los sistemas (P123+VPA-F) y (F127+VPA-F).
- Determinar la morfología de los sistemas estudiados mediante Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión.

4 Materiales y Reactivos

Todos los productos químicos y disolventes se utilizaron tal como se recibieron.

4.1 Materiales y Equipo

- Espectrofotómetro marca Cary-Bio50 Varian/Agilent
- HPLC (Agilent Technologies modelo 1260 infinity)
- Nanosizer ZS ZEN (3600) (Malvern Instruments, USA).
- VP-DSC Microcal (Northampton, MA, USA).
- Microscopio Electrónico de Barrido multifuncional JEOL JSM-5900-LV, resolución: 0.3 nm (SEI) HV / 0.5nm (BEI)LV , amplificación: 18x -300000x
- Microscopio electrónico de Transmisión multifuncional JEOL JEM-2010, resolución: 0.14nm, amplificación: 3000 – 1500k
- Spectra/por Dialysis Membrane (MWCO:12-14000) Lot # 3554013
- Balanza Analítica OHAUS modelo AV264C
- Parrilla de Calentamiento Cole Parmer modelo
- Desionizador de Agua Millipore
- Sornicador Cole Parmer modelo 8892
- Vasos de precipitados de 50 ml, 1000ml
- Tubos de Centrifuga, Falcón 50 ml
- Tubos eppendorf de 2ml
- Matraz de 50 ml
- Piseta
- Termómetro
- Espátula cromo-níquel
- Filtros Millipore Millex-GV, Hydrophilic PVDF con un tamaño de poro de 0.22µM

4.2 Reactivos

- Copolímeros de Tribloque P-123 y F127 comprados en Sigma-Aldrich, se usaron tal como se recibieron, sin purificación adicional.
- El compuesto 2(N-(2-hidroxifenil-2-propilpentanamida), se obtuvo mediante extracción con hexano destilado y el sólido formado se filtró y se lavó con hexano, proporcionado por el Laboratorio de Modelado Molecular y Diseño de Fármacos de la Escuela Superior de Medicina, IPN, México.
- Alcohol Etilico Absoluto Anhidro usado como disolvente a diferentes proporciones Etanol/Agua.
- Acetona 99% pureza, Distribuidora Química ALVI
- Diclorometano 99.98% pureza, Marca J.T. Baker
- DMSO 99.5% pureza GC marca SIGMA Life Science
- El agua utilizada para la preparación de todas las soluciones en esta Tesis fue obtenida de un equipo de destilación Millipore, RiOs-DI y pasada a través de un equipo de desionización Millipore, Simplicity.
- Buffer de Fosfatos pH:7.4

5 Metodología

5.1 Caracterización Físicoquímica del fármaco

5.1.1 Espectro UV-Visible de 2(N-(2hidroxifenil-2-propilpentanamida)

Para obtener el espectro de absorción se utilizó un espectrofotómetro marca Cary-Bio50 Varian/Agilent. Se preparó una solución de VPA-F con H₂O desionizada y se dejó en agitación por 24 h a 25 °C. Se pesaron 0.0055g del compuesto VPA-F + 7 ml de H₂O.

5.1.2 Solubilidad en diferentes disolventes

Para las pruebas de solubilidad se emplearon soluciones de aproximadamente 0.0050g de compuesto y poco más de 1 mL de los diferentes disolventes. Las soluciones se conservaron en viales de vidrio perfectamente selladas y se colocaron en una parrilla de agitación durante 72 h. Transcurrido ese tiempo se observó que el compuesto disolvió únicamente en Acetona y Alcohol.

5.1.3 Elaboración de una Curva Patrón

Se utilizó una mezcla de etanol/H₂O (1:10) para disolver 55.8 mg de VPA-F obteniendo una solución estandar. El espectro de las soluciones mantiene los dos picos de absorbancia a 240 y 280 nm, como se muestra en la Figura 13.

La cuantificación de fármaco se llevó a cabo por espectrofotometría UV/Visible a una $\lambda=280$ nm. La curva se realizó por triplicado y el promedio de las absorbancias se muestra en la Tabla 6.

5.1.4 Solubilidad Intrínseca

Para determinar la solubilidad intrínseca del fármaco en agua, se pesó una pequeña cantidad de fármaco y se adicionó 7 mL de H₂O, la solución se mantuvo en agitación por 48 h, el experimento se realizó por triplicado. Transcurrido el tiempo se filtró el fármaco no disuelto y se cuantificó la cantidad disuelta por espectroscopía UV-visible, obteniéndose un valor de 0.400 mg/mL.

Después se evaluó la capacidad de los polímeros P123 y F127 para aumentar la solubilidad del fármaco a tres concentraciones diferentes 0.5, 1.0, 5.0 % m/m en agua.

5.2 Caracterización Fisicoquímica de micelas con y sin fármaco

5.2.1 Preparación de las soluciones Poliméricas.

Se prepararon soluciones acuosas con los copolímeros P123 y F127 a tres diferentes concentraciones: 0.5% m/m, 1.0% m/m y 5% m/m. Para preparar las soluciones se utilizó una balanza analítica de la marca Ohaus, modelo Adventure Pro AV264C. Las soluciones fueron puestas bajo agitación magnética durante 24 h a 25°C, de esta manera nos aseguramos que se encontrara disuelto completamente.

5.2.2 Preparación de soluciones poliméricas con VPA-F.

Una vez obtenida la solución polimérica se pesó cierta cantidad de VPA-F que fue adicionada a las soluciones. Posteriormente se mantuvo en agitación durante 48 h a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se filtraron para eliminar el exceso de fármaco. Se utilizaron Filtros Millipore Millex-GV, Hydrophilic PVDF con un tamaño de poro de 0.22 µM.

La determinación de la concentración de VPA-F en las soluciones se cuantificó mediante espectrofotometría UV-visible y comparando con una curva patrón.

5.3 Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

La detección de compuestos de degradación en las diferentes soluciones utilizadas: F127+H₂O, P123+H₂O, VPA-F+H₂O, P123+ VPA-F, F127+VPA-F y solución H₂O+etanol se analizaron mediante un sistema de HPLC (Agilent Technologies modelo 1260 infinity). Utilizando una columna de fase reversa (Zorbax SB C18 de 150x4.6mm 0.5 µm) a 37.5°C, la fase móvil consistió en Acetonitrilo: H₂O desionizada (60%:40% (V/V)) filtrada a través de membranas de Nylon 0.45 µm (HNWP04700), con una velocidad de flujo a 1 mL/min, la longitud de onda de detección se monitorizó a 254nm en un detector por arreglo de diodos (G1315c, 1260 DAD VLT). Las muestras fueron preparadas con agua desionizada, filtradas por acrodiscos Millex PVDF de 0.45 µm y colocadas en viales de 2 mL (viales de bajo actinio) y el volumen de inyección fue de 10 µL. Los datos cromatográficos fueron analizados por el software OpenLab EZ Chrom Versión A.01.03. El tiempo de retención para el 2(N-(2hidroxifenil-2)-propilpentanamida) fue de 4.5 min.

5.4 Determinación de tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La medición de los diámetros hidrodinámicos (DH) de las partículas formadas en las diferentes soluciones (Tabla 3) se llevó a cabo mediante dispersión dinámica, se utilizó un equipo Nanosizer ZS ZEN (3600) (Malvern Instruments, USA). Usando como materiales estándar ambos copolímeros, F127 cuyo índice de refracción es 1.466 y su índice de absorción de luz es 0.010, y P123 su índice de refracción es de 1.460 y su índice de absorción de luz es de 0.010; como dispersante se usó H₂O. En cada sistema la concentración de los polímeros fue de 0.5% m/m con y sin fármaco.

| Soluciones Poliméricas | |
|------------------------|-----------------------|
| 1) | P123+H ₂ O |
| 2) | P123+VPA-F (35 mg) |
| 3) | F127+H ₂ O |
| 4) | F127+VPA-F (35.7 mg) |

Tabla 3. Soluciones poliméricas con y sin fármaco utilizadas para la determinación del Diámetro hidrodinámico.

Para el análisis de tamaño de partícula y evitando fenómenos de dispersión múltiple se filtró cada solución utilizando filtros Millipore Millex-GV, Hydrophilic PVDF con un tamaño de poro de 0.22 μ M, con el fin de evitar el paso de partículas ajenas a la composición que pudiesen alterar los resultados. Posteriormente se colocó 1 mL de cada solución en una celda de cuarzo para su lectura.

Se realizó un barrido de temperaturas de 5°C hasta 60°C cada 5°C, antes de llevar a cabo las mediciones, las soluciones fueron termostalizadas (equilibradas en temperatura) durante 10 min utilizando un baño de hielo-agua para temperaturas de (5, 10 y 15°C) y de 20°C en adelante se usó parrilla de calentamiento. Para cada medición se realizaron 3 corridas de 13 repeticiones cada una.

5.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La determinación de los parámetros termodinámicos (ΔH_{agg} , CMT, T_m), para las soluciones poliméricas con y sin VPA-F, se utilizó la calorimetría diferencial de barrido con un equipo VP-DSC Microcal (Northampton, MA, USA). La temperatura inicial fue de 5°C, la temperatura final fue 60°C, la velocidad de calentamiento fue 60°C h⁻¹ y el tiempo de termo estabilización fue de 15 min. Las soluciones fueron previamente desgasificadas durante 15 min en un equipo de vacío Thermo Vac (Sample Degassing and Thermostatic).

Las disoluciones se inyectaron dentro de la celda utilizando una jeringa de vidrio limpia y seca de 0.5 mL Hamilton (Malvern, USA), una vez llenadas las celdas con las disoluciones se selló herméticamente con el tapón presurizador.

Antes de llevar a cabo las mediciones de las soluciones se realizó un barrido de agua contra agua para generar la línea base.

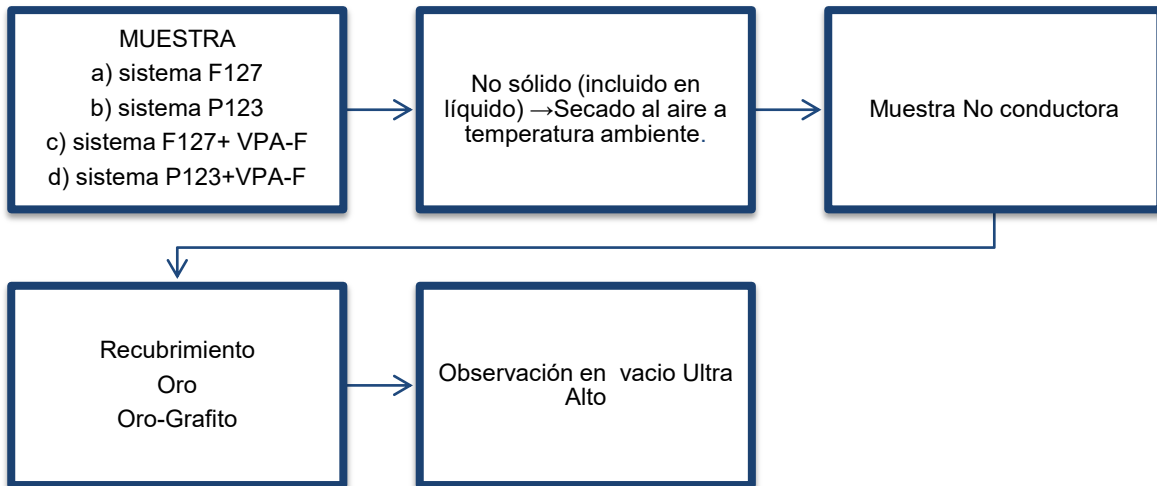
5.6 Liberación del Fármaco (VPA-F)

El estudio de liberación se realizó por triplicado en solución PBS con pH 7.4 a 37°C con agitación magnética constante. Se colocaron 2 mL de cada sistema F127+VPA-F concentración del polímero (10.38 mg/ml), concentración del fármaco (0.01286 mg/ml) y P123+VPA-F concentración del polímero (10.57 mg/ml), concentración del fármaco (0.1381 mg/ml) en las membranas Spectra/por Dialysis Membrane (MWCO: 12-14000), en 100 mL de medio.

Para determinar la cantidad de fármaco liberado fueron tomadas muestras de 50 mL por 96 h (15,30, 45, 68, 101,131, 164.197, 283,338, 393,453, 513,373, 693, 1468,2173, 2893 y 3578 min) con reposición de volumen de 50 mL a cada muestreo. La cuantificación del VPA-F se realizó por espectroscopia UV a longitud de onda de 280 nm. Los datos fueron analizados mediante el macro DDSolver 1.0 para Excel, posteriormente se analizó el modelo de liberación más adecuado para los sistemas de estudio. Para seleccionar el modelo más adecuado se tomó el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1.

5.7 Microscopia electrónica de Barrido

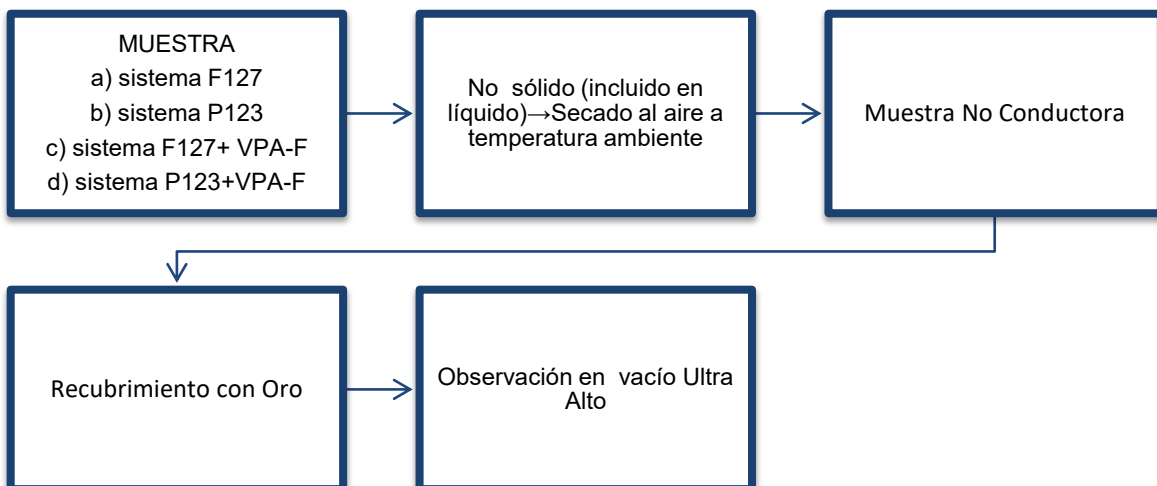
El esquema 1, muestra de manera general la preparación de las muestras de los sistemas P123 + H₂O, F127 + H₂O, P123+VPA-F, F127+VPA-F.



Esquema 1. Preparación de muestras para ser vistas por Microscopia Electrónica de Barrido.

4.7 Microscopia electrónica de Transmisión

El esquema 2, muestra de manera general la preparación de las muestras de los sistemas P123 + H₂O, F127 + H₂O, P123+VPA-F, F127+VPA-F.



Esquema 2. Preparación de muestras para ser vistas por Microscopia Electrónica de Transmisión.

6 Resultados y Discusión

6.1 Caracterización Físicoquímica del VPA-F

6.1.2 Espectro UV-Visible de 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida)

El espectro de UV-visible para una solución de VPA-F en agua, se muestra en la, Figura 1, se observan dos picos uno a $\lambda=240$ nm y otro a $\lambda=280$ nm. Los cuales ayudaron a la caracterización y posterior construcción de la curva patrón, tomando como referencia el pico a 280 nm.

Figura 11. Espectro de absorción en UV-visible para 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida) en H₂O.

6.1.3 Solubilidad en diferentes disolventes

Se realizó una prueba de solubilidad del VPA-F en diferentes disolventes, Tabla 4, para identificar los disolventes que podrían ser utilizados como cosolventes en la curva de calibración. Siendo el etanol el elegido por su baja toxicidad y rápida solubilización del compuesto.

| DISOLVENTE | ACETONA | ALCOHOL | DICLOROMETANO | AGUA | DMSO |
|----------------------------|---------------------------|------------------------|---------------|-------------|-------------|
| Observación | No disuelve completamente | disolvió completamente | No disolvió | No disolvió | No disolvió |
| mg de VPA-F agregados | 0.0070 | 0.0049 | 0.0052 | 0.0065 | 0.0053 |
| mL de Disolvente agregados | 1.0208 | 1.5241 | 1.1064 | 1.3321 | 1.1252 |

Tabla 4. Prueba de solubilidad en distintos disolventes.

Los datos sobre las observaciones físicas del estudio de solubilidad del compuesto frente a diferentes disolventes fueron de gran utilidad para una rápida y fácil caracterización.

Independientemente de las causas de la disolución del compuesto que se investiga, se observó que hay una disolución que cuando 0.0049 mg de fármaco y 1.5 mL de disolvente (etanol) se mezclan forman una disolución transparente sin precipitado a temperatura ambiente.

6.1.4 Relación H₂O-Etanol y elaboración de la curva patrón

Se determinó el espectro UV-visible del VPA-F en una solución de etanol (Figura 13) en la cual se nota que los picos de absorbancia se desplazan a la derecha con respecto a los encontrados en las solución de VPA-F en H₂O. Por lo que se buscó una relación de etanol/H₂O que tuviera la menor cantidad de etanol sin que modifique el pico de 280 nm presente en el espectro en H₂O. Los resultados se muestran en la Tabla 5, la cual describe el comportamiento encontrado en las diferentes relaciones etanol/H₂O.

| Relación Agua / Etanol | Descripción |
|--|---|
| 55.8 mg (VPA-F) + 1 ml de agua desionizada | Se observa una solución color blanco. |
| 2 ml de agua desionizada : 2 ml de etanol | Se observa una solución blanca y aparece la formación de cristales. |
| 3 ml de agua : 2 ml de etanol | Se observa una solución blanca y turbia |
| 5 ml de agua : 5 ml de etanol | La solución se observa translúcida |
| 1 ml de agua : 1 ml de etanol | Se observa una solución turbia amarillenta |

Tabla 5. Observaciones de aumento de la cantidad de etanol a una solución de VPA-F en agua.

Como se observa la relación 5 mL agua : 5 mL de etanol da como resultado una solución translúcida. A partir de esa relación se buscó reducir la cantidad de etanol hasta lograr una relación 1:10 que no modifica el espectro de absorbancia de 280 nm en el espectro, como se muestra en la Figura 13. a partir de esa relación se realizó la curva de calibración.

Figura 12. Espectro de absorción en UV-visible para 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida) en etanol/H₂O 1:10.

Figura 13. Espectro de absorción en UV-visible para (VPA-F) en diferentes disolventes.

| Concentracion (mg/mL) | Promedio de las absorbancias |
|-----------------------|------------------------------|
| 0.00692 | 0.116 ± 0.008 |
| 0.0139 | 0.207 ± 0.011 |
| 0.02085 | 0.305 ± 0.015 |
| 0.0278 | 0.401 ± 0.019 |
| 0.03475 | 0.496 ± 0.030 |
| 0.0417 | 0.609 ± 0.055 |
| 0.04865 | 0.694 ± 0.043 |

Tabla 6. Resultados de absorbancias promedio para la obtención de la curva patrón.

La curva patrón se realizó por triplicado con 8 concentraciones diferentes, las cuales se muestran en la Tabla 6. Todas las soluciones fueron leídas a 280 nm y el promedio de las absorbancias se muestra en la Tabla 6. Con los resultados se construyó la gráfica de ABS vs concentración de VPA-F (Figura 15), a la cual se le ajusta la ecuación de una línea recta ($Abs=14.087x+0.0129$). Con la ecuación obtenida es posible el cálculo de la concentración de VPA-F.

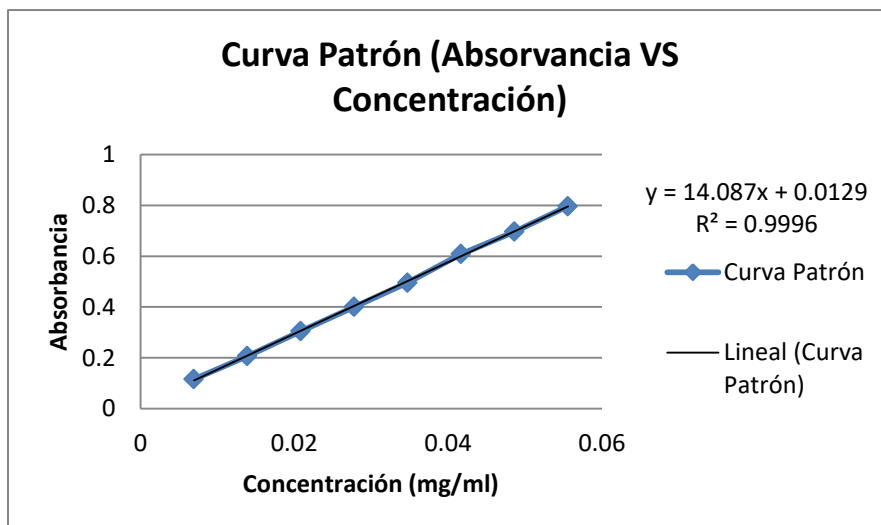


Figura 14. Curva de calibración para 2(N-(2hidroxifenil)-2-propilpentanamida).

6.1.5 Solubilidad Intrínseca y solubilidad en soluciones poliméricas de P123+H2O y F127+H2O

La solubilidad intrínseca del fármaco en agua determinada en este trabajo, fue de 0.400 mg/mL. Asimismo se evaluó la capacidad para aumentar la solubilidad del VPA-F de los polímeros P123 y F127. Los resultados se resumen en la Tabla 7, donde se muestran las cantidades que se lograron solubilizar en diferentes cantidades de polímeros, así como el porcentaje de encapsulación eficaz (EE%). Claramente se observa que la adición de los polímeros mejora considerablemente la cantidad de fármaco en las soluciones acuosas, siendo el polímero P123 el que en todos los casos, mostró la mejor capacidad de solubilización. En las soluciones con P123 se logró solubilizar la mayor cantidad de VPA-F, con un mejor EE%. Para las soluciones de 0.5 % m/m las cantidades de fármaco reportadas son las máximas, mientras que para 1 % m/m y 5 % m/m son las cantidades añadidas de fármaco debido a la poca disponibilidad del mismo.

| Concentración máxima solubilizada al 0.5% m/m | EE% | Concentración máxima solubilizada al 1% m/m | EE% | Concentración máxima solubilizada al 5% m/m | EE% |
|---|--------|---|--------|---|--------|
| PLURONIC F127 | | | | | |
| 2.17mg/ml | 94.63% | 3.63mg/ml | 97.88% | 4.85mg/ml | 97.00% |
| PLURONIC P123 | | | | | |
| 2.99mg/ml | 96.20% | 7.14mg/ml | 98.98% | 5.67mg/ml | 98.67% |

Tabla 7. Cantidades máximas solubilizadas a diferentes concentraciones (0.5%, 1% y 5%) y porcentaje de Encapsulación Eficaz (EE%).

Teniendo los datos de cantidad solubilizada por las diferentes soluciones, se puede calcular el factor de solubilidad (número de veces que se aumenta la solubilidad intrínseca) los cuales se muestran en la Figura 15. Como se muestra en la figura las soluciones de P123 tiene un factor más alto con respecto al encontrado para F127 a la misma concentración. De manera general, el polímero P123 es el que aumenta mayor número de veces la solubilidad del fármaco en agua. Concluyendo que el polímero P123 es mejor para solubilizar VPA-F.

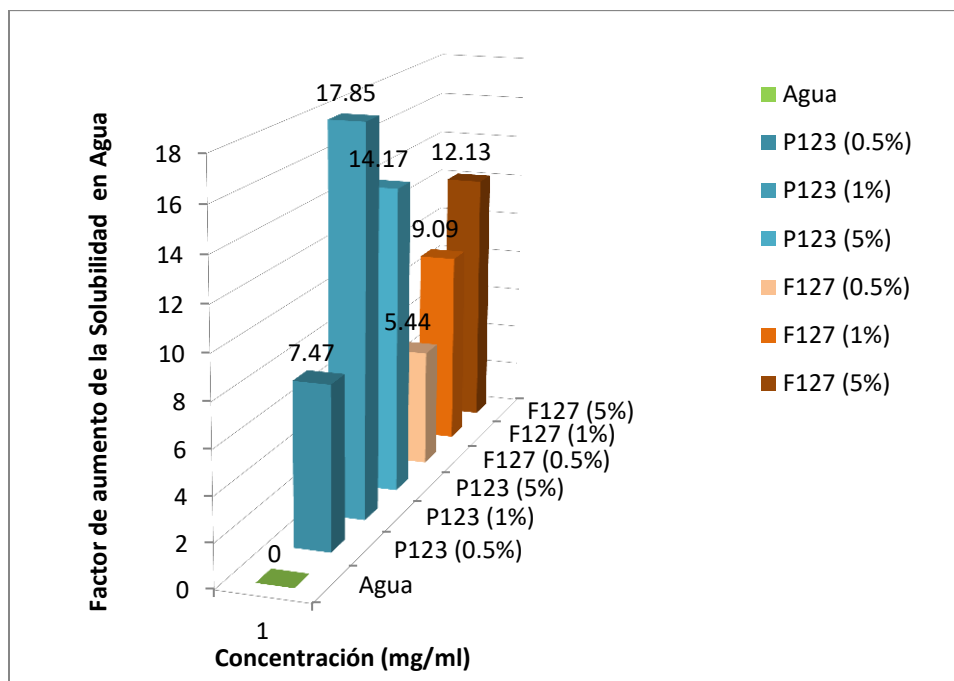


Figura 15. Factor de aumento de Solubilidad para las diferentes concentraciones de los polímeros P123 y F127.

