



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO, FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS  
NANOMÉTRICAS TIPO LIPOSOMA CON MICELA MIXTA CARGADOS DE RAPAMICINA  
PARA EL TRATAMIENTO VÍA INTRANASAL DE ENFERMEDADES  
NEURODEGENERATIVAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Olga Guadalupe Farfán Ortiz



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE: ALMA MIRIAM NOVELO TORRES**

**VOCAL: CARLOS JUAREZ OSORNIO**

**SECRETARIO: NORMA ANGELICA VILLANUEVA MARTINEZ**

**1er. SUPLENTE: GERARDO LEYVA GOMEZ**

**2° SUPLENTE: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 003 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA EN EL EDIFICIO F-1 DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

**ASESOR DEL TEMA:**

**CARLOS JUAREZ OSORNIO**

**SUPERVISOR TÉCNICO :**

**MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**SUSTENTANTE:**

**OLGA GUADALUPE FARFÁN ORTIZ**

## AGRADECIMIENTOS

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	6
Lista de figuras.....	7
Lista de tablas.....	11
I.    Introducción.....	13
II.   Marco teórico.....	15
2.1 Enfermedades neurodegenerativas .....	15
2.1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	15
2.2 Tratamiento con rapamicina.....	16
2.2.1 Características biofarmacéuticas.....	18
2.3 Sistemas de liberación modificada como método de administración de fármacos en el SNC .....	19
2.3.1 Estructuras nanométricas .....	19
2.3.2 Sistemas coloidales .....	19
2.3.3 Emulsiones .....	21
2.3.4 Micelas .....	21
2.3.5 Liposomas .....	24
2.3.6 Lipomic .....	26
2.4. Administración intranasal.....	27
2.4.1 Transporte de fármacos hacia el SNC vía intranasal.....	28
2.4.2 Mecanismo de absorción a través de la mucosa nasal.....	32
2.4.3 Aviso de privacidad.....	34
III. Justificación.....	34
IV. Objetivos.....	34
V. Hipótesis.....	35
VI. Materiales.....	35
VII. Metodología experimental.....	35
7.1 Método general .....	35
7.2 Preparación de las estructuras nanométricas .....	36
7.3 Caracterización de las estructuras nanométricas de rapamicina.....	37
7.3.1 Estudio de estabilidad.....	37

7.3.2 Potencial zeta.....	37
7.3.3 Determinación de tamaño de partícula por DLS.....	38
7.3.4 Liofilización de los sistemas fabricados.....	38
7.3.5 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR).....	38
7.3.6 Determinación de la morfología superficial mediante Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	39
7.3.7 Microscopia confocal de fluorescencia.....	39
7.3.8 Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	39
7.3.9 Estudios de liberación in vitro.....	40
VIII. Resultados y Discusión.....	41
8.1 Síntesis y caracterización de las estructuras nanométricas de rapamicina...41	
8.4.2 Potencial zeta.....	49
8.4.3 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR).....	51
8.4.4 Determinación de la topografía superficial mediante Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	52
8.4.5 Microscopia confocal.....	62
8.4.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	67
8.4.7 Estudios de liberación in vitro.....	68
IX. Conclusiones.....	75
X. Perspectivas.....	76
XI. Bibliografía.....	76

## **Lista de abreviaturas**

Ach- Acetilcolina

AIC-Criterio de Akaike

ACN-Acetonitrilo

BHE- barrera hematoencefálica

CMC-concentración micelar crítica

CPP- parámetro crítico de empaquetamiento

DPPC- 1,2 Dipalmitoil-sn-glicero-3-fostatidilcolina

mTOR- blanco de rapamicina en mamíferos

MSC-Criterio de selección del modelo

pdi- índice de polidispersión

R<sup>2</sup>- coeficiente de determinación ajustado

ROS-Especies reactivas de oxígeno

SNC- Sistema nervioso central

NP-Nanopartículas

## Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de la rapamicina.....	17
Figura 2. Emulsiones w/o y o/w.....	21
Figura 3. Esquema de una micela dividido por la mitad.....	22
Figura 4. Organización de las estructuras en función del valor de CPP de los surfactantes que las conforman.....	22
Figura 5. Esquema que muestra la conformación espacial de un surfactante.....	23
Figura 6. Esquema de un liposoma partido por la mitad .....	24
Figura 7. Esquema de la encapsulación de a) Fármaco hidrosoluble y de b) fármaco liposoluble dentro de un liposoma.....	25
Figura 8. Esquema del Lipomic.....	26
Figura 9. Vista lateral del nervio Trigémino.....	29
Figura 10. Vista lateral del nervio olfatorio.....	30
<i>Figura 11. Vista superior del agujero occipital o agujero lacerado anterior en el cráneo.....</i>	<i>31</i>
Figura 12. Diagrama del ternario 1.....	43
Figura 13. Diagrama del ternario 2 .....	46

Figura 14. Diagrama del ternario 3.....	48
Figura 15. Distribución de potencial zeta del sistema 1S14.....	49
Figura 16. Distribución de potencial zeta del sistema 1F14. ....	50
Figura 17. Espectogramas obtenidos por ATR FTIR de las materias primas y los sistemas obtenidos. ....	51
Figura 18. <i>Microscopías de SEM a 10.0 kV correspondientes al sistema 1F14</i> .....	53
Figura 19. Microscopías de SEM a 10.0 kV correspondientes al sistema 1S14.....	54
Figura 20. Microscopías de SEM a 10.0kV correspondientes al sistema 1F24...	55
Figura 21. Microscopías de SEM a 10.0kV correspondientes al sistema 1S24...	56
Figura 22. Microscopías de SEM a 10.0kV correspondientes al sistema 2F14...	58
Figura 23. Microscopía de SEM a 10.0 kV correspondiente al sistema 2S14.....	59
Figura 24. Imagen de TEM del sistema 1F14.....	60
Figura 25. Estructura de la fostatidilcolina. ....	61
Figura 26. Microscopia confocal donde “A” corresponde al sistema 1F14.....	63

Figura 27. Microscopia confocal donde “A” corresponde al sistema 2F14 teñido con rodamina y fluoresceína, mientras que “B” corresponde a una estructura del sistema 2S14 teñido con rodamina.....	64
Figura 28. Microscopia confocal de los sistemas 1S24 (“A”), 1F24 (“B”) teñidos con rodamina y fluoresceína y 1F24 (“C”) teñido con rodamina.....	65
Figura 29. Curva de calibración de rapamicina en hexano. ....	67
Figura 30. Perfil de liberación de rapamicina del sistema 1F14.....	69
Figura 31. Ajuste del perfil de liberación del sistema 1F14 al modelo de Hixson Crowll con Tlag.....	70
Figura 32. Perfil de liberación de rapamicina del sistema 1F24.....	72
Figura 33. Ajuste del perfil de liberación del sistema 1F14 al modelo cuadrático con Tlag.....	73
Figura 34. Perfil de liberación de rapamicina del sistema 2F14.....	74

## Lista de tablas

Tabla 1. Principales propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de la rapamicina.....	16
Tabla 2. Sistemas de liberación coloidales para tratamientos terapéuticos.....	18
Tabla 3. Composición tamaño de partícula, potencial zeta y días de estabilidad de los sistemas del ternario 1 en suspensión.....	42
Tabla 4. Composición tamaño de partícula, potencial zeta y días de estabilidad de los sistemas del ternario 2 en suspensión.....	44
Tabla 5. Composición tamaño de partícula, potencial zeta y días de estabilidad de los sistemas del ternario 3 en suspensión.....	46
Tabla 6. Porcentaje de los elementos encontrados durante el análisis elemental del sistema 1F14 ordenados desde la parte externa de las NP hacia adentro de la misma. ....	60
Tabla 7. Comparación entre el ajuste de modelos de los datos obtenidos para el sistema 1F14 a 293.56 nm. ....	66
Tabla 8. Comparación entre el ajuste de modelos de los datos obtenidos para el sistema 1F24 a 293.56 nm.....	69
Tabla 9. Comparación entre el ajuste de modelos de los datos obtenidos para el sistema 1F24 a 293.56 nm.....	71

## ***I. Introducción***

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que causa deterioro mental progresivo, principalmente en personas de la tercera edad, se estima que en el mundo hay cerca de 50 millones de personas que padecen la enfermedad y cada año se registran alrededor de 10 millones de nuevos casos.<sup>i</sup> Los pacientes con Alzheimer sufren de discapacidad funcional progresiva, pérdida de independencia, angustia emocional cambios de comportamiento, reducción de la atención, dificultad para encontrar palabras, desorientación espacial o de tiempo y síntomas de comportamiento tales como conducta agresiva, incapacidad para realizar las tareas comunes de la vida diaria, etc<sup>ii</sup>.

La enfermedad está relacionada con la pérdida de neuronas colinérgicas que terminan en el hipocampo y la corteza cerebral, además de la acumulación de proteínas intracelulares y la acumulación de depósitos de proteína extracelulares (placas seniles). El tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) es bastante complicado debido a la permeación altamente selectiva de la barrera hematoencefálica (BHE) la cual restringe la entrada de prácticamente cualquier sustancia hacia el cerebro, por lo que es complicado alcanzar las cantidades terapéuticas necesarias con los tratamientos actuales<sup>iii</sup>, por esta razón la administración intranasal, un método no invasivo de administración, podría ser una alternativa para lograr un tratamiento efectivo a nivel cerebral, además si el fármaco es encapsulado en algún vehículo de escala nanométrica, tales como liposomas, micelas y otros sistemas similares, podría haber ventajas tales como el incremento de la cantidad de fármaco que se logra administrar, protección de éste frente a la degradación y se podrían también sentar las bases para posteriormente lograr que el transportador sea sitio específico, reduciendo los efectos adversos debidos al fármaco.<sup>iv</sup>

La rapamicina es un fármaco que promueve la autofagia de las proteínas no deseadas que se acumulan intra y extracelularmente en la enfermedad de Alzheimer<sup>v</sup> por lo que con éste se podría elaborar un tratamiento efectivo por medio de un transportador nanométrico. La rapamicina presenta grupos

funcionales no ionizables por lo que es prácticamente insoluble en medios acuosos, esto lo hace idóneo para su inclusión en una estructura de reciente obtención, la cual fue publicada en el 2016<sup>vi</sup>, dicha estructura de geometría esférica con tamaños de hasta 200 nm tiene la particularidad de contar un núcleo hidrofóbico rodeado por fosfolípidos en bicapas o multicapas, según con los estudios instrumentales realizados por los autores.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo experimental se muestra la obtención de una nueva estructura nanométrica esférica, a partir de estudios de equilibrio de fase y mediante el empleo de una mezcla de tensoactivos no iónicos y fosfolípidos, la cual se denominó como “Subag” (del coreano, sandía), el cual se podría ser utilizado como terapia alternativa para el tratamiento del Alzheimer ; su caracterización estructural se basó en varias técnicas instrumentales, tales como: espectroscopia de infrarrojo (IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión dinámica de luz. Además se evaluó la eficiencia de encapsulación de Rapamicina y se efectuó el estudio cinético de liberación *in vitro*.

## **II. Marco teórico**

### **2.1 Enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas que están relacionadas con la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas y por ende, del sistema nervioso central, comparten entre ellas ciertas características con respecto al curso clínico, patología y mecanismos moleculares; frecuentemente están acompañadas por muerte neuronal, desaparición de cuerpos celulares neuronales, patología neuronal y proliferación glial; todas estas afectaciones no son reversibles y no existe ninguna terapia conocida para un tratamiento efectivo, aunque cabe mencionar que hay ciertos tratamientos y terapia génica con lo que se ha presentado una mejora temporal. El riesgo de desarrollar una de estas enfermedades se incrementa con la edad. Entre las principales enfermedades neurodegenerativas están la enfermedad de Parkinson, de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer <sup>vii</sup>.

#### **2.1.1 Enfermedad de Alzheimer**

El Alzheimer es una enfermedad que está relacionada con la pérdida de neuronas colinérgicas que terminan en el hipocampo y la corteza cerebral, la acumulación de proteínas intracelulares que forman marañas neurofibrilares y con la acumulación de depósitos de proteína extracelulares conocidas como placas seniles, las cuales provocan el deterioro mental progresivo principalmente en personas de la tercera edad, quienes sufren de discapacidad funcional progresiva, pérdida de independencia, angustia emocional y síntomas de comportamiento (cambios de comportamiento, deterioro de conducta social, conducta agresiva, incapacidad para realizar las tareas corrientes de la vida diaria de acuerdo con la OMS). Esta enfermedad está caracterizada por la presencia de atrofia cerebral, placas amiloides extracelulares y marañas neurofibrilares intraneuronales <sup>viii</sup>.

Las placas seniles están constituidas principalmente por el péptido  $\beta$  amiloide, el cual se forma por la división de la proteína precursora amiloide (APP) por la

participación de las enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, ésta última enzima cataliza la formación de los péptidos  $\alpha\beta$ , llamados amiloide  $\beta$ , el cual puede asociarse para formar agrupaciones de dímeros y oligómeros para después crecer hacia fibras en forma de láminas con plegamiento  $\beta$  que componen las placas seniles amiloides. Aunque los oligómeros  $\alpha\beta$  son neurotóxicos se cree que la enfermedad se desarrolla sobre todo a causa de la proteína *tau*, que normalmente se unen a microtúbulos en axones y los estabiliza, pero en la enfermedad de Alzheimer están fosforiladas excesivamente y se redistribuyen hacia el cuerpo celular de la neurona y las dendritas, donde se agregan entre si volviéndose marañas neurofibrilares insolubles; provocando pérdida de la sinapsis, apoptosis neuronal y liberación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen estrés oxidativo y contribuyen al proceso apoptótico<sup>ix</sup>.

Aunque aún no hay una cura para esta enfermedad, hoy en día existe un tratamiento de referencia, el cual consiste en el uso de inhibidores de colinesterasa, a fin de aumentar la transmisión colinérgica (de modo que la acetilcolina (ACh) liberada por las neuronas sobrevivientes pueda ser más eficaz), antagonistas de glutamato a fin de reducir su capacidad promotora de excitotoxicidad, así como el uso de antioxidantes con el fin de limitar el daño neuronal causado por los radicales libres.

## 2.2 Tratamiento con Rapamicina

La rapamicina es un macrólido fotosensible obtenido de *Streptomyces hygroscopicus*, actúa bloqueando selectivamente la activación transcripcional de citosinas y por lo tanto inhibiendo su producción. Es un potente inmunosupresor y posee propiedades antifúngicas y antineoplásicas<sup>x</sup>.

El fármaco promueve la autofagia de las proteínas no deseadas que se acumulan intra y extracelularmente en la enfermedad de Alzheimer<sup>xi</sup>, pues es un regulador negativo de la vía mTOR, por lo que podría ser un tratamiento efectivo; sin embargo contiene grupos funcionales no ionizables por lo que es prácticamente insoluble en medios acuosos. Figura 1.

Por medio de la activación de la vía mTOR se inhibe la autofagia celular, el cual es un proceso en que células dañadas, proteínas viejas o mal plegadas son transportadas hacia lisosomas para ser digeridas y degradadas.<sup>xii</sup>

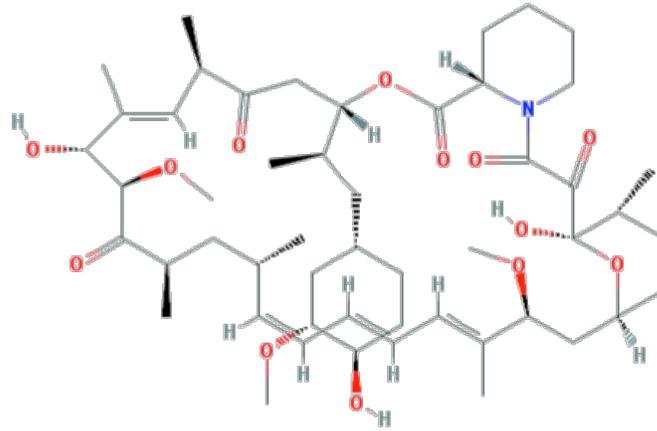


Figura 1. Estructura química de la rapamicina.<sup>xiii</sup>

El blanco de rapamicina en mamíferos o mTOR por sus siglas en inglés, es una proteína con actividad cinasa, miembro de la familia fosfatidilinositol 3-quinasa y es conocida por regular funciones biológicas como el crecimiento celular, proliferación, síntesis de proteínas, apoptosis y autofagia; su desregulación ha sido implicada en diabetes mellitus tipo II, cáncer y neurodegeneración<sup>xiv</sup>.

Se ha encontrado que mTOR inhibe la autofagia al producir ULK1 un miembro del complejo de iniciación asociado a la autofagia lo que da como resultado una pérdida de la función cinasa<sup>xv</sup>.

### 2.2.1 Características biofarmacéuticas

- Absorción

La rapamicina se absorbe poco en el tracto gastrointestinal, se estima que su biodisponibilidad oral es del 15%; el tiempo que tarda en alcanzar el pico de concentración máxima se encuentra entre 0.7 y 3 horas.<sup>xvi</sup>

- Distribución

El fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos debido a su elevada hidrofobicidad, por lo mismo su volumen de distribución es alto y variado. La biodisponibilidad promedio de la rapamicina en tableta después de la administración oral es de 27%, más alta que la de una solución oral.<sup>xvii</sup>

La Tabla 1 engloba las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de la rapamicina, fármaco de clase II, de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) por lo que tiene una baja solubilidad y una alta permeabilidad; sin embargo, hay quien lo clasifica como un fármaco clase IV, es decir poco soluble y poco permeable.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de la rapamicina

Propiedad	Valor teórico
Solubilidad en agua	0.00173 mg /mL
Biodisponibilidad	15 %
Pka	9.96 <sup>xviii</sup>
Unión a proteínas	92 %
Log P	4.3
Clasificación biofarmacéutica	Clase 2, Clase 4 <sup>xix</sup>

## **2.3 Sistemas de liberación modificada como método de administración de fármacos en el SNC**

### 2.3.1 Estructuras nanométricas

En las últimas décadas se han investigado diversos sistemas de escala nanométrica tales como liposomas, micelas, nanotubos de carbono, entre otros, con el fin de utilizarlos como vehículos de liberación modificada de medicamentos, ya que tienen la capacidad de regular la cantidad de fármaco liberada, sosteniendo la duración de la acción terapéutica y/o favoreciendo la liberación en un sitio específico u órgano diana. Estos sistemas ofrecen ciertas ventajas frente a las formas farmacéuticas convencionales (cápsulas, tabletas) tales como:

- Control del tiempo de liberación del fármaco
- Posible dirección de la liberación a un sitio específico
- Liberación en función a un estímulo (temperatura, pH, presión, campo magnético, fuerza iónica)
- Reducción de los efectos adversos
- Incremento de la adherencia terapéutica al minimizar las dosificaciones

Estos vehículos de transporte farmacéutico se caracterizan por tener un tamaño y naturaleza química que les confiere ciertas propiedades, entre los sistemas que se han usado se encuentran los siguientes:

### 2.3.2 Sistemas coloidales

Una dispersión coloidal es aquella compuesta por al menos dos fases una de las cuales está dispersa (fase en menor proporción o discontinua) en de la otra (fase en mayor proporción o continua) y poseen un tamaño de partícula entre los  $10^{-10}$  m hasta  $10^{-6}$  m; debido a su tamaño no sedimentan a tiempos cortos ya que el movimiento normal de las moléculas de agua termina por influir en la trayectoria de sedimentación (movimiento Browniano), lo que retrasa la segregación de fases<sup>xx</sup>.

Dependiendo del estado de agregación de las fases implicadas, los coloides se pueden clasificar en aerosoles (gas en líquido), emulsiones (líquido en líquido) o geles (sólido en líquido).

Se ha encontrado que ciertos medicamentos incrementan o cambian sus propiedades terapéuticas cuando se formulan en un sistema coloidal como la plata coloidal el cual se usa como germicida y no es irritante como las sales de plata iónica. Los sistemas coloidales se utilizan como formas de liberación de fármacos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica ya que aumentan la solubilidad, estabilidad y en algunos casos el sabor, lo que en consecuencia mejora sus parámetros farmacológicos.<sup>xxi</sup>

En la Tabla 2 se muestran los sistemas de liberación más usuales y su aplicación farmacéutica.

Tabla 2. Sistemas de liberación para tratamientos terapéuticos.

