



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE GELATINA-LECITINA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA**

TESIS

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

PRESENTA

REBECA SALINAS CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra: María Josefa Bernad Bernad
VOCAL: M en I: Verónica Zamora Salazar
SECRETARIO: Dr: Jorge Esteban Miranda Calderón
1er. SUPLENTE: Dr: Sergio Alberto Bernal Chávez
2° SUPLENTE: Dr: Gerardo Leyva Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO:

PERLA GARCÍA GUZMÁN

SUSTENTANTE:

REBECA SALINAS CORTÉS

Índice de contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes.....	4
3.1 Hipercolesterolemia.....	4
3.2 Estatinas	5
3.3 Atorvastatina	7
3.3.1 Farmacodinamia	8
3.3.2 Farmacocinética y Metabolismo	8
3.4 Sistemas de liberación de fármacos.....	9
3.5 Nanopartículas	9
3.5.1 Nanopartículas híbridas lípido-polímero	11
3.5.2 Polímeros de origen natural.....	14
3.5.3 Gelatina	14
3.5.4 Lecitina	15
3.6 Caracterización de sistemas coloidales	16
3.6.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad (PDI)	16
3.6.2 Potencial Z.....	18
3.6.3 Potencial de carga en superficie.....	20
3.7 Estudios de liberación de fármaco	20
3.7.1 Modelos y ecuaciones	21
3.7.2 Modelo de cinética de orden cero.....	21
3.7.3 Modelo de cinética de primer orden.....	21
3.7.4 Modelo Higuchi.....	22
3.7.5 Modelo de Korsmeyer-Peppas (Ley de potencia).....	22

3.7.6	Modelo de Hixson-Crowell.....	23
3.7.7	Modelo de Weibull	23
3.7.8	Modelo Peppas-Sahlin.....	24
3.8	Sistemas de liberación para atorvastatina.....	24
4.	Objetivos.....	26
4.1	Objetivo general	26
4.2	Objetivos específicos	26
5.	Justificación	27
6.	Hipótesis.....	28
7.	Metodología.....	29
7.1	Materiales y equipo	29
7.1.1	Materiales	29
7.1.2	Equipo	29
7.2	Elaboración y caracterización de Nanopartículas híbridas.....	30
7.2.1	Desolvatación en un paso.....	30
7.3	Formulación.....	31
7.4	Caracterización: Tamaño, potencial Z y carga en superficie.....	32
7.5	Eficiencia de entrapamiento (EE).....	33
7.5.1	Método directo.....	33
7.5.2	Método indirecto	34
7.6	Capacidad de carga (CC).....	34
7.7	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34
7.8	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	35
7.9	Estudios de liberación in vitro.....	35
8.	Resultados y Análisis.....	37

8.1	Condiciones de proceso.....	37
8.1.1	Efecto de la velocidad de agitación	37
8.1.2	Efecto del volumen de metanol.....	40
8.1.3	Efecto de la cantidad de lecitina	42
8.1.4	Efecto de la cantidad de agente entrecruzante.....	45
8.2	Nanopartículas de gelatina-lecitina con atorvastatina	51
8.3	Eficiencia de entrapamiento (EE).....	53
8.4	Capacidad de carga (CC).....	54
8.5	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	55
8.6	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	58
8.7	Estudios de liberación de fármaco <i>in vitro</i>	60
9.	Conclusiones	67
10.	Perspectivas.....	68
11.	Anexos	69
11.1	Anexo 1: Formulación	69
11.2	Anexo 2: NPG-ATV	81
11.3	Anexo 3. Mediciones de SEM	84
11.4	Anexo 4. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	85
12.	Bibliografía.....	91
13.	Abreviaturas	97

1. Resumen

En el presente trabajo se preparó un sistema de liberación modificada basado en los acarreadores nanoparticulados híbridos de lípido-polímero, utilizando a la lecitina como el lípido y a la gelatina como el polímero, con el objetivo de evaluar la viabilidad del sistema para liberar de manera prolongada a la atorvastatina, fármaco utilizado en la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol.

Se realizaron diferentes formulaciones para elegir la mejor preparación y caracterizarlas de acuerdo a su tamaño, Índice de polidispersidad (PDI), potencial Z, carga en superficie, eficiencia de entrapamiento, capacidad de carga, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y morfología a través de la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Posteriormente se evaluó el perfil de liberación del fármaco de manera *in vitro*. Se obtuvieron nanopartículas híbridas de gelatina-lecitina cargadas con atorvastatina (NPG-ATV) de tamaño 236.0 ± 1.55 nm con una eficiencia de entrapamiento superior al 85%.0, además la cinética de liberación del fármaco se ajusta a un modelo de Korsmeyer-Peppas, explicando la importancia que tiene el proceso de difusión en este sistema. Debido a que este sistema fue diseñado para ser administrado por vía oral, los resultados obtenidos demuestran que las NPG-ATV representan una prometedora primera fase en el desarrollo de una alternativa para tratar la hipercolesterolemia.

2. Introducción

Durante las últimas décadas se ha incrementado la mortalidad por enfermedades cardiovasculares entre los mexicanos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. Este tipo de enfermedades son de tipo multifactorial, sin embargo dentro de los factores de riesgo se encuentran las dislipidemias como la hipercolesterolemia que a su vez puede ser por causas genéticas o primarias o por causas secundarias.¹

Debido a que las dislipidemias son unos de los principales factores modificables para la disminución en el riesgo cardiovascular, resulta de importante interés el tratar de controlar estas enfermedades.

El colesterol dentro del organismo se obtiene por dos mecanismos: uno exógeno, por el consumo celular mediado por receptores de la familia de la lipoproteína de baja densidad (LDL); y otro de manera endógena por su biosíntesis dentro del organismo.

Los humanos sintetizan aproximadamente de 700-900 mg de colesterol al día mientras que de 300-500 mg de colesterol se absorben de la dieta consumida.²

La concentración total de colesterol en plasma depende por lo tanto de estas dos vías, tanto la exógena como la endógena, cualquier alteración en cualquiera de las dos vías tendrá un impacto en la concentración resultante de colesterol.

Las personas que padecen de hipercolesterolemia requieren de soluciones para disminuir la concentración de colesterol en plasma. Actualmente, existen las estatinas, fármacos que actúan en la vía endógena de síntesis del colesterol. Estos fármacos reducen el colesterol por la inhibición de la coenzima 3-hidroxil-3-metilglutaril reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis del colesterol.³

Existen también algunos fármacos como la ezetimiba que inhiben la absorción de colesterol proveniente de la vía exógena y por lo tanto es posible que disminuyan el colesterol contenido en los quilomicrones.

Los sistemas de liberación de fármacos (SLF) son sistemas ampliamente investigados y desarrollados para mejorar la liberación de compuestos y moléculas, prolongar su liberación e incluso dirigirlos al sitio diana. Dentro de estos sistemas, las nanopartículas representan el sistema más estudiado. Estos sistemas a nano escala presentan ventajas como la de modificar propiedades como el perfil de liberación, la difusividad, la biodisponibilidad y la inmunogenicidad por sobre los sistemas de liberación convencionales.

En el presente trabajo, se pretende atacar la vía endógena del colesterol, inhibiendo a la coenzima HMG-CoA reductasa con un sistema de liberación modificada: nanopartículas híbridas gelatina-lecitina conteniendo como fármaco a la atorvastatina.

3. Antecedentes

3.1 Hipercolesterolemia

En México, las enfermedades cardiovasculares han llegado a constituir la primera causa de mortalidad. La aterosclerosis se encuentra entre las principales causas en el desarrollo de estas enfermedades. El progreso de la aterosclerosis es causada por múltiples factores entre los que se encuentran la edad, la herencia, el tabaquismo, un estilo de vida sedentario, llevar una dieta no saludable, la elevación de la presión arterial sistémica, el sobrepeso y la obesidad, la elevación de los niveles de glucosa y los niveles inadecuados de lípidos séricos.

Dentro de todos los factores de riesgo, los más modificables son las dislipidemias. Sobre todo cuando éstas y la hipertensión arterial se encuentra asociadas y tienen un efecto sinérgico sobre el riesgo cardiovascular.

Los resultados oficiales más recientes de la encuesta nacional en salud y nutrición (ENSANUT) 2006, muestran que la prevalencia de hipertensión arterial fue de 30.8% y la prevalencia general de hipercolesterolemia fue de 26.5%, con 28.8% en las mujeres y 22.7% en los hombres.⁴

La dislipidemia más frecuente en México es la hipoalfalipoproteinemia, que es la anomalía en el nivel de las lipoproteínas en suero que está asociada con desarrollar riesgo cardiovascular e incluye la elevación de colesterol total, la elevación de los triglicéridos, disminución de la concentración de colesterol de alta densidad o HDL (por sus siglas en inglés, *High Density Lipoprotein*) y el incremento del colesterol de baja densidad o LDL (por sus siglas en inglés, *Low Density Lipoprotein*).

3.2 Estatinas

Las estatinas son el grupo de fármacos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA); la cual es una enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis del colesterol, ya que cataliza la conversión del HMG-CoA a mevalonato, con lo cual se disminuye la síntesis de colesterol en el hepatocito. ⁵

Las estatinas además de competir con el sustrato normal en el sitio activo de la enzima, alteran la conformación de la enzima cuando se une a su sitio activo, lo cual previene a la HMG-CoA reductasa de alcanzar su estructura funcional. El cambio en la conformación de la enzima cuando se une a su sitio activo hace a este grupo de fármacos muy efectivos y específicos ⁵

Al reducirse la concentración de colesterol intracelular, aumenta la expresión de los receptores de lipoproteína de baja densidad, por sus siglas en inglés (LDLRs) en la superficie celular del hepatocito. Esto lleva a un aumento en la extracción del colesterol de baja densidad, (por sus siglas en inglés LDL-C) de la sangre y por lo tanto a un decremento en los niveles de LDL-C (figura 1).

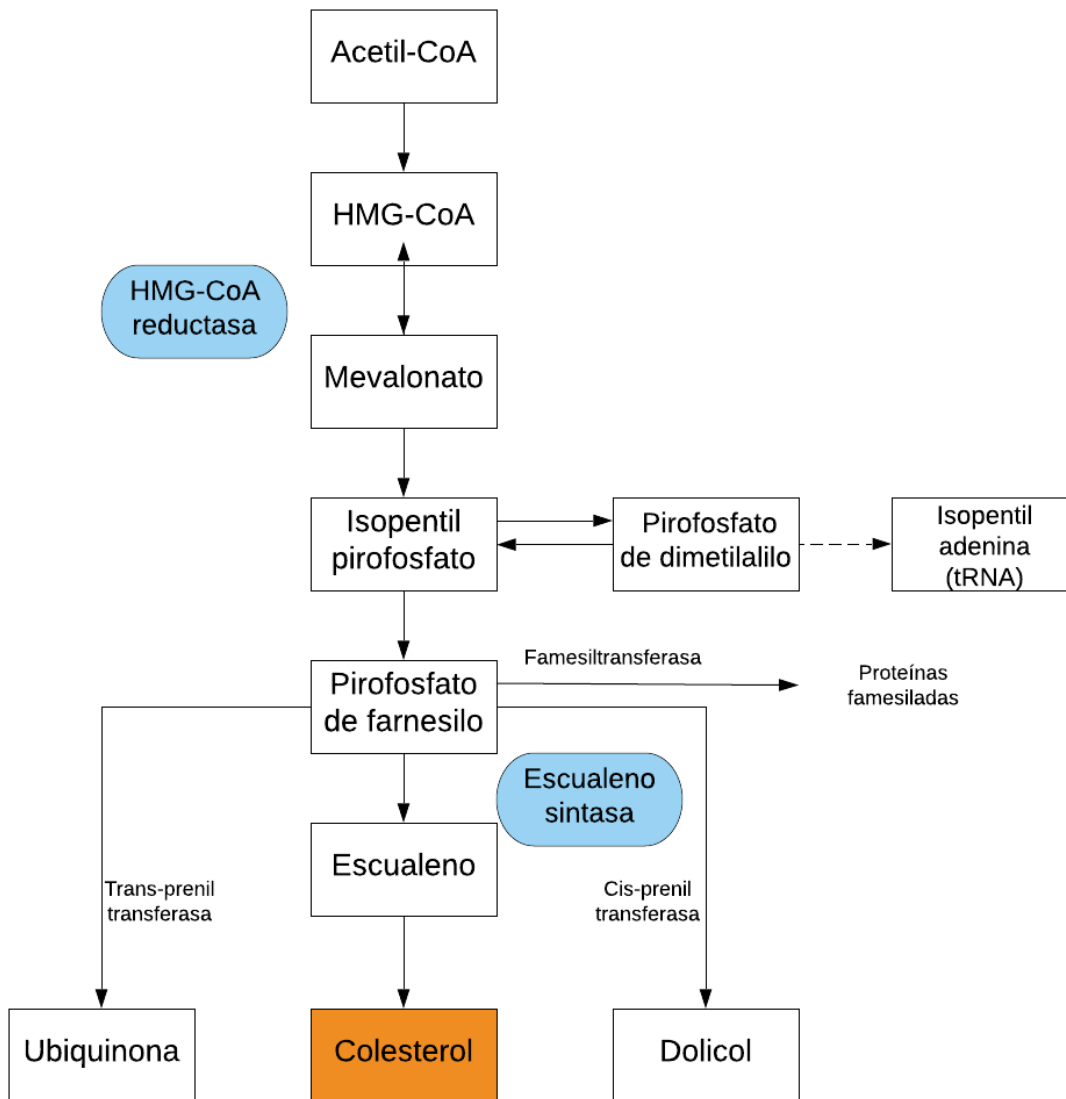


Figura 1. Vía de síntesis del colesterol y moléculas relacionadas. La Acetil CoA es biológicamente sintetizada a colesterol en un proceso que toma más de 20 pasos. Este proceso es el fundamento que sustenta el inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa, ya que al hacerlo, disminuirá la síntesis total de colesterol.