6.2 HPLC (Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)

Aplicando la cromatografía de líquidos (HPLC) se pudo observar en cada uno de los cromatogramas, tanto el fármaco (VPA-F) como los polímeros de tribloque (P123 y F127), no contienen compuestos de degradación que alterasen la formación de micelas poliméricas.

La técnica de HPLC se utilizó para verificar la posible formación de metabolitos de degradación o contaminación; en la metodología empleada para la solubilización del VPA-F (Figura 16-22).

La Figura 16, muestra el cromatograma del disolvente utilizado para la elaboración de la curva patrón del VPA-F. No se muestra ningún tipo de pico cromatográfico, indicando que no hay contaminantes presentes en el disolvente. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los sistemas P123 + H₂O y F127 + H₂O (Figuras 17 y 18). En ninguna de las figuras anteriores se muestra pico cromatográfico indicando que no hay contaminantes en las soluciones poliméricas. En cada uno de los cromatogramas, tanto el fármaco (VPA-F) como los copolímeros de bloque (P123 y F127) no contienen compuestos de degradación que alterasen la formación de micelas poliméricas o que degradarán al fármaco

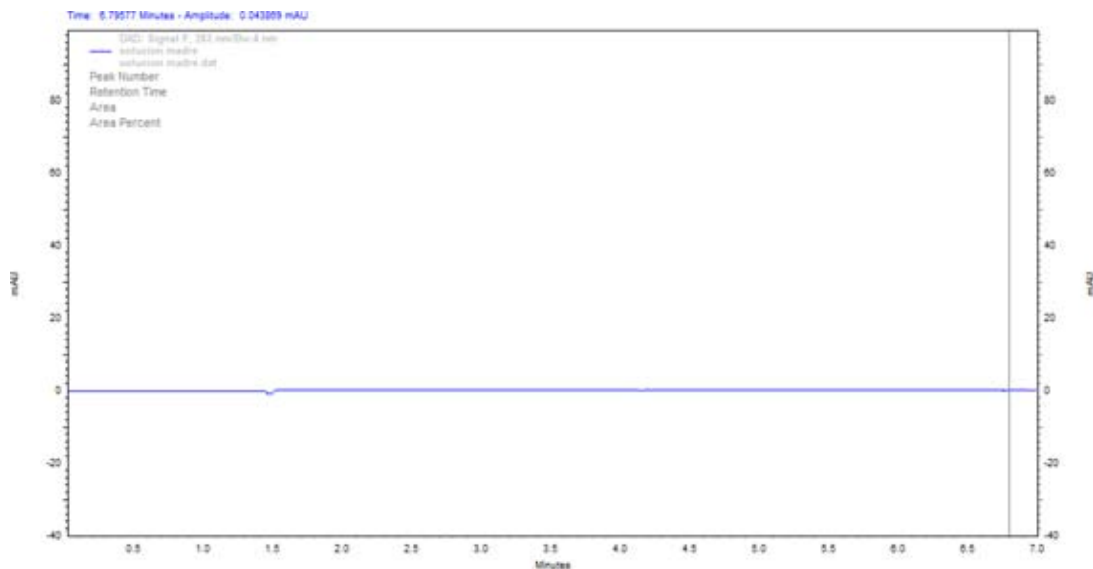


Figura 16. Cromatograma de la solución (etanol: H₂O)

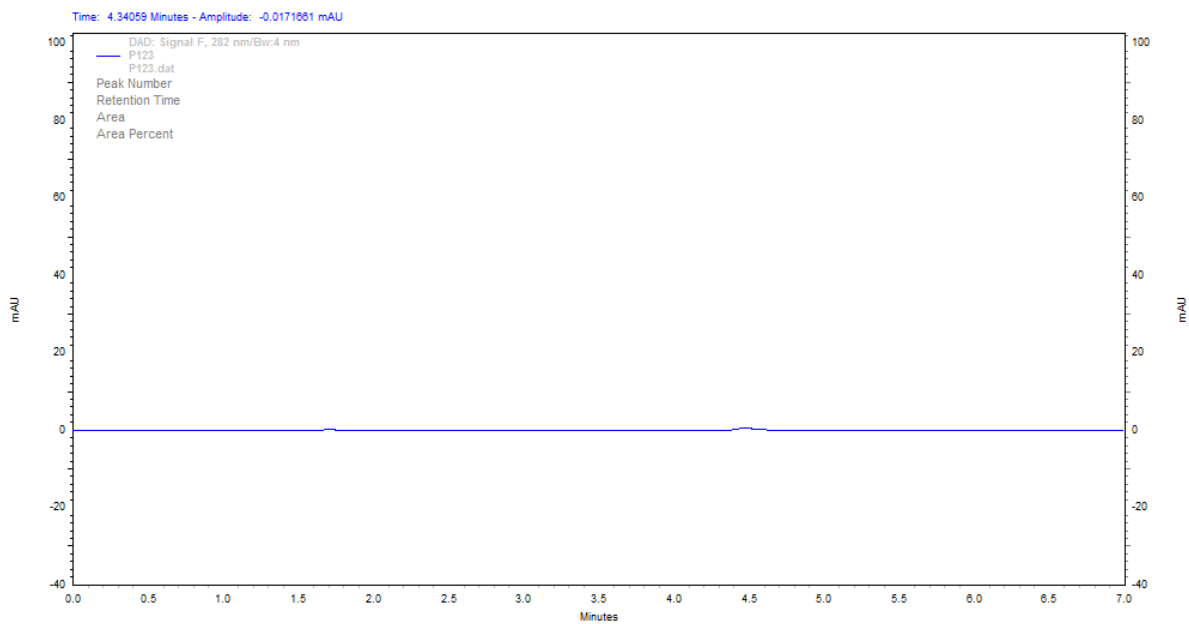


Figura 17. Cromatograma para P123 + H₂O.

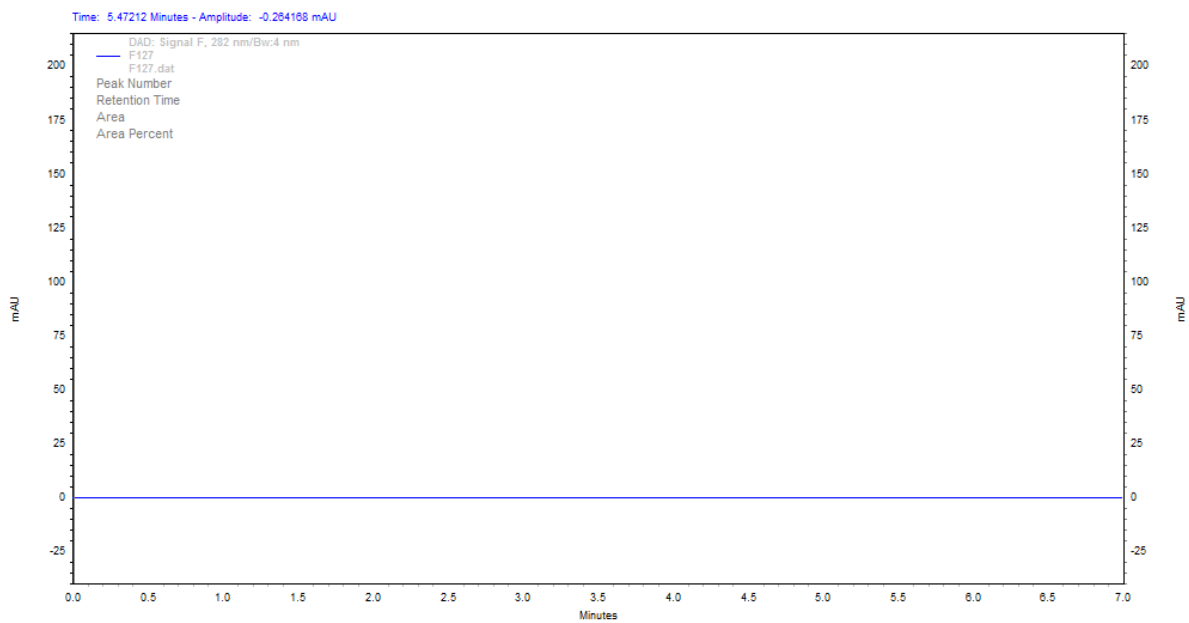


Figura 18. Cromatograma para F127 + H₂O

Al analizar una solución de etanol+ VPA-F se observa un pico a los 4.5 min correspondiente a la presencia de fármaco [24], Figura 19. Este pico se conserva en las soluciones P123+VPA-F y F123+ VPA-F, como se muestra en las Figuras 20 y 21.

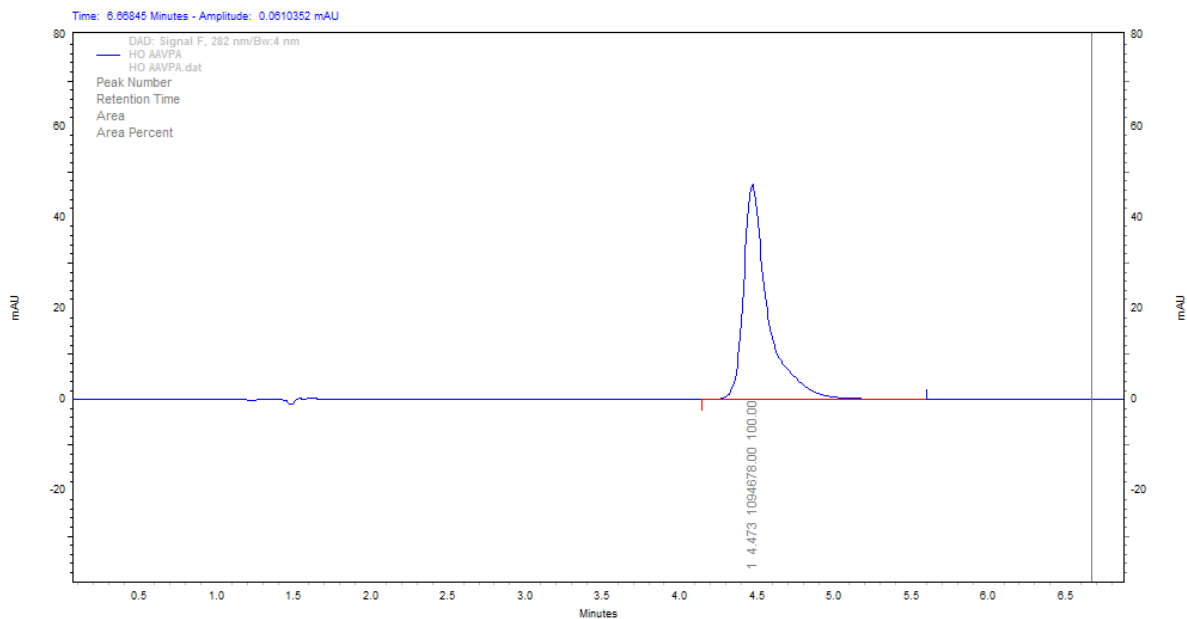


Figura 19. Cromatograma de VPA-F + etanol.

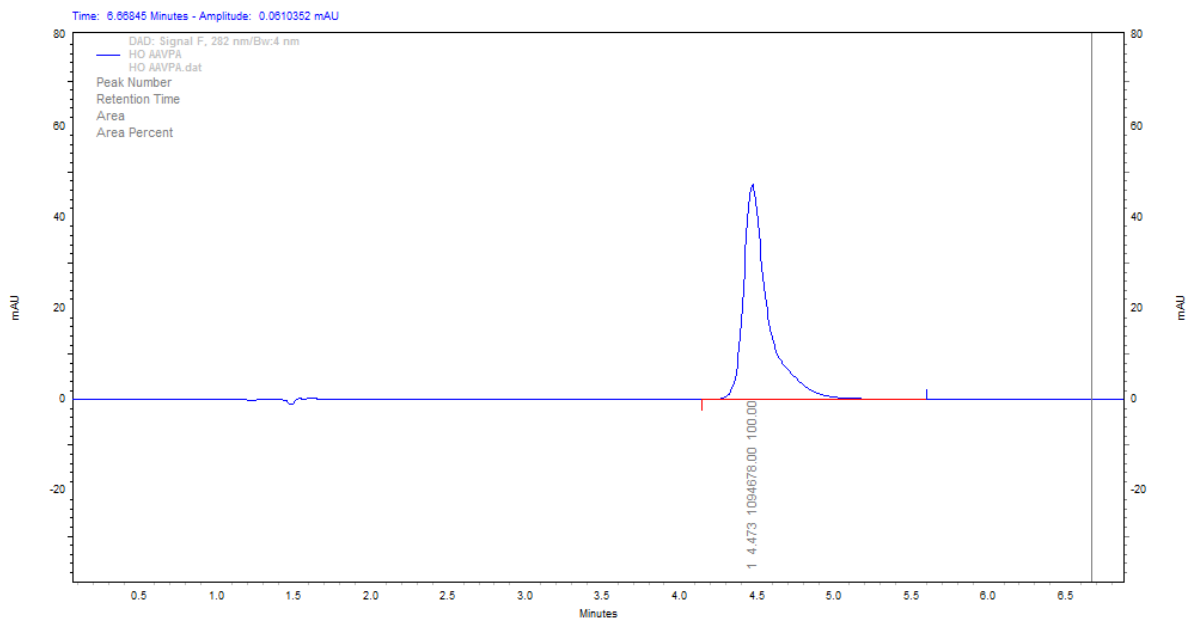


Figura 20. Cromatograma P123 + VPA-F

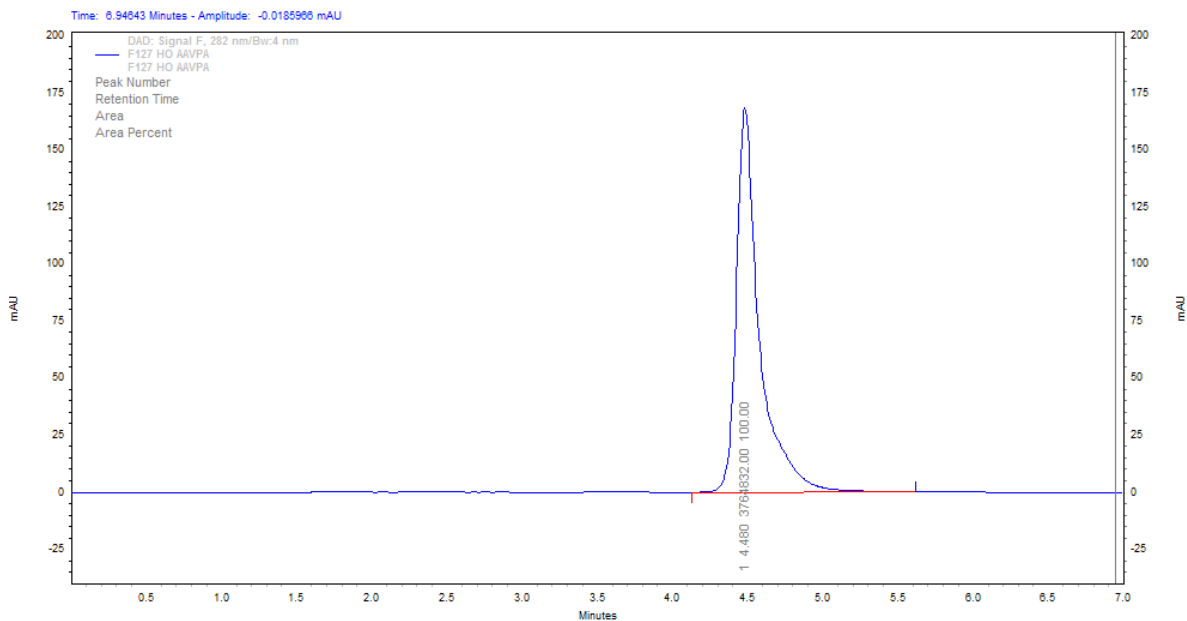


Figura 21. Cromatograma F127 + VPA-F

Con esta técnica corroboramos que la manera de preparación de las muestras no está contaminada o exista algún tipo de degradación del fármaco durante el proceso de elaboración.

6.3 Resultados de Tamaño de Partícula

Se obtuvieron los Diámetros Hidrodinámicos (DH) de los agregados poliméricos con y sin fármaco a diferentes temperaturas de (5°C- 60°C), con ello se puede observar la variación de tamaños y formación de un agregado homogéneo que se asigna a la estructura de la Micela.

6.3.1 Sistema P123+H₂O

Las Figuras 22 a, b, c y d son un ejemplo de los gráficos de distribución de tamaño de partícula obtenidos mediante DLS que corresponden al sistema P123+H₂O 0.5% m/m. Se reportan los resultados obtenidos por intensidad con la que se presentó la distribución de los 3 tamaños a temperaturas bajas de 5°C, 10°C, 15°C y 20°C.

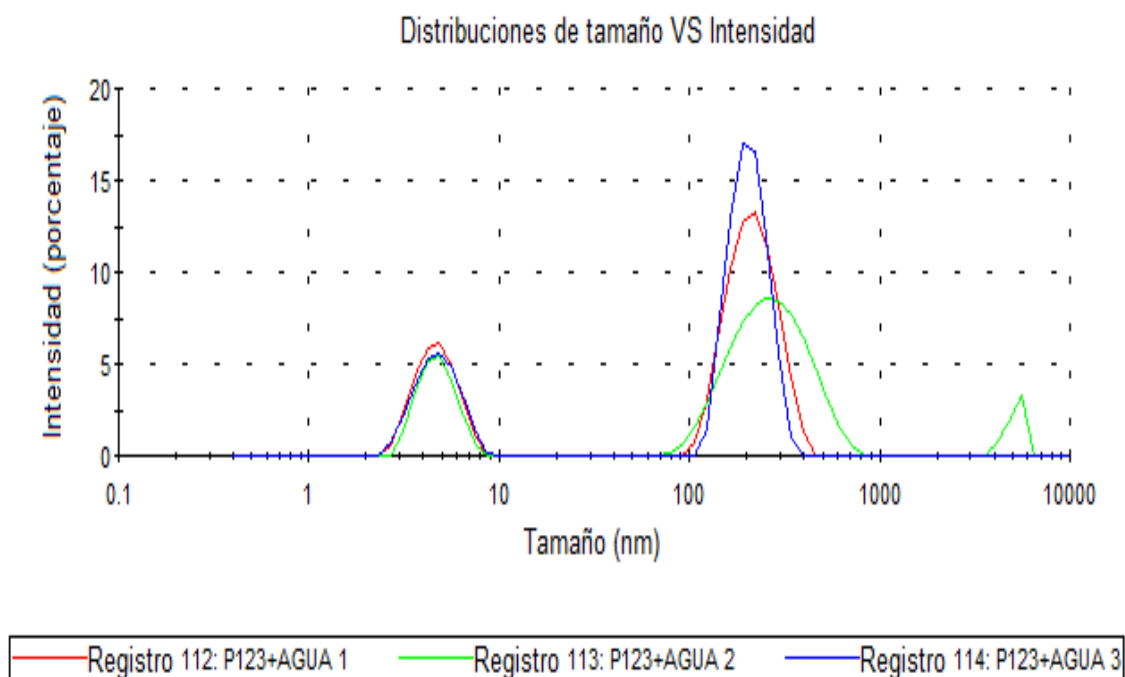


Figura 22. (a) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=5°C

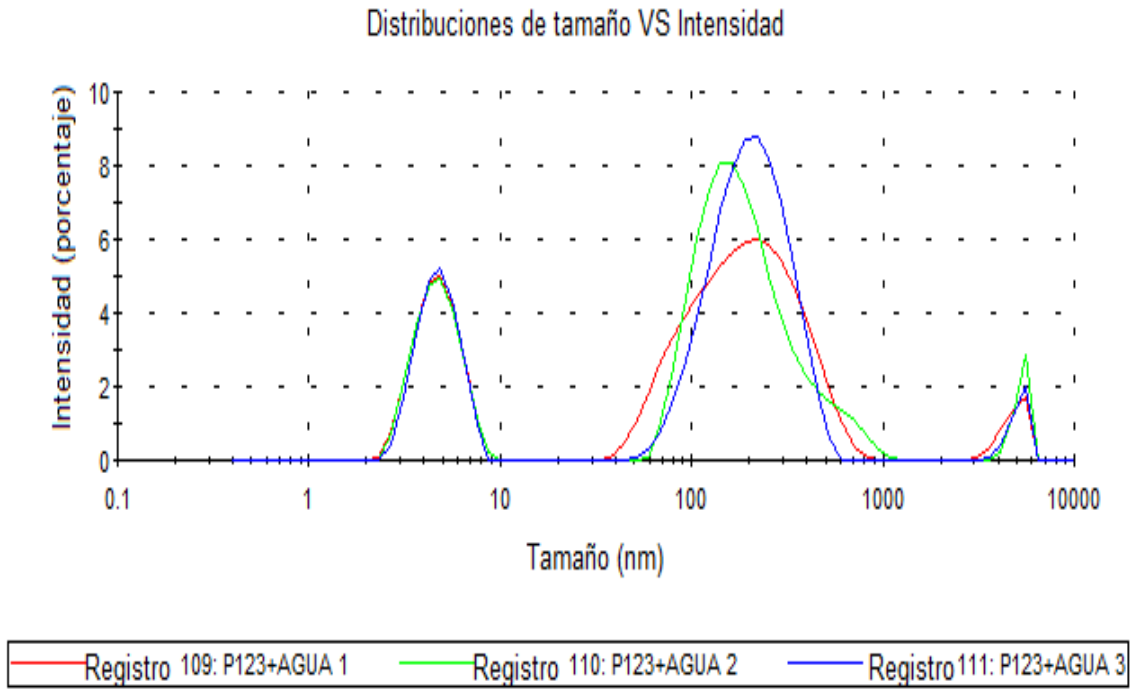


Figura 22. (b) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=10°C

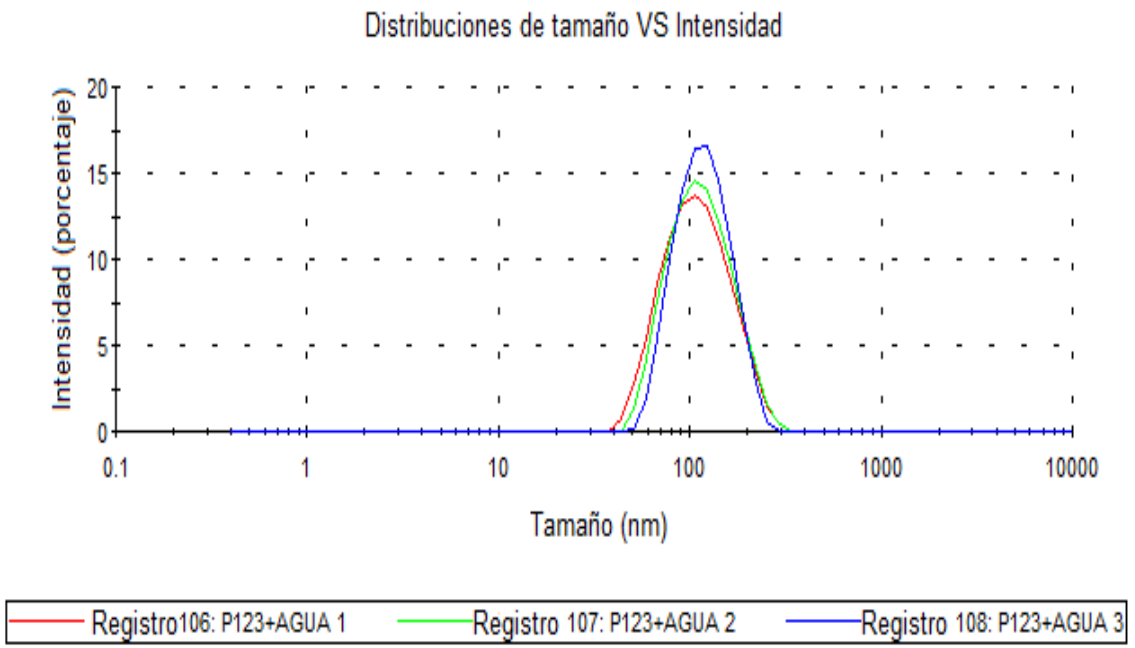


Figura 22. (c) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=15°

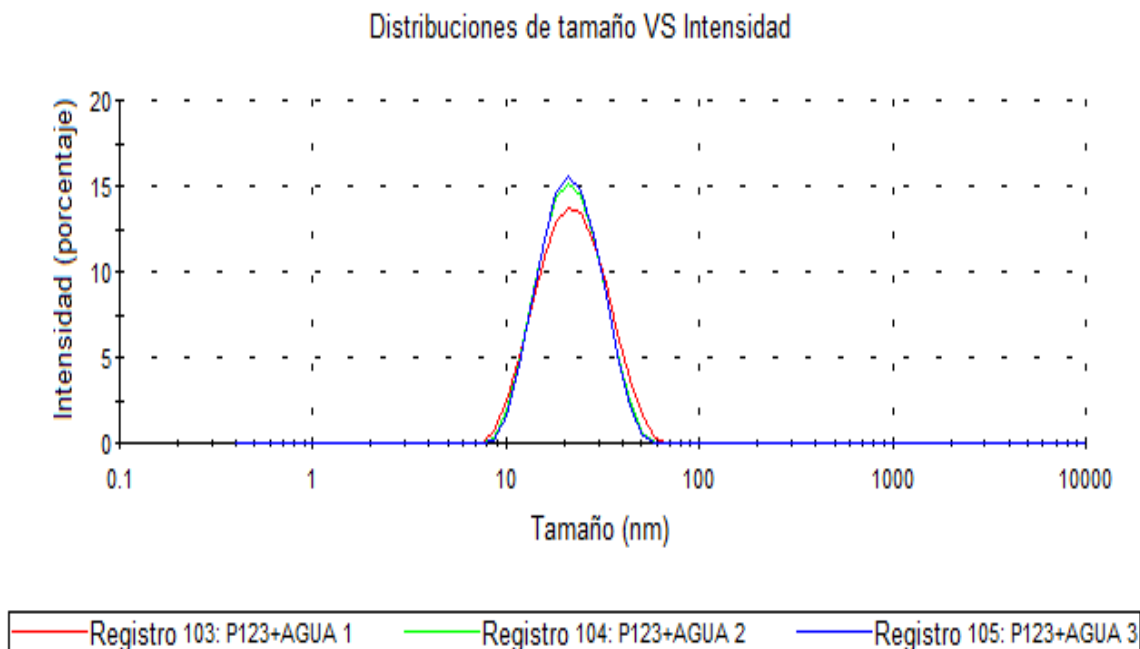


Figura 22. (d) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=20°C

En las Figura 22 (a), (b) y (c) se puede observar que existe más de una población presente a bajas temperaturas, los picos son de diferente tamaño por lo que tenemos diferentes poblaciones poco estables (ya que se observa polidispersidad) especialmente en (a) y (b), la cual disminuye con el aumento de temperatura (Tabla 8). La Figura 22 (d), muestra una población estable a una temperatura de 20°C, temperatura a la cual se inicia la formación de micelas de acuerdo con lo obtenido en la Calorimetría. A temperaturas mayores a 20°C se observa una población con un tamaño homogéneo alrededor de 33 nm asociado al tamaño de la micela polimérica, Figura 23 (e, f, g y h).