Tamaño de promedio de partícula	Tipo de sistema de liberación	Sistemas representativos (componentes)	Aplicaciones y características
0.5-20 $\mu\text{m}$	Microesferas, hidrogeles	Alginato, gelatina, chitosan, microesferas poliméricas, hidrogeles poliméricos	liberación sostenida de medicamentos, andamios para la liberación celular en la ingeniería de tejidos
0.2-5 $\mu\text{m}$ 0.15-2 $\mu\text{m}$	Emulsiones de micropartículas, micro emulsiones	Poliestireno, microesferas de ácido poliláctico, Emulsiones O/W, emulsiones W/O, micro emulsiones aceite en agua	Liberación a un sitio específico. Liberación controlada y dirigida de tratamientos terapéuticos.
30-1000 nm	Liposomas	Fosfolípidos y vesículas a base de polímero con	Liberación a un sitio específico.

		bicapa	
3-80 nm	Micelas	Micelas de surfactantes naturales y sintéticos	Liberación a un sitio específico.
2-100 nm	Nanopartículas	Nanopartículas lipídicas, poliméricas e inorgánicas	Liberación a un sitio específico. Dispositivos de navegación in vivo.
2-100 nm	Nanocristales	Puntos cuánticos	Agentes de imagen

### 2.3.3 Emulsiones

Una emulsión es un sistema disperso que consiste de al menos dos fases líquidas inmiscibles (Figura 2), una de las cuales está dispersa como glóbulos (fase dispersa) en la otra fase líquida (fase continua), son termodinámicamente inestables debido al exceso de energía libre asociada a la superficie de los glóbulos o gotitas, por lo que éstas tienden a juntarse para reducir la tensión interfacial implicada, es decir flocculan, por ello el uso de un agente emulsionante tal como un tensoactivo, ayuda a estabilizar el sistema ya que inhibe la coalescencia al abatir la tensión interfacial;<sup>xxii</sup> el tamaño de partícula va de 0.1  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ .<sup>xxiii</sup>

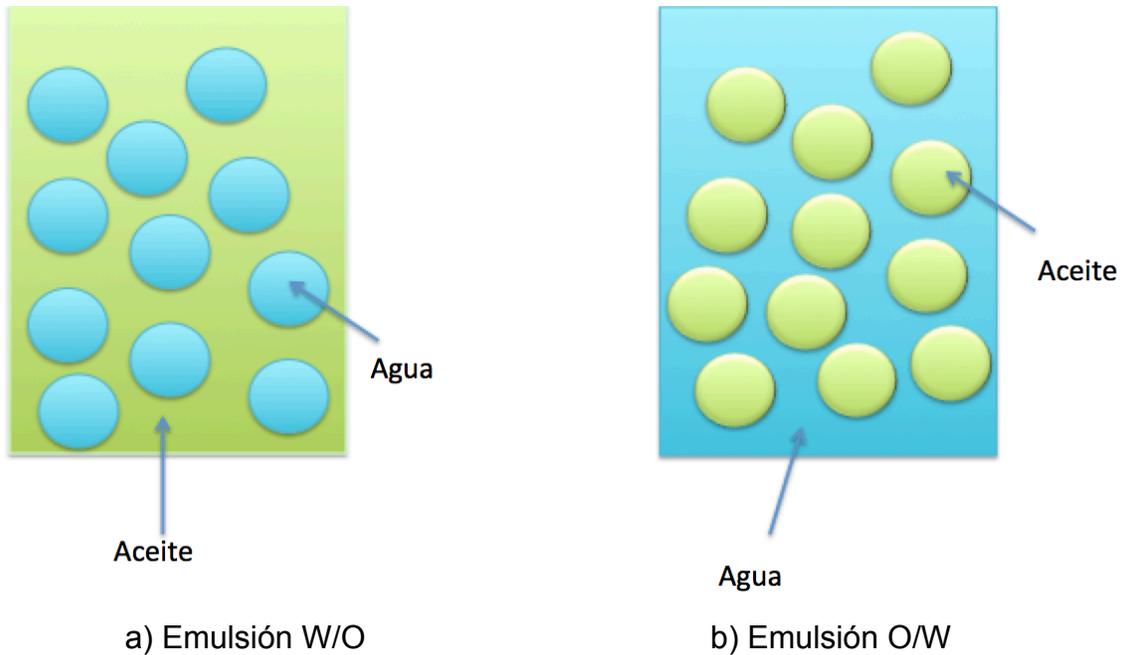


Figura 2. Emulsiones w/o y o/w, a) representa el tipo W/O donde la fase acuosa está dispersa en aceite, por lo que un fármaco hidrofílico estaría en el centro acuoso b) representa el tipo O/W donde la fase oleosa está dispersa en agua, por lo que un fármaco hidrofóbico estaría en el centro conformado por las colas hidrofóbicas del tensoactivo.

#### 2.3.4 Micelas mixtas

Estas estructuras están constituidas de tensoactivos o surfactantes, que son sustancias que abaten la tensión superficial y que están compuestos por una cabeza con un grupo polar y una cadena hidrofóbica de cadena larga (Figura 4) que al estar en un medio acuoso bajo ciertas concentraciones y temperatura, se agregan para formar micelas, éstas se ensamblan solo cuando los surfactantes están presentes a una cierta concentración conocida como concentración micelar crítica (CMC) la cual es característica para cada surfactante.<sup>xxiv</sup>

Dependiendo de la forma espacial del surfactante, la cual depende del volumen de la región polar y la región no polar del tensoactivo, está dada la geometría de las micelas. Véase Figura 4.

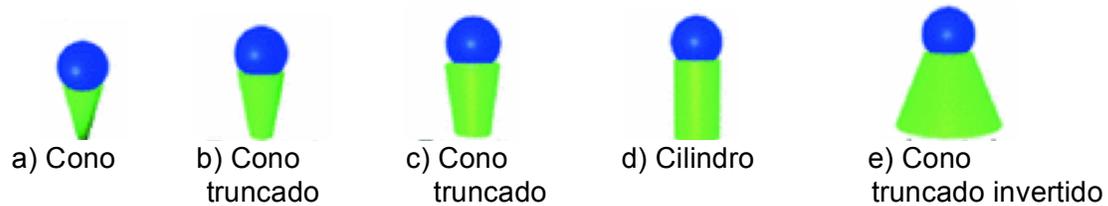


Figura 3. Esquema que muestra la conformación espacial de un surfactante, la figura geométrica que mejor los modela sirve para determinar el parámetro crítico de empaquetamiento ( $C_{pp}$ ) y por lo tanto el tipo de estructura que formarían.<sup>xxv</sup>

Las micelas mixtas son micelas que están compuestas de bloques de copolímeros de distintas clases, bloques de copolímeros mezclados con moléculas anfipáticas o bloques de copolímeros y surfactantes aniónicos o catiónicos.<sup>xxvi</sup> En la figura 4, se esquematiza el núcleo *completamente* hidrofóbico conformado por las cadenas hidrofóbicas, mientras que el exterior está conformado por las cabezas hidrofílicas.<sup>xxvii</sup>

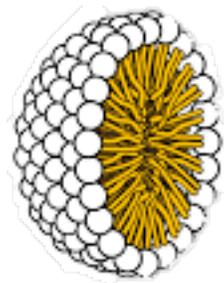


Figura 4. Esquema de una micela dividido por la mitad.

Los factores que controlan el empaquetamiento de tensoactivos pueden ser expresados mediante el Cpp definidos mediante la ecuación 1:

$$C_{pp} = \frac{V_T}{l \alpha} \quad (1)$$

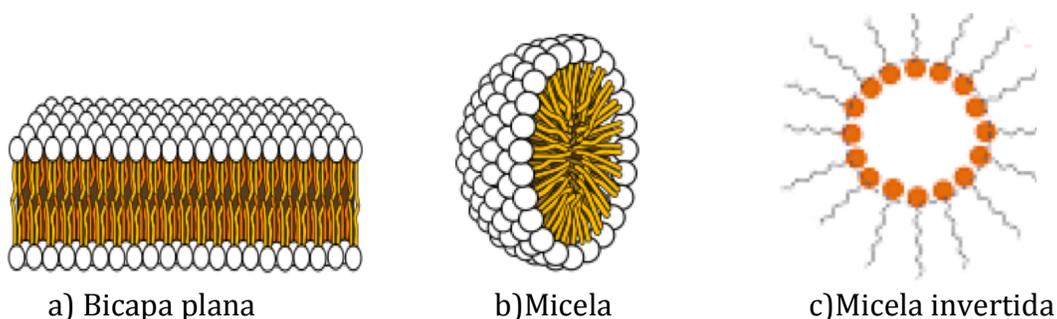
Donde:

$V_T$  : es el volumen de la proporción hidrofóbica de la micela

$\alpha$  : es el área de proyección de la región polar

$l$  : es la longitud crítica de la cadena hidrocarbonada

El valor de ese parámetro sirve para determinar la estructura en la que se organizarán los surfactantes, es decir si el Cpp es mayor que 1.0 la estructura que se espera es una micela inversa, mientras que si el valor es igual a 1.0 se trata de una bicapa plana, así mismo si el Cpp es menor a 1 la estructura formada es una micela esférica<sup>xxviii</sup>. Figura 5

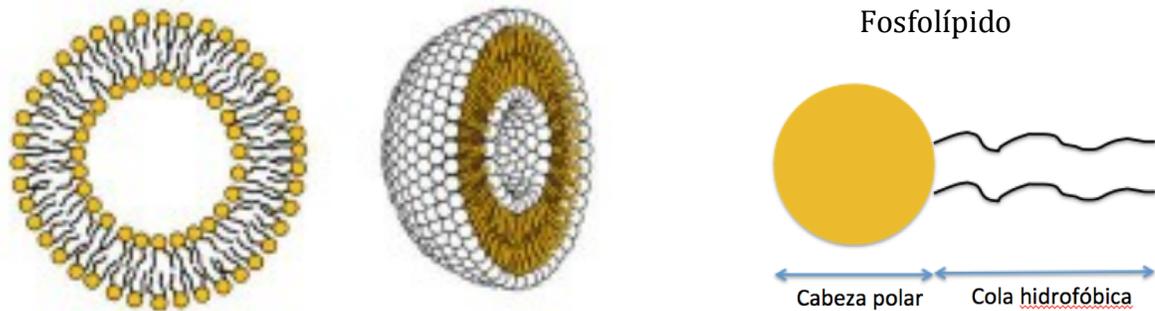


*Figura 5. Organización de las estructuras en función del valor de CPP de los surfactantes que las conforman.*<sup>xxix</sup>

### 2.3.5 Liposomas

Son sistemas vesiculares cerrados constituidos principalmente por fosfolípidos, los cuales al ser también moléculas anfipáticas y al encontrarse en agua se orientan de modo que forman bicapas concéntricas, teniendo su extremo hidrofílico en contacto con el agua, mientras que la parte hidrofóbica se orienta hacia el centro con el fin de evitar el medio acuoso, pueden adquirir tamaños en un rango de 0.02 a 20  $\mu\text{m}$  y estar constituidos por una o varias bicapas lipídicas como

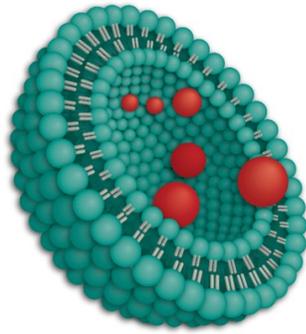
se muestra en la figura 6; en función de su tamaño y número de “capas” pueden ser clasificados como unilaminares pequeñas (SUV), unilaminares de gran tamaño (LUV) o multilaminares (MLV).<sup>xxx</sup>



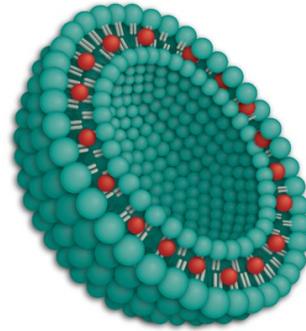
*Figura 6. Esquema de un liposoma partido por la mitad, se observa la bicapa fosfolipídica con las cabezas de los fosfolípidos orientadas hacia la parte acuosa tanto del exterior como en el centro y con las cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el interior de la estructura.*<sup>xxxii</sup>

Los liposomas pueden estar constituidos de fosfolípidos de doble cadena catiónicos, aniónicos o neutros, de naturaleza sintéticos o naturales, si bien los fosfolípidos son el componente mayoritario, pueden tener también colesterol en la membrana, para incrementar la estabilidad en fluidos biológicos debido a que hace más fluida la membrana, prevenir agregación de sustancias cargadas tales como fosfatidilserina y cardiolipinas<sup>xxxii</sup>; ya que se ha encontrado que ciertas proteínas como el citocromo C, unen, deforman y penetran la bicapa, provocando cambios en la permeabilidad.<sup>xxxiii</sup> Véase Figura 7.

Los liposomas son capaces de incorporar tanto fármacos hidrosolubles dentro del núcleo acuoso como fármacos liposolubles dentro de la bicapa, son biodegradables y no tóxicos y se ha comprobado que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los fármacos.



a)Fármaco hidrosoluble



b)Fármaco liposoluble

Figura 7. Esquema de la encapsulación de a) Fármaco hidrosoluble y de b) fármaco liposoluble dentro de un liposoma.<sup>xxxiv</sup>

### 2.3.6 Lipomic

Es una nueva partícula esférica, descrita por sus autores como una estructura tipo emulsión, se trata de estructuras micelares compuestas de una o más bicapas fosfolípidicas (no confundir con un transferosoma, véase Anexo 1) que contienen micelas mixtas de fosfolípidos y tensoactivos, especialmente ésteres de sorbitán etoxilados y no etoxilados; por lo que es una estructura hidrófoba y por tanto supondría una mayor eficiencia de encapsulamiento de fármacos hidrófobos; fue obtenida a partir de una mezcla de ésteres de sorbitán etoxilados y no etoxilados (Tween-Span), DPPC-colesterol y agua, la estructura presenta un núcleo micelar mixto donde la cantidad de DPPC es baja pues está constituido principalmente por monómeros de Tween-Span circundando esta estructura se encuentra al menos una bicapa de DPPC, está bicapa es similar a las estructuras liposomales, con algunos monómeros de tensoactivo intercalados.<sup>xxxv</sup> Véase Figura 8.

Este tipo de estructura nanométrica tiene un uso potencial como transportador de fármaco hidrofóbico.

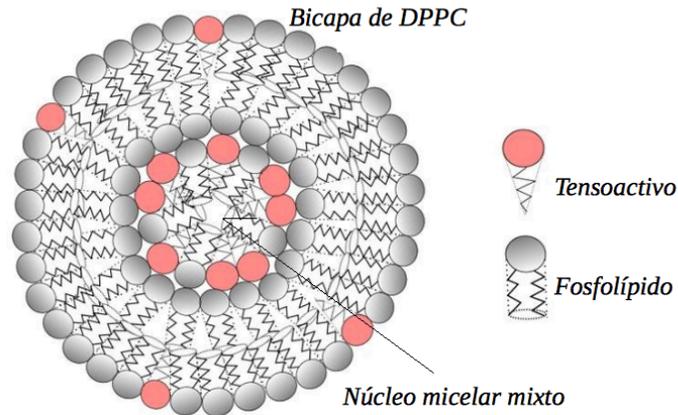


Figura 8. Esquema del Lipomic, se observa el núcleo de naturaleza mixta rico en la mezcla Tween/Span y DPPC, rodeado por al menos una bicapa de DPPC que ayuda a estabilizarlo.

Su obtención se sustenta en estudios de equilibrio de fases, ya que son la mejor herramienta para controlar la reproducibilidad de cualquier método de obtención de transportadores de fármacos en donde los surfactantes y fosfolípidos son usados.

Los ésteres de sorbitan etoxilados en agua estructuran diferentes agregados en función de su concentración y temperatura, el diagrama binario de equilibrio de fases correspondiente, muestra que a concentraciones menores de 20% m/m, en el sistema se encuentran estructuras esféricas denominadas micelas; un incremento en la temperatura promueve la inserción de más monómeros de surfactante en la micela, macroscópicamente el sistema se torna ligeramente turbio u opalescente, a esto se le conoce como punto de enturbiamiento; este estado termodinámico es de mucho interés, ya que la tensión interfacial agua-micela es muy baja y además, las micelas incrementan su capacidad de contención. Bajo las condiciones termodinámicas específicas del punto de enturbiamiento, sustancias como colesterol y fosfolípidos promueven el ensamblado de estructuras no micelares con diferente morfología, tamaño, estabilidad y propiedades farmacéuticas. El Lipomic es un ejemplo de esta nueva gama de estructuras de interés farmacéutico cuya obtención tiene reproducibilidad precisamente por el sustento en estudios de equilibrios de fase.<sup>xxxvi</sup>

## 2.4 Administración intranasal

La vía intranasal es una ruta no invasiva para la administración de fármacos ampliamente usada para tratamientos locales, puede ser útil para el tratamiento de diversas enfermedades debido a que los fármacos pueden ser absorbidos en circulación sistémica a través de la mucosa nasal sin presentarse efectos de primer paso; entre las ventajas que ofrece esta vía de administración, está la fácil administración; al no ser invasiva el paciente puede auto administrarse, la absorción de fármacos es alta para fármacos lipofílicos de valor de masa molecular de hasta 1kDa y los niveles alcanzados en plasma son similares a los alcanzados por vía intravenosa pero el tiempo que tarda el efecto terapéutico es menor<sup>xxxvii</sup> y la más importante, permite la administración de fármacos directamente al cerebro sin pasar por la BHE.<sup>xxxviii</sup>

Las diversas ventajas que ofrece la vía intranasal van desde evitar el efecto de dilución sistémica de los fármacos liberados por esta vía y la evasión del efecto de primer paso, el cual puede inactivar una parte de fármaco administrado por la metabolización en el hígado, además de que esta vía permitiría el uso de dosis terapéuticas menores, mejorando de esta manera la relación costo efectividad y la adherencia terapéutica, así como el que los fármacos absorbidos tiene una distribución más rápida hacia el sistema nervioso central, por lo que algunos de ellos alcanzan mayor concentración en el líquido cefalorraquídeo en comparación con otras vías de administración como son la orogástrica o la intravenosa<sup>xxxix</sup> así, el uso de nebulizadores e inhaladores ayuda a disminuir los efectos sistémicos y aumentar la concentración del fármaco en las vías respiratorias.

Es importante tener en cuenta que la cavidad nasal está llena de endopeptidasas y exopeptidasas que generan una degradación temprana de aquellos fármacos susceptibles a la degradación enzimática, repercutiendo en la biodisponibilidad del fármaco; debido a este hecho las formulaciones que estén ideadas para una liberación en el SNC vía intranasal, deben de atravesar rápidamente la mucosa nasal. El transporte de fármacos a través de la mucosa depende de múltiples

factores, tales como las características fisicoquímicas de la sustancia, el tipo de su formulación y las condiciones fisiológicas en el sitio de absorción, por mencionar algunos.<sup>xi</sup>

#### **2.4.1 Transporte de fármacos hacia el SNC vía intranasal**

Las superficies respiratorias y olfativas de la cavidad nasal son las principales responsables del transporte de los fármacos administrados desde la nariz hasta el cerebro, la cavidad nasal es rica en vasculatura, que se encuentra debajo de la membrana mucosa. Los fármacos lipofílicos (no polares) generalmente se absorben bien desde la cavidad nasal por difusión simple y, en la mayoría de los casos, muestran un perfil de concentración en plasma idéntico al observado después de la administración intravenosa. Los fármacos hidrofílicos (polares), por otro lado, no se absorben bien y atraviesan la mucosa nasal a la circulación sistémica o se transportan a través de la mucosa nasal al sistema nervioso central.<sup>xii</sup>

Existen tres principales formas de transporte hacia el cerebro desde la cavidad nasal:

- 1) Transporte a través de la mucosa nasal.
- 2) Transporte a través del nervio olfatorio. Figura 9.
- 3) Transporte a través del nervio trigémino. Figura 10.