Adaptado de (Haque T.) *Atorvastatin: A Review of its Pharmacological Properties and Use in Familial Hypercholesterolemia.*

3.3 Atorvastatina

La atorvastatina inhibe la enzima HMG-CoA reductasa, la cual se localiza en el tejido hepático. La inhibición de esta enzima, trae como consecuencia la disminución de colesterol producido, el cual finalmente reduce la cantidad total de LDL-C.

La atorvastatina fue sintetizada en el año 1985 por Bruce Roth en Nueva Jersey, Estados Unidos. Las dosis usuales para este fármaco son 10, 20 y 40 mg, sin embargo, se llega a prescribir hasta 80 mg al día.

Es un fármaco clase II dentro de la clasificación biofarmacéutica (CBF), lo cual significa que es una molécula de baja solubilidad y alta permeabilidad. La molécula tiene un punto de fusión de 159.2-160.7°C. Su solubilidad en agua es de 0.00063 mg/mL y un pKa de 4.33. ⁶

La atorvastatina, se encuentra en las formulaciones generalmente en forma de sales, tales como la atorvastatina sódica o la atorvastatina cálcica, siendo ésta última la que mayoritariamente está presente en las formas farmacéuticas actualmente comercializadas (figura 2).

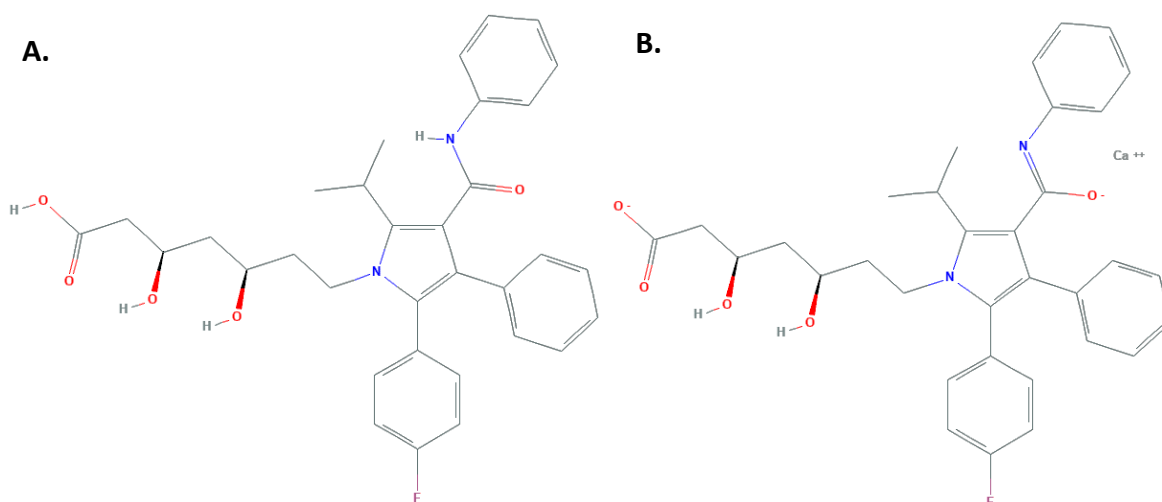


Figura 2. A. Molécula de atorvastatina B. Molécula de atorvastatina cálcica

Obtenido de PubChem

3.3.1 Farmacodinamia

Los efectos de la atorvastatina disminuyen la cantidad de lipoproteína de baja densidad (LDL), el colesterol total, la apolipoproteína B, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y los triglicéridos. Todo, mientras incrementa la secreción de lipoproteína de alta densidad (HDL), sin embargo el mecanismo por el cual se presenta el incremento del colesterol HDL es hasta ahora desconocido. ⁶

La biodisponibilidad absoluta de la atorvastatina (como fármaco parental) es de aproximadamente 14% y la biodisponibilidad sistémica inhibitoria de la HMG-CoA reductasa es aproximadamente del 30%. La biodisponibilidad sistémica es baja debido al aclaramiento pre-sistémico por la mucosa gastrointestinal y el metabolismo del primer paso en el hígado. ⁷

3.3.2 Farmacocinética y Metabolismo

La dosis terapéutica de la atorvastatina es de 10 a 80 mg/día y es administrada en la forma ácida como atorvastatina cálcica. Después de la administración oral, la atorvastatina llega a concentración máxima en plasma en 2 a 3 horas.

La atorvastatina puede alcanzar un 95% de unión a proteínas. Es metabolizada por la enzima CYP3A4, de la familia de las enzimas del citocromo P450 en el intestino e hígado y además recircula por circulación enterohepática.

Este fármaco se metaboliza principalmente en la bilis seguida por el hígado, ya que también éste es el sitio principal de síntesis y depuración de colesterol. Esta metabolización se lleva a cabo por oxidación, lactonización y glucuronidación. Por estas razones, está contraindicada la terapia con atorvastatina a pacientes con condiciones hepáticas adicionales. Se excreta en un 70% por las heces y un 2% por vía urinaria, el resto se excreta por la bilis.

El tiempo de vida media de este fármaco es de 14 horas, sin embargo la actividad inhibitoria de la HMG-CoA es de 20 a 30 horas, debido a que sus metabolitos tienen mayor tiempo de vida media y permanecen activos durante este tiempo. ⁶

3.4 Sistemas de liberación de fármacos

Los sistemas de liberación de fármacos (SLF) son sistemas ampliamente investigados y desarrollados para mejorar la biodisponibilidad de compuestos farmacéuticos y otras moléculas dentro de un organismo. También mejoran la administración y eficacia de diversos compuestos farmacéuticos como anticuerpos, péptidos, vacunas, enzimas y fármacos en general.

Actualmente, la vía de administración más común de un fármaco es por la vía oral o parenteral, sin embargo, en conjunto, las tabletas, cápsulas e inyecciones convencionales son incapaces de satisfacer necesidades terapéuticas más específicas, como el ser capaces de liberar el fármaco en el sitio diana y/o activarse en el sitio específico. Aunque no todos los fármacos o moléculas necesitan de estos recursos, estas limitaciones han hecho que las investigaciones y desarrollo se enfoquen en SLF novedosos.⁸

Otros SLF importantes, son los sistemas de liberación modificada, ya que al sostener o dependiendo del caso prolongar la liberación de un fármaco por largos periodos de tiempo, se reduce su frecuencia de administración.

El tipo de sistema de liberación dependerá de la necesidad clínica y de diversos factores relacionados al fármaco como sus propiedades fisicoquímicas, la dosis y la enfermedad que va a tratar.⁹

3.5 Nanopartículas

En los últimos años, la investigación en el área de nanociencia ha crecido sin precedentes. Existe un aumento en el optimismo dirigido hacia la nanotecnología aplicada a la medicina que traerá avances significativos en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades.¹⁰

Los SLF basados en esta tecnología, juegan un importante papel en el avance de la formulación de principios activos, ya que estos sistemas nanotecnológicos

pueden formularse para ser sitio específico y/o controlar la liberación de las moléculas.

Este tipo de partículas, al ser nanométricas, penetran en el tejido, facilitando la recepción del fármaco por las células, lo cual permite una liberación de fármaco más eficiente e incluso prolongada, además de asegurar la acción en el sitio diana.

Un acarreador es aquel vehículo que trae consigo o transporta al fármaco. Las nanopartículas se definen como sistemas acarreadores coloidales de tamaño submicrométrico que pueden consistir de diversos materiales. La primera generación de terapia basada en las nanopartículas incluyó los sistemas lipídicos como los liposomas y las micelas. Después se incrementó el uso de dendrímeros y el de nanopartículas inorgánicas como de oro, plata o aquellas con propiedades magnéticas, también se incrementó el uso y desarrollo de las nanopartículas poliméricas, tanto de polímeros sintéticos o naturales.^{11 12}

La importancia de las nanopartículas radica en que las nanoestructuras en muchos casos, previenen del daño a los fármacos en la región gastrointestinal. Estos sistemas brindan mayor biodisponibilidad oral debido a que la penetración de las nanopartículas o cualquier otra nanoestructura a las células, es mucho mayor que el de aquellas partículas de tamaños entre 1-10 μm , por lo tanto, incrementan la eficiencia y permanecen por un periodo prolongado de tiempo en el sistema de circulación sanguíneo, lo que provocan menos fluctuaciones en el plasma y por lo tanto se reducen los efectos adversos.¹²

En cuanto a la selección de nanopartículas como SLF, ésta se puede hacer con base en las propiedades fisicoquímicas de los fármacos. Los beneficios más importantes asociados a las nanopartículas están basados en sus propiedades de superficie, en su composición y capacidad para retener fármacos. Las nanopartículas a su vez, son divididas en dos subclasificaciones, las nanoesferas y las nanocápsulas. Los fármacos que son especialmente considerados candidatos para este tipo de SLF son aquellos que tienen baja o nula solubilidad acuosa y/o baja capacidad de ser absorbidos.¹²

Al usar los SLF, se pueden modificar propiedades como la biodisponibilidad, focalización al sitio diana y el control de la liberación. Sin embargo, la eficacia de las nanoestructuras como vehículos de liberación varía dependiendo de su tamaño, forma y otras características fisicoquímicas inherentes.

De acuerdo a la Iniciativa Nacional de Nanotecnología estadounidense (US NNI, por sus siglas en inglés) la nanotecnología comprende a la materia de dimensiones entre 1 a 100 nm.¹³ No obstante, en la nanomedicina, la aplicación de la nanotecnología se describe con tamaños menores a 1000 nm.¹⁴

Un ejemplo de lo mencionado son los nanomateriales poliméricos, que con diámetros que varían desde los 10 hasta los 1000 nm, exhiben características ideales para ser vehículos en SLF. Además, muchos de ellos poseen una alta biocompatibilidad y propiedades biodegradables.

Los polímeros como los alquilcianoacrilatos, alcohol polivinílico, el ácido poli-L-láctico, la policaprolactona, el polietilenglicol (PEG) y otros polímeros naturales como el alginato, quitosán y la gelatina son actualmente usados en la fabricación de nanopartículas.¹²

3.5.1 Nanopartículas híbridas lípido-polímero

Dentro de los SLF que han sido mayormente aprobados en pruebas preclínicas, clínicas y además que ya se comercializan, se encuentran los liposomas y las nanopartículas poliméricas biodegradables.

Los liposomas han sido muy exitosos porque son capaces de liberar tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos gracias a su estructura anfifílica (vesículas acuosas y bicapa lipídica). Sin embargo, las nanopartículas poliméricas traen consigo también muchos beneficios como el ser biocompatibles y tener métodos de preparación relativamente fáciles y rentables.

Las nanopartículas poliméricas aún no han tenido tanto éxito como los liposomas, probablemente debido al moderado tiempo de su uso, pero en años recientes se

han hecho grandes contribuciones para combinar los atributos positivos de los liposomas y de las nanopartículas poliméricas en un solo sistema de liberación.

Este tipo de sistemas que aportan ambas características de ser poliméricos y lipídicos se llaman nanopartículas híbridas lípido-polímero (NLPs). Las NLP ofrecen diversas ventajas terapéuticas como el alterar la biodistribución, disminuir el perfil de toxicidad en comparación al fármaco libre. Además mejorar la estabilidad física del fármaco y la biocompatibilidad. El lípido incrementa la capacidad de carga mientras que el polímero controla la liberación del fármaco.

Las NLPs se pueden clasificar en dos categorías dependiendo de su nanoestructura híbrida y métodos de ensamblado: NLPs tipo-I de matriz monolítica y las NLPs tipo-II “*core-shell*”. Las tipo-I consisten de complejos fármaco-polímero, formados vía interacciones iónicas u otras, que se distribuyen homogéneamente a través de la fase lipídica. Las tipo-II se dividen a su vez en dos subtipos basándose en su nanoestructura, (i) núcleo-polimérico hidrofílico/capa lipídica hidrofóbica y (ii) núcleo hidrofóbico-lipídico/capa polimérica hidrofílica. Las NLPs (ii) consisten en un núcleo lipídico rodeado por una capa polimérica, lo que permite la carga de fármacos hidrofóbicos en el núcleo, mientras que las NLPs (i) están diseñadas principalmente para encapsular fármacos contra el cáncer en el núcleo polimérico para que la capa que lipídica que recubre al núcleo mejore la captación celular (figura 3).