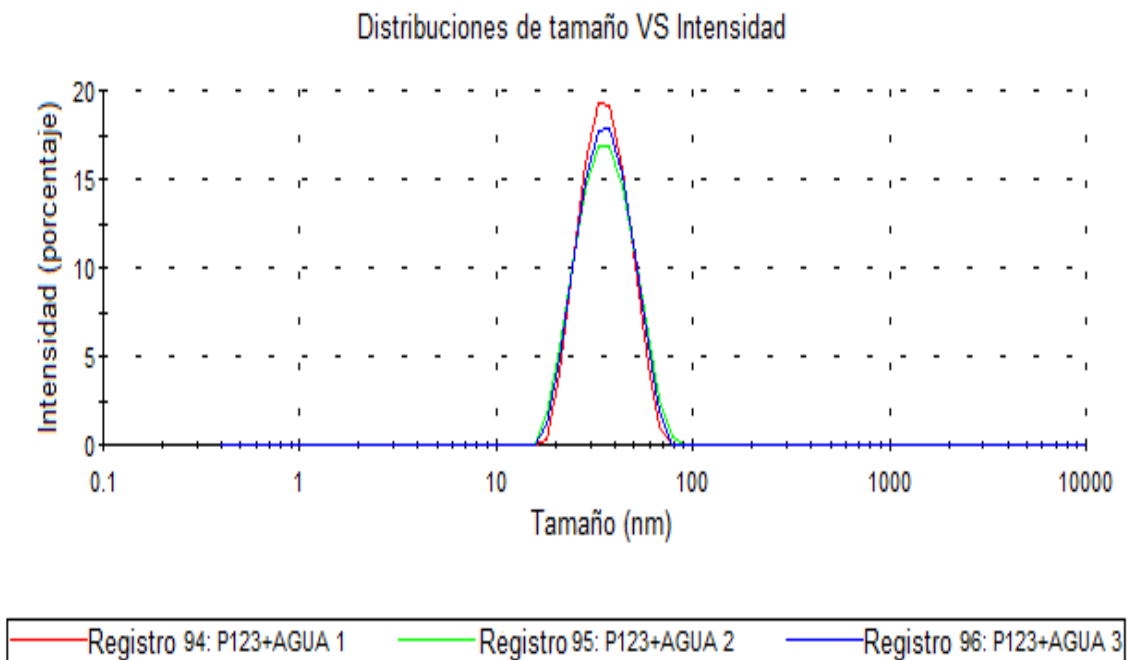


Figura 23. (e) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=35°C

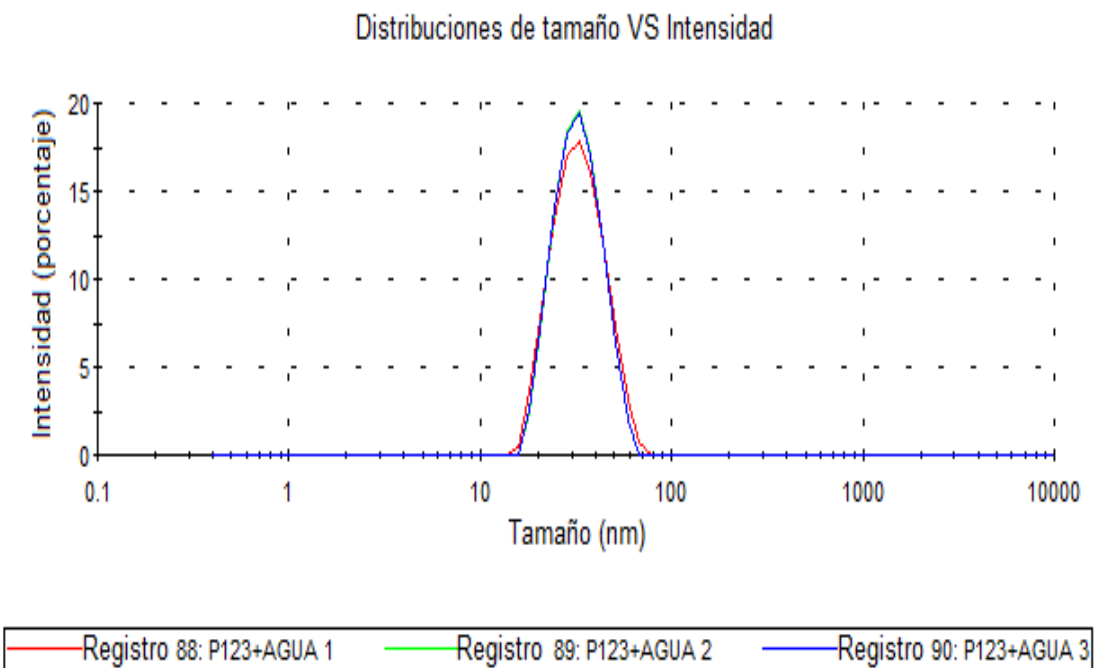


Figura 23. (f) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=45°C

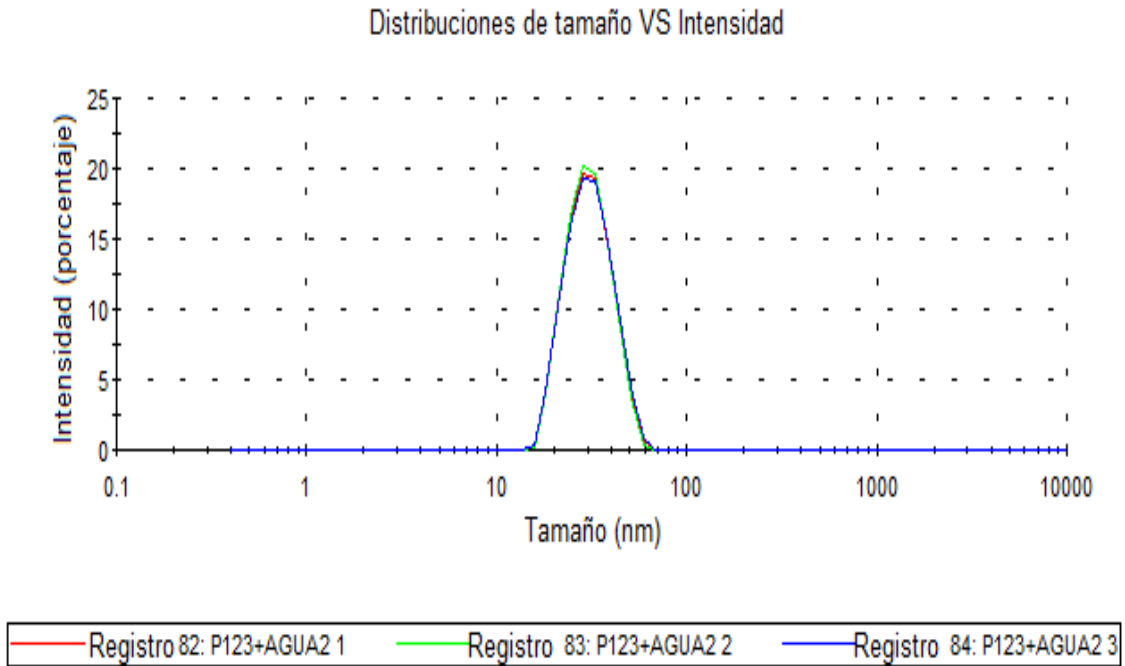


Figura 23. (g) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=55°C

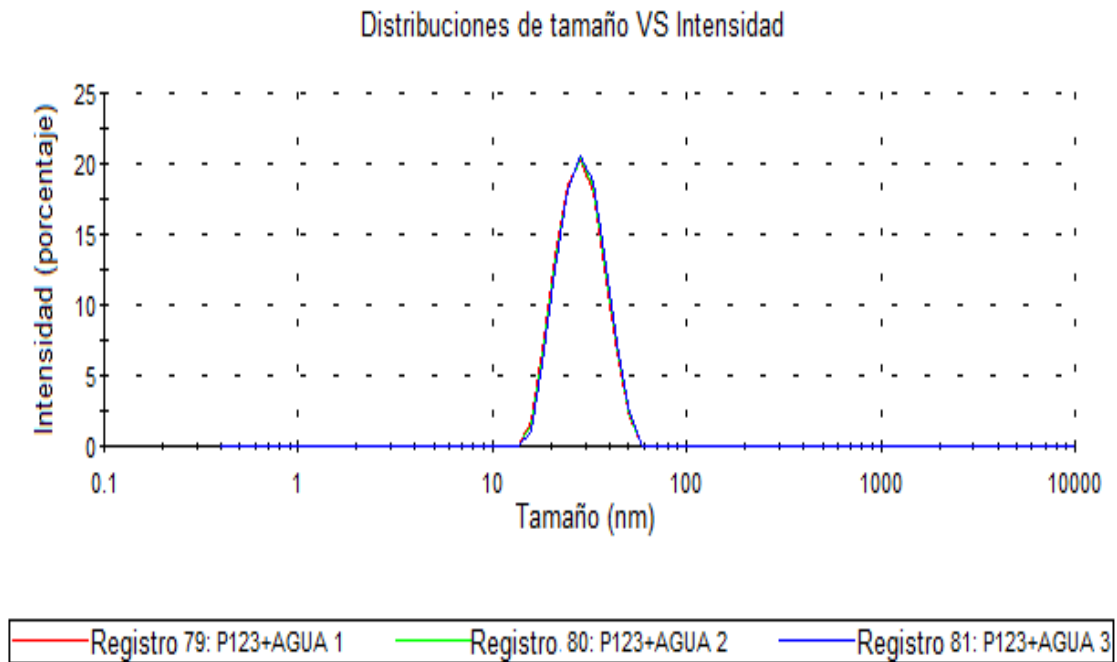


Figura 23. (h) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + H₂O a T=60°C

| P123 + H ₂ O | | | |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TEMPERATURA (°C) | TAMAÑO 1 (nm) | TAMAÑO 2 (nm) | TAMAÑO3 (nm) |
| | Tamaño | Tamaño | Tamaño |
| | Promedio/Desviación | Promedio/Desviación | Promedio/Desviación |
| | Promedio | Promedio | Promedio |
| 60°C | 29±8 | 0±0 | 0±0 |
| 55°C | 31±8 | 0±0 | 0±0 |
| 50°C | 33±9 | 0±0 | 0±0 |
| 45°C | 33±9 | 0±0 | 0±0 |
| 40°C | 35±9 | 0±0 | 0±0 |
| 35°C | 37±11 | 0±0 | 0±0 |
| 30°C | 43±16 | 0±0 | 0±0 |
| 25°C | 38±28 | 1079±527 | 0±0 |
| 20°C | 23±8 | 0±0 | 0±0 |
| 15°C | 120±44 | 0±0 | 0±0 |
| 10°C | 220±128 | 5±1 | 5071±559 |
| 5°C | 237±78 | 5±1 | 1716±170 |

Tabla 8. Diámetros Hidrodinámicos (DH) obtenidos para el sistema P123+H₂O mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) durante el barrido de temperaturas (60°C – 5°C).

La Tabla 8 nos muestra el promedio de cada población obtenida para el experimento de P123+H₂O, como se puede observar a temperaturas mayores de 25°C existe un tamaño homogéneo que se adjudica a la micela polimérica, sin embargo en el intervalo de temperatura de (40°C-55°C) no existe variación significativa en los tamaños. Una representación visual se muestra en la (Figura 24), la cual se dividió en zonas para distinguir la dependencia de las poblaciones con respecto a la temperatura. En la zona I claramente se observan diferentes poblaciones de las cuales cabe resaltar el tamaño encontrado a 5 nm el cual se asocia a los monómeros del P123, de acuerdo a lo reportado con la técnica de DLS el diámetro encontrado de tamaños es de 2 a 20 nm, el equipo usado fue un Zetasizer Nano-ZS 4800, Malvern Instruments, Reino Unido a una temperatura de 25°C. [23]

La zona II presenta uniformidad de tamaño a partir de los 25°C en adelante.

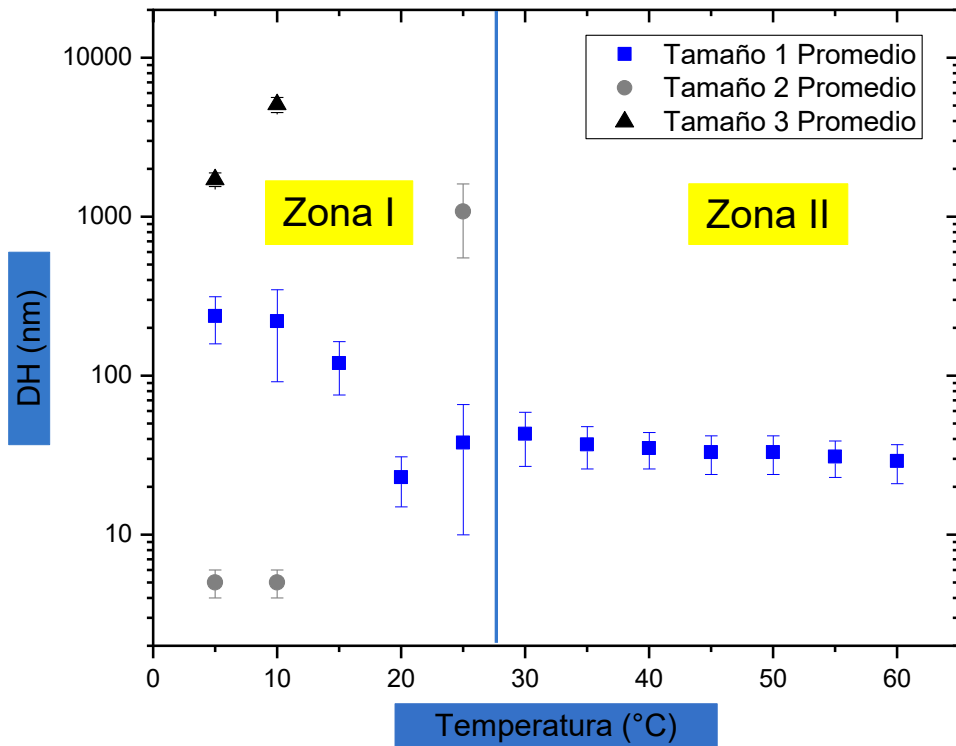


Figura 24. (DH) del sistema P123+H₂O sin fármaco encontrados durante el barrido de temperatura (5°C-60°C), se divide en dos zonas respecto a la homogeneidad de los tamaños encontrados.

Sistema P123+VPA-F

El resumen de los datos obtenidos de los (DH) para este sistema se resumen en la Tabla 9. El comportamiento es muy similar que el observado para P123+ H₂O, a bajas temperaturas se observa una polidispersidad (Figura 25) y las poblaciones se homogenizan con el aumento de temperatura a partir de 35°C, una temperatura por arriba de la encontrada en el sistema P123+ H₂O en el cual se observó a 20 °C. A temperaturas por arriba de los 35°C la población es homogénea como se observa en la Figura 26 (e, f, g y h). A partir de los 35°C el tamaño permanece homogéneo cercano a los 29 nm, como se puede observar en la figura 26 (e, f, g, y h).