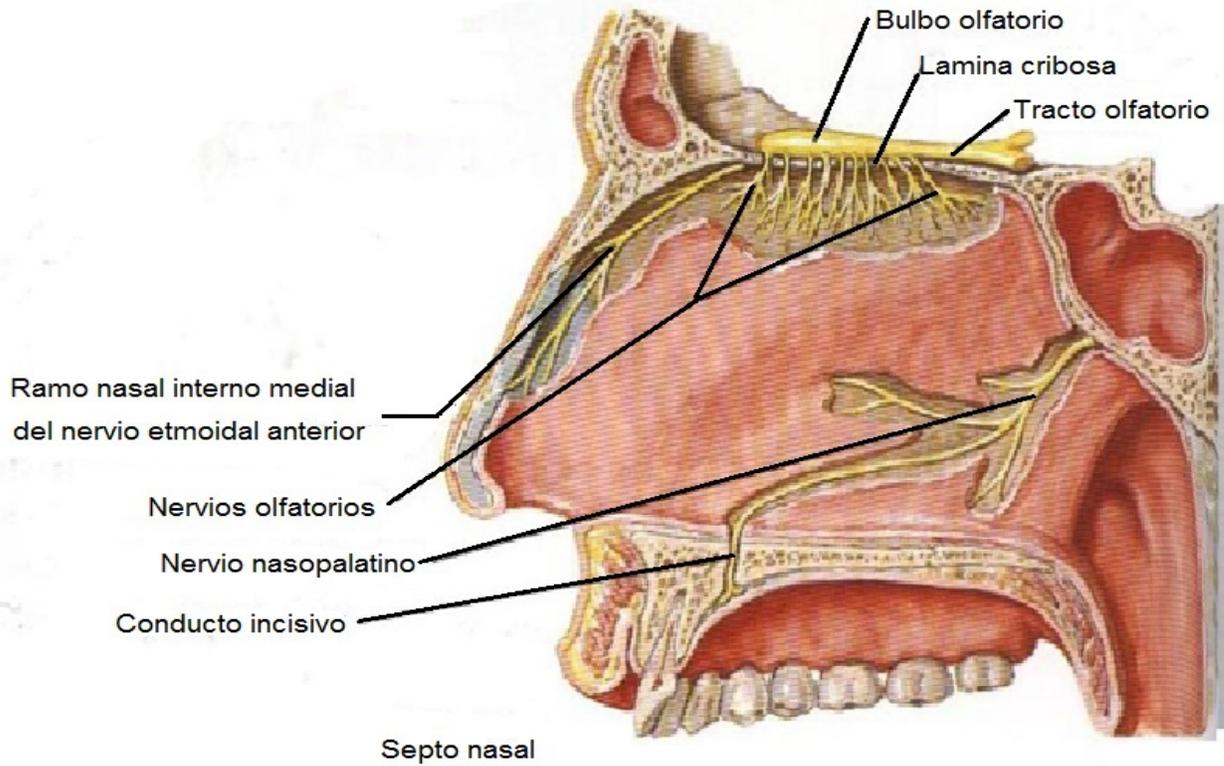
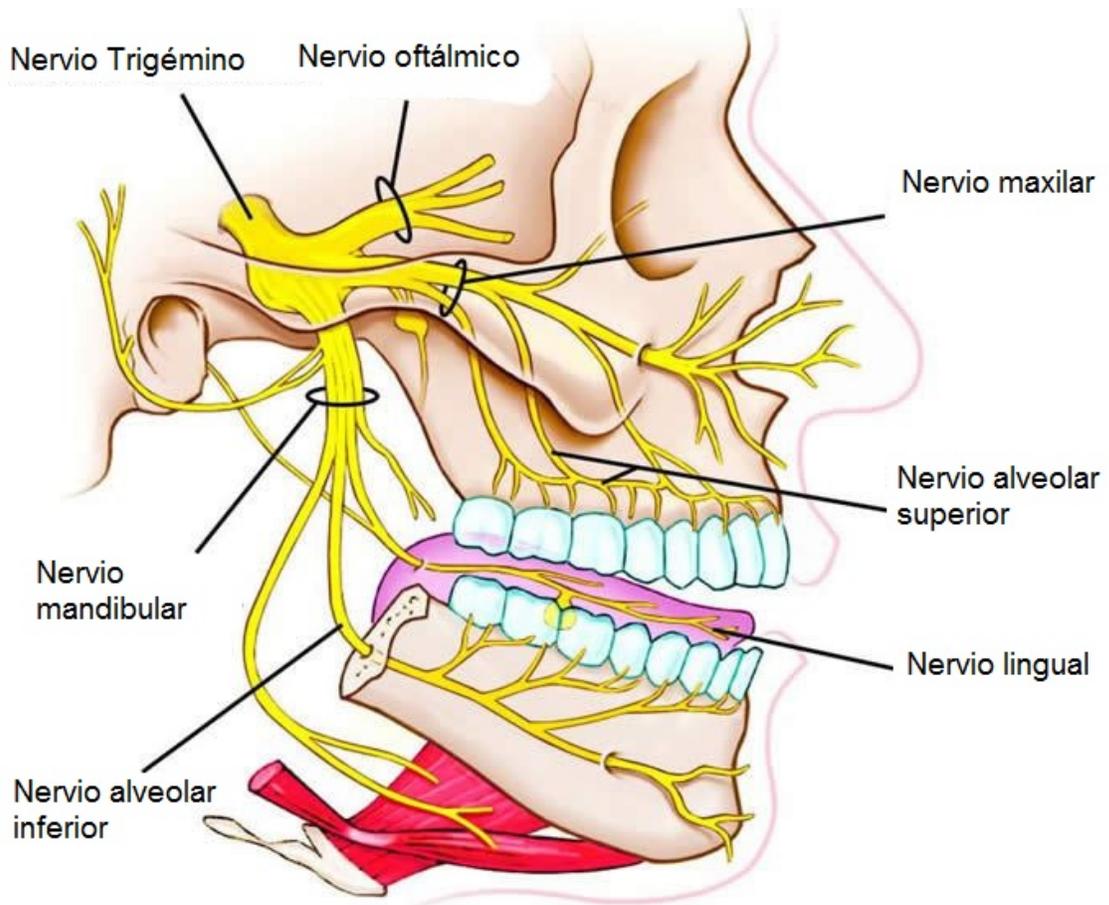


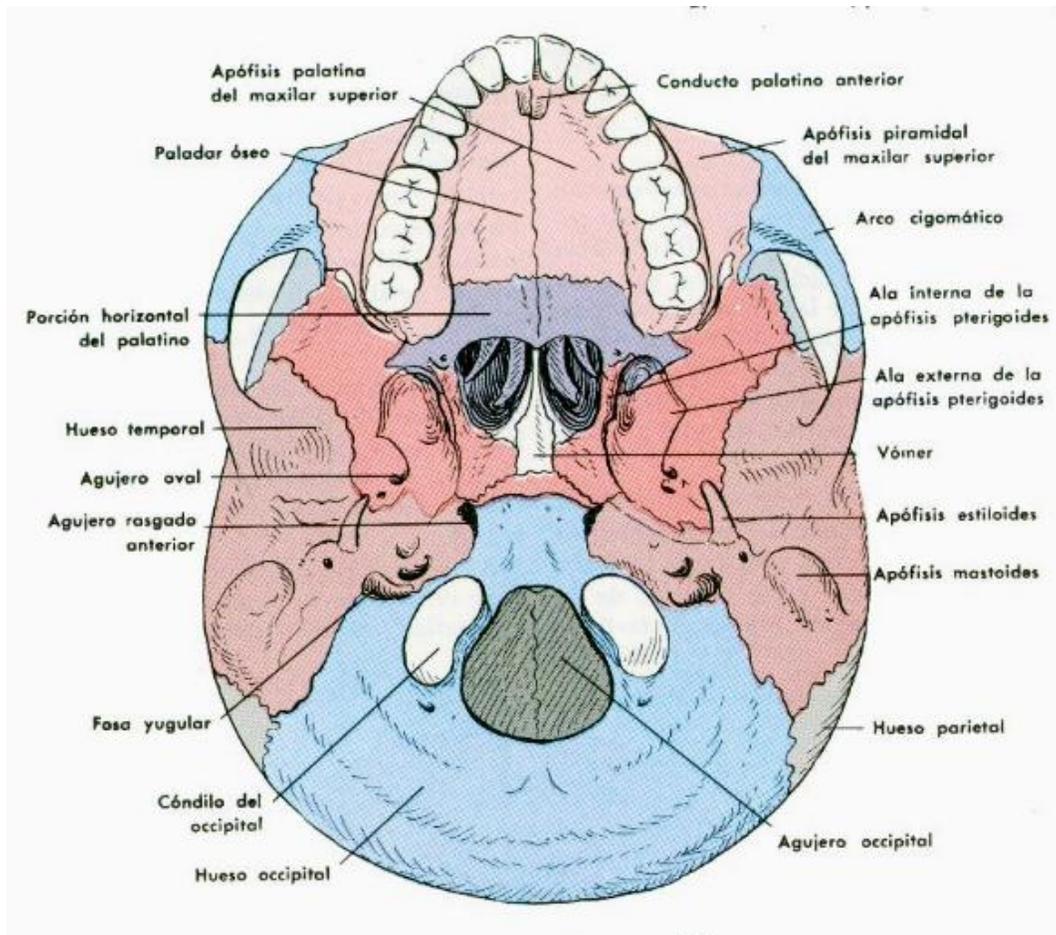
Figura 9. Vista lateral del nervio olfatorio

El transporte a través del nervio trigémino se lleva a cabo mediante dos zonas:

- 1) A través del agujero lacerado anterior o agujero occipital (Figura 11) cerca de la protuberancia y
- 2) a través de la lámina cribosa cerca del bulbo olfatorio.<sup>xlii</sup>



*Figura 10. Vista lateral del nervio Trigémينو*



*Figura 11. Vista superior del agujero occipital o agujero lacerado anterior en el cráneo*

La captación de fármacos a través de la vía olfativa se produce a través de vías intraneuronales o extraneuronales. La vía intraneuronal se prolonga y transporta principalmente los fármacos a través de la vía axonal, mientras que el transporte de flujo masivo se realiza a través de los canales perineurales, por lo que el fármaco se puede transportar desde la cavidad nasal al líquido cefalorraquídeo y la parénquima cerebral. La captación de fármacos a través del nervio trigémino se produce a través de un proceso de difusión; sin embargo, el principal portal para la absorción de fármacos desde la cavidad nasal es el epitelio olfativo donde la absorción se produce al pasar a través de la capa de mucosa, entre más pequeña y sin carga se encuentre una molécula de principio activo, más fácil será su paso a través de esta capa.<sup>xliii</sup>

Debido a la anatomía y fisiología de la cavidad nasal la cantidad de fármaco descargada dependerá del sistema de liberación (que puede ser modificado o prolongado, o no) y del dispositivo de administración nasal, ya que depende de factores tales como el modo de administración, el tamaño de partícula, la formulación, la velocidad de liberación de las partículas, el ángulo del spray y el cono formado por éste.

Los fármacos lipofílicos son transportados transcelularmente por un proceso de difusión pasiva dependiente de la concentración, mediado por receptor o acarreador y por mecanismos de transporte vesicular, mientras que los fármacos polares se cree que pasan a través de las uniones en el epitelio.

Si bien mediante la vía de administración nasal se puede alcanzar la liberación sistémica, esta vía no es la más óptima para todos los fármacos puesto que aquellos que sean de naturaleza polar y de gran peso molecular pueden no absorberse adecuadamente, esto debido a la pobre permeabilidad a la membrana, el rápido recambio y la degradación enzimática de la cavidad nasal.

Si bien se ha encontrado que la mucosa nasal tiene algún carácter hidrofílico, es mayoritariamente de naturaleza lipofílica.

En principio el tamaño de partícula óptimo para poder atravesar la barrera hematoencefálica es de 200 nm<sup>xliii</sup> ya que puede penetrar más profundamente en el cerebro y mantenerse en circulación por más tiempo, sin embargo se han reportado nanoacarreadores con un tamaño de hasta 800 nm<sup>xliiii</sup> que logran atravesar la barrera hematoencefálica.

#### **2.4.2 Mecanismo de absorción a través de la mucosa nasal**

La gran vascularidad que posee la cavidad nasal permite que los fármacos lipofílicos sean bien absorbidos por un proceso de difusión simple, por otra parte las moléculas polares no son bien absorbidas aún más si poseen un tamaño de partícula grande por lo que su biodisponibilidad es pobre en este caso.<sup>xliiii</sup>

El transporte a través de la mucosa tomando en cuenta la polaridad y tamaño del fármaco se puede dar por procesos de difusión simple por gradientes de concentración o mediada por receptores con transporte transcelular (a través de la célula) o paracelular (entre las células); generalmente compuestos con bajo peso molecular (menor a 1000 daltons) usan transporte paracelular, mientras que el transporte de moléculas polares se realiza normalmente por mecanismos de transporte vesicular tales como la pinocitosis.<sup>xlvii</sup>

La mucosa nasal es la única locación en el cuerpo humano que provee una conexión directa entre el sistema nervioso central y la atmósfera. Los fármacos administrados por la mucosa nasal atraviesan rápidamente el nervio cribiforme (Figura 9) al SNC mediante tres rutas:

- 1) Directamente de las neuronas olfatorias localizadas en el bulbo olfatorio
- 2) A través de células de soporte y el lecho capilar circundante
- 3) Directamente en el fluido cerebroespinal<sup>xlviii</sup>

Otro factor importante que puede afectar el transporte a través de la mucosa es la renovación mucociliar ya que de ésta podría depender el tiempo de contacto entre la vasculatura y el fármaco.<sup>xlix</sup>

Se ha encontrado que el uso de surfactantes tales como polisorbatos, sales biliares y derivados de estas sales, ácidos grasos, sus derivados, cosurfactantes y ciclodextrinas, promueven la absorción vía intranasal, pues generalmente actúan cambiando o mejorando la permeabilidad a través de la capa de células epiteliales ya que modifican la bicapa fosfolipídica, por lo que en algunos casos podrían ayudar a prevenir la degradación enzimática; sin embargo, el uso de estos promotores debe ser cuidadosamente seleccionado pues podría causar daño permanente en el revestimiento de la mucosa.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo, se desarrolló de un sistema nanométrico cargado de rapamicina, que busca ser una opción en el tratamiento del Alzheimer, al disminuir el progreso de la enfermedad en los pacientes, mejorando así su calidad de vida. A partir de ésteres de sorbitán etoxilados y no etoxilados, lecitina y colesterol, se obtuvo una estructura que se denominó como “Subag” la cual podría ser administrada vía intranasal; se espera que el sistema llegue al nervio olfatorio (el cuál conduce los impulsos directamente al SNC) y se favorezca la autofagia de las proteínas intracelulares acumuladas.

#### **2.4.3 Aviso de privacidad**

La trascendencia del sistema desarrollado y la oportunidad que ofrece respecto a una explotación comercial, de la cual se beneficie la Universidad y los investigadores y la autora del escrito, generó un acuerdo para proteger ciertos aspectos referentes a la identidad de algunos reactivos, sin comprometer la claridad del trabajo. El equipo de trabajo implicado agradece la comprensión del lector.

### **III. Justificación**

Debido a que no existe una cura para el Alzheimer, en esta investigación se pretende la obtención de una estructura obtenida a través de un método reproducible, sustentado en estudios de equilibrios de fase, nuevas estructuras nanométricas basadas en el Lipomic con las que se logre no solamente un tratamiento efectivo para la enfermedad de Alzheimer, sino también incrementar la cantidad de fármaco que pueda atravesar la barrera hematoencefálica.

### **IV. Objetivos**

Objetivo general

- Diseñar trayectorias termodinámicas para el desarrollo de una suspensión intranasal de vehículos nanométricos cargados de Rapamicina para el tratamiento del Alzheimer.

### Objetivos particulares

- Obtener un método reproducible de producción de un vehículo innovador de escala nanométrica cargado de rapamicina y sustentado en estudios de equilibrios de fases y que presente una estabilidad coloidal de al menos 30 días.
- Determinar instrumentalmente la identidad estructural del vehículo de transporte de liberación modificada.
- Evaluar los perfiles de liberación de la Rapamicina en el vehículo obtenido.

### V. Hipótesis

La mezcla de tensoactivos etoxilado, fosfolípidos y fármaco a una temperatura cercana al punto de enturbiamiento de la mezcla de los primeros, favorecerá el empaquetamiento de los componentes de manera controlada en estructuras nanométricas.

### VI. Materiales

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon dos tipos de tensoactivos no iónicos derivados de ésteres de sorbitán ambos de Sigma Aldrich, Rapamicina (Sinbiotik, donado por Laboratorio Santgar), Lecitina de soya (Metarin, AMFHER FOODS S.A DE C.V), Colesterol (Meyer, NF, Lote No.Q4533), agua desionizada (Equipo NANOpure Diamond Life Science UV/UF); además de Fluoresceína sódica NaFi, (marcador fluoromarcado, Sigma-Aldrich, St. EUA) y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(sulfonil de lisamina rodamina B) (sal de amonio) (RhB)(pureza > 99%, Avanti lipidsd Inc, EUA).

## **VII. Metodología experimental**

### **7.1 Método general**

Las mezclas compuestas de lecitina-colesterol y de los tensoactivos etoxilados en agua, con y sin rapamicina, fueron preparadas mediante agitación constante en parrilla de calentamiento a la temperatura cercana al punto de enturbiamiento correspondiente de la cantidad de la mezcla de tensoactivos, sin considerar los demás componentes; una vez formado el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente y se tomó una alícuota para determinar el tamaño de partícula y el potencial zeta de la muestra; todos aquellos sistemas que mostraron una estabilidad coloidal de 1 mes, entendiendo como estabilidad el tiempo en el que la suspensión se mantuvo estable (sin separación de fases), fueron sometidos a estudios instrumentales tales como SEM, FTIR y microscopia confocal, para conocer su arreglo estructural.

La liberación de Rapamicina de las estructuras nanométricas sólo se evaluó en los sistemas con al menos 30 días de estabilidad (agrupados en dos diagramas ternarios) a través del método de membrana de diálisis.

### **7.2 Preparación de las estructuras nanométricas**

La determinación del punto de enturbiamiento se realizó a partir de la mezcla de los tensoactivos etoxilados en agua, a través de determinaciones visuales. Las mezclas fueron calentadas en un baño y en agitación constante con velocidad moderada, con los datos (por triplicado) se construyó una curva de temperatura de turbidez en función de la concentración de surfactante en agua, el diagrama binario de equilibrio de fases que se obtuvo, tiene como fin de evaluar la temperatura donde la tensión interfacial agua-micela es más baja y donde se presenta la formación de micelas grandes que tienen la capacidad de atraer o capturar compuestos como fosfolípidos y/o colesterol y eventualmente la encapsulación del fármaco en la estructura nanométrica.

Para la preparación de las estructuras nanométricas, se utilizaron mezclas de dos tensoactivos etoxilados con mezclas de colesterol-lecitina y agua desionizada

(misma que contenía el fármaco), las cuales se homogeneizaron mediante el uso de una parrilla de calentamiento en un baño de agua a la temperatura correspondiente al punto de turbidez de la mezcla de tensoactivos (temperatura evaluada sin tomar en cuenta el resto de los componentes) y agitación constante de 300 rpm, a presión atmosférica normal, dicha preparación se realizó en dos partes, la primera tomando solo la mezcla de componentes sólidos, (compuesta por la mezcla de tensoactivos, fosfolípidos y colesterol), la cual fue agitada durante 50 min a 600 rpm y la segunda, una vez homogeneizada la primera mezcla, consistió en adicionar el agua que contenía el fármaco suspendido; toda la mezcla fue agitada por 30 min a 300 rpm para después calentar progresivamente, mediante parrilla de calentamiento, hasta la temperatura cercana al punto de enturbiamiento. Este proceso se efectuó durante 30 min a 300 rpm; una vez terminado este tiempo se dejó enfriar la suspensión a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad.

Con la información obtenida para todos los equilibrios de fases correspondientes, se construyó un diagrama pseudoternario de equilibrio de fases con dos a tres trayectorias por diagrama ternario, para encontrar los estados de equilibrio óptimos para la formación de suspensiones estables, dando al método una reproducibilidad considerable.

### **7. 3 Caracterización de las estructuras nanométricas de rapamicina**

Los sistemas obtenidos con respaldo de los diagramas pseudoternarios de equilibrio fueron sometidos a los siguientes estudios instrumentales:

#### **7.3.1 Estudio de estabilidad**

La estabilidad, que para esta investigación está definida como el tiempo en el cual los sistemas obtenidos tuvieron una estabilidad coloidal mínimo de un mes, se evaluó considerando la segregación de fases, para ello los sistemas obtenidos se observaron diariamente por un periodo de tres meses periodo en que los sistemas fueron almacenados a 8°C. La distribución del tamaño de partícula y la eficiencia

de encapsulación de las muestras fue determinada también en función del tiempo de almacenamiento.

### **7.3.2 Potencial zeta mediante DLS**

Para conocer la estabilidad de las suspensiones de las estructuras nanométricas, se determinó por triplicado su potencial zeta con un equipo Zetasizer Nano Zen 3600, con un valor de viscosidad de agua de 0.8872 cP a 25°C, un índice de refracción de 1.220 y un ángulo de medida 173°; la medición se llevó a cabo en una celda de plástico con las muestras del sistema sin diluir ya que la presencia adicional de agua produce el colapso de los sistemas.

### **7.3.3 Determinación de tamaño de partícula por DLS**

El tamaño de partícula se determinó con un equipo Zetasizer Nano Zen 3600, en una celda de plástico a las mismas condiciones que en la determinación del potencial zeta, para las muestras del sistema sin dilución previa.