Nanopartículas híbridas lípido-polímero (NLP)

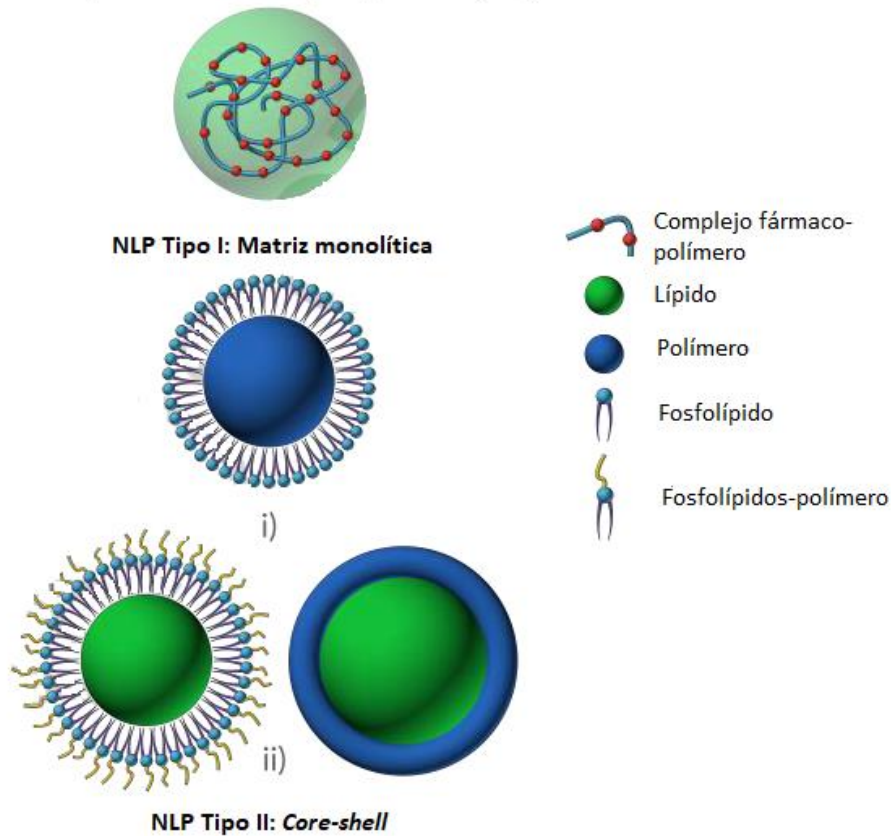


Figura 3. Ilustración esquemática de nanopartículas híbridas lípido-polímero

Modificado de (M.C. Teixeira *et al.*) *Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery.*

Se ha reportado el uso de estas nanopartículas híbridas lípido-polímero en la formulación de un sistema de liberación para vía oral del antifúngico anfotericina B ¹⁵, así como para antimicrobianos como el timol ¹⁶, para mejorar la biodisponibilidad de estos fármacos liposolubles y controlar su liberación. También se ha reportado el uso de estos SLF como acarreadores de vacunas para ligar a la superficie antígenos y potenciar la respuesta inmune ¹⁷, además se ha reportado la formulación de las nanopartículas híbridas lípido polímero en la terapia contra el cáncer para liberar salinomicina. ¹⁸

Por estos ejemplos, se muestra la oferta y viabilidad de numerosas aplicaciones que ofrece este tipo de SLF.

3.5.2 Polímeros de origen natural

Los polímeros utilizados para preparar nanopartículas pueden ser biodegradables o no biodegradables. Un polímero ideal para estos sistemas debe ser biocompatible, y presentar la mínima toxicidad, apirogénico y ser capaz de proteger al fármaco de la degradación y evitar la captación por parte del sistema inmunológico.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los polímeros utilizados pueden ser sintéticos o de origen natural. Dentro de los de origen natural, los polímeros más utilizados son: el ácido hialurónico, la albúmina, el alginato, el dextrano, el quitosán y la gelatina. Debido a su origen natural, éstos son preferidos debido a que son considerados de baja toxicidad y alta biodegradabilidad.¹⁹

En el presente trabajo, se utilizó el polímero natural gelatina y el lípido lecitina.

3.5.3 Gelatina

La gelatina es uno de los biopolímeros más versátiles que hay. Es ampliamente utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica. Es un hidrocoloide proteínico obtenido por la hidrólisis parcial del colágeno proveniente de animales como la piel de cerdo u otros tejidos de animales y huesos.

Dependiendo de las condiciones de la hidrólisis resulta en dos tipos de gelatina. La gelatina tipo A, es obtenida por hidrólisis ácida y tiene un punto isoeléctrico alto (pI 8-9), mientras que la gelatina tipo B resulta del proceso de hidrólisis básica y tiene un punto isoeléctrico bajo (pI 4-5) (Figura 4).

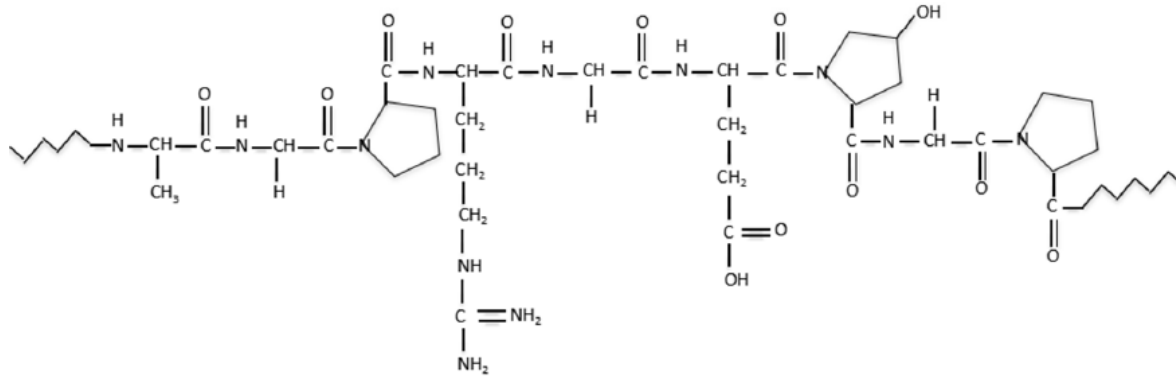


Figura 4. Estructura que forma parte de la gelatina.

Adaptado de (Wang X. *et al.*) *Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting*

3.5.4 Lecitina

La lecitina es una mezcla de fosfolípidos que se obtiene a partir de la yema de huevo o del aceite de semillas como la soya, girasol y canola. Es usado como un surfactante o emulsificador en las industrias de alimentos, cosmética, farmacéutica y biotecnológica.

La propiedad de emulsificar que tiene la lecitina se atribuye al carácter surfactante de su fracción lipídica, es decir, los fosfolípidos, éstos consisten en un segmento principal de glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo fosfato que puede estar esterificado con alcoholes monovalentes como la colina o la etanolamina, o con alcoholes polivalentes como el glicerol o inositol (figura 5).²⁰

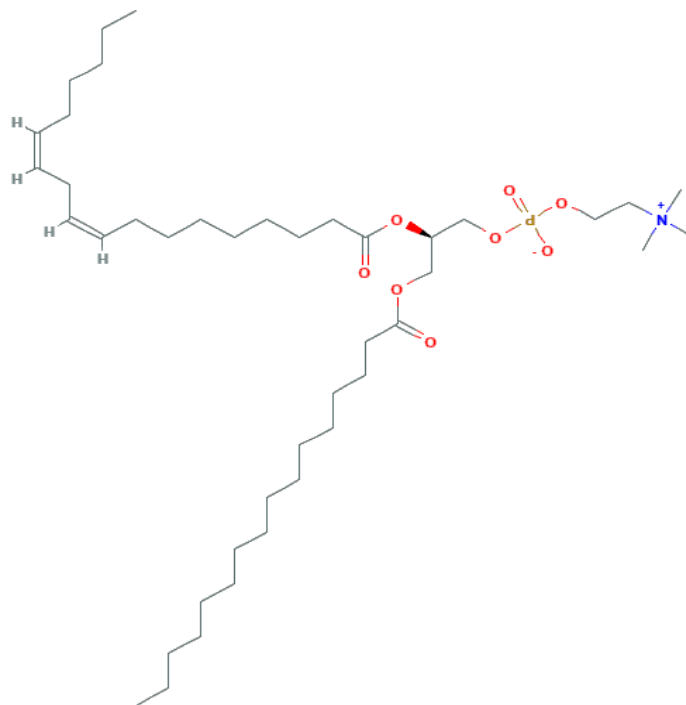


Figura 5. Estructura de la lecitina de soya (Fosfatidilcolina)

Obtenido de PubChem

3.6 Caracterización de sistemas coloidales

Los SLF, específicamente los acarreadores coloidales como las soluciones micelares, las vesículas y en este caso particular las dispersiones de nanopartículas se caracterizan por medio de distintas técnicas. Dentro de las cuales se pueden mencionar, el análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS) microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD) espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), entre otras.²¹

3.6.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad (PDI)

El tamaño de partículas es un parámetro importante en el proceso de control y caracterización del sistema coloidal. Un método apropiado para este propósito es la

dispersión de luz láser o difracción de la luz láser, sin embargo sólo se puede aplicar cuando se sabe que las partículas tienen un tamaño mayor a un micrómetro.

Además, como la mayoría de las dispersiones coloidales tienen un tamaño inferior a un micrómetro, la técnica más adecuada es la basada en la espectroscopia de correlación de fotones (*photon correlation spectroscopy*, PCS) también llamado dispersión dinámica de la luz (DLS).²¹

De forma breve, se puede decir que en un experimento de dispersión de la luz, la muestra se expone a una onda de luz monocromática y un detector apropiado detecta la señal. Cuando un haz de luz monocromático se encuentra con una solución que contiene macromoléculas, la luz se dispersa en todas las direcciones como una función del tamaño y la forma de las macromoléculas.

En cambio, en la dispersión de la luz estática, la intensidad de la luz dispersa es analizada como intensidad promedio en el tiempo, la cual provee información del peso molecular y radio de giro de las moléculas.²²

La dispersión dinámica de la luz, es una técnica que mide el movimiento Browniano de las macromoléculas. El movimiento Browniano es el movimiento al azar de las partículas, debido al bombardeo por las moléculas del disolvente que las rodea. Entre más grande la partícula, el movimiento Browniano será más lento y por el contrario, entre más pequeña la partícula, el movimiento será más rápido.

Este movimiento que se presenta, no sólo depende del tamaño de partícula sino también de la temperatura, densidad y viscosidad del disolvente.

La velocidad del movimiento Browniano se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión traslacional (D).

El tamaño de partícula es calculado a partir del coeficiente de difusión traslacional usando la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\mu D}$$

Ecuación 1: Ecuación de Stokes-Einstein

Donde:

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico

D = Coeficiente de difusión traslacional

k = Constante de Boltzmann

T = Temperatura absoluta

μ = Viscosidad

El diámetro que se mide en el DLS es un valor que se refiere al proceso de una partícula cuando se difunde en un fluido y se le llama diámetro hidrodinámico. Por lo tanto, el diámetro que se obtiene por esta técnica es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula.²³

El análisis del tamaño promedio da origen a dos valores, un promedio para el tamaño y un parámetro de ancho conocido como el índice de polidispersidad, PDI por sus siglas en inglés (*Polydispersity Index*). Por lo tanto, el PDI es un parámetro del ancho de la distribución normal.

Por eso, el valor que el PDI puede tomar del DLS está comprendido en el intervalo de 0-1, donde teóricamente un valor de cero representa un sistema monodisperso. El valor de PDI de 0.1 a 0.7 representa una preparación cercana a un sistema monodisperso, mientras que un $PDI > 0.7$ indica una distribución ancha de diferentes tamaños macromoleculares o de partícula en solución.²²

3.6.2 Potencial Z

La mayoría de los líquidos contienen iones, ya sea cargados positiva o negativamente, llamados cationes o aniones respectivamente. Cuando una partícula está cargada y suspendida, los iones de carga opuesta se atraen a la superficie de la partícula.

Los iones cerca de la superficie de la partícula, están unidos fuertemente, lo que forma una capa rígida. Esta capa se llama capa de Stern, los iones un poco más

lejanos son rechazados por la capa de Stern. Este equilibrio se le llama capa difusa de contra-iones.

Al punto donde se une la capa difusa y la capa de Stern se llama potencial Z (figura 6). Conocer el valor de potencial Z de una dispersión coloidal es importante para determinar si una partícula suspendida en un líquido tenderá o no a flocular.²⁴

El potencial Z también brinda información para estimar si una partícula podrá unirse o ser captada por las células de los tejidos ya que se conoce que las partículas altamente catiónicas interactúan más favorablemente con las membranas celulares.