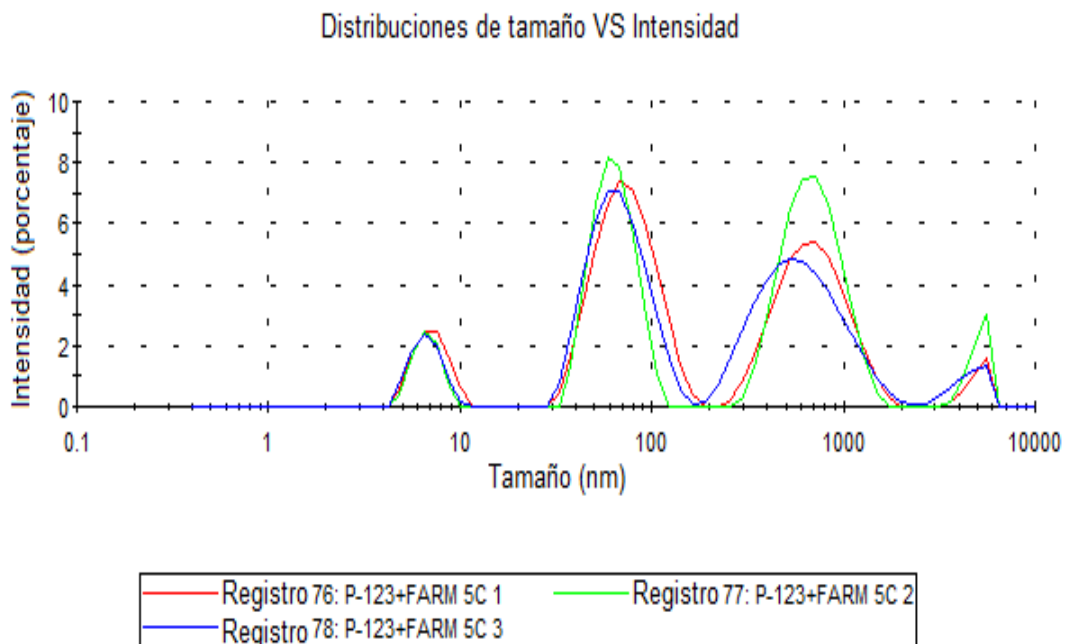


Figura 25. (a) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=5°C

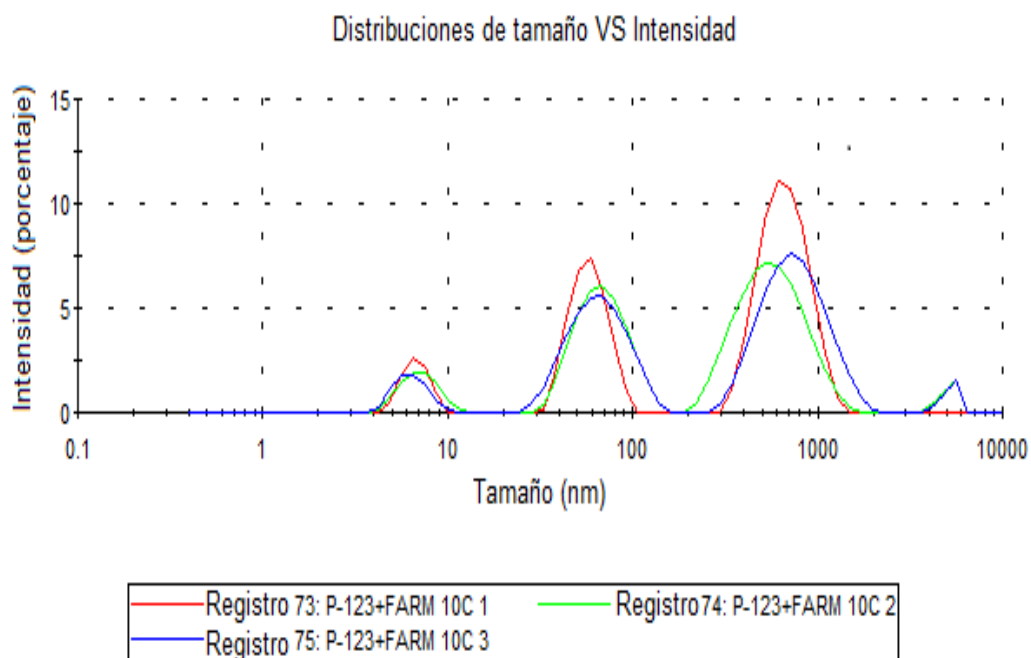


Figura 25. (b) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=10°C

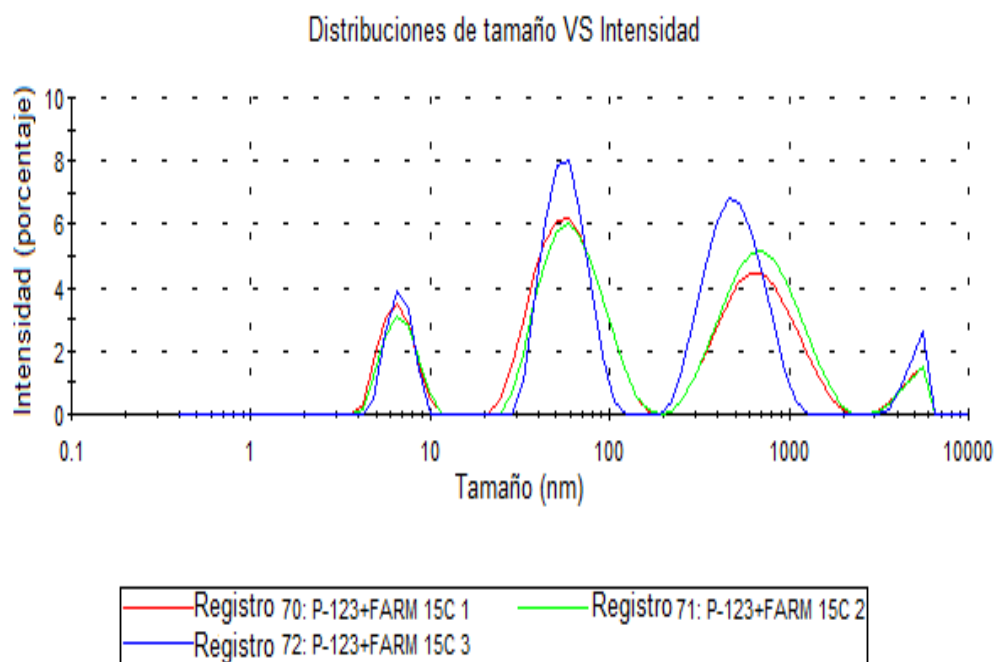


Figura 25. (c) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=15°C

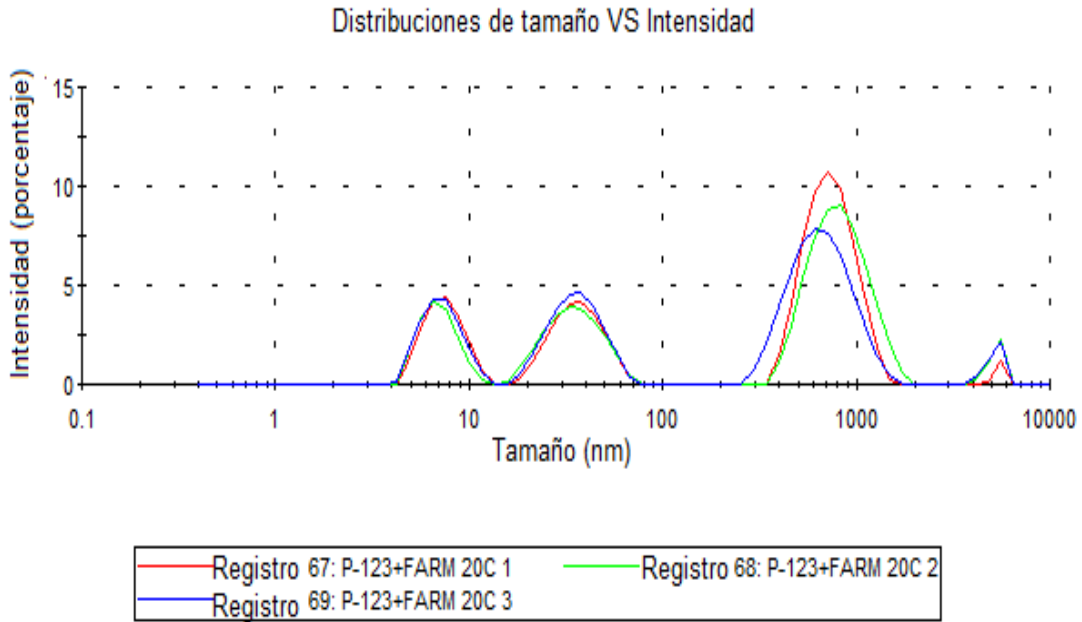


Figura 25. (d) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=20°C

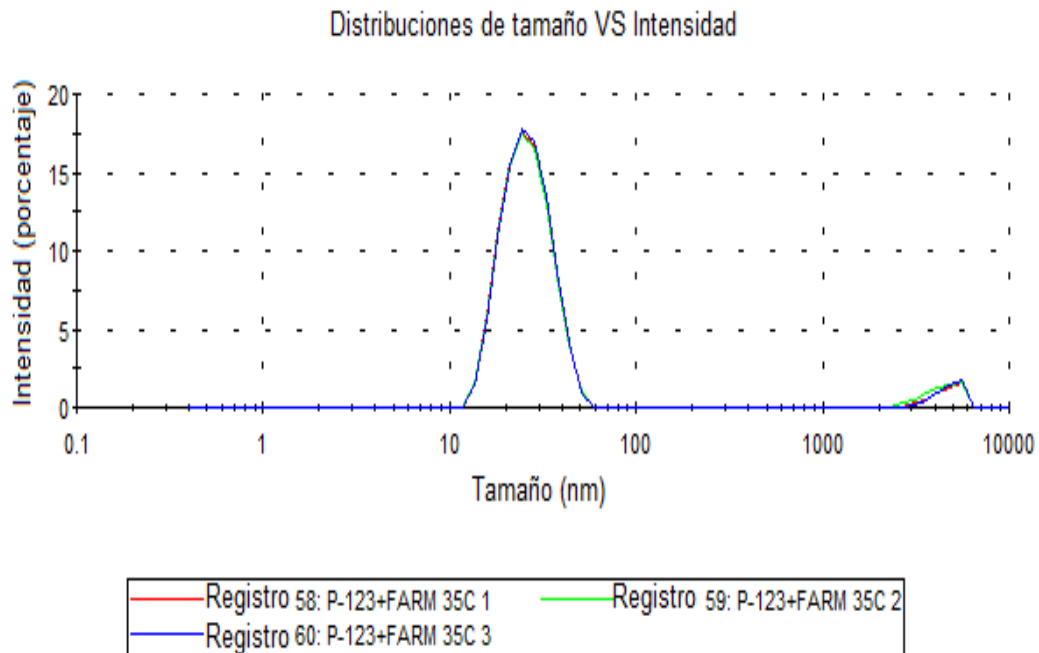


Figura 26. (e) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=35°C

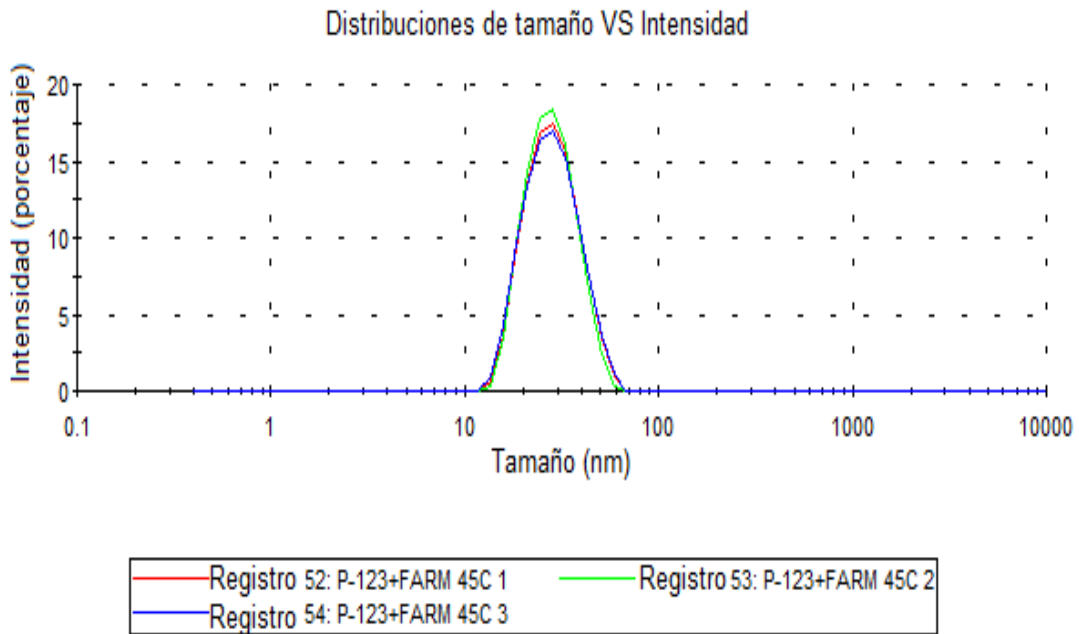


Figura 26. (f) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=45°C

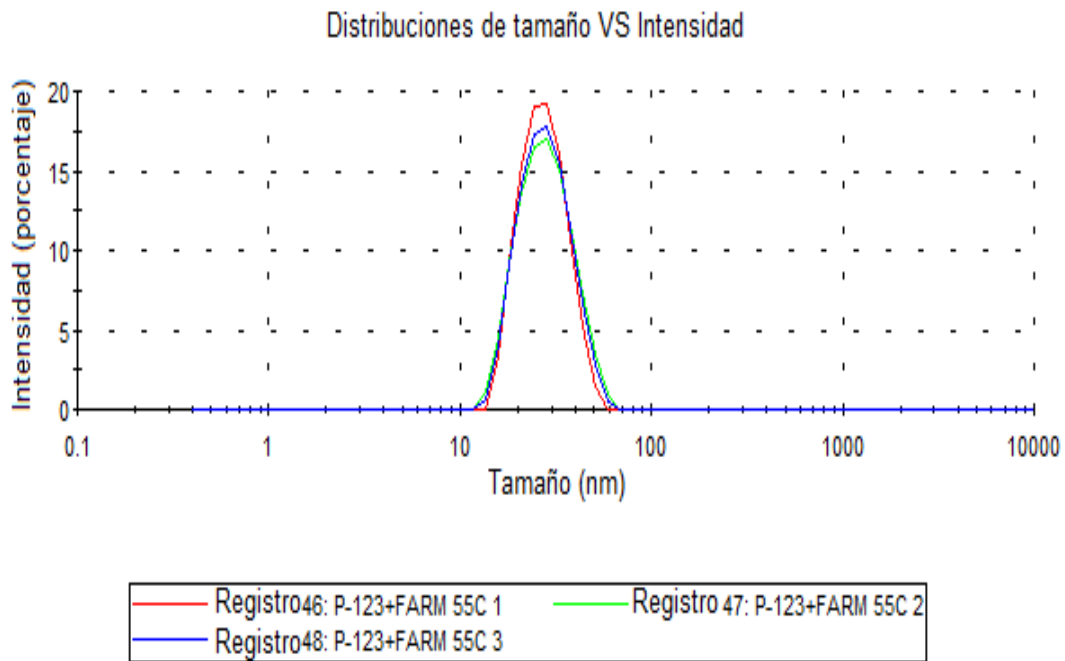


Figura 26. (g) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=55°C

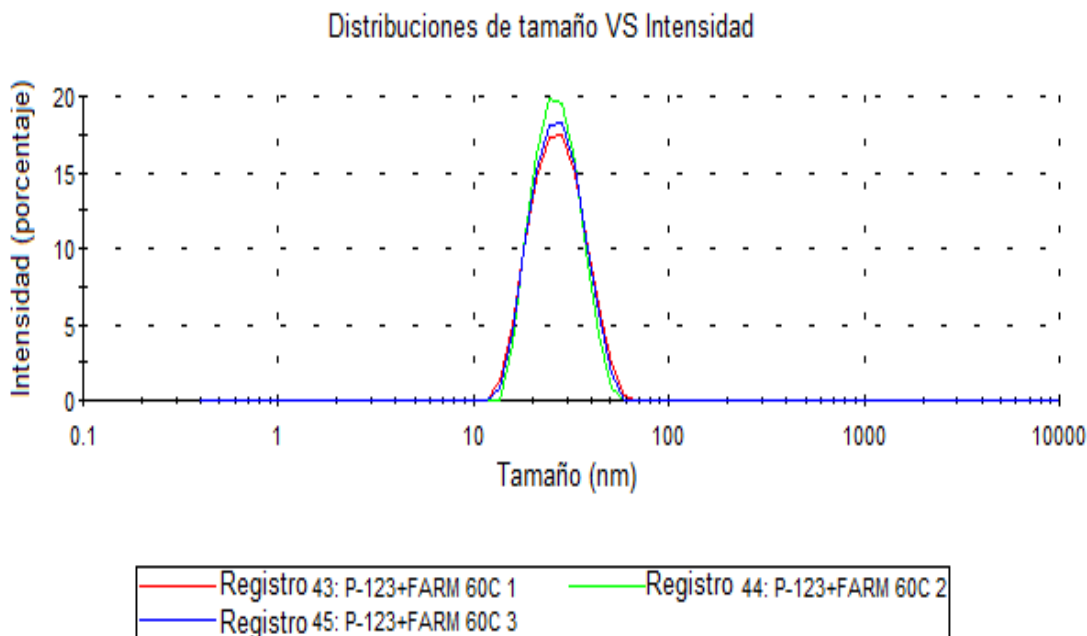


Figura 26. (h) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema P123 + VPA-F a T=60°C

| P123 + VPA-F | | | |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TEMPERATURA (°C) | TAMAÑO 1(nm) | TAMAÑO 2 (nm) | TAMAÑO3 (nm) |
| | Tamaño | Tamaño | Tamaño |
| | Promedio/Desviación | Promedio/Desviación | Promedio/Desviación |
| | Promedio | Promedio | Promedio |
| 60°C | 28±8 | - | 0±0 |
| 55°C | 28±8 | - | 0±0 |
| 50°C | 29±9 | - | 0±0 |
| 45°C | 29±9 | 0±0 | 0±0 |
| 40°C | 28±8 | 5210±458 | 0±0 |
| 35°C | 26±8 | 4613±819 | 0±0 |
| 30°C | 26±8 | 2433±1136 | 1615±193 |
| 25°C | 27±8 | 656±197 | 6±1 |
| 20°C | 758±246 | 37±11 | 7±2 |
| 15°C | 447±183 | 283±122 | 7±1 |
| 10°C | 687±248 | 66±20 | 7±1 |
| 5°C | 480±201 | 287±110 | 7±1 |

Tabla 9. Diámetros Hidrodinámicos (DH) obtenidos para el sistema P-123+ VPA-F mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) durante el barrido de temperaturas (60°C – 5°C).

Nota: La concentración en este sistema de VPA-F es 0.69 mg/ml

Los DH obtenidos para el sistema P123+VPA-F se presentan en la Tabla 9 y una representación visual la encontramos en la gráfica de la Figura 27. Esta figura representa las medidas de los (DH) y está dividido en dos zonas, la primera zona se encuentra en el intervalo que va desde los (5°C-40°C) y la segunda zona se encuentra a partir de los (40°C-60°C), en este segundo intervalo se obtuvieron tamaños de partícula homogéneos, el tamaño más abundante es de 28 nm (con un porcentaje de abundancia del 98.9%) el cual se adjudica al tamaño de la micela con fármaco. Observándose una reducción del tamaño micelar con respecto al valor de 33 nm encontrado en el sistema P123 + H₂O. Indicando la interacción entre el copolímero y el VPA-F. En la literatura se reporta que el DH encontrado para micelas con fármaco (P123+Fármaco) es de 38.9 nm (mayores al encontrado en este trabajo) con una distribución de tamaños de 24 a 84 nm, utilizando un equipo de Zetasizer 3000SH, Malvern Instruments, Reino Unido a una temperatura de 25°C. [23]

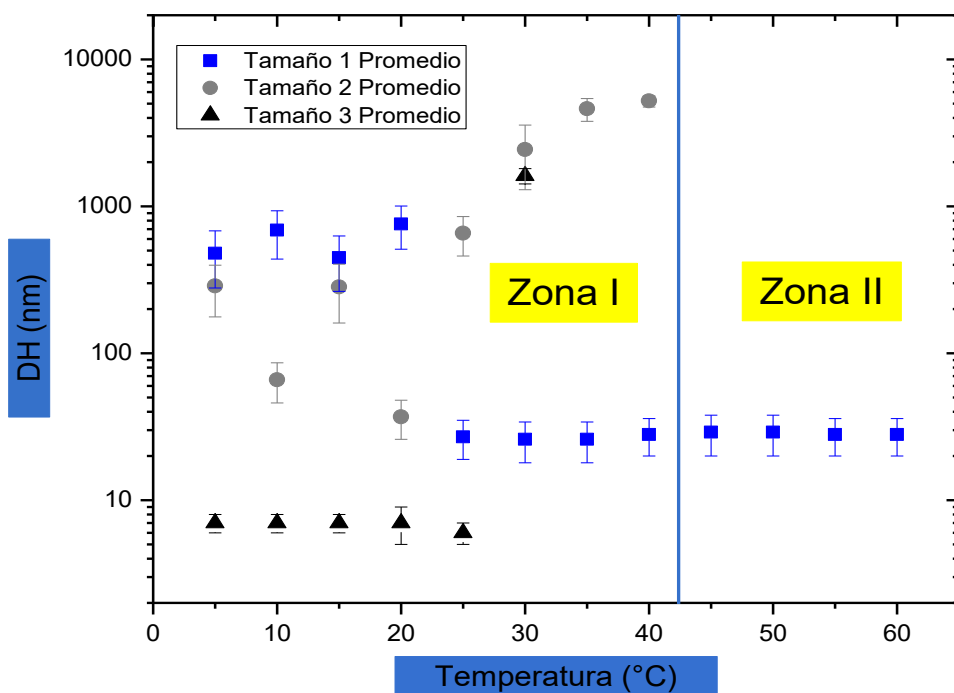


Figura 27. (DH) del sistema P123+VPA-F encontrados durante el barrido de temperatura de (5°C-60°C), se encuentra dividido en dos zonas de acuerdo a la homogeneidad con respecto al tamaño de los agregados.

6.3.2 Sistema F127+H₂O

El sistema F127+H₂O fue analizado de la misma manera que el anterior. La Figura 28 (a) y (b) son ejemplo de los gráficos de distribución de tamaño de partícula a bajas temperaturas.

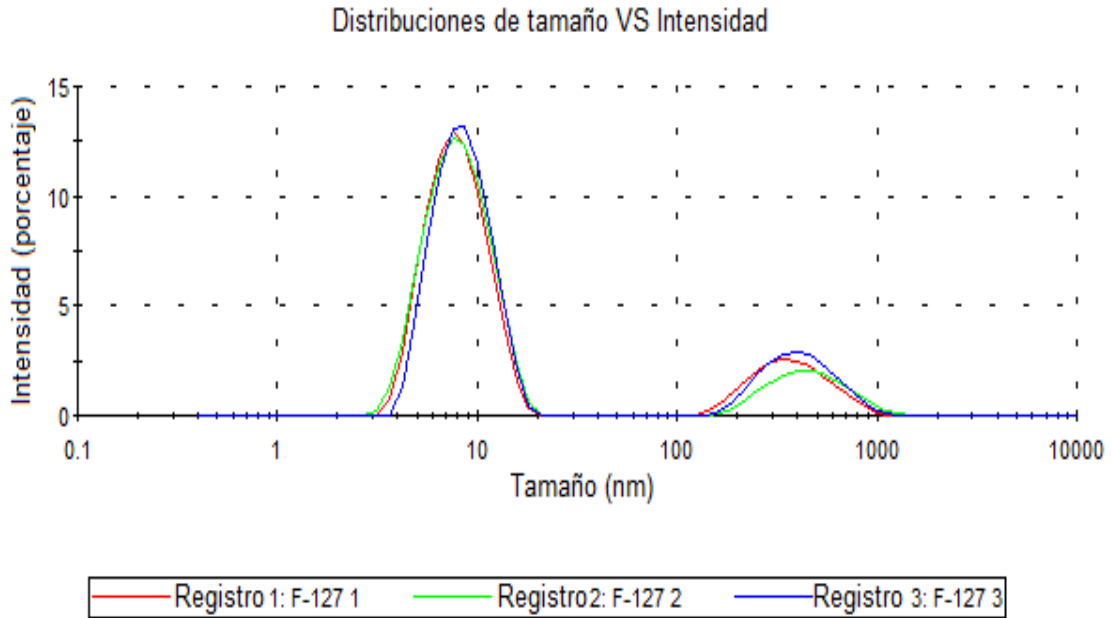


Figura 28. (a) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127 + H₂O a T=5° C

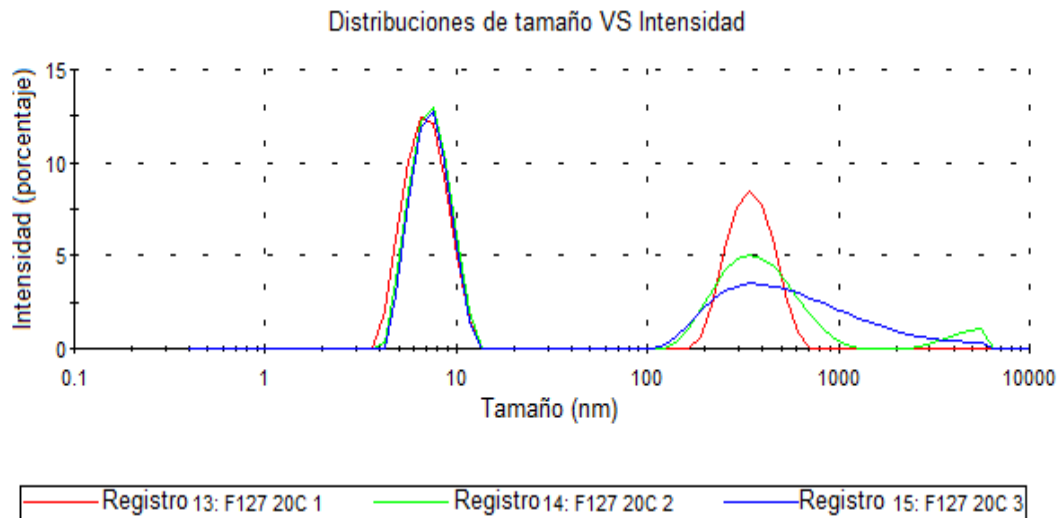


Figura 28. (b) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127 + H₂O a T=20°C

La Figura 28 (a) y (b) mostraron polidispersidad en la muestra, la cual se mantuvo en el intervalo de temperaturas de (5°C-25°C). El mismo comportamiento se observó en los sistemas anteriormente descritos (Tabla 8 y 9), con el aumento de la temperatura se homogeneiza esta polidispersidad obteniendo un tamaño promedio de (25 nm) en un intervalo de temperaturas de 30°C-60°C (Tabla 10). Este valor corresponde a la micela polimérica de F127 y está en concordancia con los valores obtenidos por (Duo We, DH de 20 nm por la técnica de DLS usando un Instrumento de Dispersión de luz láser ALV 5022 equipado con un láser He-Ne cilíndrico (10632.8 nm) a temperaturas de 20°C Y 40°C). [24]

Con los datos de la Tabla 10 fue posible construir la Figura 29 donde se dividió en dos zonas. La zona I presenta mucha polidispersidad y zona II, es una zona homogénea como se vio anteriormente en el sistema P123+H₂O. La Zona I se encuentra dentro del intervalo de temperatura que va de (5°C-25°C) y presenta diferentes distribuciones en cuanto al (DH), para estas temperaturas el tamaño más abundante corresponde alrededor de 7 nm (con un porcentaje de abundancia de 67%). Al aumentar la temperatura pasamos a la zona II dentro del intervalo de temperatura de (30°C – 60°C) donde se encontró una homogeneidad en el tamaño del (DH) con un valor de 25 nm, conforme disminuye la temperatura también disminuye el tamaño.

Comparando los dos sistemas P123+H₂O y F127+H₂O encontramos que entre (25°C Y 30°C) ocurre la transición del sistema polidisperso a un sistema monodisperso, por lo que se observa la dependencia de los agregados con la temperatura. Se encontró que el tamaño de las micelas de P123 (33 nm) fue más grande comparado con el tamaño de las micelas de F127 (25nm).

| F127 + H ₂ O | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| TEMPERATURA (°C) | TAMAÑO 1 (nm) | TAMAÑO 2 (nm) | TAMAÑO 3 (nm) |
| | Tamaño Promedio/Desviación Promedio | Tamaño Promedio/Desviación Promedio | Tamaño Promedio/Desviación Promedio |
| 60°C | 24±6 | 0±0 | 0±0 |
| 55°C | 25±6 | 0±0 | 0±0 |
| 50°C | 24±6 | 0±0 | 0±0 |
| 45°C | 25±7 | 0±0 | 0±0 |
| 40°C | 26±7 | 0±0 | 0±0 |
| 35°C | 25±7 | 0±0 | 0±0 |
| 30°C | 26±10 | 0±0 | 0±0 |
| 25°C | 7±2 | 308±143 | 386±243 |
| 20°C | 7±2 | 520±381 | 1506±292 |
| 15°C | 8±2 | 513±183 | 0±0 |
| 10°C | 7±2 | 1641±666 | 0±0 |
| 5°C | 8±3 | 439±187 | 0±0 |

Tabla 10. Diámetros Hidrodinámicos (DH) obtenidos para el sistema F127+H₂O mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz durante el barrido de temperaturas (60°C – 5°C).

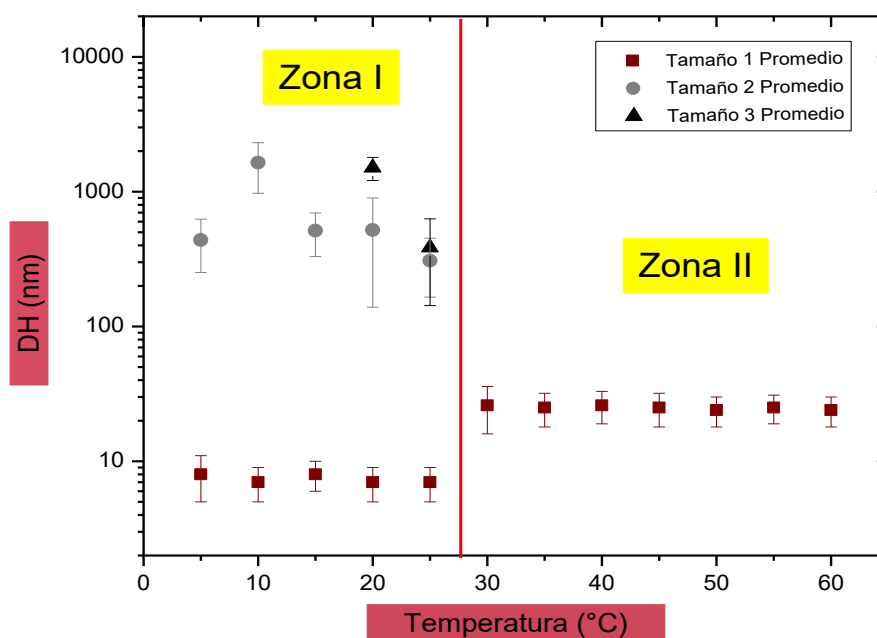


Figura 29. (DH) del sistema F127+H₂O encontrados durante el barrido de temperatura de (5°C-60°C), se divide en dos zonas de acuerdo a la homogeneidad y polidispersidad con respecto al tamaño de los agregados.

Sistema F127+VPA-F

El efecto sobre el DH de adicionar fármaco (VPA-F) al sistema F127+H₂O a temperaturas de 5°C y 20°C se muestra en las Figura 30 (a) y (b), donde se encontraron cuatro distribuciones a temperaturas menores a 20 °C, Tabla 11. La Figura 30 (c) y (d), corresponden a las mediciones del sistema F127+VPA-F, a una temperatura de 55°C y 60 °C, respectivamente, se observan una homogeneidad en el tamaño a dos distribuciones donde se vuelve más notorio cómo va incrementando el tamaño del segundo pico el cual se asocia a la formación de nuevos agregados.

Como se observa en la Tabla 11, este sistema presenta tres zonas, la zona I presenta mucha polidispersidad de tamaños, en la zona II el tamaño se homogeneiza y en la zona III se observan dos pico, uno a 50nm (el más abundante) y otro a 300 nm los cuales se asocian a la disgregación y reorganización de los agregados poliméricos.