### **7.3.4 Liofilización de los sistemas fabricados**

Con el fin de contar con muestras aptas para FTIR, se liofilizaron las muestras en un equipo Labconco a una presión de 0.021 mbar y en modo automático, el equipo fue programado con los siguientes segmentos:

Segmento 1: -55 ° C 24 h

Segmento 2: velocidad 1.04 ° C/min, -10 ° C, 12 h

Segmento 3: velocidad 0.5 ° C/min, 0° C, 20 h

Segmento 4: velocidad 1.0 ° C/min, 5 ° C, 4 h

### **7.3.5 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)**

Con el fin de coadyuvar con la determinación de la identidad estructural del sistema obtenido, se realizaron estudios de FTIR tanto a las suspensiones que

contenían rapamicina como las que no contenían dicho fármaco, así como a la rapamicina, el colesterol y a los fosfolípidos.

Las muestras de las suspensiones fueron previamente liofilizadas y se analizaron a través de un espectrómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer a 450 cm<sup>-1</sup> (Instituto de investigaciones en materiales, UNAM).

### **7.3.6 Determinación de la morfología superficial mediante Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La determinación se realizó utilizando un equipo JEOL JSM-7600F (Instituto de investigaciones en materiales, UNAM), en una rejilla de cobre como soporte para las muestras, mismas que fueron recubiertas con oro.

Para la preparación de la muestras se depositó 20 µL sobre la rejilla de cobre y se congeló con nitrógeno líquido, posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización.

### **7.3.7 Microscopia confocal de fluorescencia**

Para determinar el arreglo espacial de los fosfolípidos y para conocer la naturaleza del núcleo de la estructura, se utilizó RhB y fluoresceína sódica como marcadores fluorescentes, ambos se agregaron a la mezcla de fosfolípidos y tensoactivos antes de formar el sistema, el primero en una proporción 200:1 con respecto a la lecitina de soya y la fluoresceína en una concentración en agua de 0.2 % m/v. La microscopía fue hecha con un equipo Imagexpress Micro Molecular Devices (Unidad de Investigación Preclínica , UNAM)

Inicialmente, se prepararon sistemas solo con fluoresceína sódica los cuales se purificaron mediante diálisis para extraer la fluoresceína no encapsulada mediante membranas (MWCO: 12-14 kD con diámetro de poro de 45 mm, Fischer Scientific); se utilizó agua desionizada como medio de recepción que

se cambió cada 12 horas por un periodo de 5 días, tiempo en el que se extrajo todo el fluoromarcador, mismo que fue analizado con un fluorómetro a una longitud de onda de emisión de 460nm.

### **7.3.8 Determinación de la eficiencia de encapsulación**

Para determinar la cantidad de fármaco dentro de los sistemas se realizó la cuantificación de manera directa tomando una alícuota de 500  $\mu\text{L}$ , la cual se centrifugó a 14000 rpm por 1 hora, se extrajo con cuidado todo el sobrenadante (denominado como sobrenadante 1) con el fin de separar el agua de la suspensión del vehículo; mientras que el botón se resuspendió con 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , agitando mediante vórtex por 30 s y sonicando por 30 min con el fin de romper el sistema y dejar el fármaco suspendido, libre de fosfolípidos, transcurrido ese tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 1 hora, obteniéndose otro sobrenadante (sobrenadante 2); dado que los tensoactivos intervienen en la cuantificación y están suspendidos al igual que el fármaco en el sobrenadante 2, fue necesario precipitar los tensoactivos con una solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 20 %, lo que separó a este sobrenadante en dos fases, una rica en tensoactivos y otra pobre en tensoactivos, se tomó la fase pobre en tensoactivos con cuidado de no mezclar ambas fases utilizando una micropipeta y a esta fase se le realizó una extracción con 500  $\mu\text{L}$  de hexano, con el fin de obtener en la fase orgánica únicamente el fármaco. Para corroborar que no existiera fármaco en el sobrenadante 1, también se le realizó una extracción con hexano, posterior a la precipitación de tensoactivos de la misma manera en que se trató el sobrenadante 2 y finalmente se realizó la cuantificación de Rapamicina de las fases orgánicas mediante espectroscopia UV a una longitud de onda de 280.81 nm en una celda de cuarzo con tapa.

### **7.3.9 Estudios de liberación *in vitro***

La cinética de liberación del fármaco de las estructuras nanométricas, se evaluaron utilizando el método de membrana de diálisis (MWCO: 12-14 kD con

diámetro de poro de 45 mm, Fischer Scientific), utilizando acetonitrilo (ACN) 20 % v/v como medio de liberación. Se hidrató la membrana de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se colocó 1.5 mL de cada suspensión dentro de esta, se verificó que no existieran fugas por los extremos y se corrieron los estudios de liberación en vasos de precipitado con 100 mL de medio a  $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$  C, durante 99 horas y agitación magnética constante, en la obscuridad para evitar la degradación de la rapamicina y por ende, una cuantificación errónea, ya que como se mencionó el fármaco es fotosensible.

Para determinar la cantidad de rapamicina liberada, se tomaron alícuotas de 1 mL con reposición de volumen en cada muestreo; considerando condiciones Sink para la solubilidad de rapamicina de 65.57  $\mu\text{g/mL}$ . La cuantificación del fármaco se realizó mediante espectroscopia UV a una longitud de onda de 293.56 nm, debido a que la absorptividad molar de la rapamicina es diferente al cambiar de medio.

Los datos obtenidos se analizaron mediante DDSolver 1.0 de Excel para analizar el modelo de liberación más adecuado. Se consideró el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) más cercano a 1, el criterio de selección de modelo (MSC) mayor y el criterio de Akaike (AIC) menor.

## **VIII. Resultados y Discusión**

### **8.1 Síntesis y caracterización de las estructuras nanométricas de rapamicina**

Se llevó a cabo la síntesis de las estructuras nanométricas con y sin rapamicina, mismas que fueron evaluadas por un periodo de tres meses a fin de conocer su estabilidad en dispersión; se probaron una serie de distintas combinaciones entre los tensoactivos etoxilados, manteniendo la misma proporción de lecitina-colesterol, tal como muestra las Tablas 3, 4 y 5, mostradas más adelante.

Se construyeron tres diagramas pseudoternarios de equilibrio de fases para dichos sistemas a fin de respaldar el control del método y garantizar su reproducibilidad; en las Figuras 12-14, se muestran dos diagramas ternarios por Figura, en a) aparecen los sistemas sin fármaco, mientras que en b) los sistemas con

fármaco. Para la Figura 12, la mezcla de tensoactivos utilizada tiene un valor de HLB de 15.85, mientras que en la Figura 13, un HLB de 16.36 y para la Figura 14 un HLB de 15.34.

Utilizando la ecuación (2) se calcularon los valores del HLB correspondientes a cada mezcla de tensoactivos correspondientes a cada sistema

$$HLB_{mezcla} = HLB_A \times f_A + HLB_B \times f_B \quad (2)$$

Donde

$HLB_A$  : Valor del HLB del componente A

$HLB_B$  : Valor del HLB del componente B

$f_A$  : Proporción del tensoactivo A/ Total de los componentes

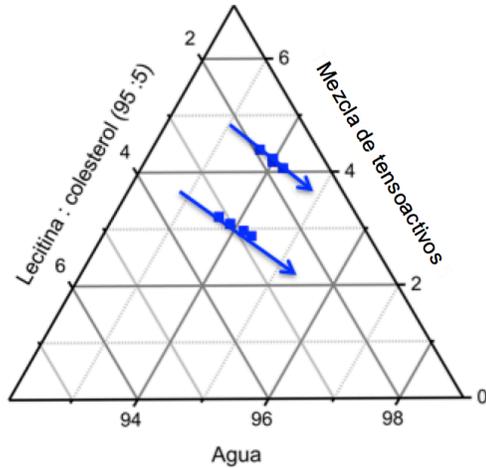
$f_B$  : Proporción del tensoactivo B/ Total de los componentes

En la tabla 3, se muestra la composición de los sistemas, comparando el tamaño de partícula y la potencial zeta entre los sistemas homólogos en composición, donde S representa a los sistemas sin fármaco y F a los sistemas con fármaco, ya que la única diferencia es la ausencia o la presencia de fármaco.

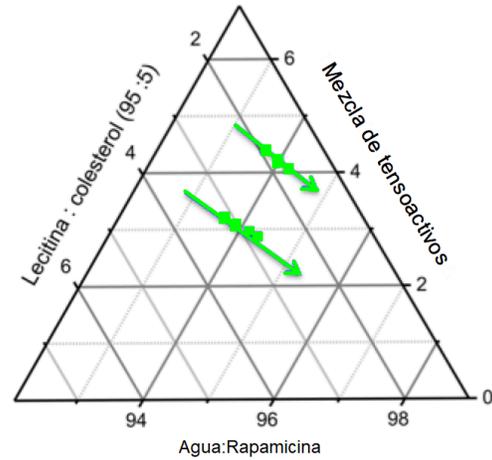
Los valores muestran el promedio de las mediciones realizadas. Entre los sistemas 1S14 y 1S24, éste último junto con su homólogo (1F24), tienen un mayor porcentaje de tensoactivos de la misma pareja de tensoactivos que el sistema 1S14 y su homólogo (1F14). La tabla 3 corresponde a los diagrama ternarios de equilibrio de fases 1 (Figura 12), para los cuales se utilizó una mezcla de tensoactivos con un HLB de 15.85.

Tabla 3. Composición tamaño de partícula, potencial zeta y tiempo de estabilidad de los sistemas del ternario 1 en suspensión.

Nombre del sistema	Componentes	Tiempo de estabilidad (meses)	Tensoactivos en agua (m/m%)	Tamaño de partícula d.nm	Potencial zeta (mV)	pdi
1S14	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (50:50 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	3	4.13	60.85±2.554	-49.7 ± 2.2	0.468
1F14	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (50:50 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	3	4.13	111.41±1.45 7	-47.1 ±1.4	0.407
1S24	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (50:50 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	5	4.31	120.86 ±9.539	-39.2±0.458	0.442
1F24	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (50:50 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	3	4.31	128.73± 28.489	-29.17 ±0.907	0.395



a) Sistemas sin fármaco (1S14 Y 1S24)



b) Sistemas con fármaco (1F14 y 1F24)

Figura 12. Diagrama del ternario 1.

Se observa en la Figura 12 las dos trayectorias que se siguieron para estos diagramas ternarios, en donde a) corresponde a los sistemas sin fármaco (1S14 y 1S24) y b) corresponde a los sistemas con fármaco (1F14 y 1F24).

La incorporación de rapamicina a los sistemas, provocó un aumento en el tamaño de partícula, debido a que la rapamicina tiene una masa molecular de alrededor de 914.187 g/mol, por lo que es probable que al quedar al interior de las estructuras nanométricas que conforman el sistema, promueve la reorganización de los fosfolípidos y tensoactivos para quedar embebida en el centro hidrofóbico (de acuerdo con la teoría basada en el trabajo de Juárez et al, 2016), provocando así un aumento de tamaño.

También se observó que al aumentar la cantidad de tensoactivo en los sistemas 1S24 Y 1F24 con respecto a los sistemas 1S14 y 1F14, como se aprecia en la tabla 3, aumentaba el tamaño de partícula, esto debido quizá a que mayor presencia de tensoactivo promueve la inserción de los monómeros de surfactante en las micelas, aumentando su tamaño.

De igual forma se observó un cambio de tamaño para los sistemas 1S24 Y 1F24, entre el sistema sin fármaco y con fármaco fue mucho menor probablemente

debido a que la cantidad de Rapamicina que se logró encapsular no fue muy grande.

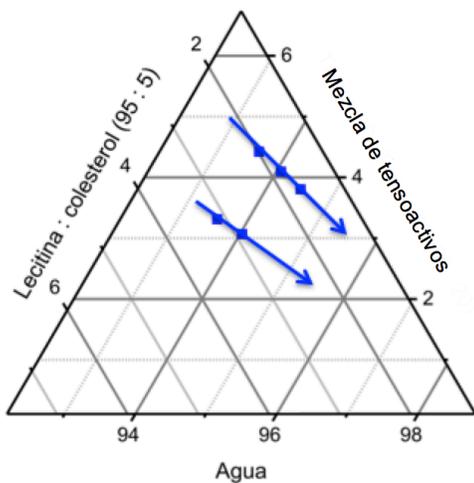
Los valores obtenidos del índice de polidispersión (pdi), que es la medida adimensional de la amplitud del tamaño de distribución calculado de análisis acumulativos, están en un rango de entre 0.3 y 0.4, lo que indica que la dispersión de los sistemas no es muy grande.

La tabla 4 muestra la composición de los sistemas de la Figura 13. comparando el promedio del tamaño de partícula y del potencial zeta, entre los sistemas homólogos. Los sistemas 2S23 y 2F23, tienen un mayor porcentaje de tensoactivos en el sistema de la misma mezcla de tensoactivos que el sistema 2S23, para los cuales se utilizó una mezcla de tensoactivos con un HLB de 16.36

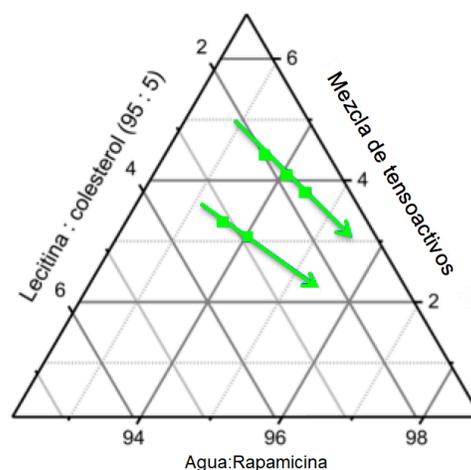
*Tabla 4. Composición tamaño de partícula, potencial zeta y tiempo de estabilidad de los sistemas del ternario 2 en suspensión.*

Nombre del sistema	Componentes	Tiempo de estabilidad (días)	Tensoactivos en agua (m/m%)	Tamaño de partícula d.nm	Potencial zeta (mV)	pdi
2S14	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (80:20 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	90	3.35	109.07 ±33.50	-38 ± 0.888	0.467
2F14	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (80:20 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	90	3.35	101.26 ±11.234	-38.75 ±3.579	0.388

2S23	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (80:20 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	18	4.61	267.16 ± 6.397	-34.5 ± 0.6928	0.456
2F23	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (80:20 % m/m) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	18	4.61	235.16 ± 5.314	-45.9 ± 1.216	0.431



a) Sistemas sin fármaco (2S14 Y 2S23)



b) Sistemas con fármaco (2F14 y 2F23)

Figura 13. Diagrama del ternario 2

Al aumentar el valor del HLB en 0.51 con respecto al ternario 1, se observó que a mayor cantidad de tensoactivo en agua, más aumento el tamaño de partícula del sistema, tal cual se observa en la Tabla 3. Para el sistema 2S23, el cual al tener un % de mezcla de tensoactivos en agua de 4.61 %, aumenta en 100 unidades su tamaño con respecto al sistema 2S14, esto se debe a que los ésteres de sorbitan etoxilados pueden construir diferentes tipos de estructuras nanométricas dependiendo de su concentración, pudiendo tener un comportamiento similar al de las micelas donde al incrementar la temperatura del

medio, se promueve la inserción de más monómeros de tensoactivo incrementándose su tamaño, sin embargo el aumento de tamaño por efecto del fármaco no es tan grande entre las dos trayectorias del ternario 2.

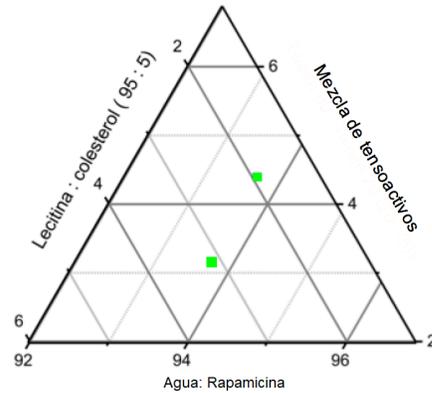
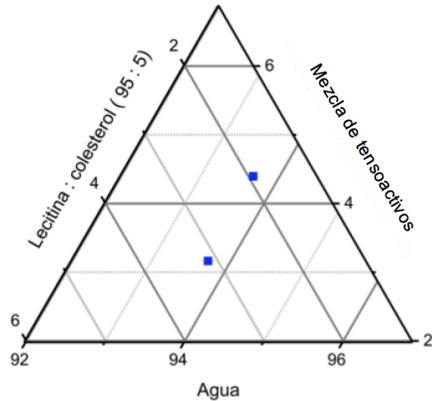
La tabla 5 corresponde el diagrama ternario de equilibrio de fases 3 (Figura 14), para el cual se utilizó una mezcla de tensoactivos con un HLB de 15.34; en donde se compara el promedio de las mediciones del tamaño de partícula y el potencial zeta entre los sistemas 3S13 y 3S23 junto con sus homólogos, de los cuales, los sistemas 3S23 y 3F23 tienen un mayor porcentaje de tensoactivos en el sistema de la misma mezcla de tensoactivos que los sistemas 3S13 y 3F13.

Tabla 5. Composición tamaño de partícula, potencial zeta y tiempo de estabilidad de los sistemas del ternario 3 en suspensión.

Nombre del sistema	Componentes	Tiempo de estabilidad (días)	Tensoactivos en agua (m/m%)	Tamaño de partícula d.nm	Potencial zeta (mV)	pdi
3S13	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (20:80) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	14	3.26	370.13 ±17.398	-46.2 ±2.73	0.432
3F13	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (20:80) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	14	3.26	502.83 ±16.771	-46.6 ±1.422	0.562
3S23	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (20:80) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	13	4.49	355.17 ±39.723	-18.8 ± 0.436	0.449
3F23	Mezcla de tensoactivos 1 y 2 (20:80) Lecitina-colesterol (95:5 % m/m)	13	4.49	349.87 ±2.113	-17.1 ±0.513	0.429

Ternario 3

Ternario 3



a) Sistemas sin fármaco (3S13 Y 3S23)

b) Sistemas con fármaco (3F13 y 3F23)

Figura 14. Diagrama del ternario 3.

En los ternarios de la Figura 14. cuyo valor de HLB es el menor de entre los tres pares de ternarios evaluados, se observó que el tamaño de partícula es significativamente mayor (véase Anexo 1) que, en los primeros dos pares de ternarios, sin embargo, es el que menor estabilidad presentó, puesto que al tener un tamaño de partícula mayor favorece la segregación de fases por sedimentación en el sistema y debido a esto se descartó el seguir trabajando con más trayectorias.

En general, se observó que la estabilidad de los sistemas fue mayor en aquellos con un tamaño de partícula menor a 150 nm y el potencial zeta era mejor en aquellos sistemas con una menor cantidad de tensoactivo en agua, ya que es indicativo de una mayor estabilidad coloidal.

Las estructuras nanométricas obtenidas, se ubican en un intervalo de tamaño de 1-1000 nm, lo que les confiere la capacidad de atravesar membranas biológicas.

En función de los tamaños determinados mediante DLS, las estructuras obtenidas se pueden clasificar como estructuras nanométricas.

#### 8.4.2 Potencial zeta

Se llevaron a cabo estudios de potencial zeta de los sistemas obtenidos en las distintas trayectorias de los ternarios, comparándolos con y sin fármaco (Figura 15 y 16); se observó que las estructuras nanométricas presentan un potencial negativo, por lo que las fuerzas repulsivas electrostáticas entre ellas, favorecen la estabilidad de la suspensión, ya que la repulsión mutua entre partículas adyacentes impiden la unión y por ende, la formación de aglomerados y su sedimentación<sup>1</sup>; lo cual coincide con lo observado, pues los sistemas tuvieron una estabilidad en suspensión de al menos tres meses como se muestra en las Tablas 3 y 4.

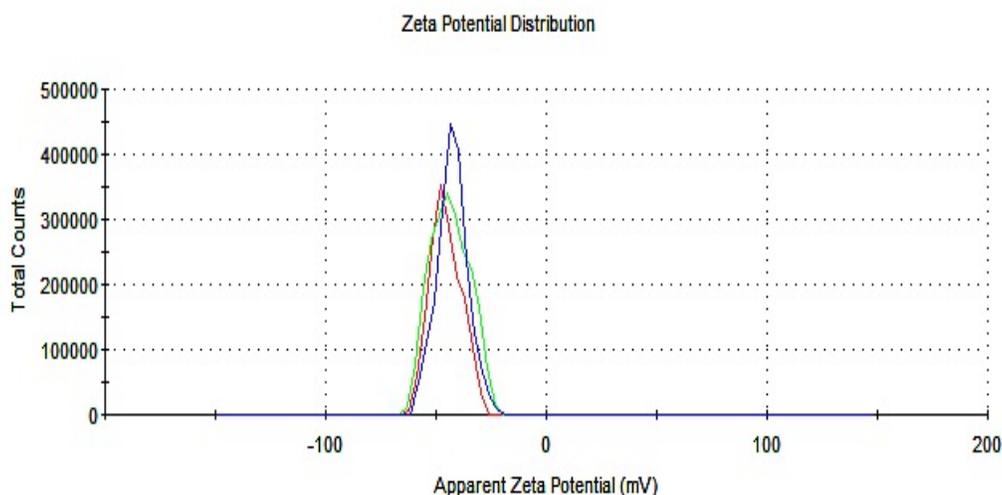


Figura 15. Distribución de potencial zeta del sistema 1S14.