25

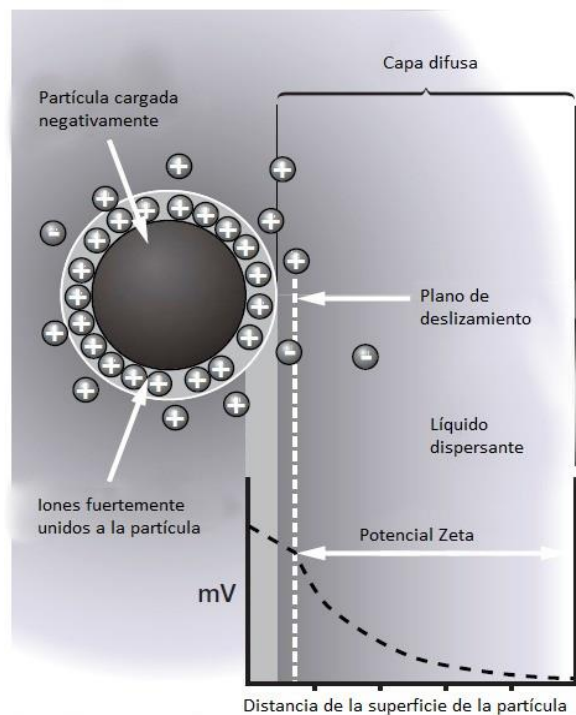


Figura 6. Representación del potencial Z con una partícula cargada negativamente.

Adaptado de (Malvern Instruments) *Zetasizer Nanoseries User Manual*.

3.6.3 Potencial de carga en superficie

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, las sustancias y partículas coloidales tienen una carga eléctrica en solución, lo que conlleva a tener contraiones y una serie de interacciones debido a éstos.

Si los contraiones son separados de la partícula, se puede medir una corriente de transmisión en mili volts (mV). Una corriente de cero mV denota el punto de cero carga (en el supuesto de que todas las cargas estén neutralizadas). El potencial por sí mismo es un parámetro relativo que depende de factores tales como la conductividad eléctrica de la muestra en dispersión, de la viscosidad, de la temperatura y del peso molecular y del tamaño de partícula en cuestión.

La carga en superficie de una partícula se puede detectar con un detector de carga de partícula, el cual mide la corriente de transmisión en mV. ²⁶

3.7 Estudios de liberación de fármaco

La liberación de un fármaco es el proceso por el cual el fármaco deja el producto que lo contiene para ser sujeto de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) dentro de un organismo.

La disolución *in vitro* es reconocida como un elemento importante en el estudio y desarrollo de un fármaco y su forma farmacéutica, ya que bajo ciertas condiciones puede ser usado como sustituto para la evaluación de la bioequivalencia.

Existen muchas teorías o modelos cinéticos para describir la liberación del fármaco de formas de liberación controlada o inmediata, donde la cantidad de fármaco liberada es una función del tiempo. A continuación se describen algunas de las más renombradas. ²⁷

3.7.1 Modelos y ecuaciones

3.7.2 Modelo de cinética de orden cero.

Es la liberación ideal para un SLF ya que la concentración del fármaco permanece constante durante todo el proceso de liberación. Un sistema que tiene una cinética de liberación de este tipo tiene una tasa de liberación que es independiente de la concentración del fármaco en la forma farmacéutica (Ecuación 2).

$$Q = Q_0 + k_0 t$$

*Ecuación 2: Modelo de cinética de liberación de orden cero*²⁷

Donde:

Q= cantidad de fármaco liberada o disuelta

Q₀= cantidad inicial de fármaco en solución (usualmente es cero)

k₀= constante de liberación de orden cero

t= tiempo

3.7.3 Modelo de cinética de primer orden.

Se usa para describir absorción y/o eliminación de algunos fármacos aunque es difícil de conceptualizar este mecanismo teóricamente. Este modelo explica un proceso en el cual la tasa de liberación es directamente proporcional a la concentración del fármaco que experimenta la disolución (Ecuación 3).

$$\ln Q = \ln Q_0 + K t$$

*Ecuación 3: Modelo de cinética de liberación de primer orden en su forma lineal*²⁸

Donde:

Q₀= concentración inicial del fármaco inicial en solución

C= cantidad de fármaco liberado al tiempo t

k= constante de liberación de primer orden

t= tiempo

3.7.4 Modelo Higuchi.

Es de los modelos más usados para describir la liberación de fármaco de un sistema matricial. Este modelo es aplicable a diferentes geometrías y sistemas porosos. Este modelo está basado en diferentes hipótesis. (1) La concentración inicial en la matriz es mucho más alta que la solubilidad del fármaco, (2) La difusión del fármaco ocurre en una sola dimensión, (3) Las partículas de fármaco son mucho más pequeñas que el ancho del sistema, (4) El hinchamiento de la matriz y disolución son menores o despreciables, (5) La difusión del fármaco es constante, (6) Siempre se mantienen condiciones “sink” (Ecuación 4).

$$Q = kH\sqrt{t}$$

Ecuación 4: Modelo de liberación de Higuchi basado en el proceso de difusión de Fick ²⁸

Donde:

kH= Constante de disolución de Higuchi

t = tiempo

3.7.5 Modelo de Korsemeier-Peppas (Ley de potencia).

Describe la liberación del fármaco de un sistema polimérico. También explica el proceso de liberación para diversas formas de dosificación o sistemas con fármaco. El valor de “n” es usado para caracterizar diferentes mecanismos de liberación, donde n=0.5 corresponde a una difusión “Fickeana” y valores de n entre 0.5-1.0 o igual a 1.0 corresponden a una difusión “No Fickeana” (Ecuación 5). ²⁹

$$\frac{Qt}{Q_{\infty}} = kt^n$$

Ecuación 5: Modelo de liberación de Korsemeier-Peppas ³⁰

Donde:

Q_t/Q_∞ = fracción de fármaco liberado al tiempo "t"

k =constante de liberación

n = exponente de liberación

3.7.6 Modelo de Hixson-Crowell.

Este modelo describe la liberación del sistema donde hay cambio de área superficial y diámetro de la partícula. Se considera que la tasa de liberación está limitada por la tasa de disolución de las partículas de fármaco y no por la difusión de ellas a través de una matriz polimérica (Ecuación 6).

$$Q_0^{\frac{1}{3}} - Q_t^{\frac{1}{3}} = kHC * t$$

Ecuación 6: Modelo de liberación de Hixson-Crowell ³⁰

Donde:

Q_t = cantidad de fármaco liberado al tiempo "t"

Q_0 = cantidad inicial de fármaco en el sistema

kHC = constante de liberación de Hixson-Crowell

3.7.7 Modelo de Weibull

Este modelo se puede aplicar a casi todas las curvas de disolución. Cuando se aplica al proceso de liberación o disolución de fármaco de una forma de dosificación o de un sistema, la ecuación expresa la acumulación de la fracción de fármaco en disolución (Ecuación 7).

$$Q = Q_0 \left(1 - e^{\left(\frac{-(t-T)^b}{a} \right)} \right)$$

Ecuación 7: Modelo de liberación de Weibull ³⁰

Donde:

Q = cantidad de fármaco disuelta en función del tiempo "t"

Q_0 = cantidad total de fármaco liberado

T = tiempo lag medido como resultado de los parámetros del proceso de disolución

t = tiempo

a = parámetro que describe la dependencia del tiempo

b = forma de la curva de disolución

Como es un modelo matemático empírico, carece de fundamentos para explicar la cinética de liberación de un fármaco en un sistema dado.

3.7.8 Modelo Peppas-Sahlin.

Es un modelo semi-empírico, en el cual el primer término del lado derecho de la ecuación representa una contribución por difusión Fickiana y al segundo término de la ecuación se le atribuye a la contribución hecha por el relajamiento del sistema (Ecuación 8).

$$\frac{Qt}{Q_0} = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$$

Ecuación: 8: Modelo de liberación de Peppas-Sahlin³⁰

Donde:

Q = cantidad de fármaco disuelta en función del tiempo "t"

Q_0 = cantidad total de fármaco liberado

k_1 y k_2 = constantes del modelo para cada contribución de la ecuación

3.8 Sistemas de liberación para atorvastatina

Además de los sistemas nanoparticulados híbridos ya mencionados, se han reportado nanopartículas híbridas específicamente para ser cargadas con

atorvastatina con el fin de mejorar la biodisponibilidad de este fármaco. Las reportadas por Deepanshu Shilpi *et al.*, son nanopartículas híbridas de gelatina modificadas con ácido esteárico, las cuales probaron tener tamaño de partícula (247.7 ± 10.9 nm) y un PDI buenos (0.219 ± 0.07 nm) pero demostraron tener una eficiencia de entrapamiento baja ($58.7 \pm 5.3\%$).³¹

Caso similar al estudiado por Sina Andalib *et al.*, en el cual se reportó un sistema de liberación de micelas copoliméricas de tamaño nanométrico cargadas con atorvastatina, que al igual que el estudio anterior, se reportó tener un buen tamaño de partícula (81.7 nm) pero una eficiencia de entrapamiento media de $62.50 \pm 0.84\%$.³²

Cabe destacar que las desventajas de estos sistemas de liberación es que presentan un procedimiento de síntesis largo y difícilmente escalable.

Guzmán García *et al.*, reportó la síntesis de un compuesto de micropartículas híbridas de gelatina con montmorillonita cargadas de atorvastatina, el cual resultó ser un sistema de liberación novedoso y eficiente para la liberación prolongada de atorvastatina, además de ser un sistema capaz de adsorber colesterol. Sin embargo, se reportó una eficiencia de entrapamiento similar a las anteriores mencionadas (hasta el 67.0%). Como un sistema dual, resulta de gran interés y utilidad, pero como sistema de liberación exclusivamente para atorvastatina, el tamaño micrométrico no resulta tan favorable como el de las nanopartículas, ya que éstos facilitan una mejor absorción del fármaco en el intestino que las micropartículas.³³

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Diseñar, preparar y caracterizar un sistema de liberación de fármaco basado en nanopartículas híbridas de gelatina-lecitina para la liberación prolongada de atorvastatina como tratamiento para la hipercolesterolemia.

4.2 Objetivos específicos

- Formular un sistema de liberación de fármaco nanoparticulado híbrido de lípido-polímero capaz de contener a la atorvastatina.
- Comparar diferentes formulaciones para elegir la mejor en función del tamaño de partícula y PDI que cumpla además con el compromiso de utilizar la menor cantidad de reactivos y así generar la menor cantidad de residuos.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas del sistema elegido por medio del tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial Z, carga en superficie, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.
- Evaluar el perfil de liberación *in vitro* del sistema nanoparticulado híbrido de lípido-polímero cargado de atorvastatina.

5. Justificación

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad en nuestro país. La aterosclerosis es una de las causas principales del desarrollo de esta enfermedad la cual es multifactorial y la hipercolesterolemia es uno de los factores que se pueden controlar para prevenir y/o disminuir su desarrollo. Para tratar esta enfermedad existe una terapia basada en la disminución de la síntesis de colesterol con la administración de estatinas, fármacos inhibidores de la HMG-CoA.

La atorvastatina es uno de los fármacos que se usa en formas farmacéuticas convencionales, sin embargo; este fármaco pertenece a la clase II de la clasificación biofarmacéutica, es de baja solubilidad y por lo tanto exhibe una baja biodisponibilidad.

Además, la atorvastatina supone una mayor ventaja por sobre otras estatinas debido a que es una de las más selectivas para actuar a nivel hepático e inhibe por más tiempo la HMG-CoA reductasa.³⁴

Un sistema nanoparticulado híbrido de lípido polímero, es ideal para incorporar en su núcleo un fármaco de baja solubilidad, rodeado de un polímero hidrofílico natural biocompatible que pueda controlar la liberación y en conjunto incrementar la biodisponibilidad.

Es por estas razones que es conveniente formular un SLF modificado adecuado para liberar a la atorvastatina como un tratamiento para disminuir la hipercolesterolemia y por consecuencia prevenir la aterosclerosis.

6. Hipótesis

Tomando en cuenta las características de un SLF nanoparticulado de lípido-polímero se considera que es posible incorporar la atorvastatina en un sistema formado por gelatina y lecitina de tamaño nanométrico. De ser así, se podrá conseguir formar un sistema con tales características que pueda ser capaz de liberar la atorvastatina de manera prolongada y de esta manera dosificar el fármaco a mayores intervalos de tiempo.