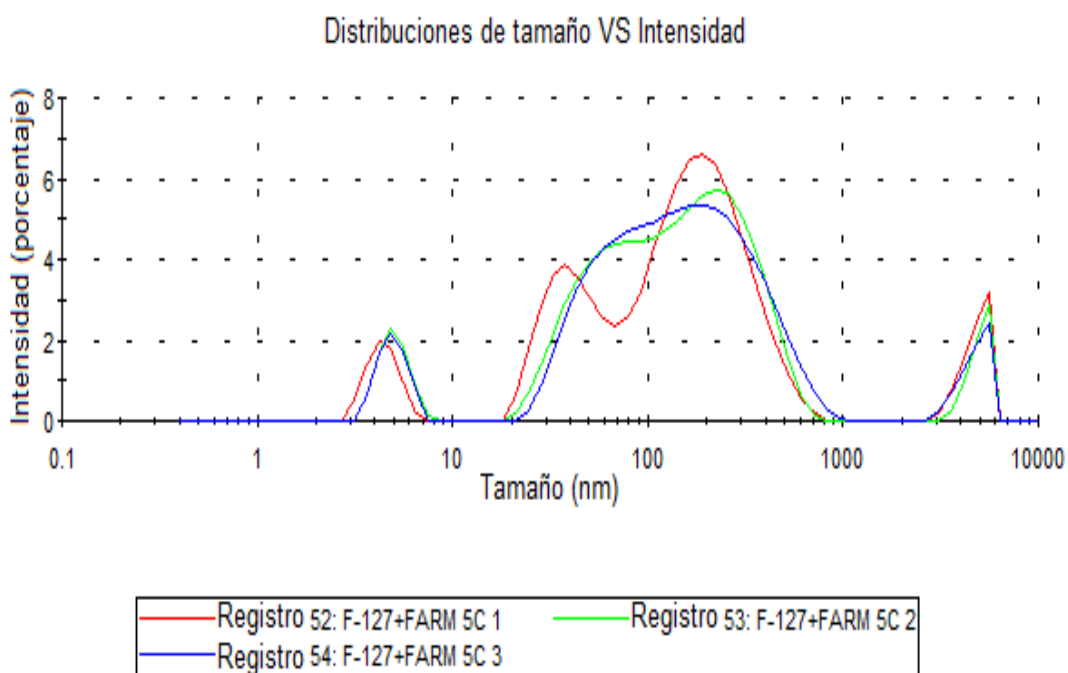


Figura 30. (a) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127 + VPA-F a T=5°C

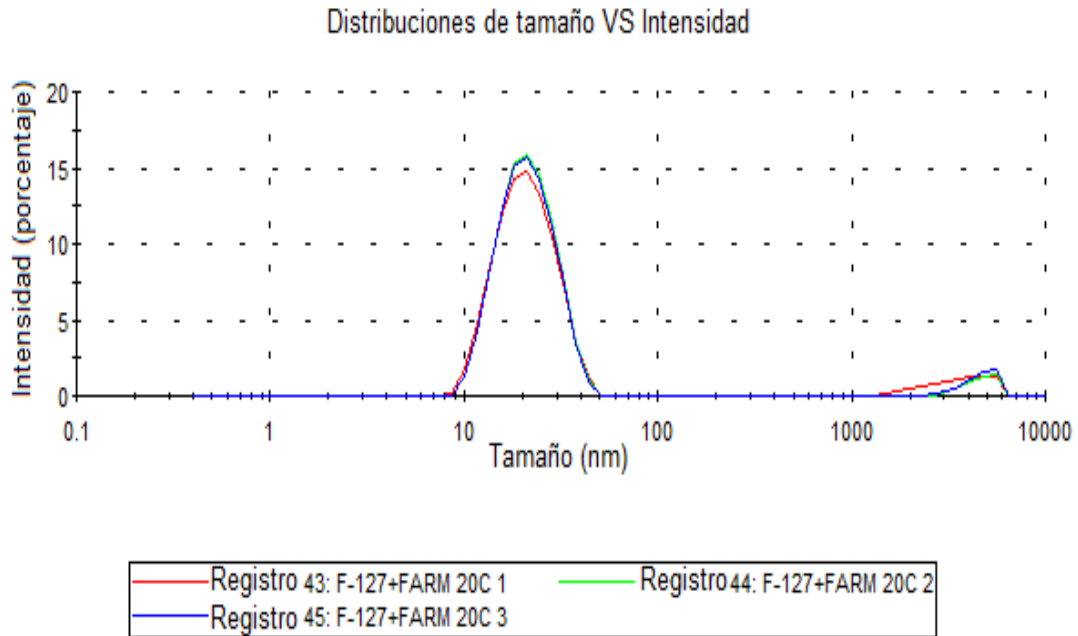


Figura 30. (b) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127+ VPA-F a T=20°C

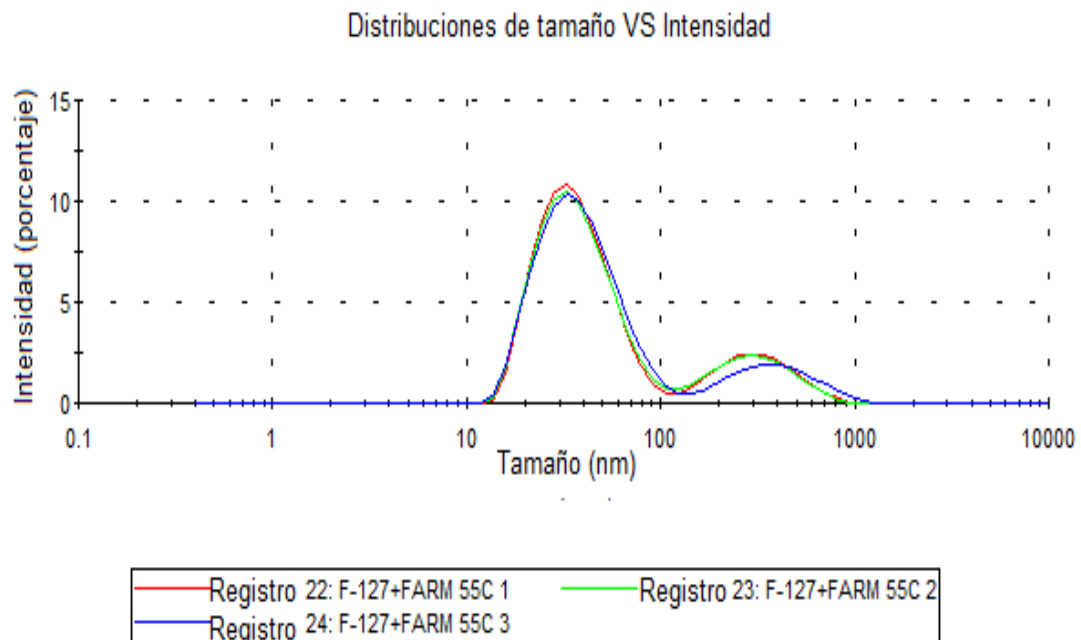


Figura 30. (c) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127+ VPA-F a T=55°C

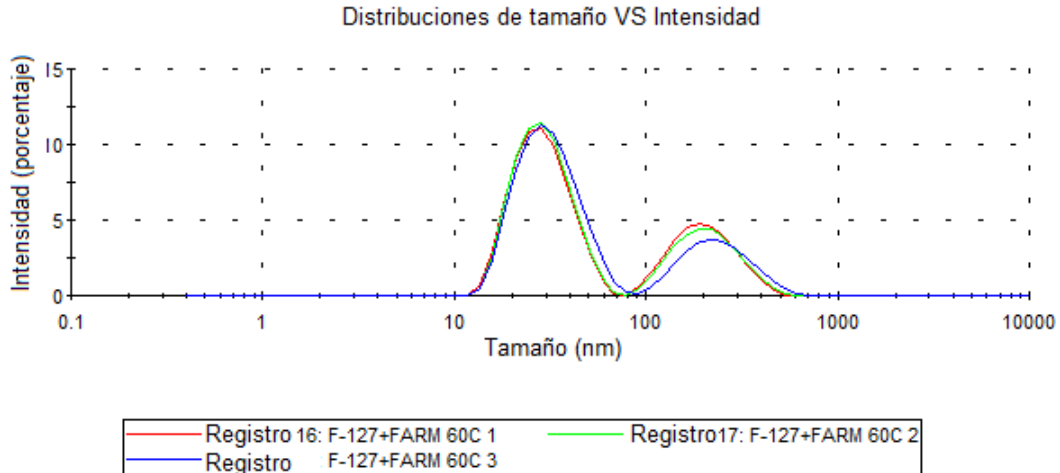


Figura 30. (d) Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127+ VPA-F a T=60°C

Figura 31. Distribución de los tamaños de partícula para el sistema F127 + VPA-F a diferentes temperaturas: (a) 5 °C, (b) 20 °C, (c) 55°C y (d) 60 °C.

| F127 + VPA-F | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TEMPERATURA (°C) | TAMAÑO 1(nm) | TAMAÑO 2(nm) | TAMAÑO3 (nm) |
| | Tamaño | Tamaño | Tamaño |
| | Promedio/Desviación | Promedio/Desviación | Promedio/Desviación |
| 60°C | 30±10 | 225±86 | 0±0 |
| 55°C | 35±15 | 231±96 | 1790±109 |
| 50°C | 37±15 | 260±103 | 1728±161 |
| 45°C | 39±17 | 294±116 | 1696±186 |
| 40°C | 39±16 | 3488±1222 | 0±0 |
| 35°C | 36±14 | 0±0 | 0±0 |
| 30°C | 44±19 | 0±0 | 0±0 |
| 25°C | 36±26 | 1603±385 | 0±0 |
| 20°C | 22±7 | 4329±958 | 0±0 |
| 15°C | 87±99 | 4199±988 | 0±0 |
| 10°C | 95±36 | 4879±671 | 157±34 |
| 5°C | 191±131 | 17±5 | 4856±696 |

Tabla 11. Diámetros Hidrodinámicos (DH) obtenidos para el sistema F127+VPA-F, mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) durante el barrido de temperaturas (5°C-60°C).

Para este sistema también se realizó el gráfico de DH contra temperatura, Figura 31, la cual muestra tres zonas, en la zona I se observa mucha polidispersidad en un intervalo de temperatura de (5°C-25°C), no existe un tamaño abundante, la zona II se encuentra en el intervalo de temperatura de (25°C-40°C) aquí se encuentra un solo tamaño entre 36 y 44 nm el cual se le adjudica a la micela polimérica con fármaco; observando que aumenta el DH con respecto a la micela sin fármaco es de un 80 %, y las medidas de los DH son muy similares. En la zona III aumenta la polidispersidad como se observó en la Figura 30 (c) y (d) posiblemente por la agregación de las micelas.

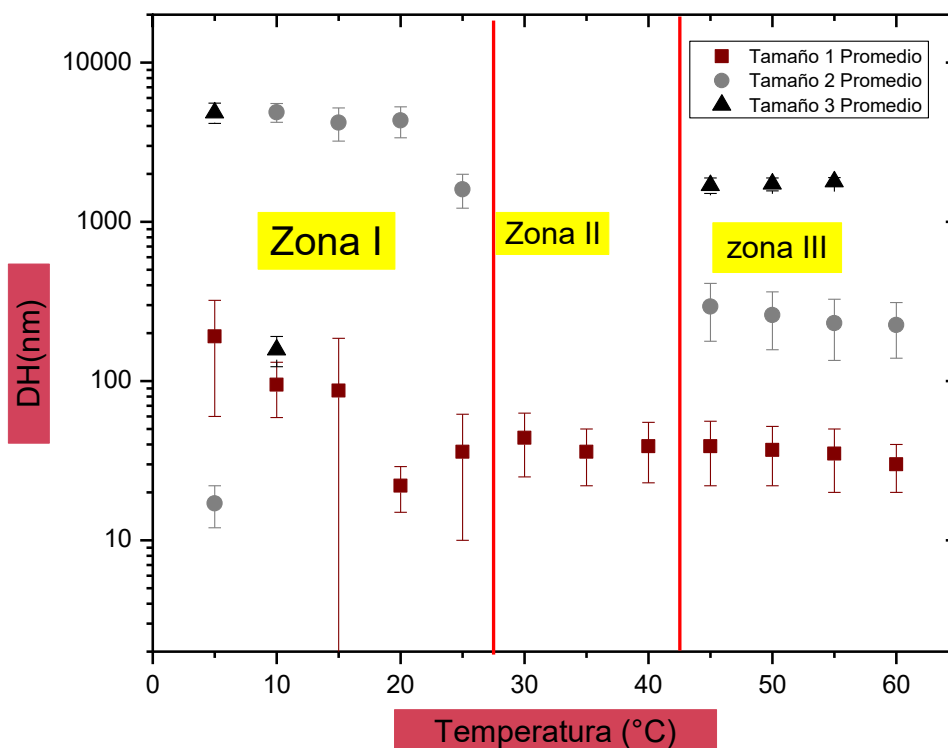


Figura 31. (DH) del sistema F127+VPA-F encontrados durante el barrido de temperatura de (5°C-60°C), se divide en tres zonas de acuerdo a la homogeneidad y polidispersidad con respecto al tamaño de los agregados.

El tamaño de las micelas cargadas con VPA-F es un parámetro importante para el efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) y la salida del sistema retículo-endotelial. Se encontró que el tamaño medio de las micelas optimizadas eran de 39 nm en la zona II, la carga del fármaco podría ser responsable de la expansión de tamaño de estas micelas, dicho valor concuerda con el tamaño encontrado por (Pooya Deghan por la técnica de TEM el DH encontrado fue de 40 nm, se utilizó un equipo de Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido, Microscopio Electrónico de Transmisión TEM a una temperatura de 25°C). [25]

6.4 Calorimetría Diferencial de Barrido

El objetivo principal de los experimentos de Calorimetría fue caracterizar el efecto del VPA-F en la energética del proceso de formación de micelas del P123 y F127. Para el análisis de los sistemas con y sin fármaco se realizaron tres repeticiones. Los potenciogramas obtenidos se muestran en las (Figuras 32 y 33). Conforme aumenta la temperatura en cada una de las concentraciones se observó el pico endotérmico característico de los sistemas P123 + H₂O y F127+ H₂O. Para cada sistema se obtuvieron los parámetros de entalpía del proceso de formación de micelas (ΔH_{agg}), la temperatura de micelización crítica (CMT) mejor definida como el inicio de la formación de micelas [18], y la temperatura media de transición (T_m) como se puede observar en las Figuras 34 y 35, los datos se encuentran resumidos en la Tabla 12. Las figuras muestran que los potenciogramas se superponen, esto es un indicativo de la reversibilidad de dicho proceso.

Figura 32. Potenciogramas de los sistemas P123+H₂O y P123+VPA-F. La concentración de P123 es 0.5 % m/m

Figura 33. Potenciogramas de los sistemas F127+H₂O y F127+ VPA-F. La concentración de F127 es 0.5 % m/m

Figura 34. Determinación de los parámetros termodinámicos CMT y T_m para el sistema P123+H₂O. La concentración de P123 es de 0.5% m/m

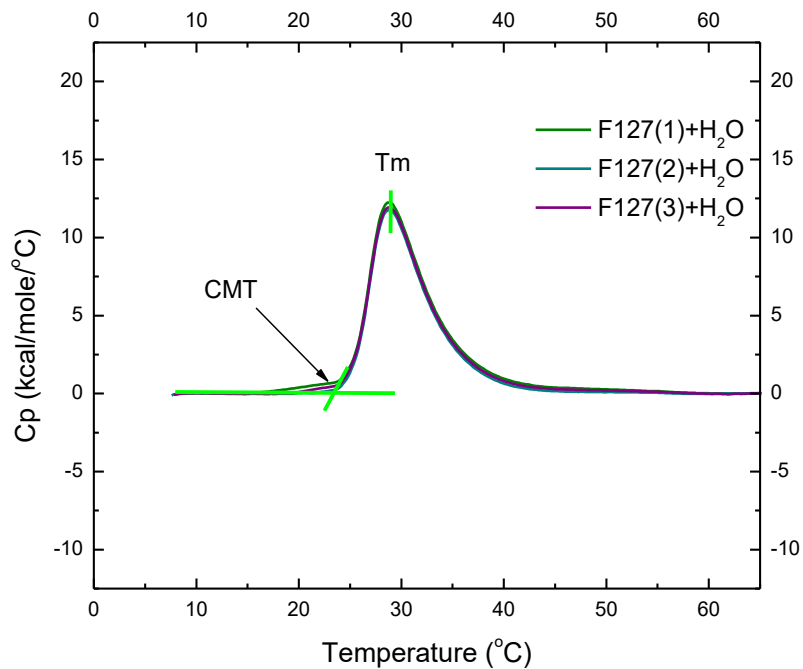


Figura 35. Determinación de los parámetros termodinámicos CMT y T_m para el sistema F127+H₂O. La concentración de F127 es de 0.5% m/m.

Los resultados obtenidos por la técnica de DLS nos indican que a bajas temperaturas existe mucha polidispersidad de la muestra tanto para ambos sistemas con y sin fármaco. El área bajo la curva del pico endotérmico del potenciograma es la energía que se requiere para que los agregados poliméricos de distintos tamaños se disgreguen y reorganicen formando un tamaño homogéneo después de la transición, como se observó en los resultados de DLS, los cuales corresponden a las micelas poliméricas. La CMT nos indica el inicio del reacomodo de los agregados mientras que la T_m es la temperatura máxima de transición. [17]

Del área obtenida bajo la curva se calcula el (ΔH_{agg}) que corresponde a la energía asociada a la ruptura de los agregados poliméricos (de diferentes tamaños) y la formación de agregados poliméricos (homogéneos) ambos procesos de manera simultánea.

En el experimento con el sistema P123+H₂O las trazas calorimétricas nos muestran picos endotérmicos con sus respectivas T_m's y CMT's. El ΔH_{agg} se calculó normalizando la concentración de las soluciones de P123+H₂O y posteriormente integrando el Cp con respecto a la temperatura, se encontró un $\Delta H_{agg} = 417 \pm 16.0$ kJ/mol, el cual concuerda con el reportado en la literatura ($\Delta H_{agg}=447 \pm 5$ kJ/mol) para el Pluronic P123 1% en solución acuosa. [7]

Así también para este experimento algunos autores muestran el valor promedio de $\Delta H_{agg}=436 \pm 16$ KJ/mol del sistema P123+H₂O a diferentes concentraciones, como puede observarse la variación de la concentración no afecta en gran medida el valor normalizado del ΔH_{agg} , valor congruente con el encontrado por Marcos Benítez ($\Delta H_{agg}=442 \pm 32$ kJ/mol) para el mismo sistema. [17]

En el caso del sistema F127+H₂O el valor encontrado para el $\Delta H_{agg} =374 \pm 3$ kJ/mol, coincide con el que se encuentra reportado en la literatura donde el $\Delta H_{agg}=374$ kJ/mol. [26]

Copolímeros + VPA-F

Cuando se añaden diferentes cantidades de VPA-F a los sistemas P123+H₂O y F127+H₂O, existen cambios significativos en los potenciogramas donde los valores de la traza calorimétrica cambian (Figuras 36-41). Por ejemplo, para el sistema P123+VPA-F se observó una disminución en el ΔH de agregación (Figuras 36, 38 y 40) el valor obtenido es un $\Delta H_{agg} = 201. \pm 11$ kJ/mol en una solución de P123 al 0.5%, el mismo efecto se ha observado en otros sistemas donde el ΔH_{agg} disminuye en presencia de fármaco. [17]. Por otro lado la traza calorimétrica correspondiente al sistema P123+VPA-F mostró un desplazamiento de la CMT hacia la izquierda, ambos fenómenos corroboran la fuerte interacción que existe entre el fármaco y el Pluronic P123.

Una posible explicación es que con la presencia del fármaco aumenta la contribución hidrofóbica en el sistema, lo que provoca la formación de los agregados a una menor temperatura recorriéndose la traza calorimétrica hacia la izquierda y/o disminuyendo la energía que se requiere para llevar a cabo la transición. Otros autores han citado valores de entalpía de micelización para el Pluronic P123+Fármaco al 1% con un $\Delta H_{agg} = 414 \pm 22$ kJ/mol y para la concentración de 5% un $\Delta H_{agg} = 435 \pm 12$ kJ/mol con Econazol (fármaco imidazólico tópico) indicado para el tratamiento de candidiasis cutáneas. [7]

El sistema F127+VPA-F mostró un resultado diferente al esperado, el ΔH_{agg} de este sistema fue mayor (aumentó a 518 ± 9 kJ/mol, a una concentración de copolímero de 0.5 % m/m, Figura 37), en comparación con el encontrado en la literatura donde el valor del ΔH_{agg} es de (307 ± 8 kJ/mol) para soluciones con una concentración del 1% y un ΔH_{agg} de (353 ± 2) para concentraciones del 5%, utilizando fármaco Econazol. [7]

Los resultados de los diferentes parámetros obtenidos para los cuatro sistemas se resumen en la Tabla 12. En la cual se ve la disminución de ΔH_{agg} para las soluciones con P123 (0.5 % m/m) y un aumento para las soluciones con F127 (0.5% m/m) al añadir fármaco.

Si aumentamos la concentración de copolímero al 1 % y 5 % m/m, encontramos una disminución en las ΔH_{agg} para ambos casos (P123 y F127). La Figura 39 y 41, muestran la obtención de la CMT y T_m para el caso de los sistemas F127+ VPA-F a diferentes concentraciones.

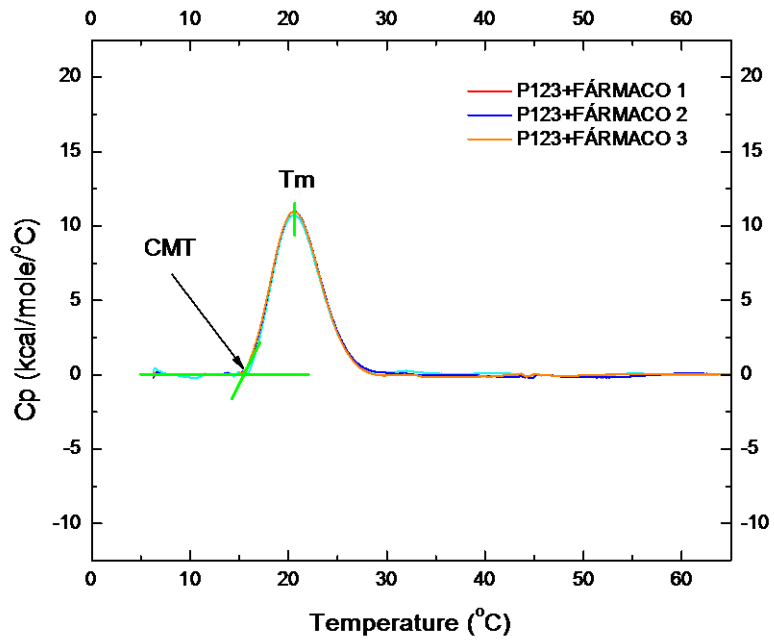


Figura 36. Sistema P123+VPA-F, la concentración de P123 es de 0.5 % m/m.

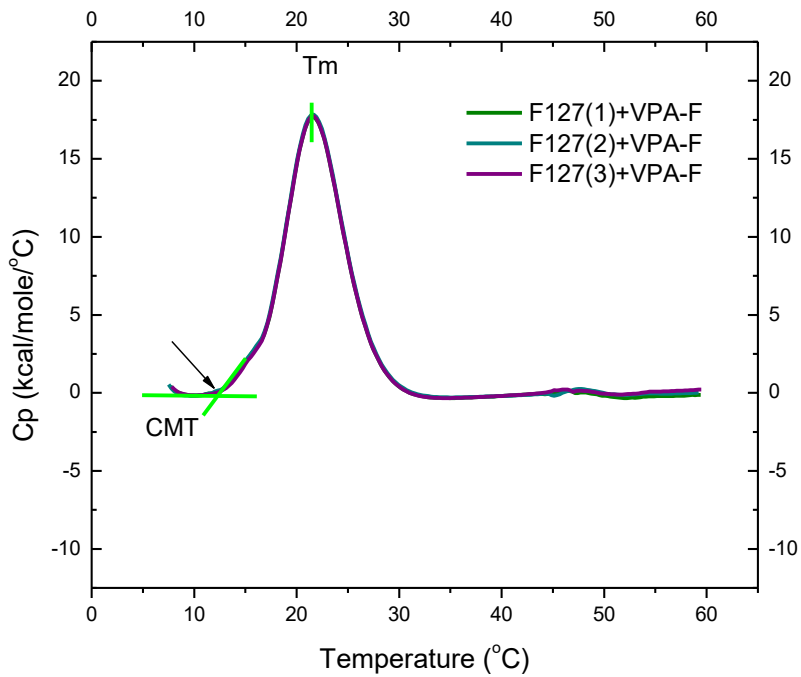


Figura 37. Sistema F127+VPA-F, la concentración de F127 es de 0.5 % m/m.

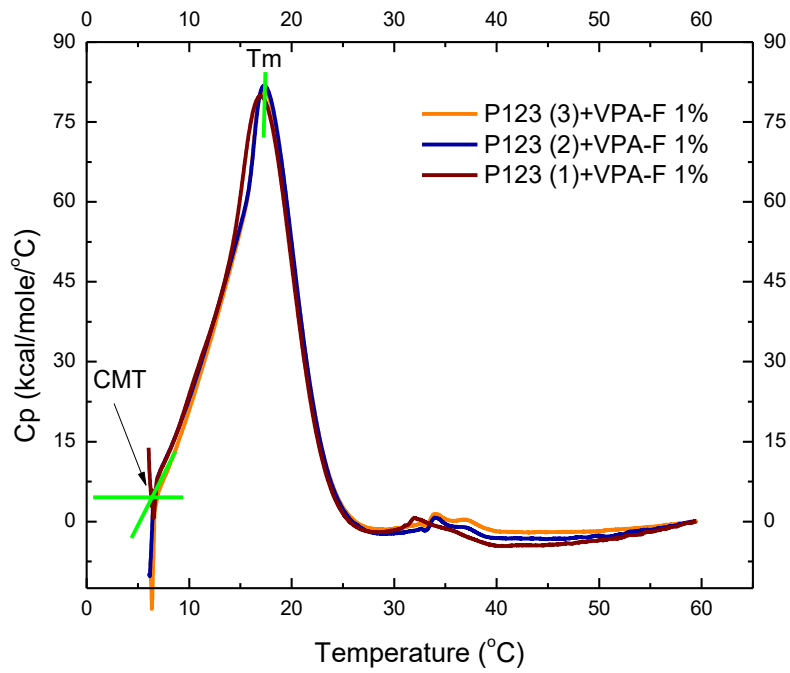


Figura 38. Sistema P123+VPA-F, la concentración de P123 es de 1% m/m.