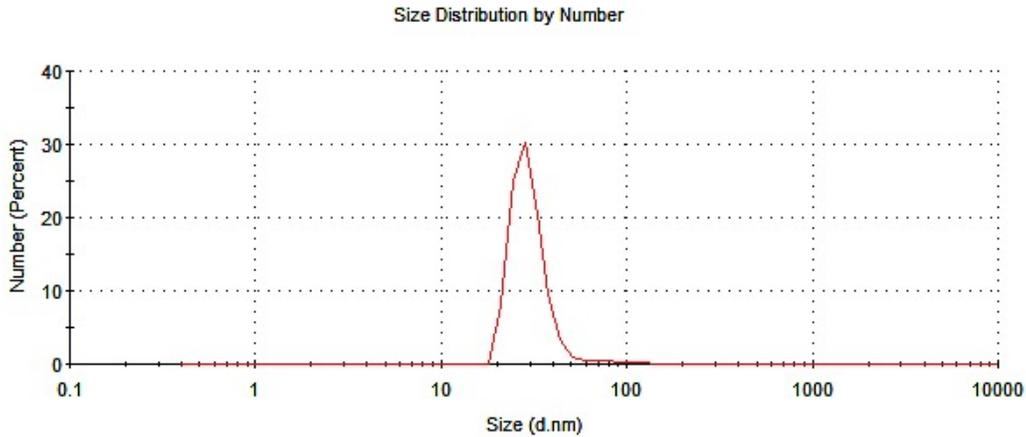


Figura 16. Distribución de potencial zeta del sistema 1F14.

El sistema 1F14 mostró una disminución en el potencial zeta, único sistema en presentar este fenómeno, ya que presentó un menor valor absoluto que su homólogo sin fármaco, como se puede observar en la Tabla 3, lo que indica que el fármaco afecta la carga superficial favoreciendo la estabilidad de las estructuras en el sistema, pues la presencia de los grupos hidroxilo y carbonilo le confieren al fármaco una carga negativa, si la carga del potencial zeta es negativa quiere decir que la superficie de las NP es de naturaleza aniónica, por lo que atraen cationes a la capa de Stern que a su vez atraen aniones como contraiones, obteniéndose un signo negativo.

En el caso del ternario 2, se observó que los valores de potencial zeta se mantuvieron similares, exceptuando el sistema 2F23 que aumentó al menos 10 unidades, pero no mejora su estabilidad con respecto al tiempo (véase Tabla 4).

Se observó que el ternario 3 al tener el menor valor de HLB entre los tres ternarios evaluados, presentó menores valores de potencial zeta (Tabla 5), debido a su gran tamaño, son los que menor estabilidad con respecto al tiempo presentan.

### 8.4.3 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Con el fin de inferir sobre la composición de las estructuras nanométricas, se realizaron estudios de FTIR en donde se compararon los sistemas obtenidos, tanto cargados con rapamicina como vacíos, junto con los componentes sólidos por separado, como se observa en la Figura 17.

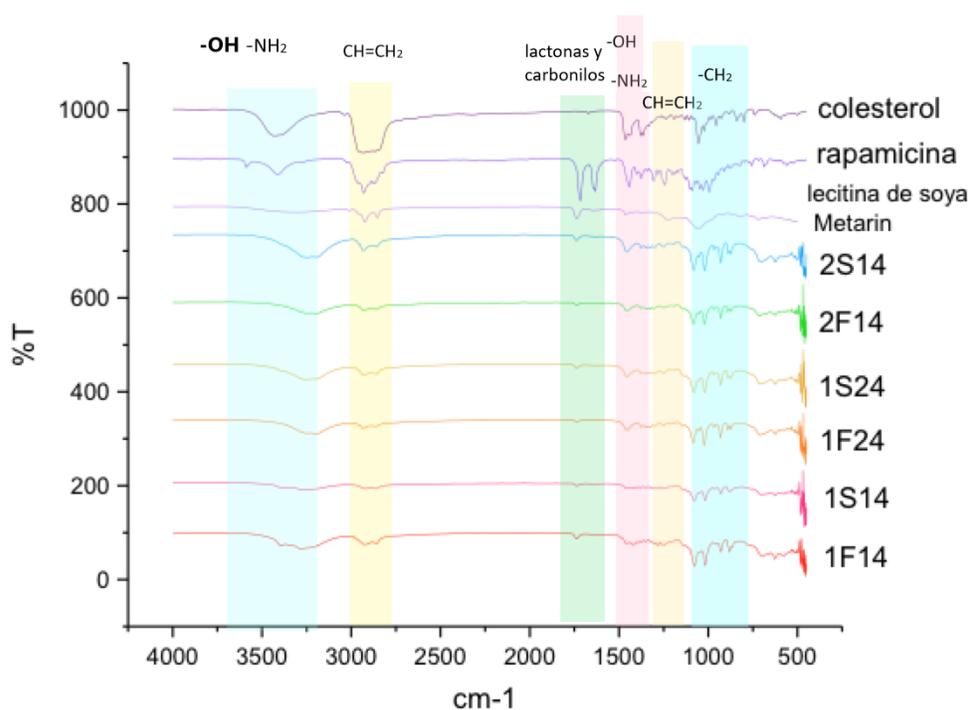


Figura 17. Espectogramas obtenidos por ATR FTIR de las materias primas y los sistemas obtenidos.

Todos los sistemas presentan las bandas características para -OH y -NH<sub>2</sub>, que son características tanto del colesterol como de la rapamicina. Sin embargo, entre los sistemas sin fármaco y aquellos con fármaco, no se presentó variación significativa en la intensidad de estas bandas, con respecto a la intensidad de la banda de -CH=CH<sub>2</sub>, que también está presente tanto en la Rapamicina, la lecitina y el colesterol; esta sí muestra una variación en la intensidad. Tomando en cuenta

solo estas tres bandas, no es posible hacer una diferencia entre los sistemas que tienen la rapamicina y los que no.

Los sistemas con fármaco presentan sólo una banda de las dos presentes en la zona de lactonas y carbonilos, propias de la Rapamicina, por lo que los sistemas cumplen con la identidad de cada uno de los componentes. Se observó que los sistemas sin fármaco presentan una banda más intensa en la zona de los  $-CH_2$  que aquellos sistemas con fármaco, sin embargo no se aprecia un cambio significativo en los espectros de los sistemas que contienen el fármaco y los que no, por lo que podría tratarse de estructuras similares entre sí.

#### **8.4.4 Determinación de la topografía superficial mediante Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

De los sistemas estudiados, en el sistema 1F14 se observó una superficie sólida y rugosa, con el centro más oscuro que el resto de la misma, también se observan al menos tres halos oscuros y tres claros, lo que nos indica que posiblemente son dos zonas de composición diferentes.

Debido a la forma de preparación de las muestras y debido a que los sistemas no son rígidos, puede observarse en la Figura 18 "B" que éstos se fusionan, sin embargo, se reorganizan para seguir manteniendo la estructura original que presenta los halos previamente mencionados.

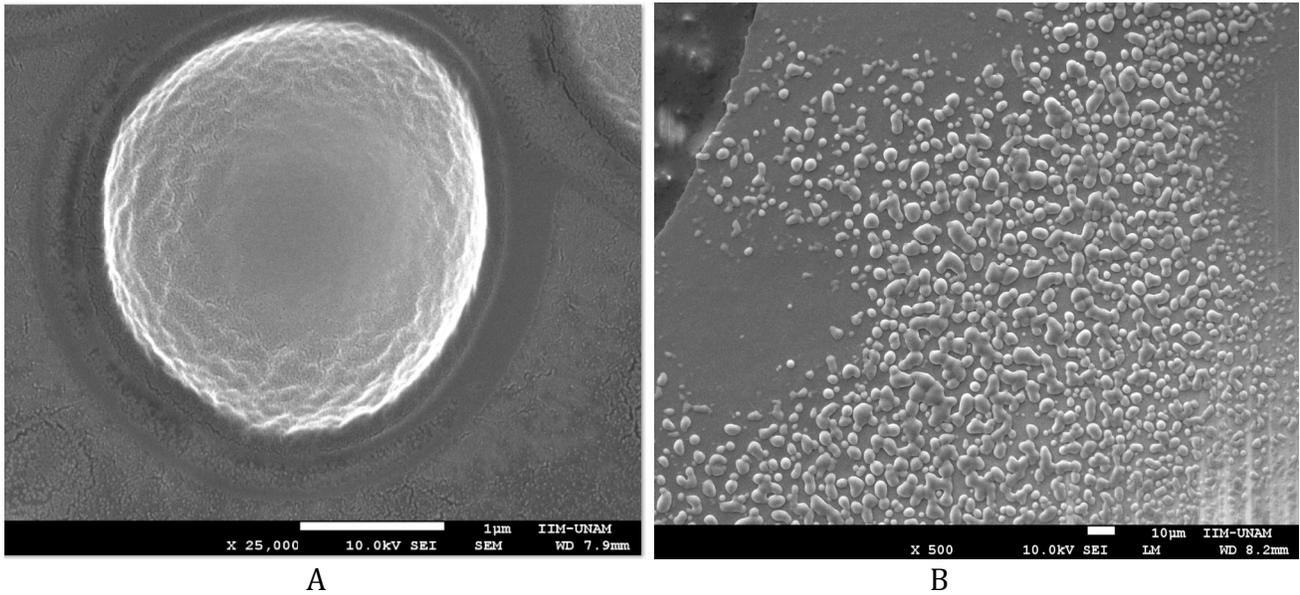
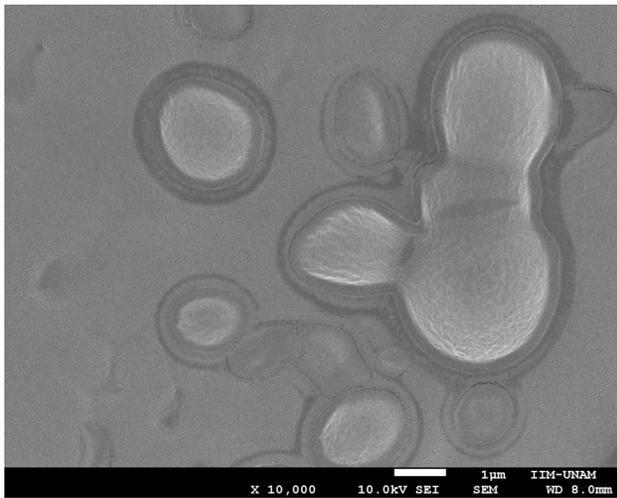


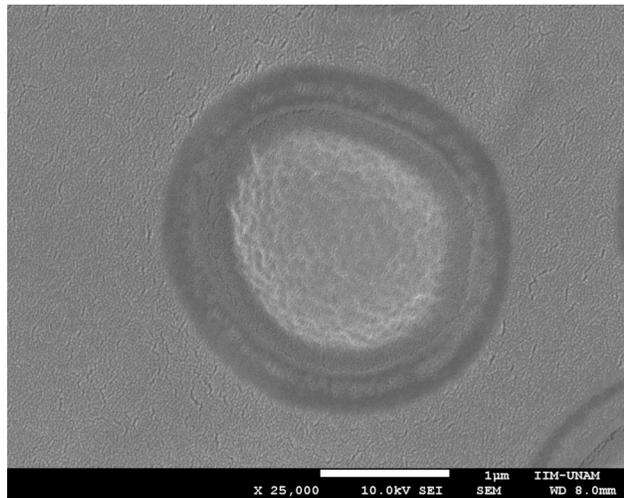
Figura 18. Microscopías de SEM a 10.0 kV correspondientes al sistema 1F14.

“A” corresponde a la vista de una estructura de las que componen dicha población con un diámetro de  $3.583 \mu\text{m}$  y del cual  $0.460 \mu\text{m}$  corresponde a los halos que se observan, mientras que “B” corresponde a una población de las estructuras obtenidas del sistema 1F14.

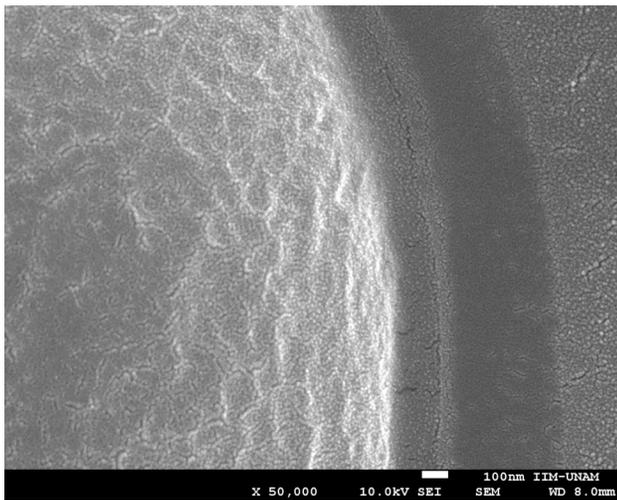
El sistema 1S14 que se observa en la Figura 19, tiene superficie sólida y rugosa, también se observan al menos dos halos oscuros y uno claros, lo que nos indica que posiblemente son dos zonas de composición diferentes; la parte exterior tiene la apariencia de una bicapa. Como se puede observar en la Figura 19 A, el fenómeno de fusión está presente dentro del sistema pero éste no afecta estructuralmente debido al re-arreglo que presenta.



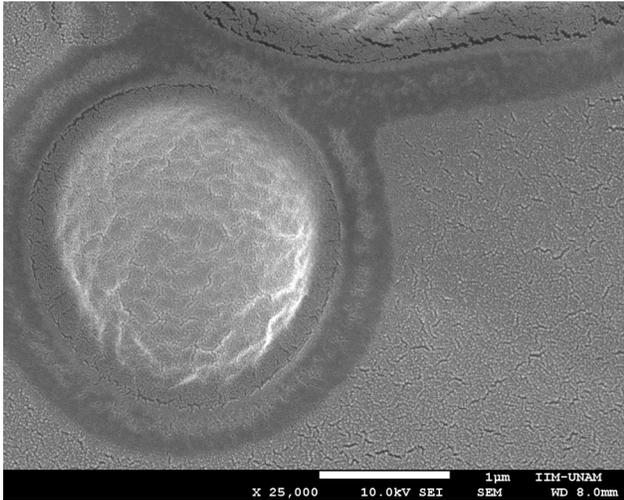
A



B



C



D

Figura 19. Microscopías de SEM a 10.0 kV correspondientes al sistema 1S14

“A” corresponde a una población de las estructuras obtenidas del sistema 1S14 fusionándose, “B” corresponde a la vista de una estructura de las que componen dicha población, al igual que “D”, mientras que “C” corresponde a la vista a x 50.000 de los halos y la superficie de una estructura del sistema 1S14 con un diámetro de 3.583 μm y del cual 0.460 μm corresponde a los halos que se observan.

En el análisis del sistema 1S24 (Figura 20) se observó que no sólo presentaba un tamaño mayor con respecto al sistema 1F24 (Figura 21) sino también una estructura menos sólida y de apariencia más lisa, de igual manera el centro de las estructuras es más oscuro que los bordes al compararla con las estructuras del sistema 1F24.

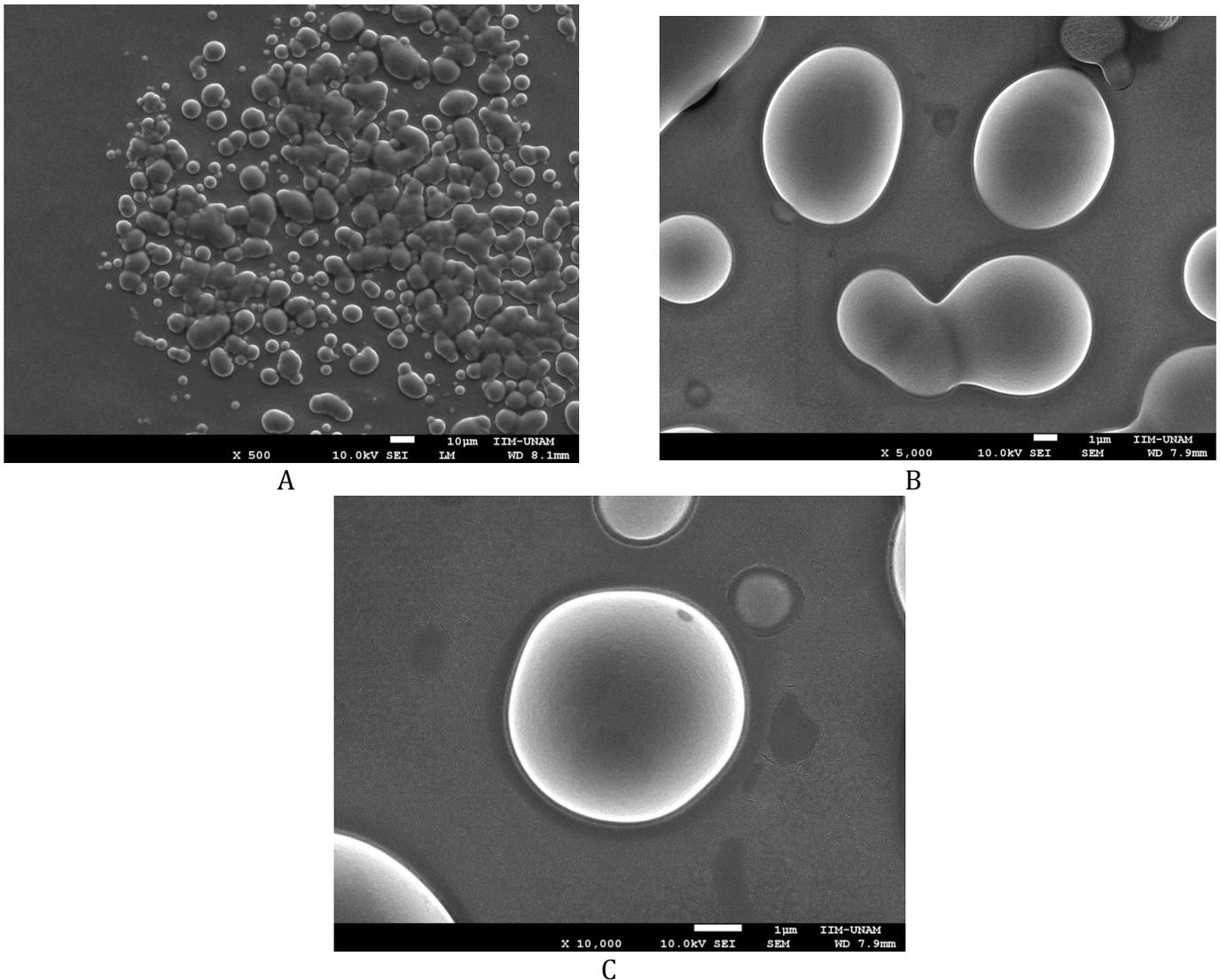
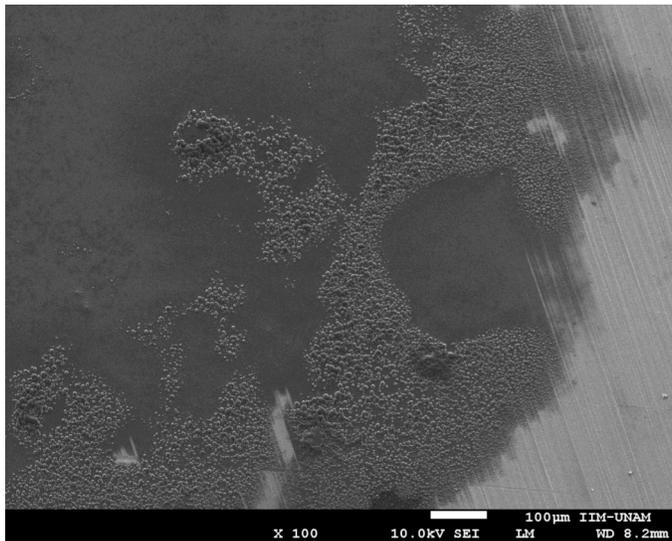
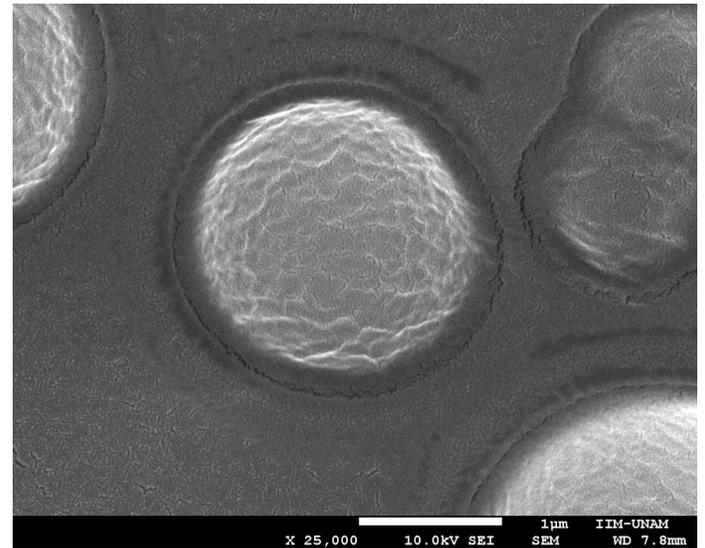


Figura 20. Microscopías de SEM a 10.0kV correspondientes al sistema 1S24  
“A” corresponde a una población de las estructuras obtenidas del sistema 1S24,  
“B” corresponde a la vista de una estructuras de las que componen dicha

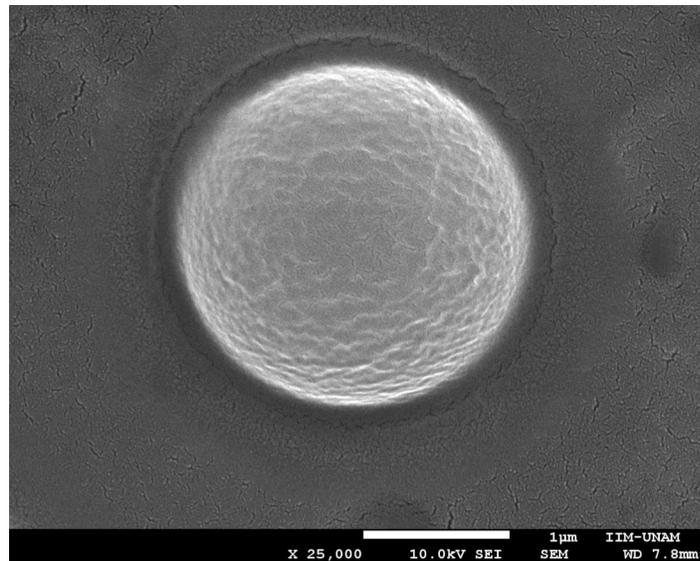
población, al igual que “C” con un diámetro de 5.867  $\mu\text{m}$  y del cual 0.352  $\mu\text{m}$  corresponde a los halos que se observan.