7. Metodología

7.1 Materiales y equipo

7.1.1 Materiales

Gelatina de piel bovina tipo B BioReagent (Sigma), L- α -Fosfatidilcolina tipo IV-S, $\geq 30\%$ TLC (lecitina de soya) (Sigma), atorvastatina cálcica trihidratada (AC) (Sigma-Aldrich), glutaraldehído grado I (25% v/v) (Merck), acetona reactivo Baker ACS (J.T Baker), metanol reactivo Baker ACS (J.T Baker), Ácido clorhídrico (HCl) 0.2 M, agua desionizada ultra pura con 18.2 M Ω cm, bolsas para diálisis de celulosa regenerada estándar RC Tubing. MWCO 12-14kD. 16 mm (Spectrum). Todas las soluciones amortiguadoras se prepararon de acuerdo a la farmacopea USP 30-NF 25.³⁵

7.1.2 Equipo

Homogeneizador-dispersador Ultra Turrax® T18 digital (IKA), bomba de jeringa (Cole-Parmer), potenciómetro Orion 3 Star (Thermo Electron Corporation), centrífuga Biofuge Primo R (Thermo Electron Corporation), balanza analítica (Adventurer Ohaus), Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments), agitador vórtex tipo 37600 (Barnstead Thermolyne), detector de carga de partícula PCD 03 (Mutek Wet End Technology), espectrofotómetro SAD500 (Ocean Optics, Inc) con fuente de luz AIS DT1000 (Analytical Instrument Systems, Inc), ultrasonicador 8890 (Cole-Parmer), baño de agua LAB-LINE/Dubnoff Incu-Shaker (LAB-LINE Instruments, Inc).

7.2 Elaboración y caracterización de Nanopartículas híbridas

Las nanopartículas híbridas de gelatina (NPG) fueron preparadas por el método de desolvatación en un paso. En el laboratorio de Sistemas de Liberación, se tiene el antecedente de que el método de preparación de desolvatación en dos pasos funciona para preparar micropartículas híbridas gelatina-lecitina con montmorillonita como el descrito por García-Guzmán *et al.*³⁶

El método de desolvatación se basa en la adición de un agente desolvatante que reduce la disponibilidad del agua para mantener la gelatina en cadena en disolución. Lo que resulta en la aglomeración y formación de las partículas. Este método fue seguido similarmente al reportado por Bahareh Azimi *et al.* (Nanopartículas de gelatina como sistema de liberación para albúmina de suero bovino) con ligeros cambios que se reportan a continuación.³⁷

7.2.1 Desolvatación en un paso

Se disuelve la gelatina en agua desionizada bajo agitación y calentamiento constante (750rpm, 40°C). Una vez disuelta se agrega acetona y se deja en reposo hasta que precipite la gelatina de alto peso molecular. Se elimina el sobrenadante y se disuelve nuevamente en agua desionizada bajo agitación y calentamiento constante. Posteriormente, se ajusta la gelatina a pH 3 (añadiendo HCl 0.1 M).

De manera alterna, se disuelve la lecitina de soya y la cantidad correspondiente de atorvastatina en metanol bajo agitación y calentamiento constante (750 rpm, 30°C).

Esta disolución de lecitina de soya y atorvastatina se añade gota a gota a razón de 150 mL/h a la gelatina, bajo agitación constante a 13000 rpm con Ultra Turrax®.

Una vez terminado la adición, se deja en agitación constante para dejar evaporar al metanol por 12 horas. Al finalizar, se añade glutaraldehído al 2% y se deja en agitación nuevamente por 12 horas más.

7.3 Formulación

Para formular las NPG, se comenzó por sintetizar nanopartículas blanco, es decir, nanopartículas de gelatina sin el fármaco empleando el método de desolvatación en un paso anteriormente descrito con las siguientes condiciones (Tabla 1).

Concentración de gelatina	Volumen final	Cantidad de lecitina	Volumen de metanol
10 mg/mL	10.0 mL	100 mg	5.0 mL

Tabla 1. Condiciones iniciales de preparación por el método de desolvatación en un paso.

Para comprobar si la agitación al agregar la lecitina y el fármaco a la gelatina puede afectar el tamaño de partícula, se realizó una prueba (n=1) para evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño a diferentes velocidades del homogeneizador-dispersador (Ultraturrax® (750, 1500, 10000, 13000 rpm). Posteriormente, con la velocidad del dispersador fija, se varió la cantidad de metanol como segundo agente desolvatante para determinar si el volumen de disolvente en el que se disuelve la lecitina para ser agregada a la gelatina y ser dispersada, tiene algún efecto sobre el tamaño de partícula. Las condiciones fueron las siguientes (n=2) (Tabla 2):

Concentración de gelatina	Volumen final	Cantidad de lecitina	Volumen de metanol	Velocidad de agitación
10 mg/mL	10.0 mL	100 mg	5.0 mL/10.0 mL	13 000 rpm

Tabla 2. Condiciones de variación de volumen de metanol

Se estudió el impacto de la cantidad de lecitina en la disminución de tamaño de partícula, dejando la variable del volumen de metanol fija (n=3). Con las condiciones que se describen en la tabla 3.

Condición	Concentración de gelatina (mg/mL)	Volumen final (mL)	Cantidad de lecitina (mg)	Volumen de metanol	Velocidad de agitación (rpm)
A	10.0	10.0	100.0	5.0	13000
B	✓	✓	50.0	✓	✓
C	✓	✓	20.0	✓	✓

Tabla 3. Condiciones de variación en la cantidad de lecitina

Después de variar la velocidad, cantidad de metanol y de lecitina se evaluó el impacto sobre el tamaño de partícula y potencial Z de la cantidad de entrecruzante, glutaraldehído (2%) (n=3). Se utilizaron las condiciones C descritas anteriormente y solamente se varió la cantidad de entrecruzante en cinco niveles: 25, 50, 100, 300 y 500 μL .

Una vez fija la formulación, se prepararon las NPG con el fármaco atorvastatina y se caracterizaron por las técnicas que se describen a continuación.

7.4 Caracterización: Tamaño, potencial Z y carga en superficie.

Se determinó el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersión (PDI) para las NPG como para las NPG-Atorvastatina (NPG-ATV), utilizando la técnica de DLS usando un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments). Las mediciones se llevaron a cabo con un ángulo de detección fijo a 173° a una temperatura de $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$.

Adicionalmente se determinó el potencial Z con el mismo equipo con una dilución de 50 μL en 1.0 mL de agua desionizada.

Por último, para las NPG-ATV y las NPG se determinó la carga en superficie de partícula con un detector de carga de partícula PCD 03 (Mutek Wet End Technology) con una dilución de 1.2 mL en 25 mL de agua desionizada.

7.5 Eficiencia de entrappe (EE)

Se determinó la eficiencia de entrappe (%) de modo directo e indirecto, utilizando la cuantificación espectrofotométrica UV-VIS de la atorvastatina cálcica contenida en la dispersión de NPG-ATV.

7.5.1 Método directo

Se tomó una alícuota (1.0 mL) de la dispersión de NPG-ATV (n=3), se centrifugó a 14000 rpm (Biofuge Primo R) hasta obtener el botón de NPG (20 minutos). Posteriormente el botón se resuspendió en acetona (1.0 mL), luego se sonicó durante 30 minutos a 20°C a alta frecuencia (42 kHz) con un ultrasonificador (Cole-Parmer 8890), después, la última homogeneización se realizó con agitador vórtex (Barnstead Thermolyne) por 3 minutos. Se cuantificó la cantidad de atorvastatina cálcica del sobrenadante de acetona mediante la dilución de 50 µL de éste diluïdos a 10.0 mL en metanol.

La absorbancia de esta dilución se determinó con un espectrofotómetro SAD500 (Ocean Optics, Inc) con fuente de luz AIS DT1000 (Analytical Instrument Systems, Inc) a la longitud de onda de máxima absorción de la atorvastatina en metanol ($\lambda_{max}=250.57$ nm) para la cual se empleó una celda de cuarzo de 1 cm de ancho (Guanglianggaoke).

La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva patrón de atorvastatina cálcica en metanol en un intervalo de 1 a 30 µg/mL a partir de una disolución “stock” de 100 µg/mL (n=3). La linealidad y confiabilidad de las curvas patrón se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Centurion XVIII®.

Para calcular la eficiencia de entrappe (EE) por el método directo se utilizó la ecuación 9.

$$EE (\%) = \frac{\text{Fármaco en nanopartículas}}{\text{fármaco total}} * 100$$

Ecuación 9: Eficiencia de entrappe por el método directo

7.5.2 Método indirecto

Se tomó una alícuota (0.5mL) de la dispersión de NPG-ATV (n=3), se centrifugó a 14000 rpm (Biofuge Primo R) hasta obtener el botón de NP (20 minutos). Se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se diluyeron en 5.0 mL de metanol. Esta dilución se cuantificó con los mismos instrumentos detallados en el método directo y se utilizó la misma curva patrón de atorvastatina cálcica en metanol para conocer la cantidad de fármaco no encapsulado.

Para calcular la eficiencia de entrappe (EE) por el método indirecto se utilizó la ecuación 10.

$$EE (\%) = \frac{\text{Fármaco añadido} - \text{fármaco libre (SN)}}{\text{fármaco añadido}} * 100$$

Ecuación 10. Eficiencia de entrappe por el método indirecto

7.6 Capacidad de carga (CC)

Se tomó una alícuota (1.0 mL) de la dispersión de NPG-ATV (n=3), se centrifugó a 14000 rpm (Biofuge Primo R) por 30 min. Se separó el sobrenadante del botón y éste se dejó secando a temperatura ambiente hasta secar (5 días). La masa restante se pesó en una balanza analítica (Ohaus).

Para calcular la capacidad de carga, se utilizó el resultado de la determinación de EE por el método directo y la ecuación 11.

$$CC(\%) = \frac{\text{fármaco atrapado}}{\text{masa de partículas}} * 100$$

Ecuación 11: Capacidad de carga

7.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se determinó la morfología de las NPG-ATV por medio de la microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscopy*), SEM. Para analizar las muestras, se tomó una gota (10 μ L) de la dispersión y se depositó en el porta muestras, se dejó

evaporar el agua a temperatura ambiente. Las muestras se examinaron de dos maneras diferentes: unas muestras se recubrieron con oro y se visualizaron con imagen con detector de electrones secundarios en un microscopio electrónico de barrido JSM-5900-LV (JEOL) a 20.0 kV, otras se recubrieron con plata y se visualizaron con imagen con detector de electrones secundarios en un microscopio electrónico de barrido Karl Zeiss EVO MA 15 a 20.0 kV.

7.8 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Las nanopartículas blanco y con atorvastatina junto con los materiales que las componen (atorvastatina, gelatina bovina tipo B, lecitina) fueron caracterizados por FT-IR. Los espectros correspondientes se registraron con un espectrómetro Spectrum 400 FTIR/FIR (Perkin-Elmer). Los espectros se midieron en un intervalo de longitud de onda de 4000-400 cm^{-1} .

7.9 Estudios de liberación in vitro

El perfil de liberación de las NPG-ATV se evaluó mediante el método de bolsa de diálisis y se llevó a cabo en dos valores de pH, los cuales fueron cambiados consecutivamente. Las primeras 2.0 horas del experimento se llevaron a cabo en un medio amortiguador a pH 2.0 (HCl/KCl) y el tiempo posterior (28 horas) se llevó a cabo en una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0 (NaOH/ KH_2PO_4). El estudio de liberación se llevó a cabo en estas condiciones pretendiendo que la formulación de las NPG-ATV sea administrada por vía oral; así que, estas condiciones de pH son las que a grandes rasgos, experimentaría la formulación al ser administrada al pasar por el estómago y posteriormente al intestino delgado.³⁸

Las bolsas para diálisis de celulosa regenerada estándar de 12-14 kDa (Spectrum) se hidrataron por 12.0 horas en agua desionizada a temperatura ambiente.

Una cantidad conocida de las NPG-ATV en un volumen fijo se colocó dentro de las membranas hidratadas, las cuales fueron selladas herméticamente mediante bandas elásticas.

Las bolsas de celulosa hidratadas con un volumen fijo de la dispersión (n=6) fueron colocadas dentro de la primera solución amortiguadora a pH 2.0 en vasos de precipitados tapados. Previamente, cada vaso con solución amortiguadora fue puesto a equilibrar la temperatura ($37^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) la cual se mantuvo constante durante todo el experimento.

Se puso en agitación constante a 250 rpm el medio de disolución a pH 2.0 conteniendo a la bolsa con el sistema NPG-ATV, se tomaron alícuotas (2.0 mL) a tiempos fijos y se repuso el medio extraído. Pasada las primeras dos horas, la solución amortiguadora a pH 2.0 se drenó y se reemplazó con la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0. Se siguió con el mismo esquema de muestreo y reposición de medio.

Como control negativo, se llevó a cabo un control del proceso de liberación, para constatar que la liberación se debía al sistema de NPG y no debido a la membrana de celulosa.

Se realizó la cuantificación por medio de una curva patrón de atorvastatina cálcica tanto en el medio de la solución amortiguadora a pH 2.0 (HCl/KCl) como en la solución amortiguadora a pH 7.0 (NaOH/KH₂PO₄), ambas en un intervalo de 1 a 30 µg/mL a partir de una disolución stock de 100 µg/mL (n=3). La linealidad y confiabilidad de las curvas patrón se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Centurion XVIII®.