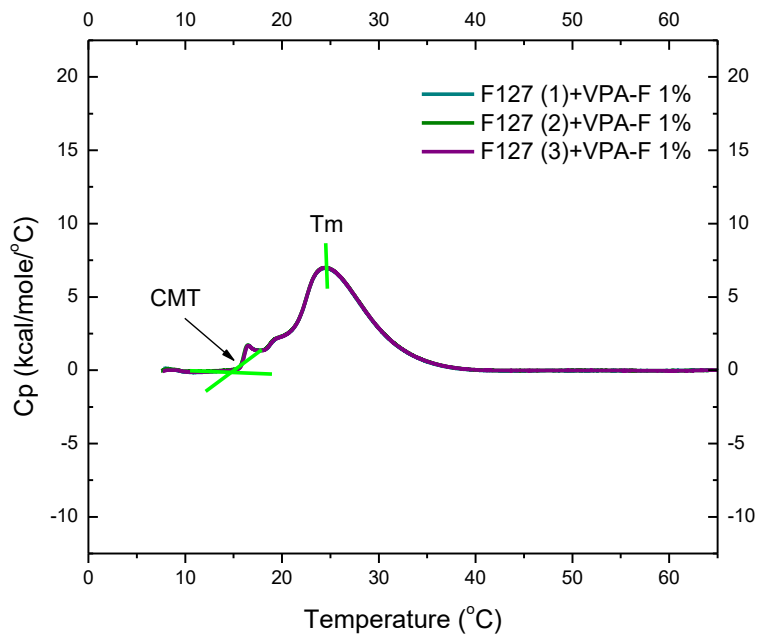


Figura 39. Sistema F127+VPA-F, la concentración de F127 es de 1% m/m

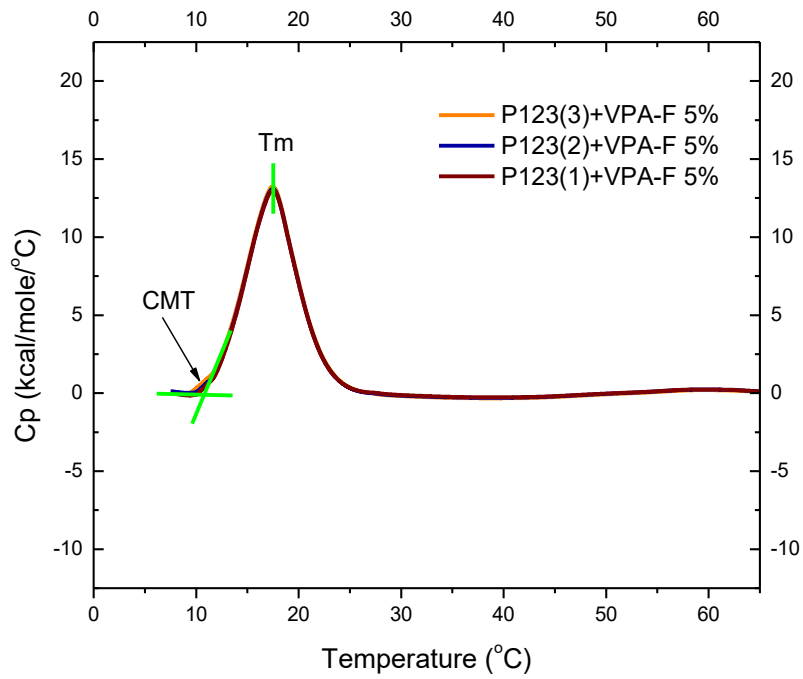


Figura 40. Sistema P123+VPA-F, la concentración de P123 es de 5% m/m.

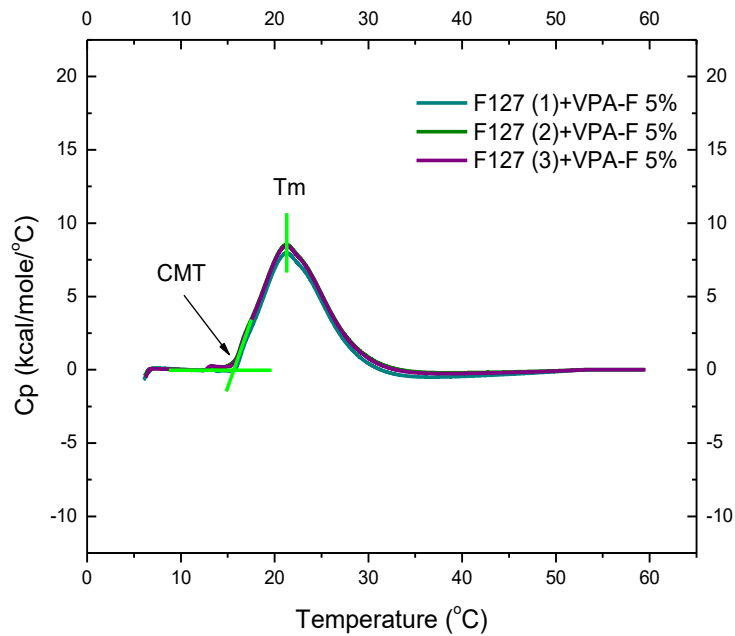


Figura 41. Sistema F127+VPA-F, la concentración de F127 es de 5% m/m

El resumen de los parámetros calculados para todas las concentraciones (0.5, 1 y 5% m/m) se encuentra en la Tabla 12. De manera general al agregar el fármaco el ΔH_{agg} disminuye, excepto a una concentración de copolímero del 0.5 % m/m para el sistema con el polímero F127. La disminución en el ΔH_{agg} confirma la fuerte interacción entre los componentes.

| Sistemas | Concentración de fármaco (mg/ml) | $\Delta H_{agg} / \text{KJ mol}^{-1}$ | T_m/K | CMT/K |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|-------|
| Concentración 0.5% m/m | | | | |
| (P123+H2O) | | 417 ± 16 | 294.0 | 288.7 |
| (F127+H2O) | | 374 ± 3 | 301.8 | 297.2 |
| Concentración 0.5% m/m | | | | |
| (P123+VPA-F) | 2.99 | 201 ± 11 | 299.5 | 293.5 |
| (F127+VPA-F) | 2.17 | 518 ± 9 | 293.8 | 288.5 |
| Concentración 1% m/m | | | | |
| (P123+VPA-F) | 7.14 | 262 ± 6 | 304.4 | 279.8 |
| (F127+VPA-F) | 3.63 | 267 ± 3 | 297.5 | 287.7 |
| Concentración 5% m/m | | | | |
| (P123+VPA-F) | 5.67 | 332 ± 3 | 290.5 | 283.9 |
| (F127+VPA-F) | 4.85 | 256 ± 3 | 294.3 | 288.7 |

Tabla 12. Parámetros termodinámicos para los diferentes sistemas (P123 y F127) con fármaco a diferentes concentraciones de polímero y fármaco.

6.5 Liberación del VPA-F.

La Figura 42, muestra los perfiles de liberación obtenidos de las soluciones poliméricas con fármaco en buffer fosfatos(PBS). Se muestra una lenta liberación pero constante las primeras 10 h, llegando a una liberación máxima a las 24 hrs el cual se mantiene constante hasta alcanzar una liberación máxima de 63% transcurridas 96 hrs.

Figura 42. Perfiles de liberación in vitro de las micelas cargadas con VPA-F. Perfil de liberación control VPA-F+PBS

Con los datos de liberación (cantidad de fármaco liberado en función del tiempo) se ajustaron diferentes modelos de cinética de liberación no lineales (korsmeyer-Peppas, Weibull, Logistic, Gompertz y Probit) [27], para ambos sistemas P123+VPA-F y F127+VPA-F. Los modelos nos permiten conocer el mecanismo de liberación del fármaco de las micelas poliméricas hacia el medio; los ajustes evalúan la liberación desde una matriz polimérica.

Existen tres mecanismos básicos: hinchazón, difusión y degradación, presentes en la liberación del fármaco cargado a partir de partículas poliméricas. Cualquiera o todos estos mecanismos pueden ocurrir en un sistema de liberación dado. La hidrofobicidad del polímero determinó la rapidez de captación del agua durante el curso de la liberación. Con la absorción de agua, las partículas de micelas se hincharon y permitieron que el fármaco que se encontraba dentro difundiera hacia el medio.

Para comparar modelos con diferentes números de parámetros, es necesario realizar el ajuste del coeficiente de correlación (R^2), donde n es el número de puntos de datos y p es el número de parámetros en el modelo.

Esto se debe a que R^2 aumentará siempre a medida que se incluyan más parámetros, mientras que R^2 ajustado puede disminuir cuando se produce una sobrecarga. Por lo tanto, el criterio para seleccionar el modelo más apropiado se basó en el valor de la R^2 cercana a 1. [28]

$$R^2 \text{ ajustado} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \cdot (1 - R^2)$$

Liberación de P123 + VPA-F

Para el sistema P123 se encontró que el VPA-F tuvo una liberación lenta ya que después de 12 h se siguió detectando VPA-F liberado, además se apreció que no se liberó la fracción total del fármaco si no que alcanzó solo el $65 \pm 2\%$ liberado transcurridas 96 h.

El ajuste no lineal de los modelos antes mencionados, se encuentran descritos en las figuras 43-47. Los parámetros calculados se resumen en la Tabla 13, para el modelo de Korsmeyer-Pepas sugieren que la liberación se llevó a cabo mediante difusión de Fick al tener el parámetro n menor a 0.5, (Tabla.1) este valor nos indica que se trata de una liberación controlada por difusión. La F de Fisher para el modelo de Korsmeyer-Peppas resulto ser pequeña con un valor negativo, por lo que los datos experimentales convergen con el modelo, donde se interpreta el valor de F_0 como la fracción liberada resultante de una liberación de estallido.

Modelos cinéticos promedio de Liberación del sistema P123+VPA-F

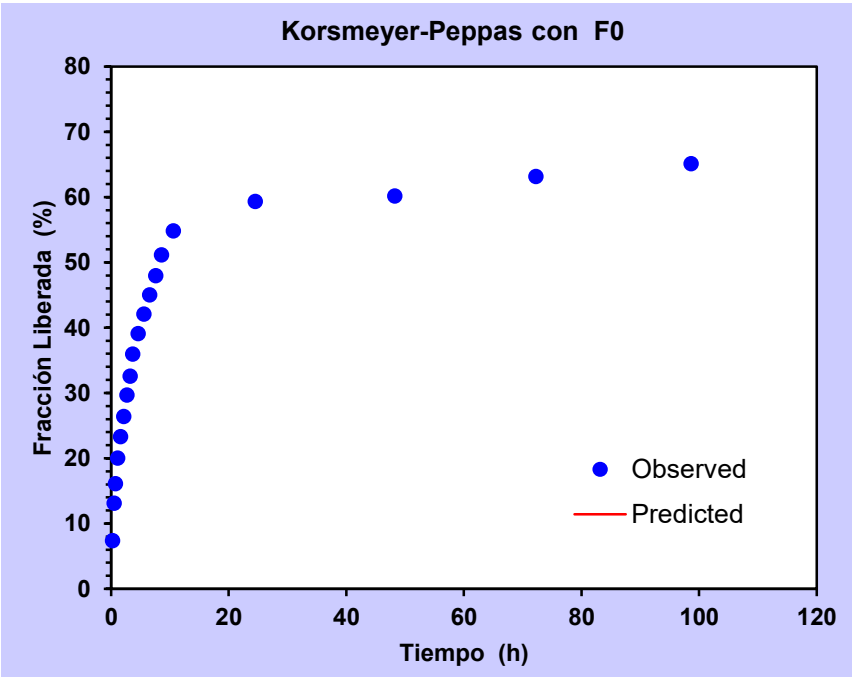


Figura 43. Perfil cinético de liberación Korsmeyer-Peppas para el sistema P123+VPA-F.

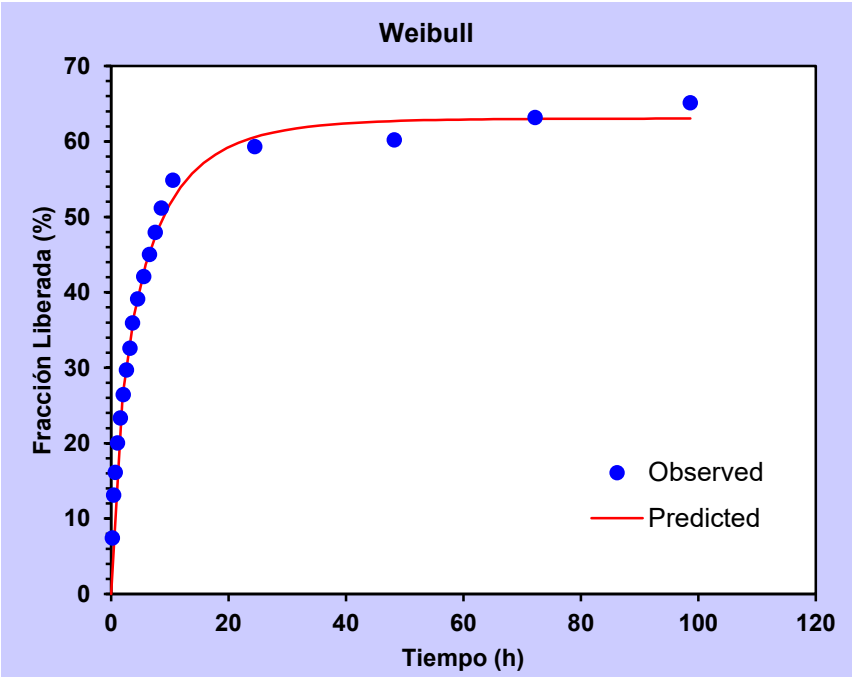


Figura 44. Perfil cinético de liberación Weibull para el sistema P123+VPA-F.

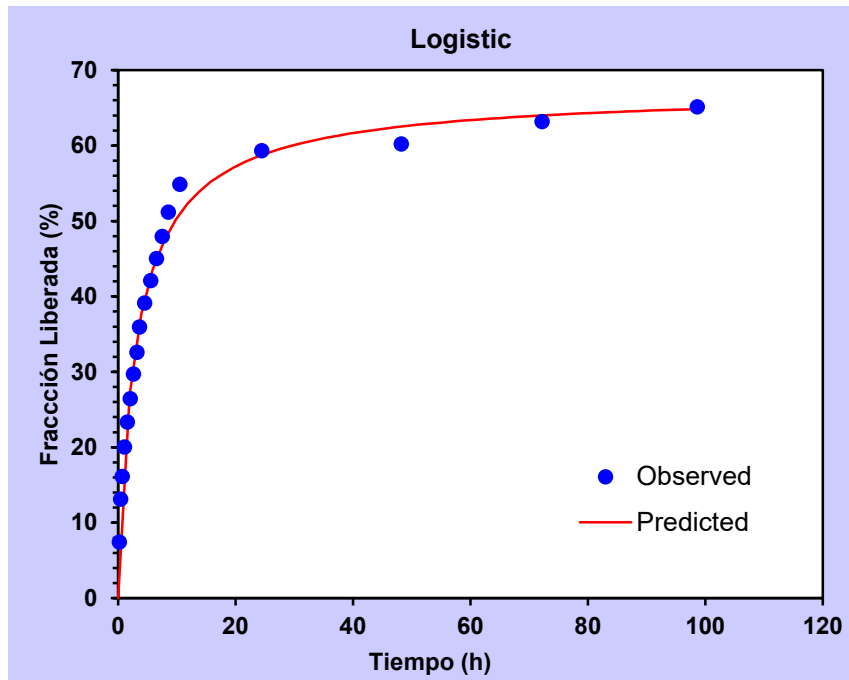


Figura 45. Perfil cinético de liberación Logistic para el sistema de liberación P123+VPA-F.

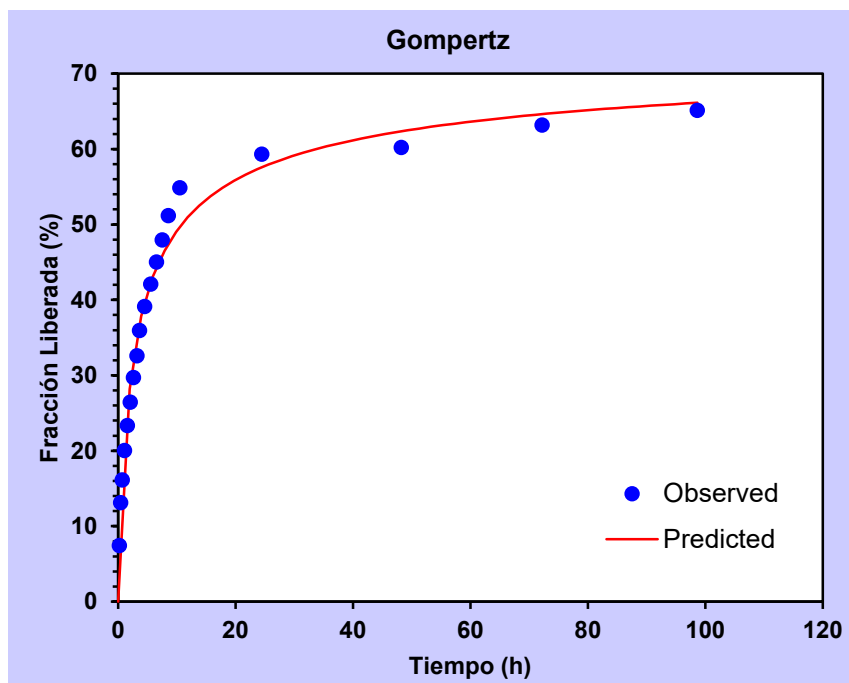


Figura 46. Perfil cinético de liberación Gompertz para el sistema P123+VPA-F.

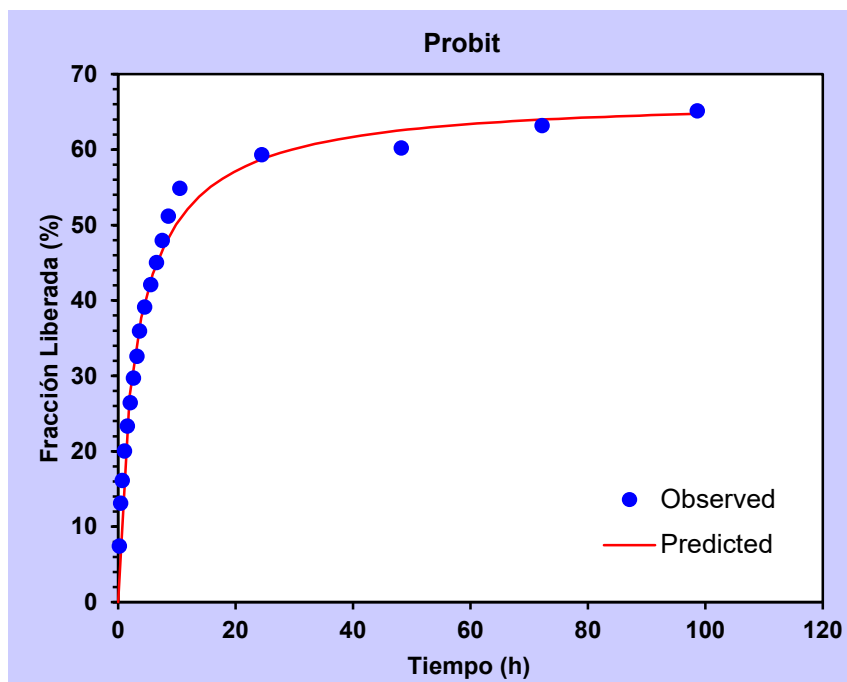


Figura 47. Perfil cinético de liberación Probit para el sistema P123+VPA-F.

| Korsmeyer-Peppas | kKP | n | R ² | R ² ajustado | F |
|--|-----------|---------|----------------|-------------------------|-------------------|
| $F=F_0+kKP*t^n$ | 30675.993 | 0.000 | 0.9768 | 0.9335 | $F_0= -30654.432$ |
| Weibull | α | β | R ² | | F |
| $F=F_{max}\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$ | 2.997 | 0.711 | 0.9974 | 0.9970 | $F_{max}=63.45$ |
| Logistic | α | β | R ² | | F |
| $F= \frac{F_{max} \cdot Exp[\alpha + \beta \cdot \log(t)]}{1 + Exp[\alpha + \beta \cdot \log(t)]}$ | -1.028 | 2.104 | 0.9956 | 0.9950 | $F_{max}=67.583$ |
| Gompertz | α | β | R ² | | F |
| $F=F_{max} \cdot Exp\{-\alpha \cdot Exp[-\beta \cdot \log(t)]\}$ | 1.397 | 1.180 | 0.9913 | 0.9902 | $F_{max}=75.537$ |
| Probit | α | β | R ² | | F |
| $F=F_{max} \cdot \Phi[\alpha + \beta \cdot \log(t)]$ | -0.605 | 1.304 | 0.9948 | 0.9941 | $F_{max}=66.262$ |

Tabla 13. Parámetros calculados a partir del ajuste no lineal con los modelos de cinética de liberación del sistema P123+VPA-F.

La Tabla 13, resume los parámetros obtenidos por los modelos implementados, en todos los casos F es el porcentaje de fármaco liberado en el instante t. [29]. De acuerdo al R² el modelo que mejor ajusta y describe los datos, fue el de Weibull, debido a que el valor de R² es el más cercano a 1 comparado con los otros modelos.

La cinética del VPA-F indicó que su liberación fue de manera sostenida ya que el fármaco se liberó en fracciones muy pequeñas durante todo el tiempo que duró el experimento.

Después de llegar a la fase de meseta, parece que alrededor del 40% de VPA-F, respectivamente, todavía estaba atrapado en las micelas. Dado que VPA-F es muy hidrófobo, parece que las interacciones hidrofóbicas entre el fármaco y el núcleo de la micela impiden la liberación completa .

El Modelo de Weibull presenta una $F_{max}=63\%$, esta es la fracción máxima que se logró liberar durante las 96 horas que se estuvo cuantificando. El parámetro $\alpha \approx 3$, este valor es la escala del tiempo en la que se presentó cada evento del porcentaje liberado de manera ordenada, establece divisiones del tiempo transcurrido desde el inicio hasta el término del estudio. La β es el parámetro indicativo de la forma que toma la curva a lo largo del experimento, en este caso $\beta < 1$ corresponde a una liberación donde la curva toma la forma de una parábola.

El segundo modelo que logró un mejor ajuste para el parámetro de R^2 fue Logistic sin embargo se obtuvo una $F_{max}= 68\%$, la cual fue mayor, comparada con el modelo de Weibull. El parámetro de α fue negativo esto nos dice que a lo largo del proceso no hubo una buena distribución de los datos con respecto al tiempo, ya que el intervalo de liberación entre una fracción y otra es mínimo, con la prolongación del tiempo de muestreo se observó un valor constante del % liberado de fármaco, con el valor de $\beta > 1$ indica que el comportamiento de los datos es semejante a tener una curva sigmoide, modelo matemático que muestra cómo aumenta lentamente al principio el % liberado, luego acelerándolo y después disminuyéndolo para finalmente volverse asintótica donde ya no se observa fracciones altas de fármaco liberado. La cinética de liberación del VPA-F utilizando el modelo de Gompertz dice que el % máximo liberado de fármaco fue del 75% durante toda la medición, tiene un valor de escala de tiempo de 1.39 y una $\beta=1.18$ por lo tanto si $\beta > 1$ se cumple que la curva es del tipo sigmoide para este caso. Por otro lado la cinética de liberación ajustando el modelo Probit indica que el 67% fue el total del fármaco liberado, con $\alpha < \beta$ y $\beta > 1$ obteniendo una curva sigmoide y el tiempo entre un % liberado y otro es pequeño. La F de Fisher para el modelo de Korsmeyer-Peppas resulto ser pequeña con un valor negativo, por lo que los datos experimentales convergen con el modelo, donde se interpreta el valor de F_0 como la fracción liberada resultante de una liberación de estallido.

Liberación de F127+VPA-F

El perfil de liberación dependiente del tiempo del sistema F127+ VPA-F se analizó bajo las mismas condiciones que el P123 con solución PBS pH 7.4 a una temperatura de 37°C. Se observó una liberación lenta y sostenida, sólo el $60 \pm 7\%$ del fármaco se liberó durante un periodo de 96 horas. Como se esperaba la liberación fue más rápida en la etapa inicial, y se redujo en la etapa posterior, se encontró que el fármaco difundió rápidamente de la membrana de diálisis al medio de diálisis. A partir de los perfiles de liberación se encontró que el sistema F127+VPA-F mostró una tasa de liberación más alta respecto al sistema de P123+VPA-F

Es importante mencionar que en estos experimentos sólo estamos demostrando que en efecto existe una liberación por parte del fármaco a partir de los agregados poliméricos, puesto que los sistemas no son todavía una formulación.

Modelos cinéticos promedio de Liberación del sistema F127+VPA-F

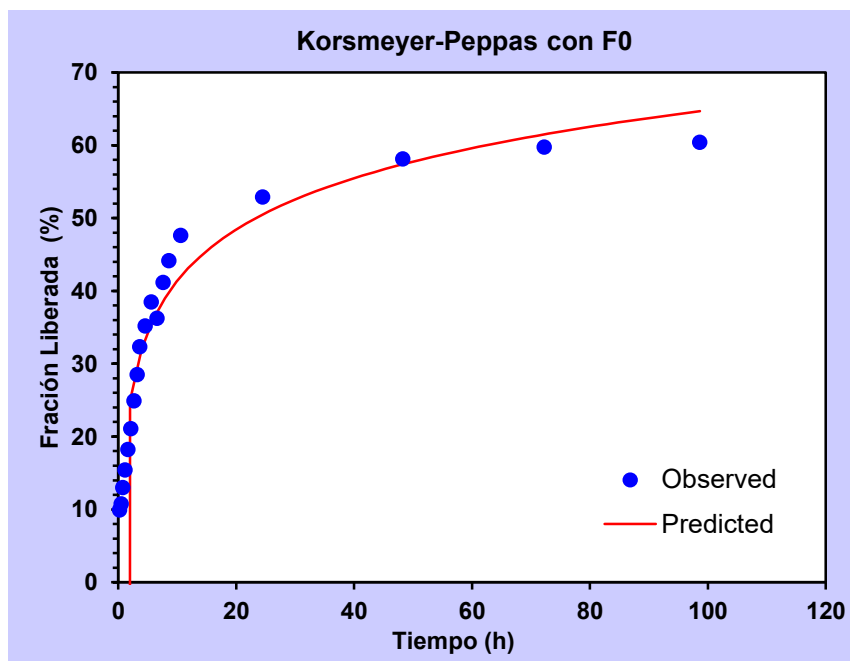


Figura 48. Perfil cinético de liberación Korsmeyer-Peppas para el sistema F127+VPA-F.