A



B



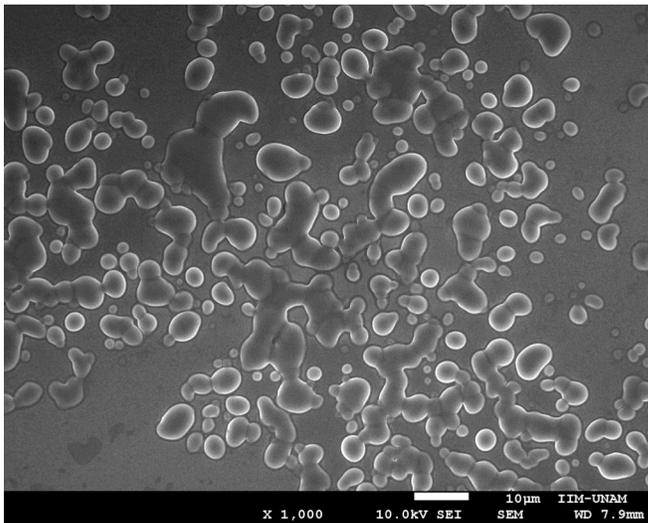
C

Figura 21. Microscopías de SEM a 10.0kV correspondientes al sistema 1F24  
“A” corresponde a una población de las estructuras obtenidas del sistema 1F24 en el borde de la placa de cobre, “B” corresponde a la vista de una estructuras de las

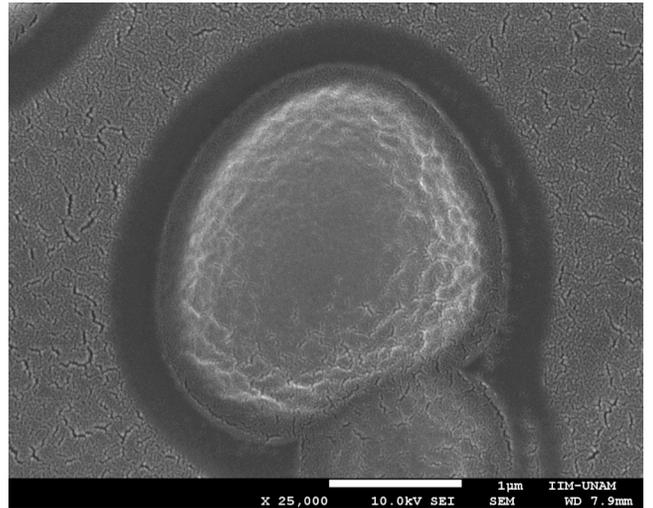
que componen dicha población, al igual que “C” con un diámetro de 2.707  $\mu\text{m}$  y del cual 0.132  $\mu\text{m}$  corresponde a los halos que se observan.

Entre los sistema 2F14 (Figura 22) y 2S14 (Figura 23) se observó un cambio evidente, ya que el que no tiene Rapamicina es más pequeño, más rugoso y la tonalidad entre los halos es diferente, puesto que son más oscuros que aquellos en donde el sistema no tiene fármaco.

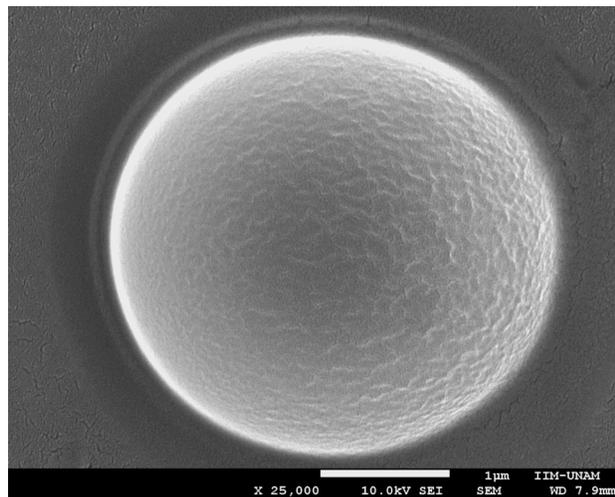
Mediante la técnica de SEM fue posible comparar las estructuras obtenidas que se forman a partir de los diferentes ternarios y comparar su morfología, así como comparar si hay cambios debidos a la presencia de rapamicina en los sistemas o no, utilizando la misma técnica de preparación.



A



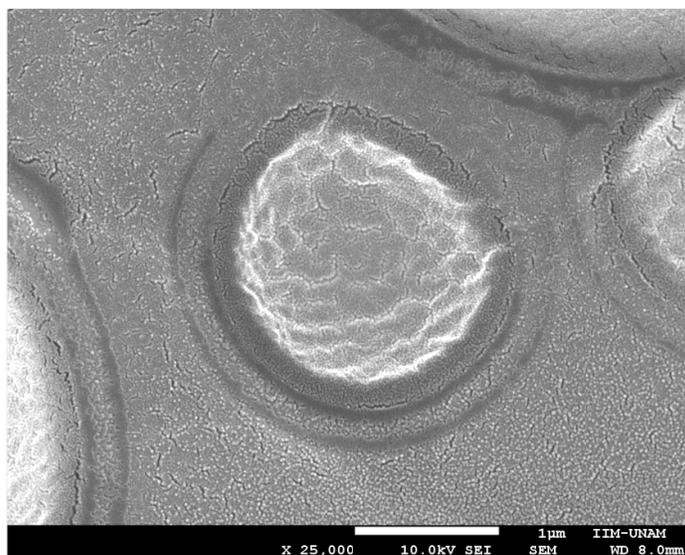
B



C

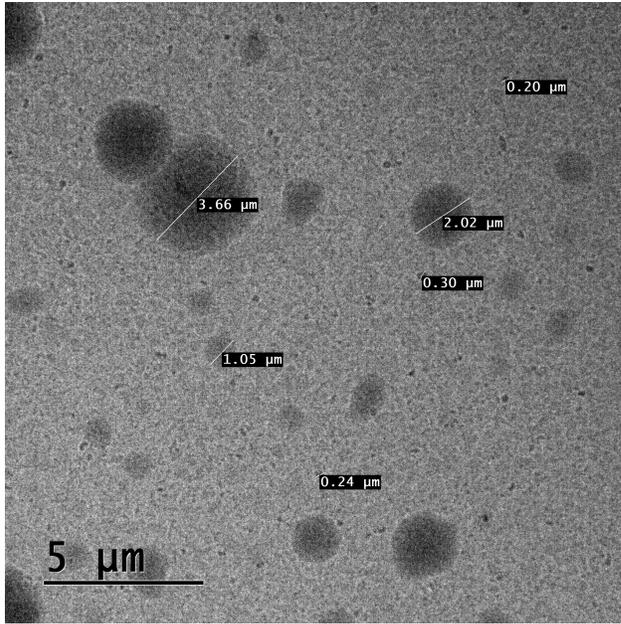
*Figura 22. Microscopías de SEM a 10.0kV correspondientes al sistema 2F14*

*“A” corresponde a una población de las estructuras obtenidas del sistema 2F14, “B” corresponde a la vista de una estructuras de las que componen dicha población, al igual que “C” con un diámetro de 3.370 μm y del cual 0.344 μm corresponde a los halos que se observan.*

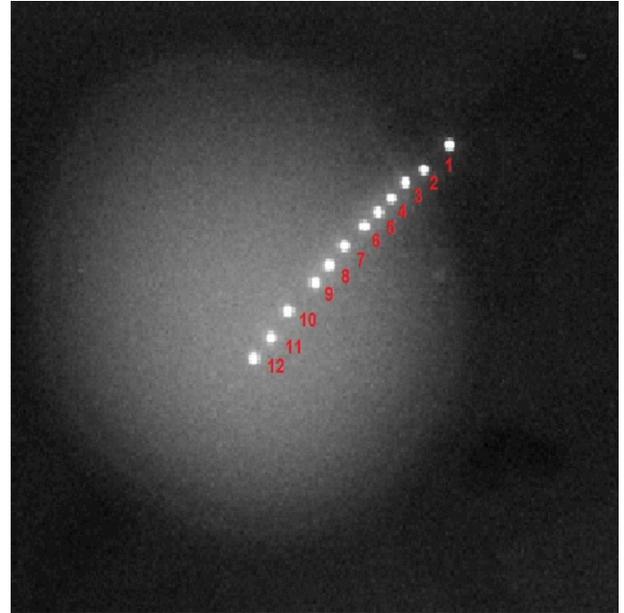


*Figura 23. Microscopía de SEM a 10.0 kV correspondiente al sistema 2S14, la estructura tiene un diámetro de 2.7  $\mu\text{m}$  y del cual 0.219  $\mu\text{m}$  corresponde a los halos que se observan.*

Se llevó a cabo un análisis elemental del sistema 1F14 mediante la técnica de TEM y se obtuvieron los porcentajes de C, N, O y P que se encuentran en las NP como se muestra en la tabla 6 y se encontró que la diferencia en los porcentajes de composición no es muy grande, lo que sugiere que la estructura no tiene zonas acuosas, la mayor cantidad de Nitrógeno se encuentra en el centro del sistema, este elemento solo se encuentra en la fosfatidilcolina debido al grupo amino que posee (Figura 25), lo que sugiere que el centro de la estructura es rico en fosfolípidos, más no exclusivo en ellos; si tomamos en cuenta la geometría y curvatura del núcleo, el cual demanda una curvatura positiva que se favorece con la presencia de tensoactivos de geometría cónica (Figura 4 inciso a), debe estar compuesto de una mezcla tensoactivo-fosfolípido.



A



B

Figura 24. Imagen de TEM del sistema 1F14. Donde “A” corresponde a la imagen de una población de NP, mientras que “B” corresponde al análisis elemental de una de las NP que conforman al sistema, los puntos blancos corresponden al lugar donde se hizo incidir el haz de electrones, cuyo orden va de afuera hacia adentro.

Tabla 6. Porcentaje de los elementos encontrados durante el análisis elemental del sistema 1F14 ordenados desde la parte externa de las NP hacia adentro de la misma, siguiendo la numeración de la figura 25

No	C (%)	N (%)	O (%)	P (%)
1	61.07	0	37.86	1.07
2	64.09	0.25	34.79	0.86
3	62.49	0	36.73	0.78
4	64.11	0	35.11	0.79
5	65.84	0	33.56	0.60
6	65.41	0	34.01	0.58
7	64.58	0	34.65	0.77
8	67.99	0	31.30	0.71
9	64.49	0	34.91	0.60
10	68.75	0	30.58	0.67
11	67.15	0.45	37.86	1.07
12	66.21	0	33.07	0.72

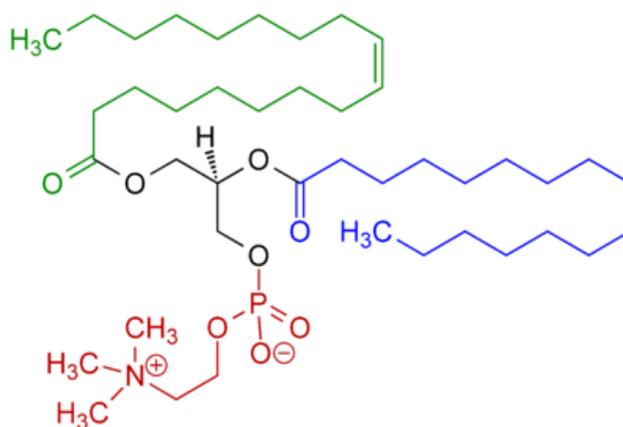


Figura 25. Estructura de la fosfatidilcolina. El componente principal de la lecitina utilizada es la fosfatidilcolina, sin embargo, no es un fosfolípido, también se encuentran en menor proporción, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol.

#### 8.4.5 Microscopia confocal

El uso de rodamina y fluoresceína como marcadores permitió la observación de las estructuras presentes en el sistema, ya que la rodamina es de naturaleza hidrofóbica y la fluoresceína de naturaleza hidrofílica, por lo que los componentes lipídicos se observaron teñidos de rojo mientras que los componentes hidrofílicos se observaron teñidos de verde.

En el sistema 1F14 (Figura 26) se observaron estructuras cuyo centro es de naturaleza hidrofóbica, mientras que la parte externa es de naturaleza hidrofílica, de un diámetro de (No.1, Fig. 26) 9.762  $\mu\text{m}$  del cual 5.483  $\mu\text{m}$  corresponden al centro hidrofóbico de la estructura y de (No.2, Fig. 26) 8.235  $\mu\text{m}$  del cual 5.224  $\mu\text{m}$  corresponden al centro lipídico lo cual corresponde a lo observado mediante el análisis elemental por TEM, por otro lado, en su contraparte (sistema 1S14) debido a la movilidad que presentaban las estructuras nanométricas durante su observación al microscopio no fue posible fotografiar estructuras sin fármaco con el núcleo rojo, por lo que solo se obtuvieron imágenes de estructuras de naturaleza completamente hidrofílica (Juárez et al habían reportado fenómeno similar) con diámetros de (No. 1, Fig. 26) 43.28  $\mu\text{m}$ , (No. 2, Fig. 26) 32.175  $\mu\text{m}$  y (No. 3, Fig. 26) 18.43  $\mu\text{m}$ .

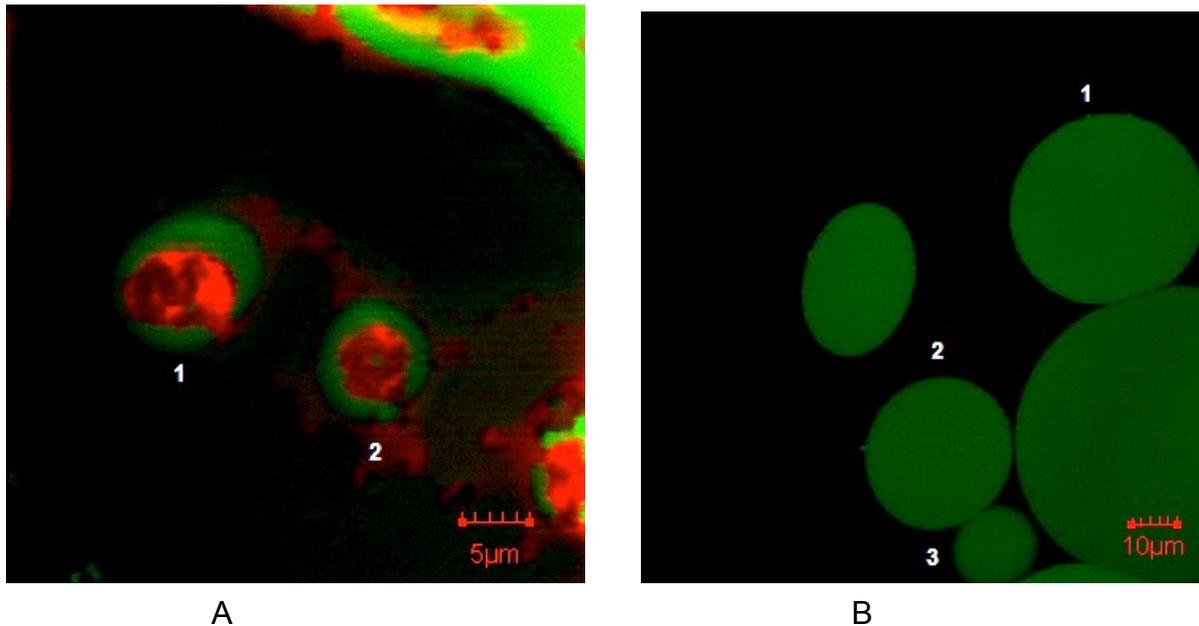


Figura 26. Microscopia confocal de los sistemas 1F14 y 1S14, donde “A” corresponde al primero, mientras que “B” al segundo, ambas teñidas con rodamina y fluoresceína.

En el sistema 2F14 (Figura 27) se observaron estructuras de un diámetro promedio de  $12.702 \mu\text{m} \pm 3.234 \mu\text{m}$ , de naturaleza hidrofílica puesto que la coloración que presentaron fue completamente verde, lo que sugiere que en este sistema hay presencia de los fosfolípidos dentro del sistema, mientras que en el sistema 2S14 en el cual solamente se utilizó rodamina como indicador, se observó una estructura de naturaleza multicapa, donde hay al menos 4 capas de naturaleza hidrofóbica, mientras que las zonas no teñidas corresponderían a zonas hidrofílicas correspondientes a los tensoactivos.

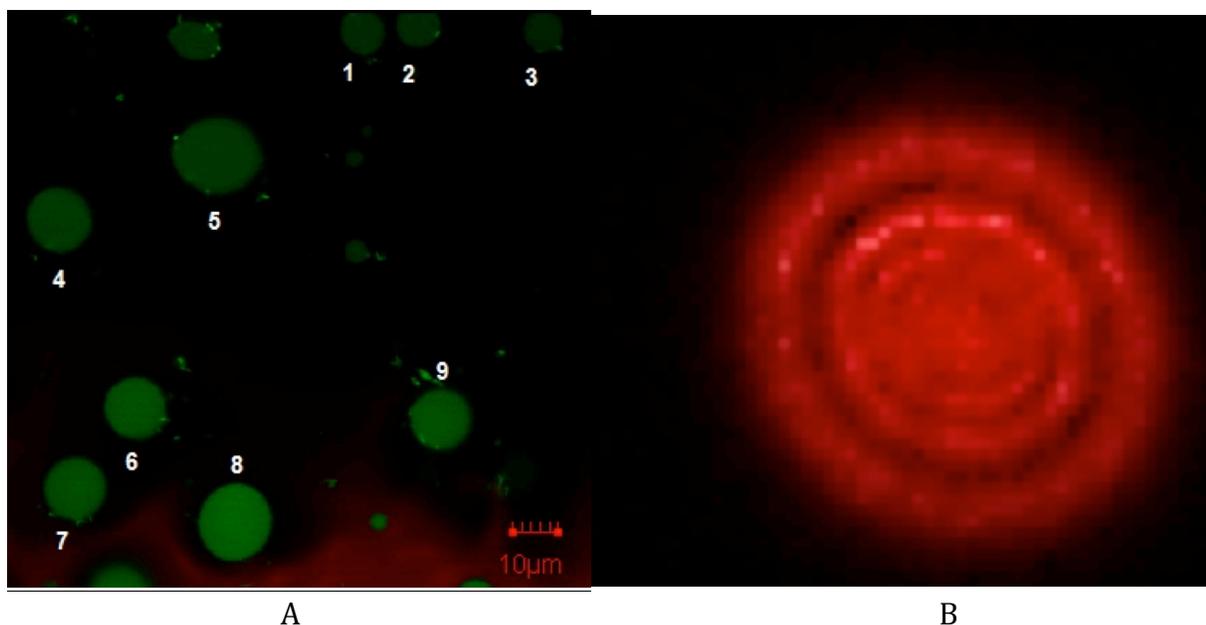


Figura 27. Microscopia confocal donde “A” corresponde al sistema 2F14 teñido con rodamina y fluoresceína, mientras que “B” corresponde a una estructura del sistema 2S14 teñido con rodamina.