8. Resultados y Análisis

8.1 Condiciones de proceso

Es importante señalar que en el presente trabajo se reportan los tamaños de diámetro hidrodinámico (d) de las mediciones promedio de tamaño (Z-promedio), ya que en DLS este es el número más importante y estable que se produce por esta técnica.

8.1.1 Efecto de la velocidad de agitación

Es raramente reportado el uso de homogeneizadores en la elaboración de nanopartículas por el método de desolvatación en un paso, sin embargo, Jia X. y Qixin Z. reportaron el uso de la homogeneización de alta velocidad para la preparación de nanopartículas híbridas de timol.¹⁶ En el presente trabajo, se experimentó con cuatro niveles de velocidad.

La tabla 4 muestra los resultados (n=1) de tamaño y PDI en función del cambio en la velocidad de la homogeneización.

Velocidad de agitación (rpm)	Tamaño de partícula d(nm) \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)
750	1350 \pm 192.3	1.0 \pm 0.0
1500	699.6 \pm 38.28	0.461 \pm .056
10000	478.5 \pm 5.766	0.264 \pm 0.024
13000	397.3 \pm 4.359	0.197 \pm 0.028

Tabla 4. Resultados de tamaño y PDI para velocidad de homogeneización

A continuación, en las figuras 7 y 8 se ilustra el efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño y PDI de la partícula por medio de diagramas de barras.

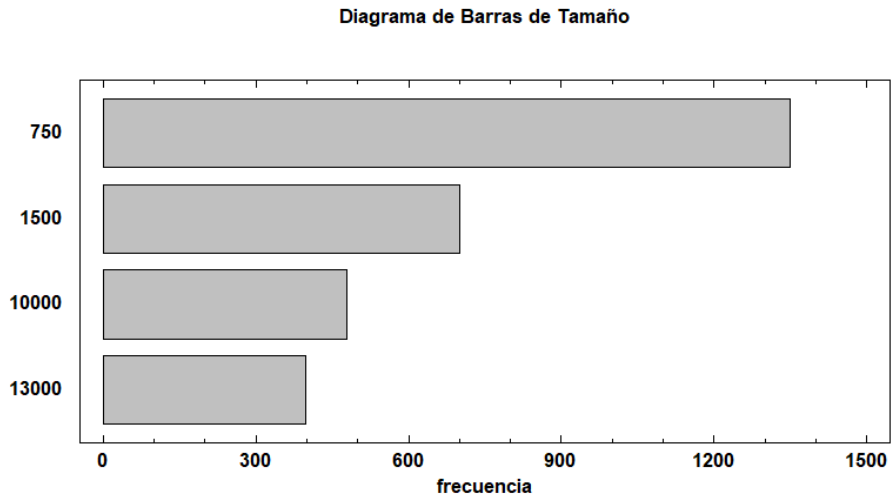


Figura 7. Gráfica de barras que muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula

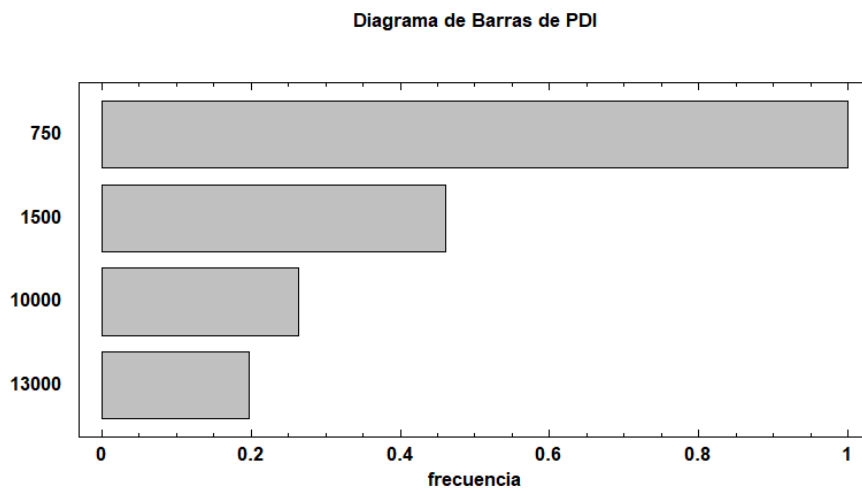


Figura 8. Gráfica de barras que muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre el PDI

Se tiene evidencia que la lecitina por si sola debido a su naturaleza anfifílica forma micelas al estar en el agua.³⁹ Sabiendo que la lecitina se puede agrupar en micelas en medio acuoso, la parte polar de la molécula también puede interactuar con moléculas polares como ciertas proteínas en este caso, la gelatina.¹⁶ Es decir, la gelatina y la lecitina pueden interactuar para formar partículas en dispersión formando un arreglo estable.

Debido a que se sabe que se puede formar este arreglo, la formación de la dispersión o emulsificación de la gelatina-lectina se lleva a cabo por medio de agitación u homogeneización a alta velocidad.

Como se observa en la tabla 4 y en las gráficas de las figuras 7 y 8, se aprecia una tendencia de la disminución del tamaño de partícula y de PDI en relación a la velocidad de agitación; es decir, a mayor velocidad de agitación, se obtiene un tamaño de partícula menor y un menor valor de PDI.

Esto se puede deber al hecho de que la lecitina al agitarse a alta velocidad, se dispersa en gotas más pequeñas y se asocia con las cadenas de gelatina precipitada. En cambio, cuando se dispersa a menores revoluciones por minuto, hay menos turbulencia en el ambiente y las gotas generadas de lecitina son de mayor tamaño.

Se demostró un efecto similar en la disminución del tamaño de partícula a mayor velocidad de agitación en la preparación de nanoacarreadores de quitosán reportados por Diky Mudhakhir.⁴⁰

La misma relación de aumento de velocidad-disminución de tamaño de partícula se reportó en la elaboración de microesferas de Eudragit RS 100 con teofilina encapsulada por Gülen Melike Demir *et al.*⁴¹

El valor de PDI también disminuye a mayor velocidad de agitación, probablemente debido al mismo fenómeno de agregación de la lecitina. A menor velocidad, más cantidad de lecitina se puede agregar entre sí junto con la gelatina y se formarán más poblaciones de partículas de diferentes tamaños a que si se homogeneizara a mayor velocidad.

A continuación se presenta la gráfica (figura 9) de distribución de tamaño por intensidad de señal de la medición de las partículas formadas con una agitación de 13000 rpm.

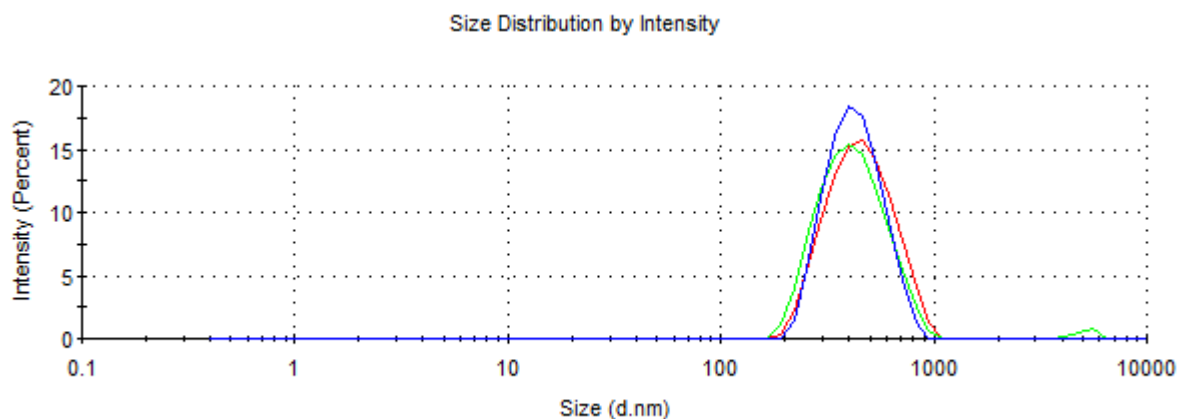


Figura 9. Distribución de tamaño (n=3) para las partículas dispersadas a 13000 rpm. El valor de PDI de 0.028 indica una distribución homogénea.

Debido a este resultado, la velocidad para crear la dispersión de partículas se fijó a 13000 rpm con el homogeneizador. Adicionalmente, se fijó un tiempo extra de 5.0 min de agitación para igualar aún más el tiempo de homogeneización después de terminar la adición de lecitina a la gelatina.

8.1.2 Efecto del volumen de metanol

La tabla 5 muestra los resultados de variar el volumen del metanol como segundo agente desolvatante (n=2) (los resultados desglosados se encuentran en el anexo 1.0):

	5.0 mL de metanol			10.0 mL de metanol		
Repetición	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV) (n=3)	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV) (n=3)
Promedio	350.23	0.381	18.03	242.26	0.208	16.40
Desv.Est (M)	17.07	0.018	2.66	5.68	0.107	2.66

Tabla 5. Resultados de tamaño, PDI y Potencial Z para dos distintos volúmenes de metanol (5.0 y 10.0 mL respectivamente, complemento estadístico en Anexo 1.1)

Se realizó la comparación de las medias de tamaño de los dos tratamientos con una prueba-T para comparar medias. (Anexo 1.1) Suponiendo varianzas iguales: $t=10.3962$, Valor-P=0.000483416

Debido a que el valor-P es menor que 0.05 se puede rechazar la hipótesis nula para $\alpha=0.05$.

Por lo tanto, se puede constatar que existe una diferencia significativa en el impacto del tamaño de partícula al variar el volumen de disolvente empleado para disolver la lecitina.

Se tiene como resultado que a mayor volumen de disolvente, menor tamaño de partícula. Esto puede ser debido a que, el metanol también actúa como un agente desolvatante, lo que reduce la solvatación de las cadenas de gelatina y tiene como resultado la aglomeración y subsecuente formación de las partículas.³⁷ Al agregar más agente desolvatante (10.0 mL), se precipita más gelatina de alto peso molecular en pequeñas partículas aunado al hecho de la homogeneización de alta velocidad.

Además, al estar disuelta en un mayor volumen, es como si se agregara más lentamente cada molécula de lecitina a la superficie de la gelatina y se conformara la partícula antes de que se unan más moléculas de la misma naturaleza.

De la misma manera que con el tamaño de partícula, se realizó la comparación de las medias de potencial Z de los dos tratamientos con una prueba-T para comparar medias. (Anexo 1.2)

Suponiendo varianzas iguales: $t=0.974172$, valor-P=0.385133, no se rechaza la hipótesis nula para $\alpha=0.05$. Es decir, las medias del valor para potencial Z de los dos niveles del volumen de metanol son estadísticamente iguales.

Con esta aseveración, se sabe que el volumen de metanol para disolver a la lecitina sólo tiene un efecto en el tamaño de partícula pero no en el potencial Z. Esto debido a que la composición final de la partícula es la misma y por lo tanto no se altera este valor.

A pesar de que claramente se obtiene un tamaño de partícula menor empleando una mayor cantidad de disolvente, y para cumplir uno de los objetivos del presente trabajo, se decidió optar por otras maneras de disminuir el tamaño de partícula que implicaran la utilización de menos recursos.

8.1.3 Efecto de la cantidad de lecitina

Los resultados del experimento en donde se varía la cantidad de lecitina se resumen en la tabla 6 (n=3). (Los resultados desglosados se reportan en el Anexo 1.3).

	Cantidad de lecitina (mg)	Tamaño promedio de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV) ± DE (n=3)
A	100.0	350.23 ± 17.06	0.381 ± 0.018	18.03 ± 2.66
B	50.0	246.56 ± 42.85	0.206 ± 0.117	17.83 ± 0.55
C	20.0	184.60 ± 19.22	0.267 ± 0.008	16.37 ± 1.51

Tabla 6. Resultados de tamaño promedio para los tres niveles diferentes de cantidad de lecitina.