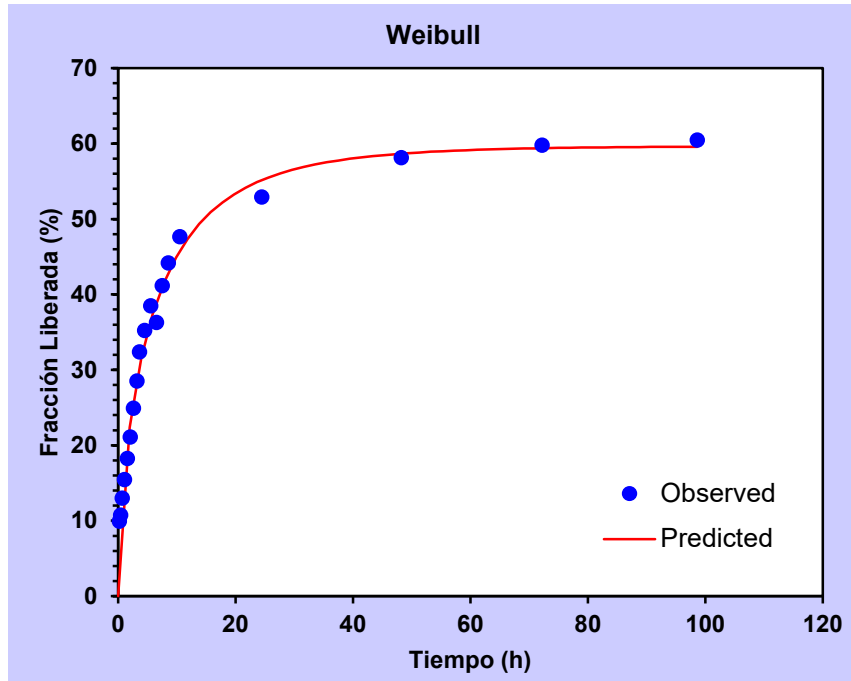


Figura 49. Perfil cinético de liberación Weibull para el sistema F127+VPA-F.

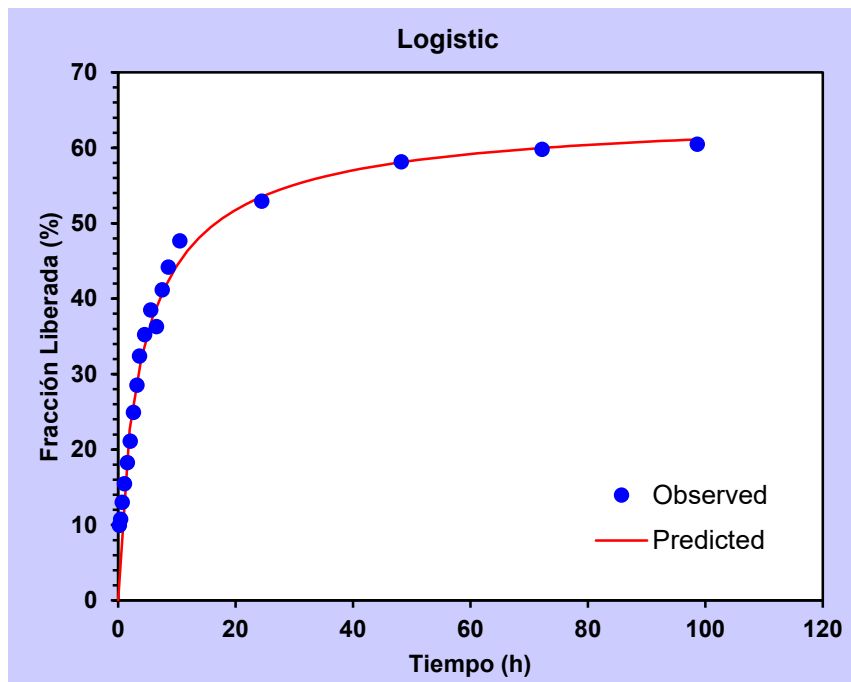


Figura 50. Perfil cinético de liberación Logistic para el sistema F127+VPA-F.

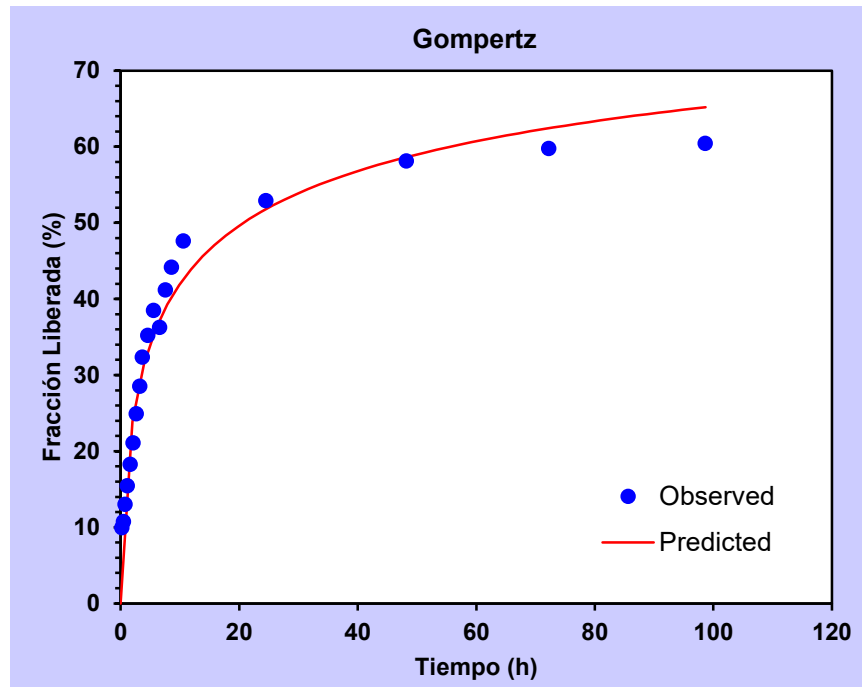


Figura 51. Perfil cinético de liberación Gompertz para el sistema F127+VPA-F.

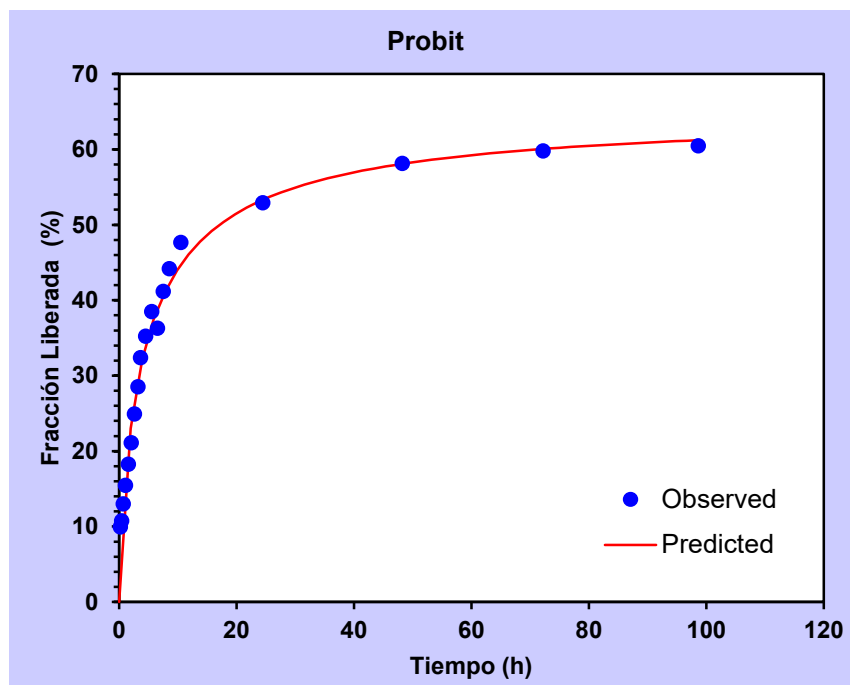


Figura 52. Perfil cinético de liberación Probit para el sistema F127+VPA-F.

| Korsmeyer-Peppas con F0 | K | n | R ² | R ² ajustado | F |
|--|--------------|---------|----------------|-------------------------|--------------|
| $F=F_0+kKP*t^n$ | kKP=7388.106 | 0.001 | 0.9793 | 0.9767 | F0=-7370 |
| Weibull | α | β | R ² | | F |
| $F=F_{max}\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$ | 3.375 | 0.677 | 0.9950 | 0.9943 | Fmax=59.671 |
| Logistic | α | β | R ² | | F |
| $F=F_{max}Exp[\alpha+\beta*log(t)]/(1+Exp[\alpha+\beta*log(t)])$ | -1.210 | 1.970 | 0.9941 | 0.9933 | Fmax= 65.154 |
| Gompertz | α | β | R ² | | F |
| $F=100*Exp\{-\alpha*Exp[-\beta*log(t)]\}$ | 1.768 | 0.712 | 0.9855 | 0.9836 | 0 |
| Probit | α | β | R ² | | F |
| $F=F_{max}\Phi[\alpha+\beta*log(t)]$ | -0.718 | 1.207 | 0.9928 | 0.9919 | Fmax= 64.136 |

Tabla 14. Parámetros calculados a partir del ajuste no lineal con los modelos de cinética de liberación del sistema F127+VPA-F.

En la Tabla 14, se pueden encontrar los parámetros obtenidos para cada sistema, modelo, el modelo que mejor se ajusta es el de Weibull, esto tomando en cuenta el valor de R² más cercano a 1. Sin embargo la fracción máxima liberada fue del 60 %, no fue la más alta en comparación a los otros modelos. Utilizando la ecuación de Logistic el % máximo liberado da un total del 65 %, además la escala del tiempo es muy estrecha durante todo el proceso, el mecanismo de liberación se da inicialmente muy rápido y conforme pasa el tiempo disminuye y se vuelve constante. En la cinética de Weibull también ocurre lo mismo al inicio la liberación es relativamente rápida pero después disminuye con el tiempo, a diferencia del modelo de Logistic, este modelo explica que los tiempos entre un evento de liberación y otro son más prolongados al tener una $\alpha=3.375$ a diferencia de Logistic donde su $\alpha= -1.21$, para el modelo de Weibull su parámetro de $\beta<1$ indica que el comportamiento de su curva asemeja a una sigmoide.

El fármaco difundió siguiendo un comportamiento de tipo Fick puesto que $n<0.5$, para el modelo de Korsmeyer-Peppas.

Para el modelo de Gompertz no existe valor del % de fármaco máximo liberado y el valor de $\beta<1$ nos dice que su curva se comporta como una parábola. En el modelo de Probit el 64 % es la cantidad máxima que se liberó en el proceso, y la $\beta>1$ presenta una curva que adquiere el comportamiento de una gráfica sigmoide. Los porcentajes de liberación del VPA-F encapsulado en cada uno de los polímeros no llegan a liberar el 100% del fármaco pero se puede observar que los porcentajes de fármaco liberados son más altos para el sistema de P123+VPA-F comparado con el sistema de F127, tal parece que entre más interacciones hidrofóbicas tenga VPA-F con el núcleo de las micelas que forman los polímeros da como resultado una liberación más lenta y por lo tanto se observará un menor % de fármaco liberado.

6.6 Microscopia electrónica de Barrido y Microscopia electrónica de transmisión

El estudio de la morfología de los agregados formados se realizó por medio de la técnica de SEM y TEM, a soluciones de polímero al 0.06 % m/m con y sin fármaco. La (Figura 53 (a) y (b)) son microscopías tomadas al sistema F127 + agua. La Figura 53 (a) corresponde a la técnica de TEM y la Figura 53 (b) corresponde a la técnica SEM, en ambas microscopías se observa una morfología esférica.

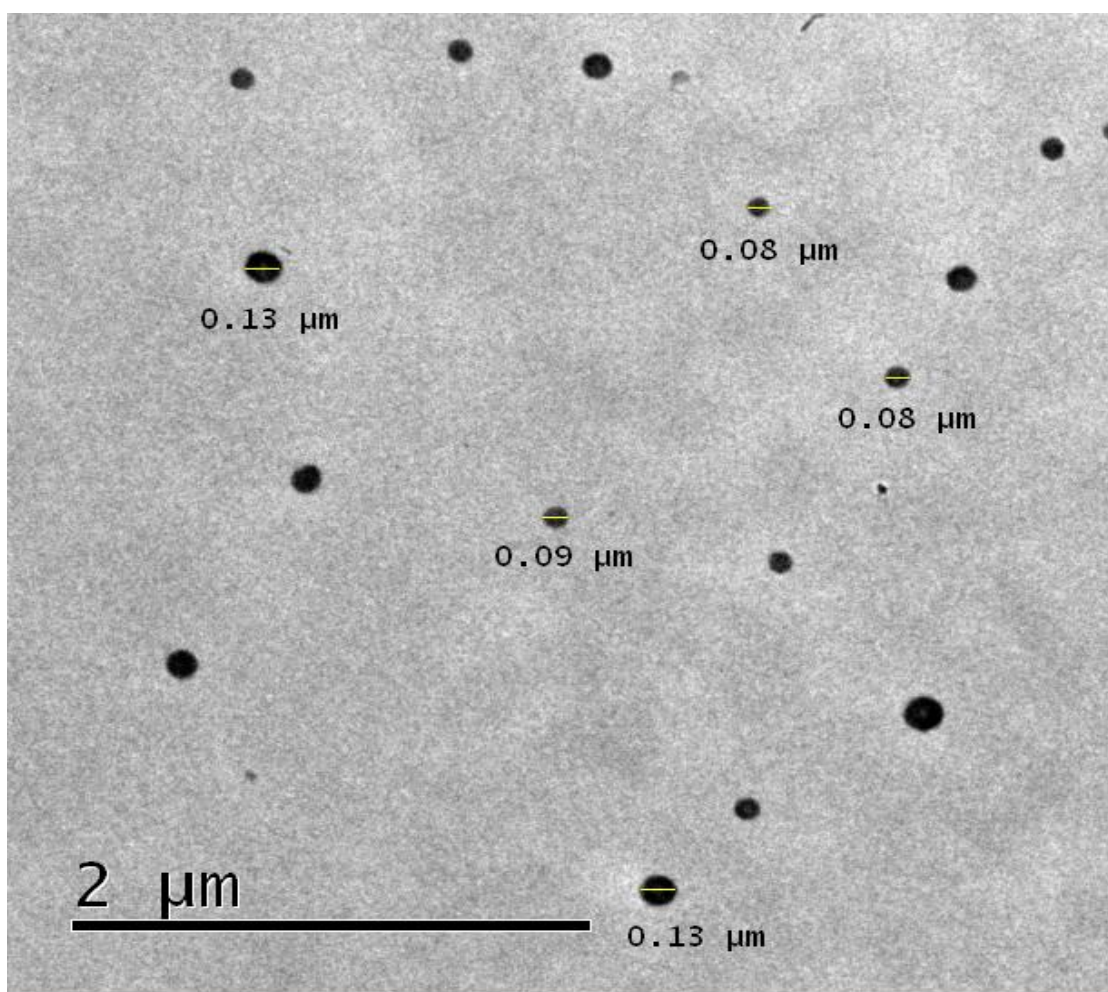


Figura 53. (a) Microscopia del sistema F127+H₂O, utilizando la técnica de TEM.

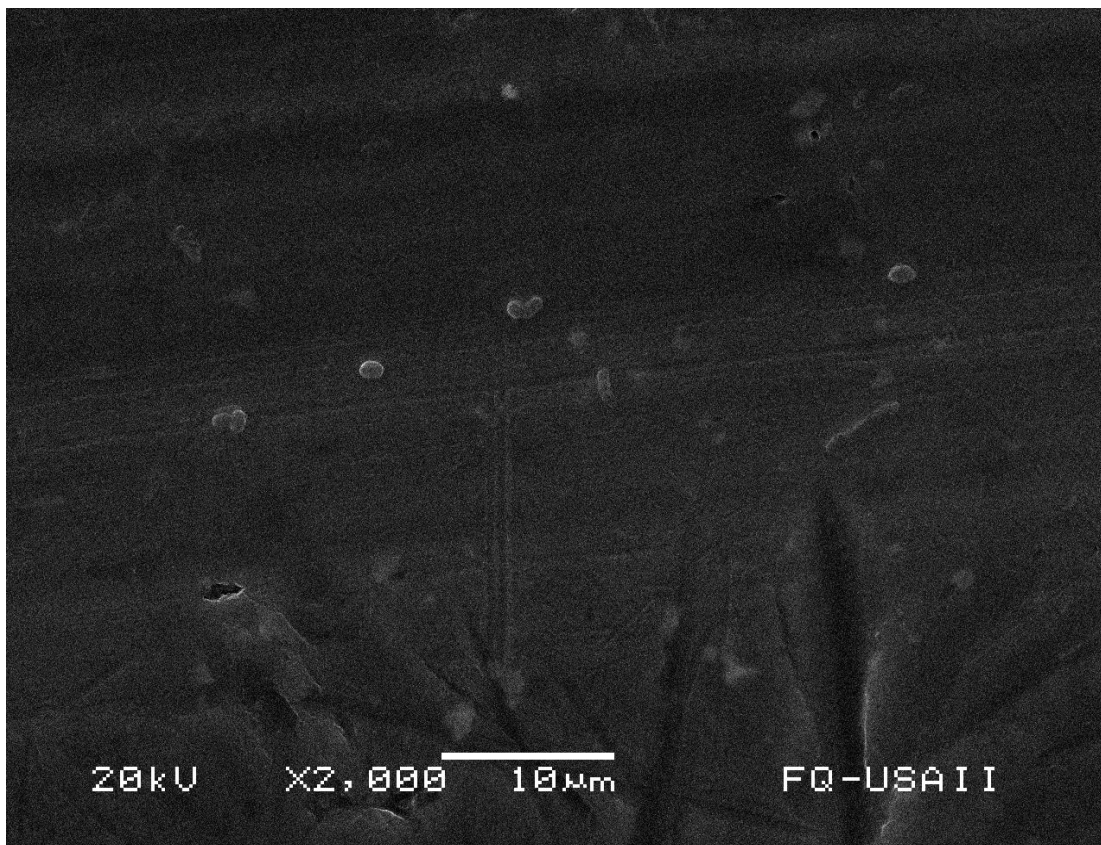


Figura 53. (b) Microcopia del sistema F127+H₂O, utilizando la técnica de SEM.

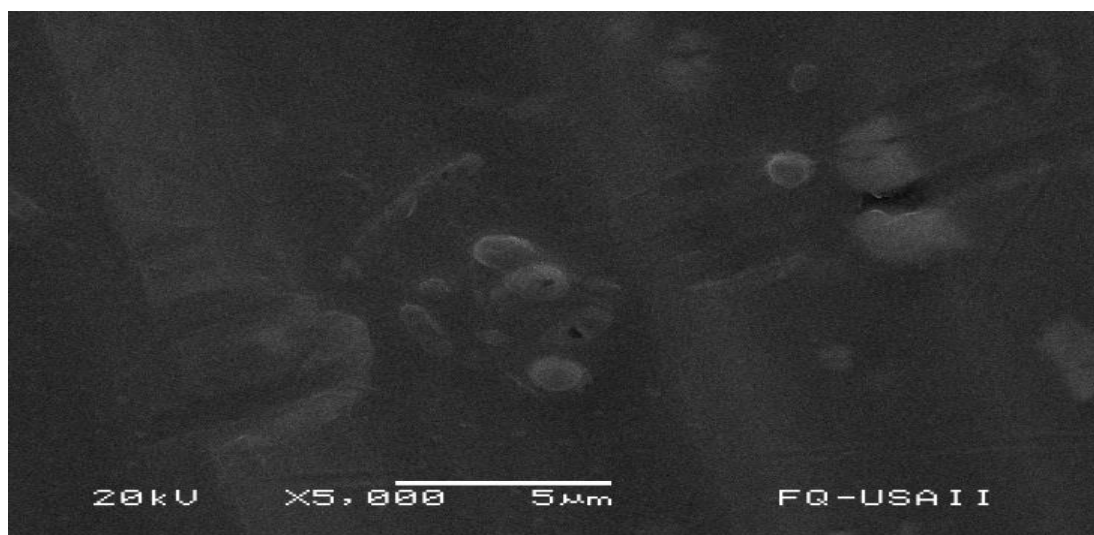


Figura 54. Microscopia del sistema P123+H₂O, utilizando la técnica de SEM.

La forma esférica de los agregados se mantiene después de agregar el fármaco como se observa en la figura 55, para el sistema P123+VPA-F. La figura 56 (a, b, c, d, e y f) muestran la forma esférica de los agregados del sistema F127+VPA-F, si se hace un aumento se observan estructuras circulares homogéneas con un diámetro que corresponde al encontrado en los DLS.

Las microscopías electrónicas obtenidas tanto por TEM y SEM revelan que las micelas poliméricas de P123 y F127 cargadas con VPA-F mantienen forma esférica con una buena estructura núcleo-envoltura. Además en la mayoría de las micelas, no se observaron rugosidades, ni bordes afilados que las ayudasen a escapar del sistema retículo-endotelial . [29]

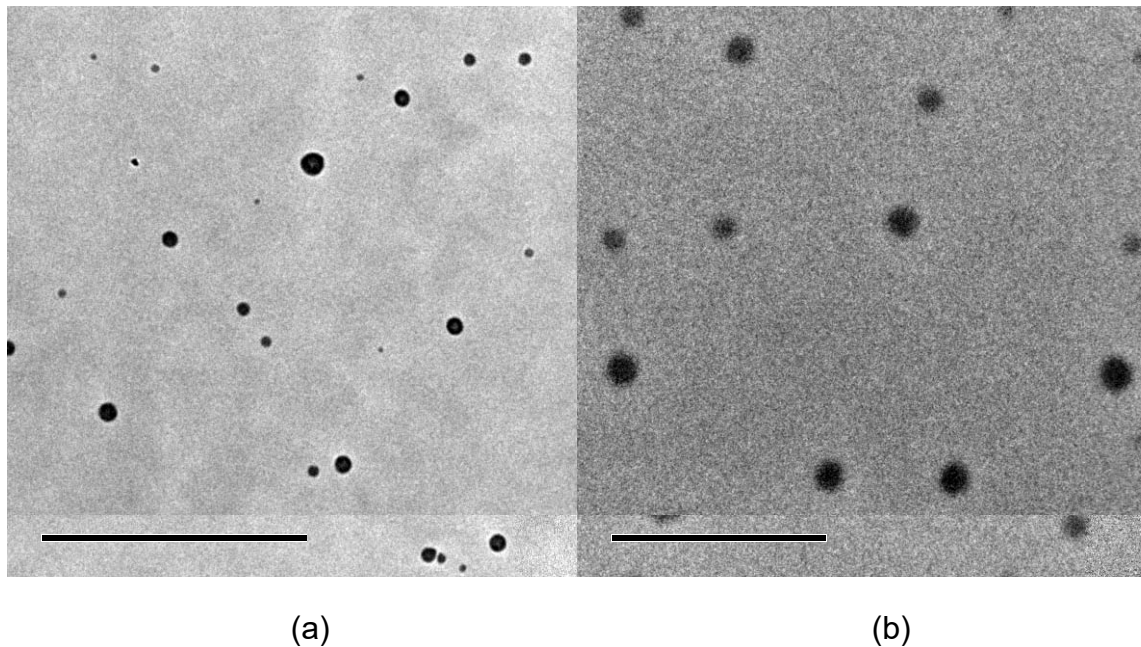


Figura 55. (a) y (b) Microscopia del sistema P123+VPA-F, utilizando la técnica de TEM

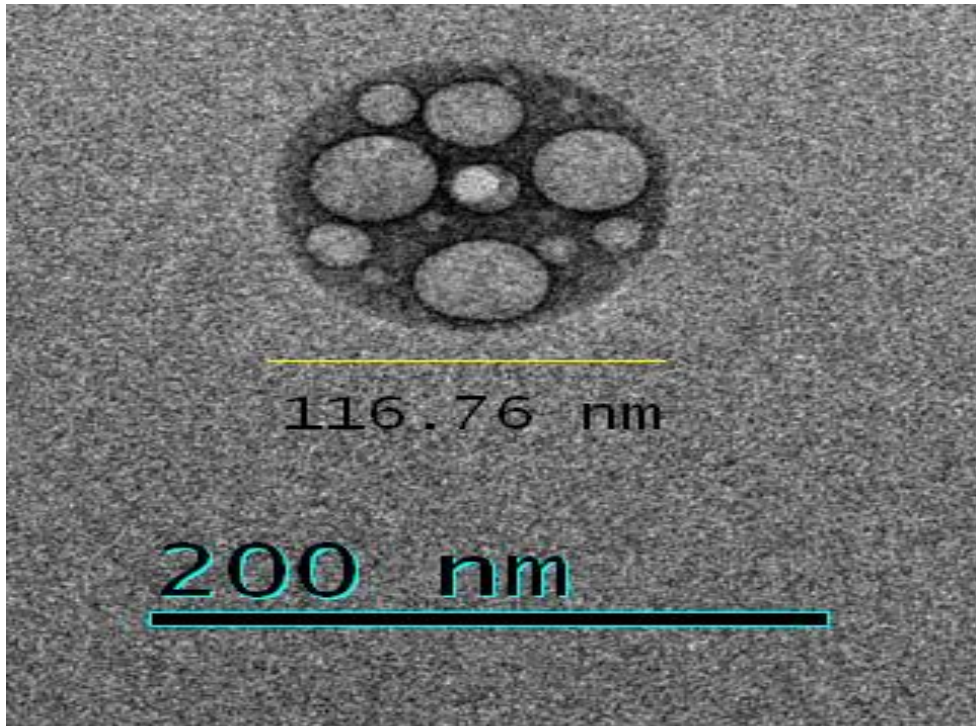


Figura 56. (a) Microscopia del sistema F127+VPA-F, utilizando la técnica de TEM.