En el sistema 1S24 se observaron estructuras con un diámetro promedio de  $11.975 \mu\text{m} \pm 3.954 \mu\text{m}$  las cuales son esféricas y tienen una apariencia porosa a diferencia de los demás sistemas no se observa la presencia de halos. Por otra parte en el sistema 1F24 también se observaron estructuras con un diámetro promedio de  $11.292 \mu\text{m} \pm 3.625 \mu\text{m}$  en su mayoría las estructuras son como las encontradas en el sistema 1S24, esféricas y de apariencia porosa, sin embargo también se observó la presencia de estructuras con un halo hidrófobo en el exterior posiblemente una bicapa, un halo sin teñir por lo que sería una zona hidrofílica y una estructura esférica de naturaleza lipídica en el centro.

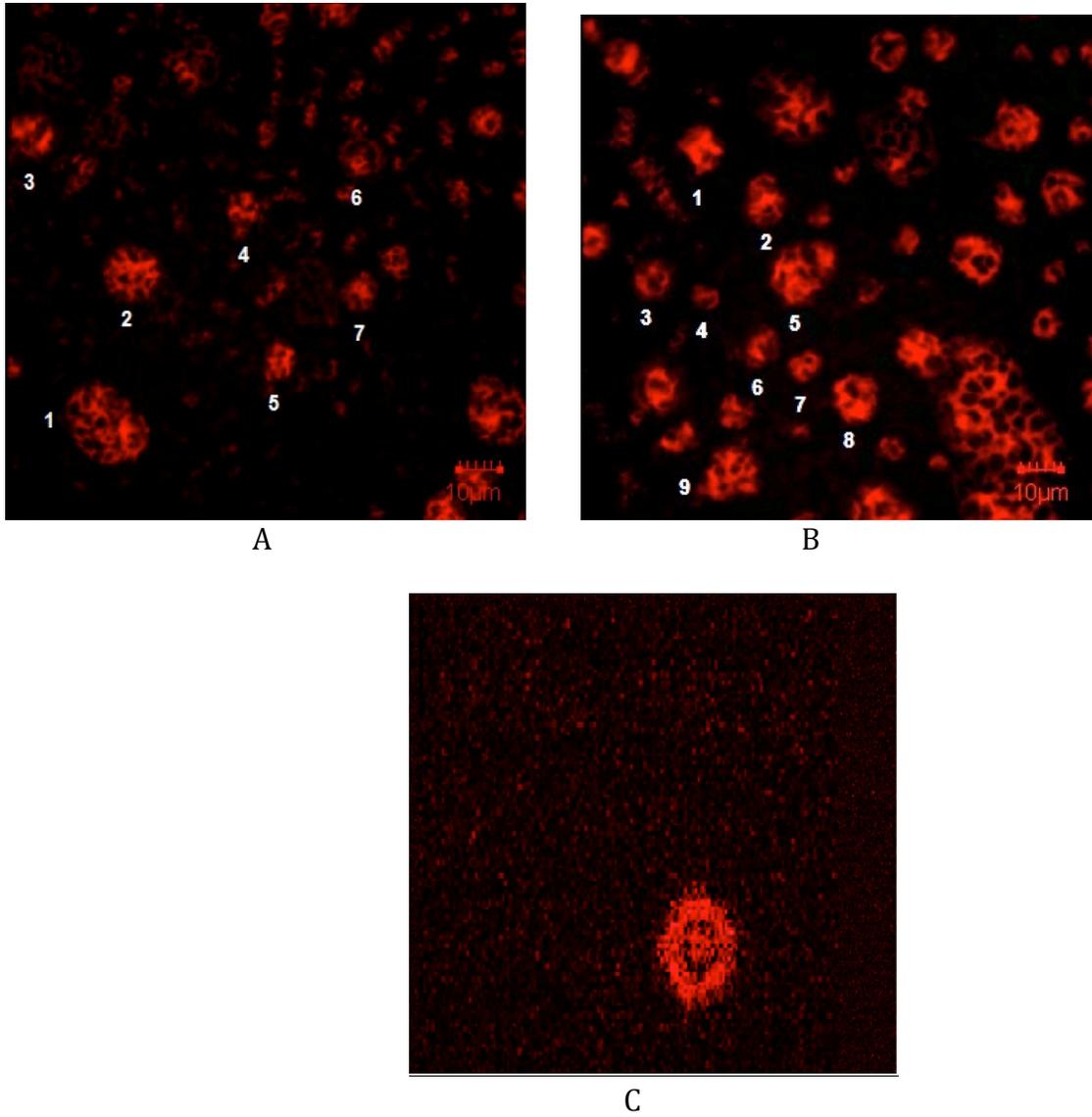


Figura 28. Microscopia confocal donde “A” corresponde a una estructura del sistema 1S24 mientras que “B” corresponde al sistema 1F24 teñidos con rodamina y fluoresceína, “C” corresponde al sistema 1F24 teñido con rodamina.

Es posible que las estructuras esféricas que presentan os sistemas se deba a la naturaleza anfipática tanto de los tensoactivos como de los fosfolípidos, se autoensamblan al dispersarse en medios acuosos, asociándose los fragmentos hidrofóbicos de las moléculas con la finalidad de evitar el ambiente acuoso y exponiendo los fragmentos hidrofílicos.<sup>ii</sup>

Lo cual es favorable por que al tener en la superficie polímeros hidrófilos aumenta el tiempo de permanencia en circulación sanguínea como se ha demostrado en otros sistemas, por lo que es altamente probable que se observe también este fenómeno en los Subag, puesto tienen una superficie rica en componentes hidrofílicos, estabilizando la superficie en medios acuosas, previniendo la adsorción de proteínas como las inmunoglobulinas y la adhesión celular, por lo que se incrementaría el tiempo de permanencia del sistema dentro del organismo.

#### 8.4.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación

La determinación de la eficiencia de encapsulación es un parámetro importante debido a que nos ayuda a calcular la rapidez y duración de la liberación del fármaco; para esto, se realizó una curva de calibración de seis concentraciones diferentes de rapamicina en hexano por triplicado (Figura 29). Siguiendo la metodología descrita en la sección 7.3.8 para las muestras, el porcentaje de encapsulación utilizando la ecuación 3:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{Fármaco inicial}}{\text{Fármaco encapsulado}} \times 100 \quad (3)$$

En la tabla 7. Se presenta el % de encapsulación que se obtuvo en cada uno de los sistemas.

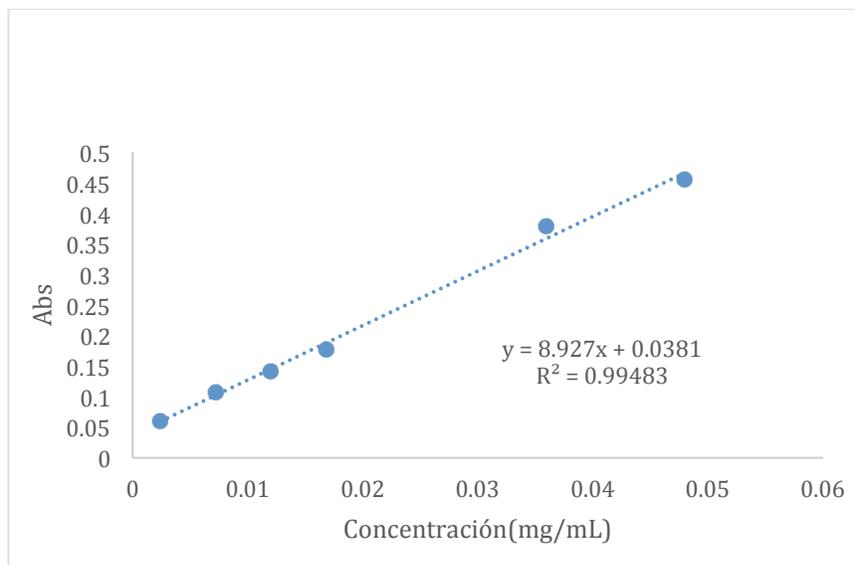


Figura 29. Curva de calibración de rapamicina en hexano

Tabla 7. Porcentaje de encapsulación correspondiente a cada sistema

Sistema	% de encapsulación
1F14	63.07 ± 0.2562%
1F24	21.31 ± 0.102%
2F14	28.32± 0.093 %

Solamente para el sistema 1F14 se obtuvo un % de encapsulación mayor al 50%, esto puede deberse a posibles pérdidas durante el proceso de extracción o incluso se puede deber a que las condiciones de fabricación no fueron las óptimas para asegurar una mayor eficiencia, además de que las estructuras correspondientes a cada sistema, si bien son similares en cuanto a composición, presentan diferencias estructurales que les otorgan propiedades diferentes.

#### 8.4.7 Estudios de liberación in vitro

Se observó en el sistema 1F14 (Figura 30), que la liberación del fármaco no ocurre hasta pasadas las 24 horas por lo que la velocidad de liberación es muy lenta, obteniéndose para el máximo tiempo evaluado de 35 horas, un porcentaje de liberación de apenas el 13.73%, por lo que se puede clasificar como un sistema de liberación prolongada, para el análisis de los datos obtenidos durante la liberación del fármaco (% liberado vs tiempo), se probaron varios modelos de disolución con el software DDSolver y se encontró que el mejor ajuste fue dado por los siguientes modelos mostrados en la Tabla 8. Todas las muestras de liberación fueron leídas a 293.56 nm.

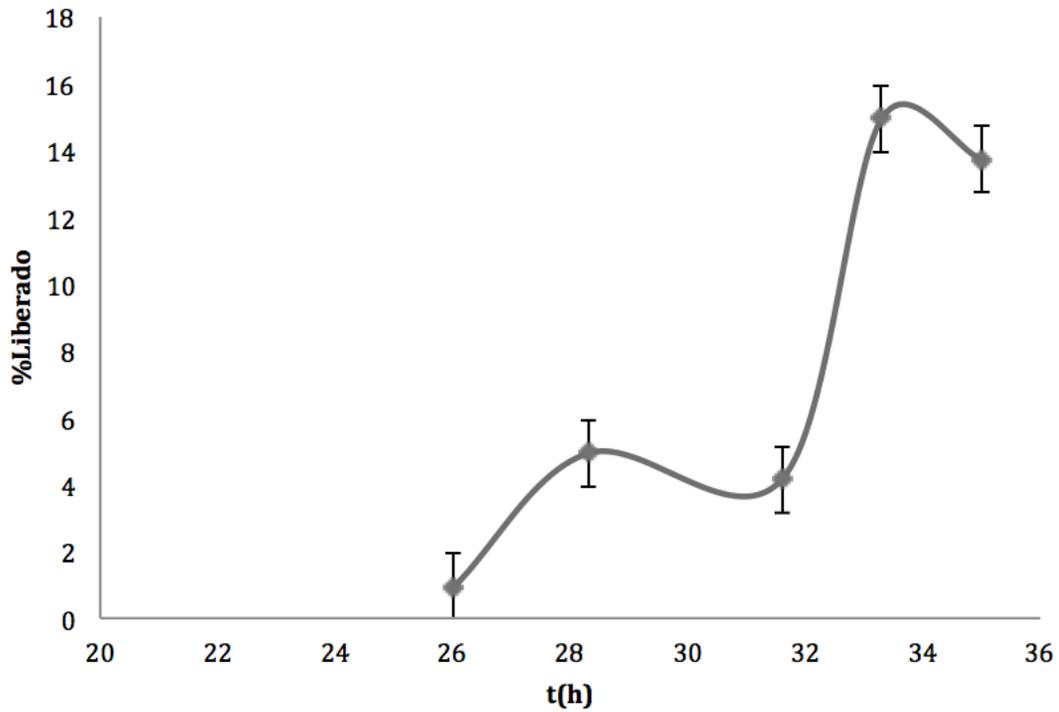


Figura 30. Perfil de liberación de rapamicina del sistema 1F14.

Al terminar el muestreo, se tomó el contenido de la membrana de diálisis y siguiendo el mismo tratamiento descrito en la sección 7.3.8 se cuantificó la cantidad de fármaco remanente dentro de la membrana y se encontró que el 85.27% aún se encontraba dentro de la misma, por lo que prolongar el tiempo de muestreo daría mayores datos acerca del comportamiento del sistema.

Tabla 8. Comparación entre el ajuste de modelos de los datos obtenidos para el sistema 1F14.

Modelo	No. de parámetros	Fmax	R2 ajustada	AIC	MSC
Orden cero con Tlag	5	NA	0.9104	14.1410	1.8999
Primer orden con Tlag	5	NA	0.9135	13.9635	1.9354
Higuchi con F0	5	NA	0.9146	13.8972	1.9486
Hixson Crowell con Tlag	5	NA	0.9666	14.0201	0.19241
Makoid Banakar	5	NA	0.9349	12.5175	2.2246
Weibull	5	14.800	0.9412	12.0053	2.3270

Nota: MSC se refiere al Criterio de selección del modelo, AIC al criterio de Akaike, R2 al coeficiente de determinación ajustado y el No. de parámetros se refiere a los parámetros utilizados para caracterizar la curva del perfil de liberación.

El modelo con los valores de R<sup>2</sup> más cercano a 0.99, el AIC menor y el de MSC mayor, fue el modelo de Hixson Crowll con Tlag (ecuación 4), dicho modelo asume que la liberación de fármaco está limitada por la velocidad de disolución de las partículas del fármaco y no por difusión y generalmente ocurre en matrices poliméricas<sup>iii</sup>.

$$F = 100 \cdot \left\{ 1 - [1 - k_{HC} \cdot (t - T_{lag})]^3 \right\} k_{HC}, T_{lag} \quad (4)$$

Al tomar en cuenta los resultados obtenidos en las imágenes de SEM y microscopia confocal, donde se observa una capa de un grosor considerable, es de esperarse que ésta actué como una barrera de regulación de la salida del fármaco hacia el medio.

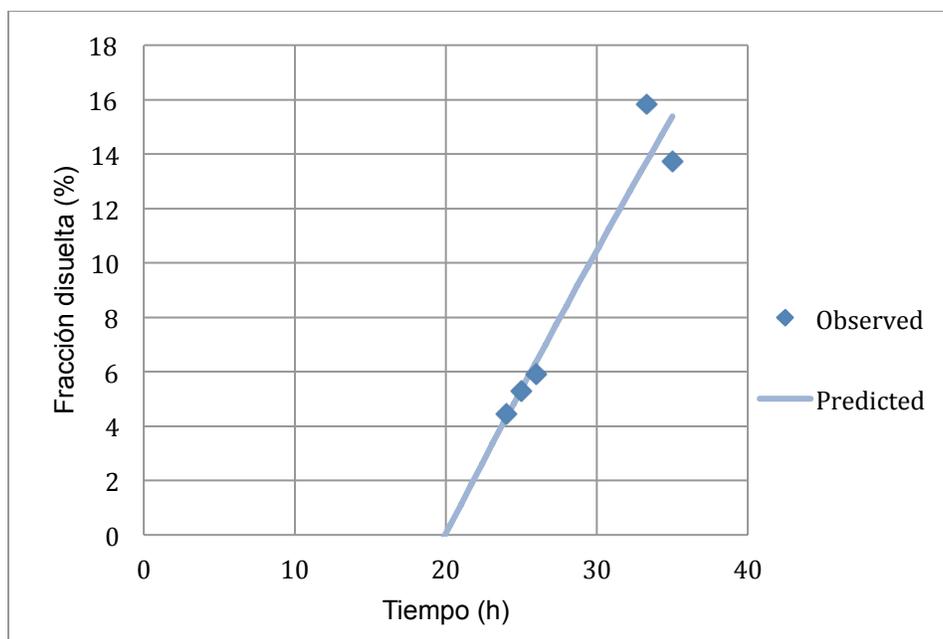


Figura 31. Ajuste del perfil de liberación del sistema 1F14 al modelo de Hixson Crowll con Tlag.

El perfil de liberación obtenido para el sistema 1F24 se muestra en la Figura 32, de igual manera, se probaron varios modelos de disolución con el software DDSolver y se encontró que el mejor ajuste fue dado por los siguientes modelos mostrados en la Tabla 9.

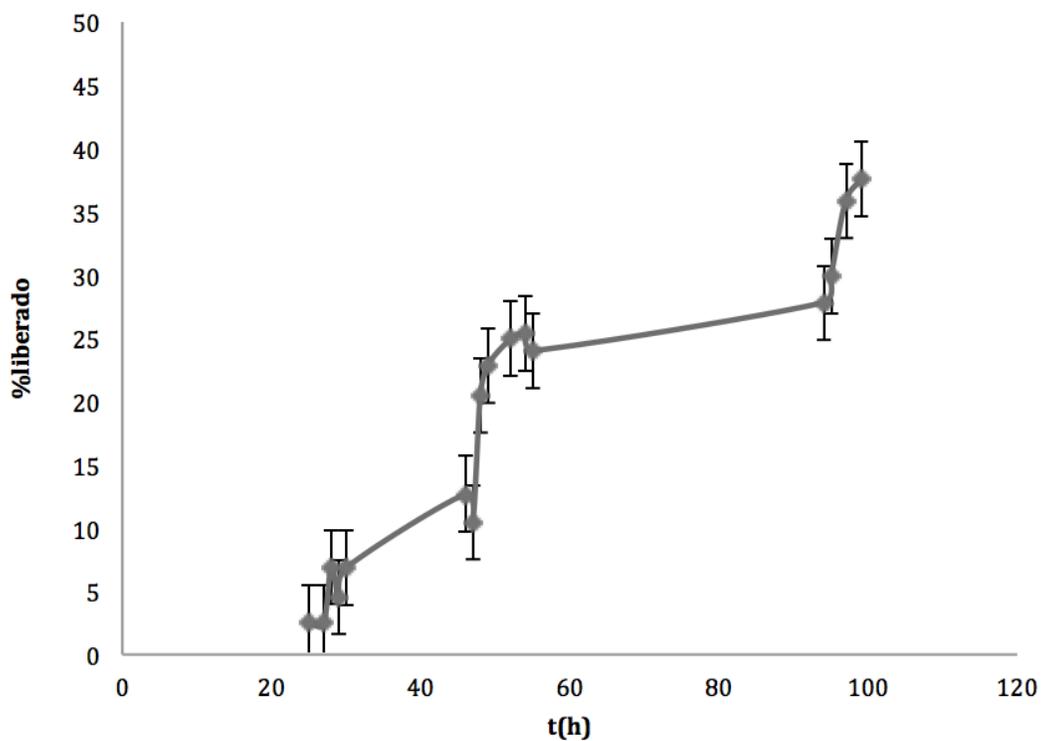


Figura 32. Perfil de liberación de rapamicina del sistema 1F24.

Tabla 9. Comparación entre el ajuste de modelos de los datos obtenidos para el sistema 1F24.