Para comparar las medias de los grupos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (cantidad de lecitina) en los tres niveles descritos (20, 50, 100 mg). El valor-P obtenido de la prueba-F es menor que 0.05 (Anexo 1.4). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de tamaño (nm) entre un nivel de lecitina y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

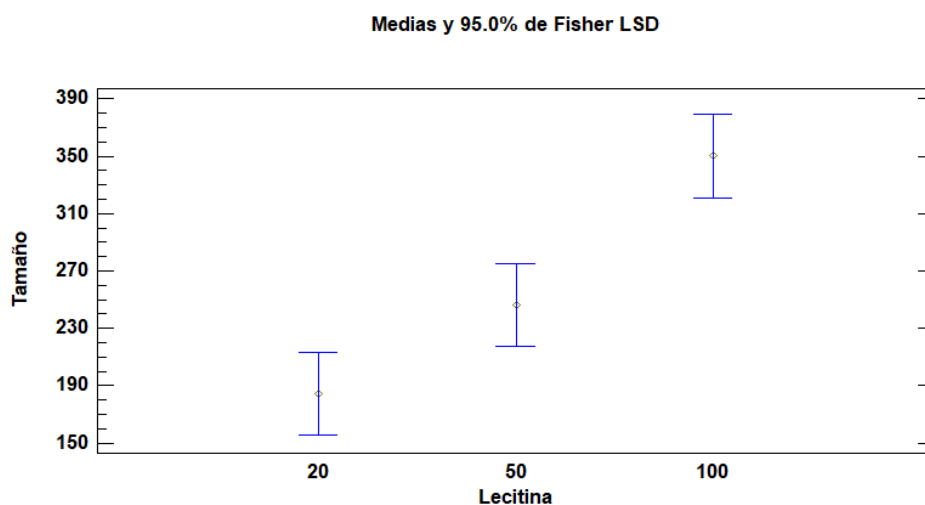


Figura 10. Gráfica de Medias y 95% de Fisher LSD de tamaño de partícula para los tres niveles de cantidad de lecitina.

En la figura 10, la gráfica de Medias y de Fisher LSD (La diferencia mínima significativa) demuestra que hay diferencia entre cualquier par de medias entre sí y entre las tres medias también ya que no hay ningún traslape entre ellas.

El resultado de la ANOVA (Anexo 1.4) confirma que existe una diferencia significativa entre las medias con un nivel del 95.0% de confianza debido a que el valor-P de la prueba-F es menor a 0.05.

Aunque el resultado de esta prueba y la gráfica de medias confirmen que las medias de los tres grupos son diferentes, se realizó una prueba de rango múltiple para confirmar la diferencia entre un nivel y otro.

El resultado de la prueba de múltiple rangos (Anexo 1.5) confirmó que las medias de los tres niveles del análisis (20 mg, 50 mg y 100 mg de lecitina) son diferentes entre sí con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, se puede manifestar que usar 20.0 mg de lecitina tiene un impacto significativo en la disminución del tamaño de partícula, confiriendo un tamaño de diámetro hidrodinámico promedio de 184.6 ± 19.22 nm.

En cuanto al potencial Z, también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (cantidad de lecitina) en los tres niveles descritos (20, 50, 100 mg) para conocer si estas cantidades tienen un impacto en el valor de potencial Z.

La tabla ANOVA (Anexo 1.6) indica que el valor-P de la razón-F es mayor o igual a 0.05, por lo tanto no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de potencial Z y entre un nivel de cantidad de lecitina y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

La figura 11 comprueba visualmente la aseveración anterior, ya que se puede observar un traslape entre los tres niveles para cantidad de lecitina. Por lo tanto, no fue necesario realizar la prueba de rango múltiple.

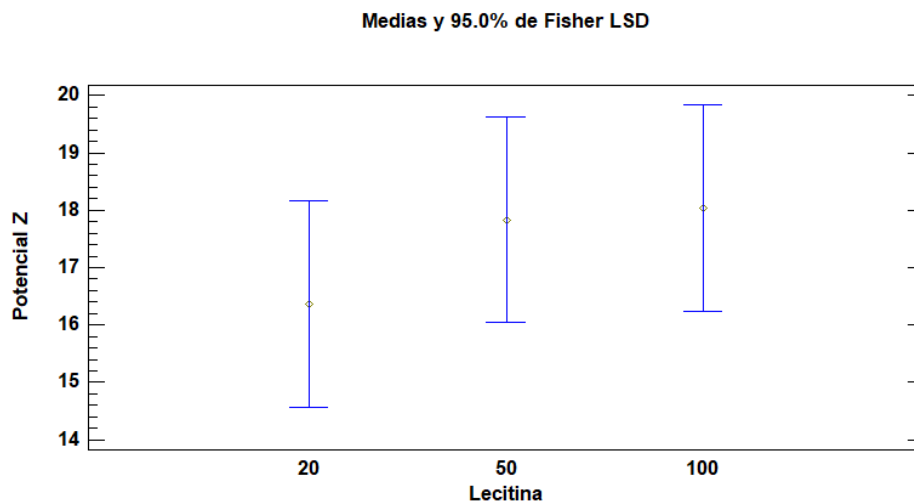


Figura 11. Gráfica de Medias y 95% de Fisher LSD de potencial Z para los tres niveles de cantidad de lecitina.

Concluida esta prueba estadística se puede confirmar que la cantidad de lecitina empleada en la formulación sólo tiene un impacto significativo en el tamaño (diámetro hidrodinámico) de la partícula y no sobre el potencial Z. Los factores más importantes que afectan el valor de potencial Z son el pH del medio y la fuerza iónica del medio.⁴² Debido a que el dispersante (agua) es desionizada, ésta no tiene un impacto relevante en el valor del potencial Z puesto que la fuerza iónica de una disolución resulta de la concentración de los iones presentes en ella.

De esta manera, el único factor constante en las formulaciones es el ajuste de pH a un valor de 3. Es decir, todas las formulaciones sin importar los cambios fueron ajustadas al mismo pH antes de hacer la dispersión y por lo tanto todas resultaron con el mismo pH final, ya que se mantuvo fijo el volumen de ácido agregado. Por estas razones los diferentes factores cambiados en la formulación no tienen un impacto sobre el potencial Z.

Como ya se ha mencionado, este tipo de SLF, las nanopartículas híbridas de polímero-lípido poseen la ventaja dual de ser particuladas y vesiculares, en la cual el fármaco se encapsula en el lípido que a su vez es estabilizado por el polímero.

Bajo esta afirmación, se conoce que este tipo de sistemas forman sistemas de tipo capsulares.¹⁵

Además, el proceso de solvatación en un paso, precipita la gelatina que forma a la partícula y alrededor de éste, el lípido de carácter anfifílico se auto ensambla. Como su nombre lo indica, el disolvente orgánico al difundirse en la solución acuosa, desolvata el medio alrededor de las cadenas poliméricas, lo que causa que precipite en nanopartículas.

Al adicionar el lípido, éste se auto ensambla formando el núcleo de la partícula por interacciones hidrofóbicas en un arreglo acorde a la naturaleza de las moléculas, lo que reduce la energía libre del sistema.⁴³

Por lo tanto, utilizar una menor cantidad de lecitina (20.0 mg) da como resultado un menor tamaño de partícula que se puede explicar con lo anteriormente descrito, ya que entre más lecitina se pueda auto ensamblar en el núcleo de la partícula, las partículas tenderán a tener un mayor tamaño.

Finalmente, basándose en uno de los objetivos del presente proyecto, se eligió continuar con la formulación de las NPG, con la menor cantidad de lecitina (20.0 mg) ya que otorga el menor tamaño de partícula, incluso que la formulación con mayor cantidad de disolvente de lecitina (metanol) y además, es la formulación que emplea el menor uso de reactivos y por lo tanto genera menos residuos.

8.1.4 Efecto de la cantidad de agente entrecruzante

Como paso final en la síntesis de las nanopartículas híbridas de gelatina-lecitina, está el entrecruzamiento. En este caso, se utilizó glutaraldehído (2% v/v).

Los agentes entrecruzantes en sistemas de liberación poliméricos se utilizan para solidificar las partículas creadas.¹⁵ El glutaraldehído es un aldehído multifuncional porque puede existir en varias formas en solución acuosa (monomérica, dimérica, trimérica, polimérica). Se ha usado ampliamente para entrecruzar proteínas porque puede reaccionar con muchos grupos funcionales reactivos de las proteínas, en especial con los grupos amino.⁴⁴

De manera resumida, el grupo aldehído (-CH=O) reacciona con los grupos amino de las cadenas poliméricas de gelatina (-NH₂-) para formar una aldimina (CH=N).

El objetivo principal de realizar esta reacción de entrecruzamiento es para consolidar la partícula de polímero creada y brindar mayor estabilidad. Se ha documentado el hecho de que las partículas de gelatina al ser entrecruzadas con glutaraldehído son más resistentes a pHs extremos y a altas temperaturas.⁴⁵

Debido a que el glutaraldehído puede reaccionar con cualquier grupo amino, el resultado de esta reacción puede generar entrecruzamiento intra-particular, el cual es el deseado pero también puede generar entrecruzamiento inter-particular.

Hasta el presente estudio de la formulación, se estuvo utilizando 25 µL de glutaraldehído (2% v/v). A continuación se analizó el efecto de la cantidad de glutaraldehído sobre el tamaño de partícula y potencial Z (Tabla 7).

Cantidad (µL)	Tamaño promedio de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV) ± DE (n=3)
25.0	184.60 ± 19.22	0.268 ± 0.008	16.37 ± 1.51
50.0	189.77 ± 2.84	0.235 ± 0.032	16.47 ± 3.50
100.0	196.13 ± 15.20	0.245 ± 0.022	17.50 ± 2.25
300.0	213.27 ± 9.74	0.234 ± 0.043	17.76 ± 2.08
500.0	214.40 ± 7.43	0.255 ± 0.048	16.70 ± 2.01

Tabla 7. Resultados de tamaño, PDI y potencial Z para los cinco niveles de cantidad de glutaraldehído.

En el anexo (1.7) se muestra el resumen estadístico para estos resultados así como el resultado de la tabla ANOVA, el cual revela que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, lo que indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en la media de tamaño entre un nivel de cantidad de glutaraldehído y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Como este análisis no determina qué medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la prueba de rango múltiple.

Mientras tanto, el gráfico de medias (figura 12), comprueba visualmente la aseveración anterior, ya que se puede apreciar un traslape entre las medias de 25, 50 y 100 μL y a su vez entre las medias de 100, 300 y 500 μL .

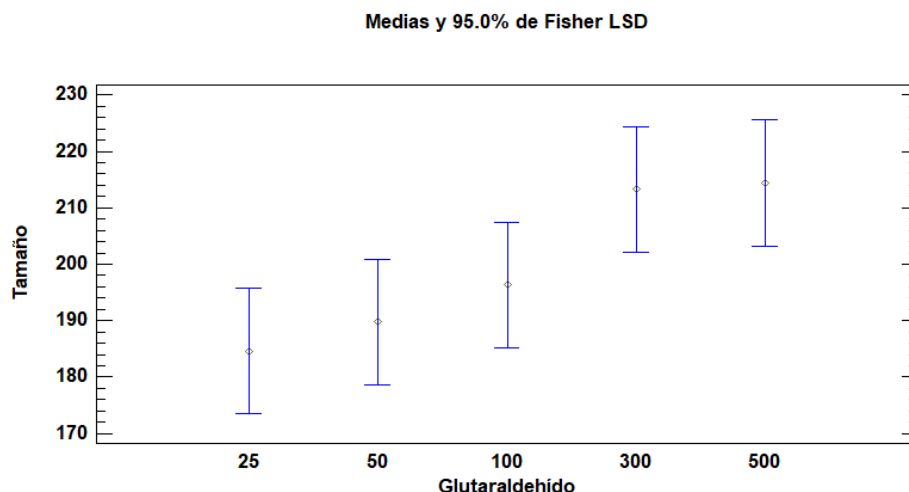


Figura 12. Gráfico de Medias y 95% de Fisher LSD de tamaño de partícula (nm) para los cinco niveles de cantidad de glutaraldehído (μL).

De acuerdo al resultado de la prueba de rango múltiple (anexo 1.8) las medias de los niveles de 25, 50 y 100 μL de glutaraldehído son grupos homogéneos, mientras que al mismo tiempo las medias de los niveles de 100, 300 y 500 μL muestran homogeneidad entre sí. Es decir, sólo existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza entre el nivel de 25 μL con 300 μL y 500 μL , y entre el nivel de 50 μL con 300 y 500 μL .

Por lo tanto, solo se tiene un impacto significativo en el aumento de tamaño al aumentar de 50 μL a 300 μL o incluso más volumen de glutaraldehído. El utilizar 25 μL o 50 μL e incluso 100 μL , otorgan un tamaño similar, estadísticamente hablando.

En cuanto a la influencia de la cantidad de agente entrecruzante en el potencial Z, también se realizó un análisis de varianza (ANOVA, anexo 1.10 y resumen estadístico anexo 1.9) con el cual se obtiene que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, por lo que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de potencial Z entre un nivel de cantidad de glutaraldehído y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Esto se puede comprobar visualmente a través del gráfico de medias (figura 13), ya que las medias y sus respectivos errores estándar se traslapan y no son diferentes unos de otros.