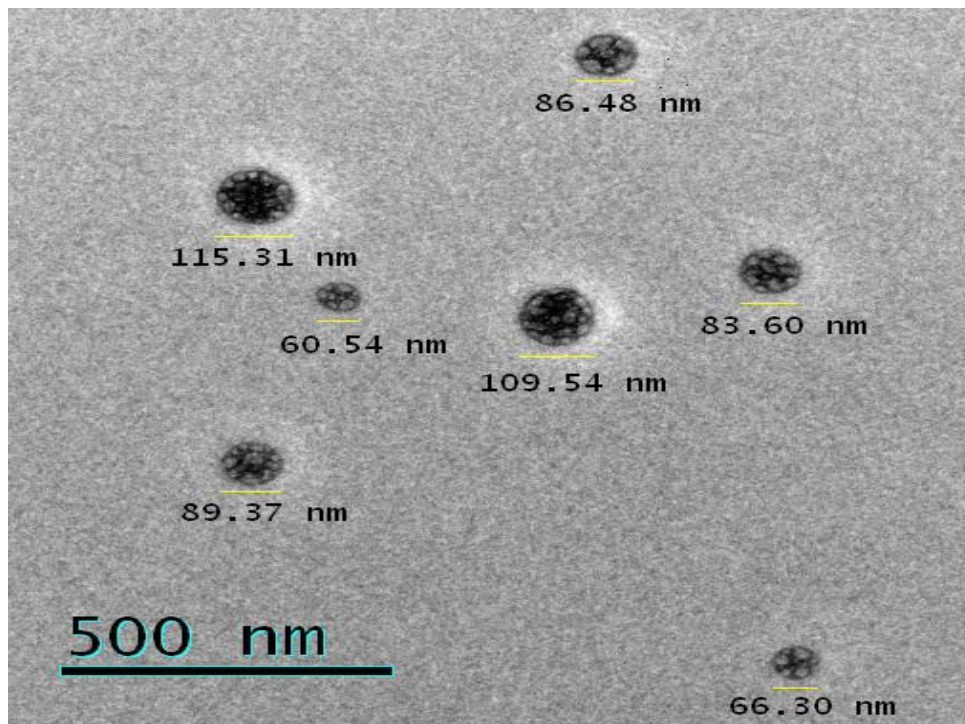


Figura 56. (b) Microscopia del sistema F127+VPA-F, utilizando la técnica de TEM.

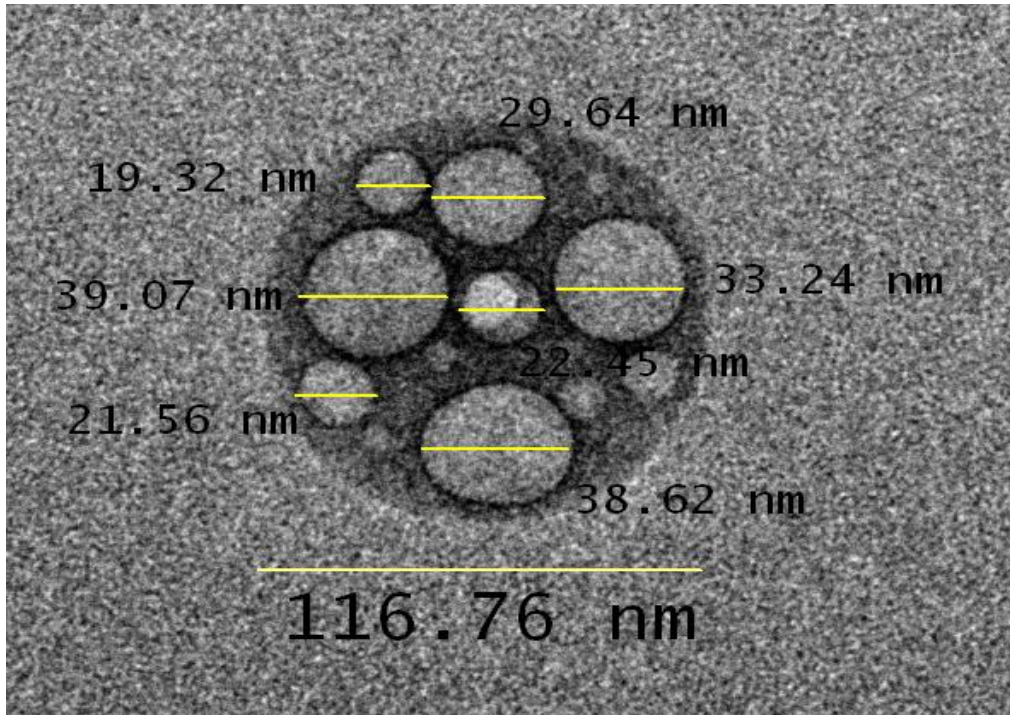


Figura 56 (c) Microscopia del sistema F127+VPA-F, utilizando la técnica de TEM.

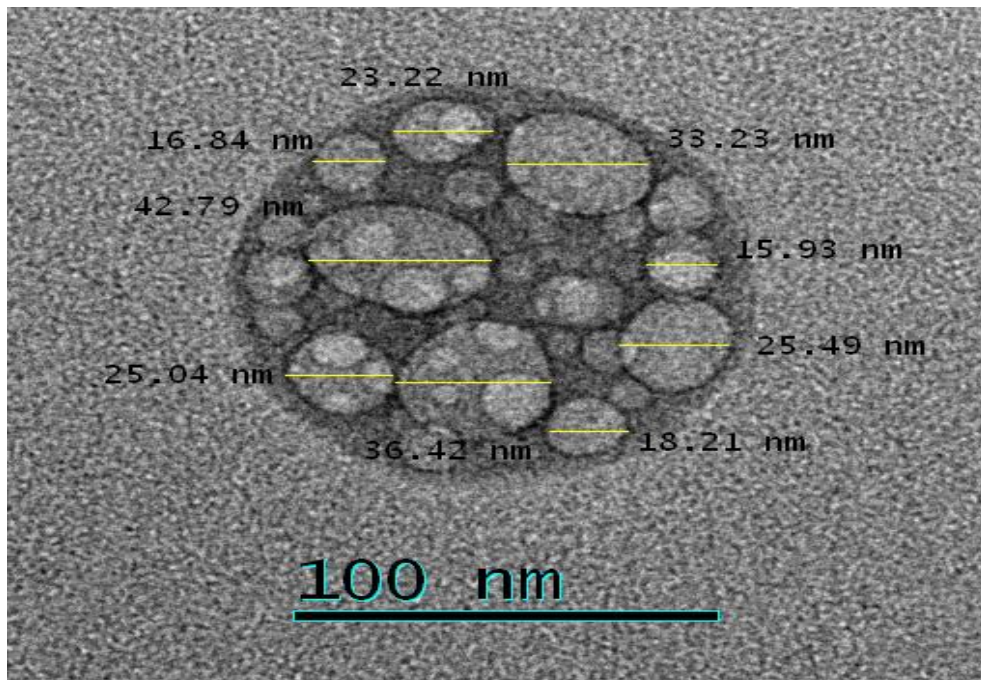


Figura 56 (d) Microscopia del sistema F127+VPA-F, utilizando la técnica de TEM

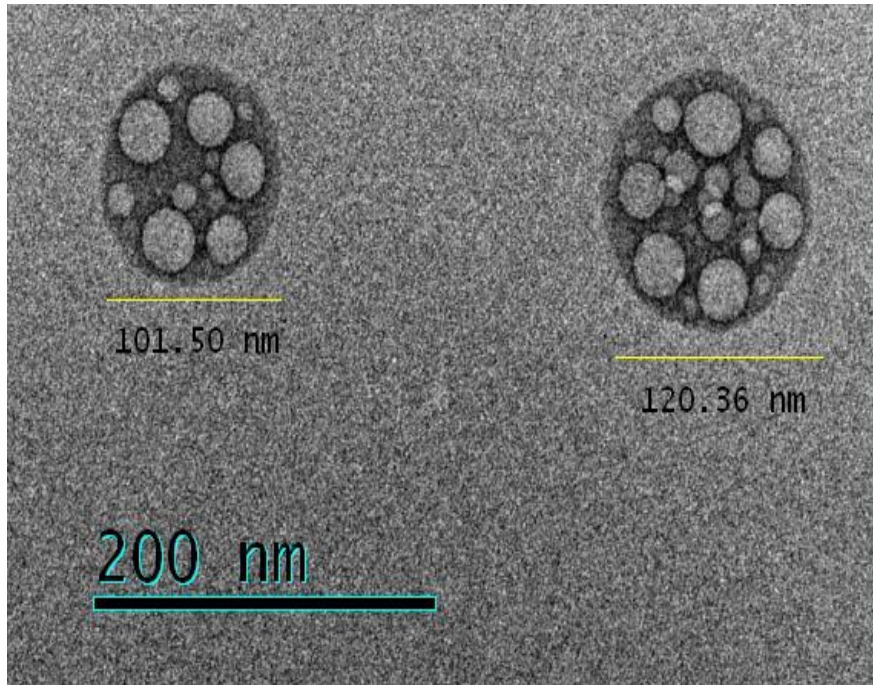


Figura 56. (e) Microscopia del sistema F127+VPA-F, utilizando la técnica de TEM

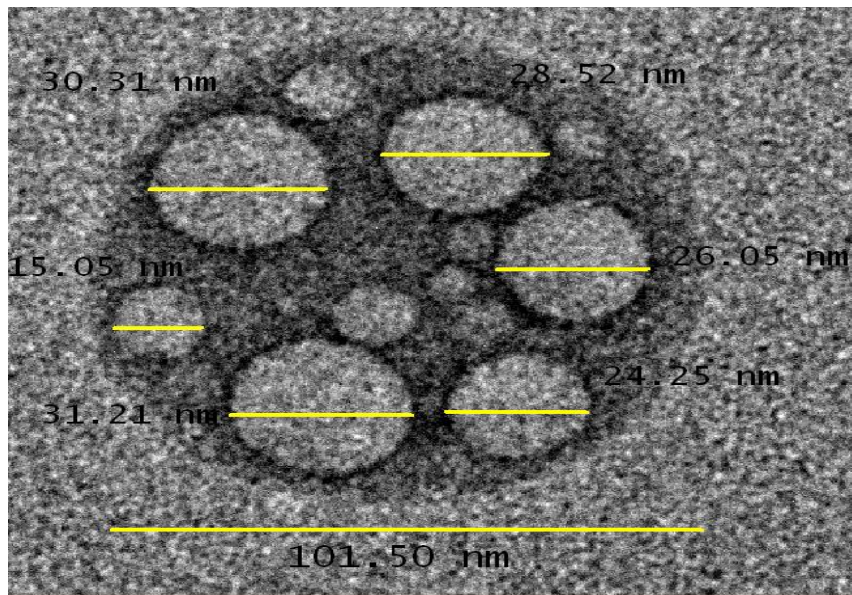


Figura 56. (f) Microscopia del sistema F127+VPA-F, utilizando la técnica de TEM

Las manchas grises representan el núcleo PPO de micelas que encapsulan VPA-F. Dado que en el método de dispersión láser, el tamaño hidrodinámico de las micelas ha sido medido, el tamaño de las micelas es ligeramente sobreestimado. En las primeras microscopías obtenidas el tamaño de las micelas era correspondiente a unidades en micras las cuales no correspondían a los reportados por el DLS, por lo que se les realizó un acercamiento para poder apreciar el núcleo en donde se observaron estructuras esféricas de menor tamaño con diámetros similares a los que se encontraron en el tamaño de partícula, Figura 57 (a)

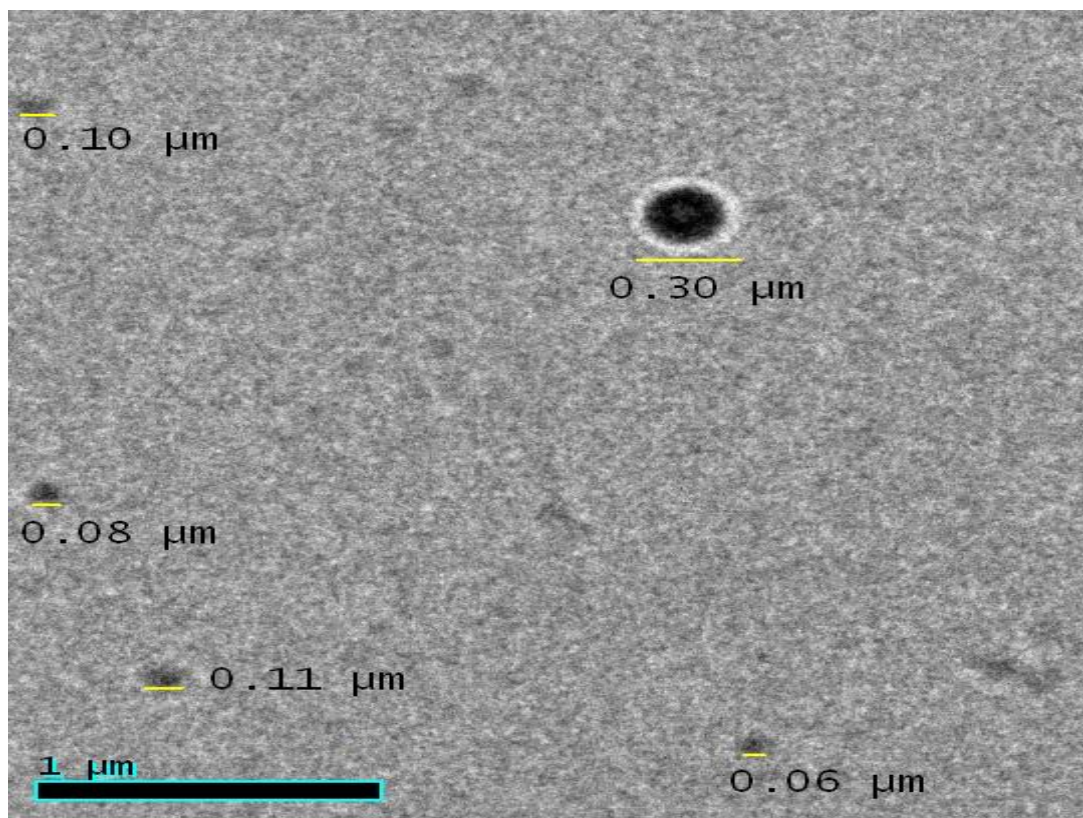
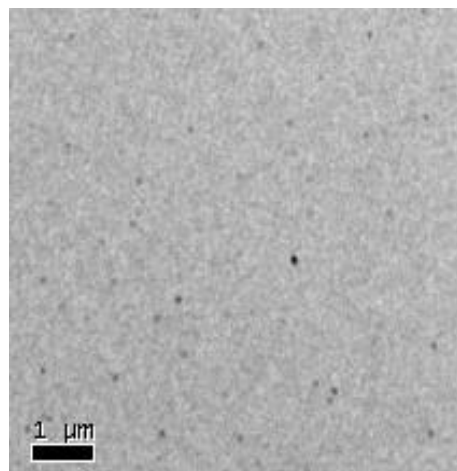
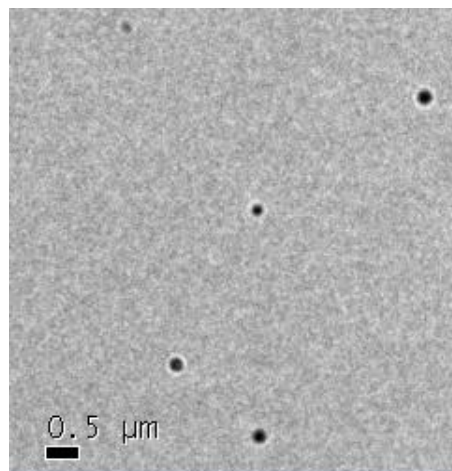


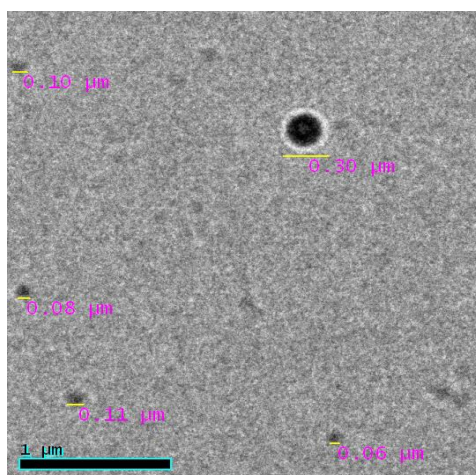
Figura 57. (a) Microscopia electrónica de Transmisión obtenida para el Sistema P123+VPA-F



(b)



(c)



(d)

La Figuras 57. (b,c y d) ilustran la forma esférica de las micelas formadas por el sistema P123+VPA-F, obtenidas por la técnica de TEM (acercamiento microscópico)

Para el sistema de P123+VPA-F (Figura 57 b, c y d) las microscopias que se obtuvieron por TEM presentaron tamaños muy grandes entre 1 y 2 μm nada comparables con los obtenidos por DLS (Tabla 9, Figura 27), sin embargo si se realiza un acercamiento a las microscopias se observa en el fondo muchas micelas de diminuto tamaño para las cuales su diámetro va de 40 a 300 nm una diferencia bastante amplia, esto se puede atribuir al tiempo transcurrido durante el secado de la muestra antes de ser leída ya que tiende a formar aglomerados.

El tamaño obtenido en el DLS a temperatura ambiente está dentro del rango de (20-40 nm) lo que permite que las micelas sean alojadas en vesículas endocíticas y el acceso a las células diana a través de endocitosis. [29]

7 CONCLUSIONES

Se logró determinar la solubilidad del VPA-F en agua resultando de 0.400 mg/ml, la cual se mejoró considerablemente en presencia de diferentes cantidades de polímero P123 o F127, con un %EE del 94.36% para F127 y del 96.20% para P123, utilizando una concentración de 0.5 % m/m de polímero. El polímero P123 es el compuesto que solubiliza mayor cantidad de fármaco.

La técnica de HPLC corrobora que no existen compuestos de degradación en los sistemas (P123+VPA-F y F127+VPA-F).

Se identificaron regiones en las cuales el diámetro hidrodinámico se mantuvo constante para los sistemas estudiados. A temperatura del cuerpo humano se encuentra un tamaño homogéneo de 37 nm para el sistema P123 en agua y de 25 nm para F127 en agua. En presencia de fármaco el tamaño se reduce en un 30% para las micelas de P123 y un aumento del 30% en las micelas de F127.

La presencia de VPA-F en las soluciones poliméricas disminuye la entalpía de agregación, así como la CMT y T_m para el sistema (P123+VPA-F).

Los perfiles de liberación muestran que la liberación de VPA-F es sostenida las primeras 10 horas y después de las 24h se libera el 63 % de fármaco manteniéndose constante, el modelo que mejor se ajusta a los perfiles es el de Weibull para ambos copolímeros.

La morfología para cada sistema de acuerdo a las microscopias de SEM y TEM es esférica y en el caso de P123+ VPA-F los valores corresponden a los encontrados por DLS.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Breastcancer: Estadísticas, síntomas y tratamiento del cáncer de mama. (s.f.) (consultado el 12 de septiembre de 2017). (en línea) en <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancerdemama>.
2. Berenice Prestegui-Martel, Jorge Antonio Bermúdez-Lugo, Alma Chávez-Blanco, Alfonso Dueñas González, José Rubén García Sánchez, Oscar Alberto Pérez-González, et al. *N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide, a valproic acid aryl derivative designed in silico with improved anti-proliferative activity in HeLa, rhabdomyosarcoma and breast cancer cells*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry Version Online 1/10. (2016) 1,2 y 3.
3. Oncolink: Síndrome mano-pie. (s.f.) (consultado el 3 de septiembre de 2017). (en línea) en <https://es.oncolink.org/tratamiento-del-cancer/quimioterapia/efectos-secundarios/cual-es-el-sindrome-mano-pie>.
4. Nishiyama Nobuhiro, Kataoka Kazunori. *Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery*. Pharmacology & Therapeutics 112, (2006) 630,631 y 632.
5. Isabel Metodologías biofarmaceuticas en el desarrollo de medicamentos. España: Universidad de Valencia; 2015.
6. Amalina Bte Ebrahim Attia. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. Current Opinion in Colloid & Interface Science 16, (2011) 183,184 y -185.
7. Rodríguez Loya María Luisa. Solubilización Micelar de Econazol y Alfa-Tocoferol en Copolímeros Tribloque P123 y F127. Tesis Para Obtener Título Químico Farmacéutico Biólogo, (2016) 13,17,18,23,29,30,31,32,36,60 y 64.
8. Kyung T. Oh, Tatiana K. Bronich, Alexander V. Kabanov. *Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers*. Journal of Controlled Release 94, (2004) 411-412.
9. Paschalis Alexandridis, T. Alan Hatton. *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 96 (1995) 2.
10. Acofarma: Fichas de información técnica. (s.f.). Select Latin America website. Retrieved from August 11, 2017. (en línea en) http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/7065-634109dfb6dfd04fae8889492f4e56c2cb5bbccd/main/files/Poloxamer__Pluronic_F_127_.pdf

11. Sigma-Aldrich. (s.f.). Select Latin America website. Retrieved from august 11, 2017 . (en línea en) https://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~fr_FR/Catalog/Detergents/doc4/BASF/PRD/30085864/.pdf?asset_type=msds/pdf&language=ES&validArea=MX&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8804a85f7.pdf
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/435465?lang=es®ion=MX>.
12. Scielo: Materiales poliméricos en nano medicina: Transporte y liberación controlada de fármacos. 2013. (consultado el 14 de octubre de 2017). (en línea) en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082013000100008.
13. Gautam Singhvi y Mahaveer Singh. In vitro- Drug release characterization models. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research Vol II, (2011) 82-83.
14. López Córdova Fernando Alex. Desarrollo de sistemas de encapsulación de compuestos para a protección de extractos antioxidantes de Yerba Mate. Tesis para optar por el grado de maestro en tecnología e higiene de los alimentos. (2012) 67.
15. Malvern. Zetasizer Nano series User Manual. Inglaterra: Malvern Instruments; 2004.
16. Malvern: Particle size. (s.f.). (consultado el 7 de febrero 2017). (en línea) en <https://www.malvern.com/en/products/measurement-type/particle-size/>
17. Marcos Benítez Xelhua Elihut. *Caracterización fisicoquímica de mezclas pluronics – polímeros derivados de la celulosa para su uso en formulaciones farmacéuticas*. Tesis Para Obtener Título de Doctora en Ciencias, (2016) 25, 48, 49, 51 y 53.
18. S. Suriñach, M.D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, M.T. Clavaguera-Mora. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. (1992) 11.
19. Farmupibi: Capacidad calorífica. 2015. (Consultado el 14 de octubre 2017). (en línea) en <http://farmupibi.blogspot.mx/2015/04/objetivos-objetivogeneral-determinar-la.html>.
20. Tecnología Farmacéutica: Desnaturalización y degradación de proteínas mediante calorimetría diferencial de barrido. (s.f.). (consultado el 15 de octubre de 2017). (en línea) en http://www.sefig.com/doc/Congreso%20Granada/TF/016_TF.pdf
21. González, G., Noguez, E., (2009), *Principios de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X Característicos* (pp 13, 47, 77, 79-81) México DF, México: Facultad de Química, UNAM.

22. My scope: Australian Microscopy & Microanalysis Reserach Facility. (s.f.). (consultado el 29 de mayo 2017). (en línea) en <http://ammrf.org.au/myscope/>.
23. Zhihong Liu, Donghua Liu, Lili Wang, Juan Zhang y Na Zhang. Docetaxel-Loaded Pluronic P123 Polymeric Micelles:in Vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Molecular Sciences* (2011) 1685-1687.
24. Duo Wei, Lingling Ge y Rong Guo. Microstructure transition of hydrophilic modified ibuprofen and Pluronic copolymer F127 complexes. *Colloid Polym Sci* 291 (2013) 1261-1263.
25. Pooya Dehghand Kelishady, Ebrahim Saadat, Fatemeh Ravar, Hamid Akbari y Farid Dorkoosh. Pluronic F127 polymeric micelles for co-delivery of paclitaxel and lapatinib against metastatic breast cáncer: preparation, optimization and *in vitro* evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20:8 (2014) 1014-1015.
26. Nivedita Pandit, Troy Trygstad, Scott Croy, Maria Bohorquez y Cody Koch. Effect of Salt son the Micellization, Clouding, and Solubilization Behavior of Pluronic F127 Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 222 (2000)218.
27. STREAM: Disolution and dissolution models. (s.f.). (consultado el 7 de Julio 2017). (en línea) <http://www.authorstream.com/Presentation/aSGuest106867-1122372-dissolution-and-its-models/>
28. Yong Zhang, Meirong Huo, Jianping Zhou. DDsolver: An Add-In Program for modelin and comparison of drug dissolution profiles. *Journal of DDSolver Vol 12*, (2010) 263-270.
29. Zhang Wei, Juoguo Hao y Shi Yuan. Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Journal of Pharmaceutical Nanotechnology* 376 (2009) 179-181.