Modelo	No. Parámetros	Fmax	R2 ajustada	AIC	MSC
Primer orden con Tlag	19	NA	0.8922	120.7969	2.0744
Korsmeyer Peppas con Tlag	19	NA	0.9016	119.9119	2.1210
Korsmeyer Peppas con F0	19	NA	0.9083	118.5842	2.1908
Makoid Banakar	19	NA	0.9236	115.0965	2.3744
Cuadrático con Tlag	19	NA	0.9173	116.6183	2.2943
Weibull	19	45.376	0.9233	115.1793	2.3701

El modelo con mejor linearidad, el AIC menor y el de MSC mayor, fue el modelo de Makoid Banakar, sin embargo al ser un modelo empírico como el de Weibull, no tienen fundamento cinético, son descriptivos y no permiten la obtención de inferencias sobre las propiedades de la cinética de disolución del fármaco<sup>liii</sup>, por lo que se escogió el modelo Cuadrático con Tlag (ecuación 5), en este modelo los parámetros indican que Tlag es el tiempo de retraso antes de la liberación del fármaco, que en este caso tiene un valor de 18.901, k1 es la constante en el modelo cuadrático que indica la contribución relativa de la liberación de fármaco dependiente de t<sup>2</sup>, que en este caso tiene un valor de 0.041; k2 es la constante en el modelo cuadrático que indica la contribución relativa de la liberación de fármaco dependiente de t que en este caso tiene un valor de 0.011.<sup>liv</sup>

$$F = 100 \cdot \left[ k_1 \cdot (t - T_{lag})^2 + k_2 \cdot (t - T_{lag}) \right] \quad k_1, k_2, T_{lag} \quad (5)$$

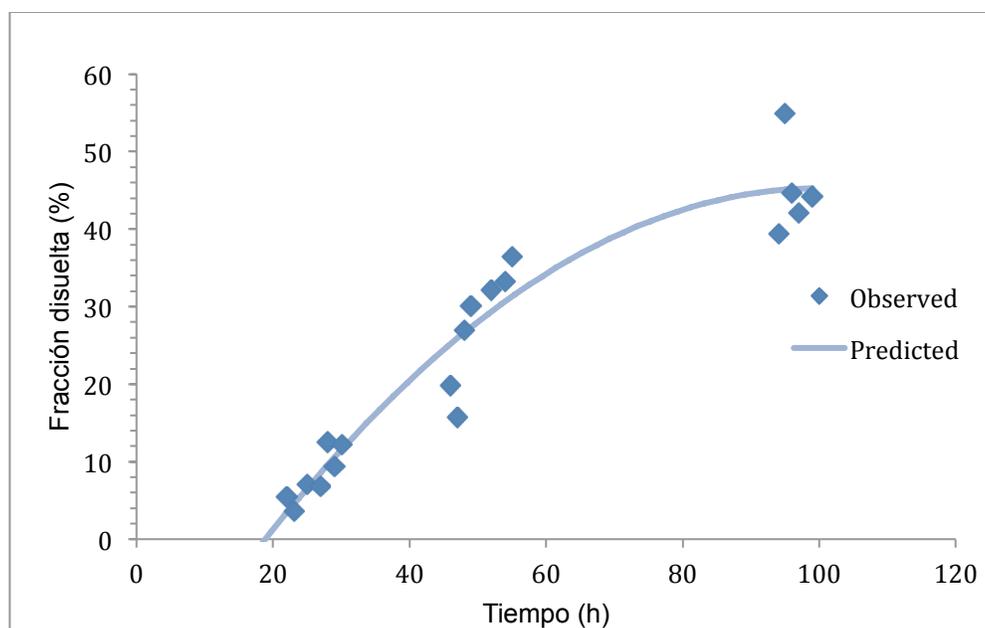


Figura 33. Ajuste del perfil de liberación del sistema 1F14 al modelo cuadrático con Tlag.

El perfil de liberación obtenido para el sistema 2F14 se muestra en la Figura 34, a pesar de que se probaron varios modelos de disolución con el software DDSolver para el sistema 2F14, no se encontró un solo modelo que se ajustara a los datos obtenidos, puede ajustarse a más de un modelo, la repetición del experimento para la obtención de más datos podría ayudar a encontrar un modelo más adecuado.

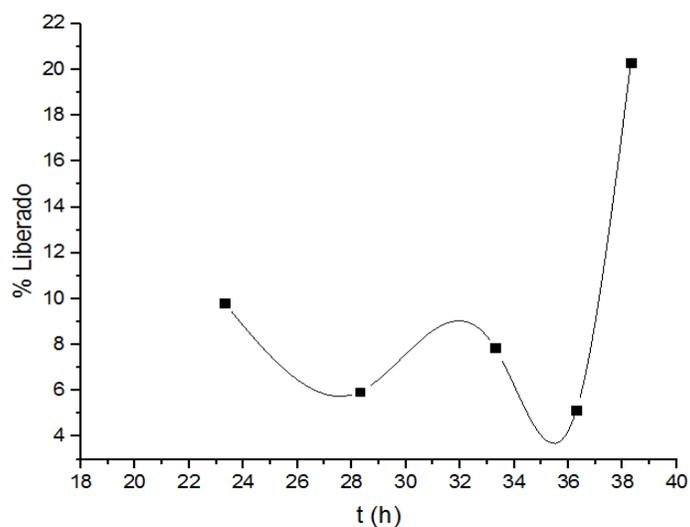


Figura 34. Perfil de liberación de rapamicina del sistema 2F14.

## **IX. Conclusiones**

Se obtuvieron estructuras nanométricas a partir de agua, lecitina de soya, colesterol y una mezcla de ésteres de sorbitan etoxilados al mezclarlos cerca de la temperatura del punto de enturbiamiento de los surfactantes etoxilados. La estructura de los sistemas Subag está compuesta de un centro de naturaleza hidrofóbica, en donde deben estar presentes en mayor concentración la lecitina, el colesterol y la rapamicina, mismo que está rodeado por un halo de naturaleza hidrofílica de acuerdo con las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal, dicho halo es rico en agua (zona teñida en verde), el cual está justo en contacto con la fase acuosa de suspensión; los ésteres de sorbitán etoxilados tienen la capacidad de formar diferentes arreglos denominados cristales líquidos, así que es posible que esa zona sea un gel y que el agua este inmersa en esta especie de gel, pues bien podría estar en contacto con el agua del medio circundante sin mezclarse.

Al tener este tipo de estructura es posible transportar tanto fármacos hidrosolubles como liposolubles, ya que le proporciona la capacidad de retener especies hidrofílicas en la capa externa e hidrofóbicas dentro del núcleo, por lo que tiene potencial como sistemas de liberación modificada, de fármacos y productos biotecnológicos; esto además del hecho de que sus componentes son biocompatibles, además de proteger al fármaco del medio exterior, evitan la inactivación del fármaco, mejorando la biodisponibilidad y reduciendo la toxicidad debida al fármaco.

Además, entre las ventajas que aporta este sistema están el bajo coste de las materias primas, un método de fabricación sencillo y económico y una alta estabilidad en suspensión y reproducible por estar sustentado en estudios de equilibrio de fases, aunado al hecho de que se obtuvo mediante Química Verde, pues prescindió del uso de disolventes orgánicos para su obtención.

## **X. Perspectivas**

La completa caracterización del sistema encontrado, requiere de estudios como la calorimetría diferencial de barrido y estudios referidos a su distribución en animales de experimentación para probar su eficacia y seguridad; así mismo, es posible plantear modificaciones al método para que la eficacia de encapsulación de fármacos sea mayor.

### Apéndice I

#### **Transferosomas**

Son un tipo especial de liposomas, que consisten en fosfatidilcolina y un activador de orilla; son vesículas blandas maleables diseñadas para un mejor suministro de principios activos. [8] Están registradas por una empresa alemana IDEA AG y son utilizadas por ella para referirse a su tecnología patentada de administración de medicamentos. El nombre significa "cuerpo portador" y se deriva del latín "transfere" que significa "llevar a través" y del griego "soma" para un "cuerpo".

Un transferosoma es una vesícula artificial diseñada para ser como una vesícula celular o una célula comprometida en la exocitosis y, por lo tanto, adecuada para la administración controlada y dirigida de fármacos. El transferosoma es un agregado complejo, altamente adaptable, sensible al estrés. Su forma preferida es una vesícula ultra-deformable que posee un núcleo acuoso rodeado por la compleja bicapa lipídica.<sup>iv</sup>

## Análisis ANOVA y Tuckey

Utilizando el programa Prism graph-path 8, se realizó una prueba de ANOVA comparando los sistemas que contenían al principio activo y los que no lo tenían por separado, para conocer si había alguna diferencia estadística significativa entre el tamaño de partícula de los sistemas y posteriormente se realizó una prueba de Tuckey para saber cuáles sistemas tenían una diferencia significativa.

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM				
<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary				
Alpha	0.05				
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>P value summary</b>	<b>Significant?</b>	
Row Factor	0.3367	0.5849	ns	No	
Column Factor	98.57	0.0001	***	Yes	
<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>P value</b>
Row Factor	192.7	2	96.33	F (2, 4) = 0.6150	P=0.5849
Column Factor	56397	2	28198	F (2, 4) = 180.0	P=0.0001
Residual	626.6	4	156.6		

Figura 1. Análisis de ANOVA entre los sistemas sin fármaco

Number of comparisons per family	3				
Alpha	0.05				
Title					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Title					
Row 1					
2S14 vs. 3S13	-98.80	-131.4 to -66.21	Yes	***	0.0009
1S14 vs. 3S13	-46.77	-79.36 to -14.18	Yes	*	0.0151
1S14 vs. 2S14	52.03	19.44 to 84.62	Yes	*	0.0103
Title					
Row 2					
2S14 vs. 3S13	-98.80	-131.4 to -66.21	Yes	***	0.0009
1S14 vs. 3S13	-46.77	-79.36 to -14.18	Yes	*	0.0151
1S14 vs. 2S14	52.03	19.44 to 84.62	Yes	*	0.0103
Title					
Row 3					
2S14 vs. 3S13	-98.80	-131.4 to -66.21	Yes	***	0.0009
1S14 vs. 3S13	-46.77	-79.36 to -14.18	Yes	*	0.0151
1S14 vs. 2S14	52.03	19.44 to 84.62	Yes	*	0.0103

*Figura 2. Análisis de Tuckey entre los sistemas sin fármaco*

Se encontró que el tamaño de partícula entre los sistemas sin fármaco es significativamente diferente.

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM				
<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary				
Alpha	0.05				
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>P value summary</b>	<b>Significant?</b>	
Row Factor	0.3367	0.5849	ns	No	
Column Factor	98.57	0.0001	***	Yes	
<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>P value</b>
Row Factor	192.7	2	96.33	F (2, 4) = 0.6150	P=0.5849
Column Factor	56397	2	28198	F (2, 4) = 180.0	P=0.0001
Residual	626.6	4	156.6		

Figura 3. Análisis ANOVA entre los sistemas con fármaco

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	3				
Number of comparisons per family	3				
Alpha	0.05				
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
Row 1					
3F13 vs. 2F14	190.1	153.6 to 226.5	Yes	***	0.0001
3F13 vs. 1F14	128.3	91.85 to 164.7	Yes	***	0.0005
2F14 vs. 1F14	-61.80	-98.22 to -25.38	Yes	**	0.0083
Row 2					
3F13 vs. 2F14	190.1	153.6 to 226.5	Yes	***	0.0001
3F13 vs. 1F14	128.3	91.85 to 164.7	Yes	***	0.0005
2F14 vs. 1F14	-61.80	-98.22 to -25.38	Yes	**	0.0083
Row 3					
3F13 vs. 2F14	190.1	153.6 to 226.5	Yes	***	0.0001
3F13 vs. 1F14	128.3	91.85 to 164.7	Yes	***	0.0005
2F14 vs. 1F14	-61.80	-98.22 to -25.38	Yes	**	0.0083

Figura 4. Análisis Tuckey entre los sistemas con fármaco

Se encontró que el tamaño de partícula entre los sistemas con fármaco es significativamente diferente.

## XI. Bibliografía

---

- <sup>i</sup> Organización Mundial de la Salud, Demencia,
- <sup>ii</sup> Organización Mundial de la Salud, Signos de trastornos mentales, <http://www.who.int/features/qa/38/es/>
- <sup>iii</sup> Vyas, T.K., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23:319–347.
- <sup>iv</sup> Sinko, Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences 6 edition, Lippincott Williams & Wilkins, US, 2011, pág. 610
- <sup>v</sup> Fernández Larrosa, Pablo N., Ruiz Grecco, Marina, Alvarado, Cecilia V., Micenmacher, Sabrina, Aguirre, Cristina, Martínez Noël, Giselle, Costas, Mónica A., & Rubio, María Fernanda. (2011). Efectos de la rapamicina en los procesos de senescencia y autofagia en líneas celulares humanas. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(3), 238-242. Recuperado en 14 de agosto de 2017, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802011000500007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802011000500007&lng=es&tlng=es).
- <sup>vi</sup> Carlos Juárez-Osornio & Jesús Gracia-Fadrique (2017) Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media, *Journal of Liposome Research*, 27:2, 139-150, DOI: [10.1080/08982104.2016.1174944](https://doi.org/10.1080/08982104.2016.1174944)

---

vii Lynch M.A., Hardiman O., Elamin M., Kirby J., Rowland L.P. (2016) Common Themes in the Pathogenesis of Neurodegeneration. In: Hardiman O., Doherty C., Elamin M., Bede P. (eds) Neurodegenerative Disorders. Springer, Cham

viii Cai, Z., & Yan, L.-J. (2013). Rapamycin, Autophagy, and Alzheimer's Disease. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 1(2), 84–90.

ix Fox, Fisiología humana 13ª edición, Mc Graw Hill, México, 2011, pág. 222

x Drug Bank, rapamicina <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00877#properties> 09/08/2017

xi Fernández Larrosa, Pablo N., Ruiz Grecco, Marina, Alvarado, Cecilia V., Micenmacher, Sabrina, Aguirre, Cristina, Martínez Noël, Giselle, Costas, Mónica A., & Rubio, María Fernanda. (2011). Efectos de la rapamicina en los procesos de senescencia y autofagia en líneas celulares humanas. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(3), 238-242. Recuperado en 14 de agosto de 2017, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802011000500007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802011000500007&lng=es&tlng=es).

xii Fernández Larrosa, Pablo N., Ruiz Grecco, Marina, Alvarado, Cecilia V., Micenmacher, Sabrina, Aguirre, Cristina, Martínez Noël, Giselle, Costas, Mónica A., & Rubio, María Fernanda. (2011). Efectos de la rapamicina en los procesos de senescencia y autofagia en líneas celulares humanas. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(3), 238-242. Recuperado en 14 de agosto de 2017, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802011000500007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802011000500007&lng=es&tlng=es).

xiii Pubchem, estructura rapamicina <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284616#section=Top> (2017)

---

<sup>xiv</sup> Li Lin, The Molecular Mechanism of Glucagon-Like Peptide-1 Therapy in Alzheimer's Disease, Based on a Mechanistic Target of Rapamycin Pathway, CNS Drugs, 2017 de

Crossref DOI link: <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0431-2>

Published: 2017-07

<sup>xv</sup> Wu L, Feng Z, Cui S, Hou K, Tang L, et al. (2013) Rapamycin Upregulates Autophagy by Inhibiting the mTOR-ULK1 Pathway, Resulting in Reduced Podocyte Injury. PLoS ONE 8(5): e63799. doi:10.1371/journal.pone.0063799

<sup>xvi</sup> A. NOGUERA, J. MASSÓ, D. SOY, C. CODINA, J. RIBAS. (2002). Sirolimus: una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor. Farmacia Hospitalaria, 26, 9.

<sup>xvii</sup> A. NOGUERA, J. MASSÓ, D. SOY, C. CODINA, J. RIBAS. (2002). Sirolimus: una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor. Farmacia Hospitalaria, 26, 9.

<sup>xviii</sup> Drug Bank, rapamicina, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00877>

<sup>xix</sup> <https://www.invima.gov.co/images/bioequivalencia/Sistema-de-clasificacion-biofarmaceutica-para-los-principios-activos-que-deben-presentar-estudios-de-bioequivalencia-de-acuerdo-con-el-anexo-tecnico-2-de-la-resolucion-1124-de-2016.pdf>

<sup>xx</sup> R. Gennaro,A.. (2003). Remington Farmacia 20° edición. España: Panamericana.

<sup>xxi</sup> Sinko, Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences 6 edition, Lippincott Williams & Wilkins, US, 2011, pág. 406

---

<sup>xxii</sup> R. Gennaro,A.. (2003). Remington Farmacia 20° edición. España: Panamericana. Pág 373

<sup>xxiii</sup> Patrick J. Sinko, Yashveer Singh,. (2011). Martin´s Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences 6th editon. USA: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.pg 419

<sup>xxiv</sup> Sinko, Martin´s Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences 6 edition, Lippincott Williams & Wilkins, US, 2011, pág. 621

<sup>xxv</sup> Imagen tomada de <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cp/c3cp50620g/unauth#!divAbstract>

<sup>xxvi</sup> Sobczyński, J.& Chudzik-Rząd, B.. (2018). Mixed micelles as drug delivery nanocarriers. En Design and Development of New Nanocarriers(p.333). United Kingdom: Elsevier

<sup>xxvii</sup> Imagen tomada de [https://es.wikipedia.org/wiki/Estructuras\\_lip%C3%ADdicas](https://es.wikipedia.org/wiki/Estructuras_lip%C3%ADdicas)

<sup>xxviii</sup> Galán Diaz Juan Jose . (2008). Influencia de la temperatura en las propiedades micelares de sales cuaternarias de amonio en disolución acuosa. España : Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Física pg. 34

<sup>xxix</sup> Imagen tomada de [https://es.wikipedia.org/wiki/Estructuras\\_lip%C3%ADdicas](https://es.wikipedia.org/wiki/Estructuras_lip%C3%ADdicas)

<sup>xxx</sup> G. Hernández, A. Moreno . (2010). Tratado de Medicina farmaceutica. España: Panamericana.

<sup>xxxi</sup> Imagen tomada de [https://es.wikipedia.org/wiki/Estructuras\\_lip%C3%ADdicas](https://es.wikipedia.org/wiki/Estructuras_lip%C3%ADdicas)

---

<sup>xxxii</sup> 6 – Drug delivery systems, Editor(s): Marcos Luciano Bruschi, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Woodhead Publishing, 2015, Pages 143-146, ISBN 9780081000922, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.

<sup>xxxiii</sup> R. Gennaro, A. (2003). Remington Farmacia 20<sup>o</sup> edición. España: Panamericana.

<sup>xxxiv</sup> Imagen tomada de <http://www.edicionesvr.com/notas.php?id=1397>

<sup>xxxv</sup> Carlos Juárez-Osornio & Jesús Gracia-Fadrique (2017) Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media, Journal of Liposome Research, 27:2, 139-150, DOI: [10.1080/08982104.2016.1174944](https://doi.org/10.1080/08982104.2016.1174944)

<sup>xxxvi</sup> Carlos Juárez-Osornio & Jesús Gracia-Fadrique (2017) Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media, Journal of Liposome Research, 27:2, 139-150, DOI: [10.1080/08982104.2016.1174944](https://doi.org/10.1080/08982104.2016.1174944)

<sup>xxxvii</sup> Stanislas Grassin-Delye, Amparo Buenestado, Emmanuel Naline, Christophe Faisy, Sabine Blouquit-Laye, Louis-Jean Couderc, Morgan Le Guen, Marc Fischler, Philippe Devillier, Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration Focus on opioids, Pharmacology & Therapeutics, Elsevier, Junio 2012.

<sup>xxxviii</sup> García-Corvillo, M. (2016). Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central. Ars Pharm, 51, 27-35.

---

<sup>xxxix</sup> Mendoza Patiño, Farmacología médica /Medical Pharmacology, Editorial Medica Panamericana, México, 2008, pág 838

<sup>xi</sup> Vyas, T.K., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23:319–347.

<sup>xii</sup> Vyas, T.K., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23:319–347.

<sup>xiii</sup> García-Corvillo, M.. (2016). Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central. *Ars Pharm*, 51, 27-35.

<sup>xliii</sup> Vyas, T.K., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23:319–347.

<sup>xliv</sup> Y.-H. Tsou, X.-Q. Zhang, H. Zhu, S. Syed, X. Xu. (2017, October 16). Drug Delivery to the Brain across the Blood–Brain Barrier Using Nanomaterials. *Small*, 13, 17.

<sup>xlv</sup> Y.-H. Tsou, X.-Q. Zhang, H. Zhu, S. Syed, X. Xu. (2017, October 16). Drug Delivery to the Brain across the Blood–Brain Barrier Using Nanomaterials. *Small*, 13, 17.

<sup>xlvi</sup> Vyas, T.K., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23:319–347.

---

<sup>xvii</sup> Banks, W. A. (2012). Drug Delivery to the Brain in Alzheimer's Disease: Consideration of the Blood-brain Barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 629–639. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.005>

<sup>xviii</sup> Patrick J. Sinko, Yashveer Singh,. (2011). Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences 6th editon. USA: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.

<sup>xlix</sup> Vyas, T.K., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23:319–347.

<sup>l</sup> Singh, A. K. Engineered Nanoparticles: Structure, Propierties and Mechanisms of Toxicity. 1<sup>st</sup> edition edn, (Academisc Press, 2015).

<sup>li</sup> Borrell, J. H., Domènech, Ò., Keough, K. M.W., (2016). *Membrane protein – lipid interactions: physics and chemistry in the bilayer*. SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology, Khalil, R. A., Zarari, A. A. (2014). Applied Surface Science Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*, 318, 85–89.

<sup>lii</sup> 5 - Mathematical models of drug release, Editor(s): Marcos Luciano Bruschi, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Woodhead Publishing, 2015, Pages 63-86, ISBN 9780081000922, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.

<sup>liii</sup> 5 - Mathematical models of drug release, Editor(s): Marcos Luciano Bruschi, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Woodhead

---

Publishing, 2015, Pages 63-86, ISBN 9780081000922,  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.

<sup>liii</sup> Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263–271. <http://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>

<sup>liii</sup> Rajan, R., Jose, S., Mukund, V. P., & Vasudevan, D. T. (2011). Transferosomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(3), 138-43.

---