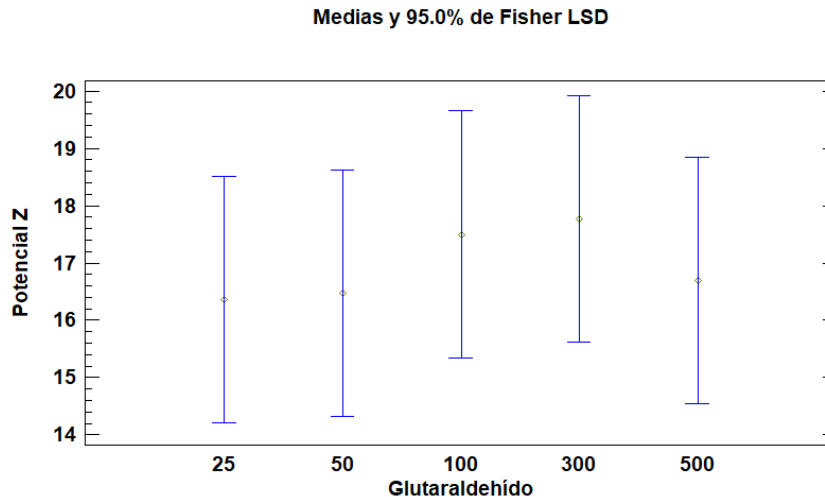


Figura 13. Gráfico de Medias y 95% de Fisher LSD de potencial Z (mV) para los cinco niveles de cantidad de glutaraldehído (μL).

De igual manera, la prueba de rango múltiple para potencial Z por cantidad de glutaraldehído (Anexo 1.11) comprueba que no hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias con un nivel del 95.0% de confianza y se considera que todas las medias de los diferentes niveles son homogéneas entre sí.

En resumen se puede decir que, el glutaraldehído reacciona con cualquier grupo amino que se encuentre en solución, es por eso que al haber más glutaraldehído disponible (300-500 μL) éste llega a reaccionar con las cadenas de gelatina que pueden quedar libres sin haber formado una partícula. Es decir, el glutaraldehído puede hacer que el tamaño de partícula crezca aún más al seguir agregando cadenas de gelatina. Además, se pueden generar entrecruzamiento no sólo intra-particular sino inter-particular lo que puede ocasionar que dos partículas queden fusionadas por medio de enlaces aldimina.

Así que, cumpliendo nuevamente con uno de los objetivos del proyecto, la cantidad de glutaraldehído para entrecruzar las NPG se fijó en 25 μL , porque produce el menor tamaño de partícula junto con las cantidades de 50 μL y 100 μL . Además, es el nivel que reduce la cantidad de reactivo a utilizar para la síntesis y éste es un hecho deseable ya que el glutaraldehído está catalogado como un agente tóxico. En este caso la toxicidad proviene del hecho que la reacción de entrecruzamiento es altamente heterogénea, por lo que los aldehídos que no reaccionaron son los que pueden causar efectos tóxicos. ⁴⁶

El poder entrecruzar con menor cantidad de glutaraldehído, asegura que queden menos moléculas sin reaccionar y por lo tanto las nanopartículas se puedan lavar más fácilmente de los aldehídos tóxicos.

Es poco notable el cambio del tamaño de partícula, hasta que se agrega mayor cantidad de entrecruzante, pero dado a los hechos mencionados relacionados a este evento, a continuación se analiza el impacto en el tamaño de partícula antes y después de entrecruzar las partículas de los casos anteriores. Se resumen los resultados en la tabla 8.

Nivel (cantidad de glutaraldehído en μL)	Tamaño promedio de partícula d(nm) antes de entrecruzar \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)	Tamaño promedio de partícula d(nm) después de entrecruzar \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)
25	178.26 \pm 15.28	0.217 \pm 0.020	184.60 \pm 19.22	0.268 \pm 0.008
50	169.07 \pm 3.03	0.233 \pm 0.021	189.77 \pm 2.84	0.235 \pm 0.032
100	169.70 \pm 4.94	0.239 \pm 0.025	196.13 \pm 15.20	0.245 \pm 0.022
300	172.47 \pm 8.68	0.233 \pm 0.013	213.27 \pm 9.74	0.234 \pm 0.043
500	177.13 \pm 5.08	0.224 \pm 0.016	214.40 \pm 4.43	0.255 \pm 0.048

Tabla 8. Resultados promedio (n=3) de tamaño de partícula y PDI antes y después de entrecruzar. Los resultados individuales para tamaño de partícula antes de entrecruzar se encuentran desglosados en el anexo 1.12

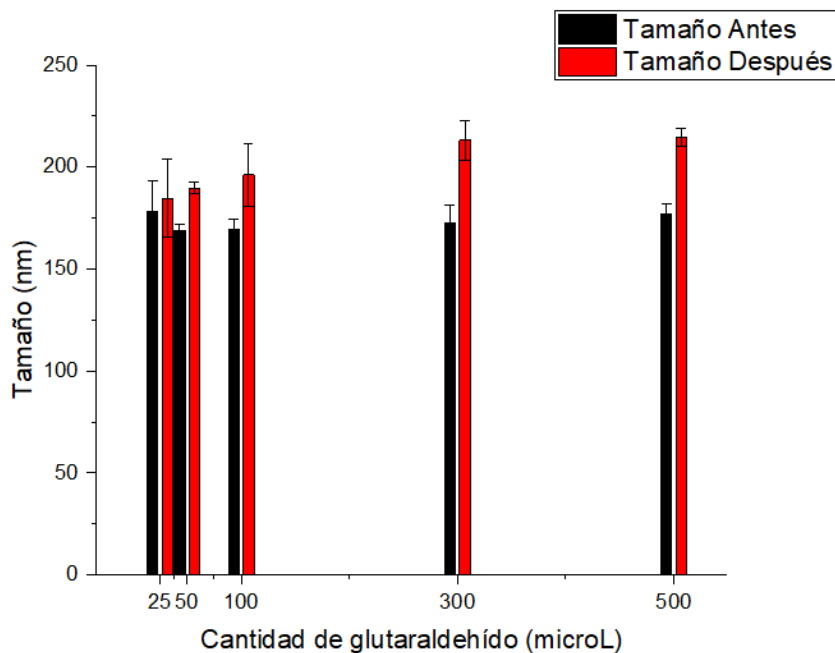


Figura 14. Gráfico de barras que muestra el cambio en el tamaño de partícula antes y después de entrecruzar.

Se realizó una prueba-T entre los resultados de tamaño de partícula antes y después de entrecruzar para analizar el impacto que tiene la reacción de entrecruzamiento en el tamaño de partícula.

Para el nivel de 25 μL , no hay una diferencia significativa entre el antes y el después con un nivel de confianza del 95.0% (Anexo 1.13). En el caso del nivel de 50 μL , sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias antes y después del entrecruzamiento con un nivel de confianza del 95.0% (Anexo 1.14).

Se realizó la misma prueba-T a las medias de los niveles 100, 300 y 500 μL en las condiciones de antes y después del entrecruzamiento (Anexo 1.15, 1.16, 1.17). Para todos éstos se demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellas. Visto de otra manera, a partir de entrecruzar con 50 o más μL de glutaraldehído, el tamaño de partícula aumenta significativamente de su tamaño inicial.

Estos resultados apoyan la teoría de que a mayor cantidad de glutaraldehído disponible las partículas formadas pueden reaccionar con algunas cadenas de gelatina sobrantes y enlazarse a la partícula aumentando su tamaño. Además sigue siendo posible el hecho de que puedan ocurrir enlaces aldimina interparticularmente.

Por ello, entrecruzar con 25 μ L de glutaraldehído (2% v/v) sigue siendo la mejor opción para la preparación de estas nanopartículas.

Con respecto al PDI, se ha mencionado que es un índice de la polidispersidad. Valores de PDI mayores a 0.7 indican que una muestra tiene una distribución de partícula muy amplia. Sin embargo, se tienen otros estándares para valores de PDI en las aplicaciones para sistemas de liberación que usan sistemas híbridos lipídicos. Para estos casos, un valor de PDI de 0.3 o menor es considerado aceptable e indica una población homogénea de las partículas.⁴⁷

Este es el caso para los resultados que se muestra en la tabla 6 con la formulación de 20 mg de lecitina y también para los resultados de la tabla 7 con la formulación de 25 μ L de glutaraldehído. Por lo tanto, con la formulación final, se obtiene de manera reproducible un valor de PDI inferior a 0.3, lo cual apoya el uso de esta formulación.

Recapitulando, la formulación elegida consta de lo siguiente: concentración de gelatina 10 mg/mL, cantidad de lecitina 20 mg, metanol como segundo agente desolvatante y disolvente de lecitina 5.0 mL y por último, entrecruzamiento con 25 μ L de glutaraldehído. Con esta formulación se evaluó la capacidad de encapsulación del fármaco atorvastatina por medio de la eficiencia de entrapamiento y capacidad de carga además de tamaño partícula, potencial de carga en superficie y PDI.

8.2 Nanopartículas de gelatina-lecitina con atorvastatina

En unas micropartículas híbridas de gelatina/compuesto de montmorillonita para la liberación controlada de atorvastatina por García-Guzmán³⁶ se demostró la

capacidad de encapsular a la atorvastatina con una eficiencia de entrappe del 67.30 ± 2.65 % en micropartículas de 1.42 ± 0.21 μm . Esta eficiencia de entrappe se dio a partir de preparar las micropartículas con 10.0 mg del fármaco. Partiendo de esta información, y debido a la diferencia de tamaño de las nanopartículas del presente trabajo, se utilizaron 5.0 mg para cargarlas de fármaco.

Los resultados de las NPG-ATV se observan en la tabla 9.

NPG-ATV	Tamaño de partícula d(nm) \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)	Potencial de carga en superficie (mV) \pm DE (n=3)
1	236.9 \pm 3.963	0.278 \pm 0.013	199 \pm 0
2	234.2 \pm 1.015	0.274 \pm 0.010	208 \pm 1.15
3	236.9 \pm 3.297	0.282 \pm 0.037	204 \pm 1.00
Promedio	236.0	0.278	203.89
Desv.Est (M)	1.55	0.004	4.83

Tabla 9. Resultados de tamaño de partícula y potencial de carga en superficie para las NPG-ATV

Se prepararon otras NPG con el fin de comparar el nuevo parámetro de potencial de carga en superficie (Tabla 10)

NPG	Tamaño de partícula d(nm) \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)	Potencial de carga en superficie (mV) \pm DE (n=3)
1	175.4 \pm 0.985	0.302 \pm 0.030	212.34 \pm 0.58
2	186.0 \pm 2.631	0.294 \pm 0.030	218 \pm 0.57
3	176.5 \pm 1.079	0.247 \pm 0.043	231.33 \pm 0.57
Promedio	179.30	0.281	220.77
Desv.Est (M)	5.83	0.029	9.67

Tabla 10. Resultados de tamaño de partícula y potencial de carga en superficie para las NPG.

Una prueba-T de comparación de medias (Anexo 2.1) confirma que las medias son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95.0%. Esto quiere decir que existe un aumento en el tamaño del diámetro hidrodinámico de la partícula de 56.7 nm al cargar las nanopartículas con fármaco. Este es un indicio de que efectivamente el sistema de liberación está conteniendo en cierta medida a la atorvastatina. Para calcular este parámetro, se calculó la eficiencia de entrappe (n=3).

Respecto al potencial Z, el resultado de potencial Z para las NPG, resultó de 16.37 ± 1.51 mV, éste valor resultó suficiente para tener las partículas sin flocular en suspensión, ya que se obtuvieron campanas de distribución de tamaño con PDI menor a 0.3. Debido a que no se tienen datos de potencial Z para las NPG-ATV pero sí se tienen de carga en superficie, se puede hacer una comparación del valor de potencial Z con el de carga en superficie de las NPG ya que de éstas si se tienen ambos valores. De las NPG se obtuvo un valor de potencial Z de 16.37 ± 1.51 mV y un valor de carga en superficie de 220.78 ± 9.67 mV. Como las NPG-ATV no cuentan con un valor de potencial Z pero sí de carga en superficie que es igual a 203.89 ± 4.83 mV, con éste se puede estimar que el valor de potencial Z sería un poco menor a 16.37 mV.

El valor de carga en superficie se utiliza para caracterizar sistemas coloidales en general aunque para sistemas coloidales con fines farmacéuticos se utiliza más el valor de potencial Z. Sin embargo, ambos están altamente relacionados debido a que el potencial de carga se refiere a la carga iónica de la doble capa eléctrica que también es una capa de contraiones al igual que la zona del potencial Z.⁴⁸

Un valor ideal de potencial Z en un sistema coloidal es aquel mayor a ± 30 mV, ya que se considera que con esos valores el sistema es estable y no tenderá a flocular.⁴⁹

Debido a que el valor de potencial Z del presente sistema nanoparticulado no cumple con ese parámetro, tiene una ligera tendencia a flocular, sin embargo aun así, este sistema muestra un buen valor de PDI y reproducibilidad de éste con cada muestra preparada.

8.3 Eficiencia de entrapamiento (EE)

Se obtuvo la eficiencia de entrapamiento para las NPG-ATV utilizando una curva patrón de atorvastatina en metanol (Anexo 2.2).

Los fármacos no solubles en agua o hidrofóbicos son de particular interés para los sistemas de liberación de fármacos. Se ha demostrado la capacidad de cargar un

sistema polimérico de gelatina con fármacos hidrofóbicos como el timol y la anfotericina B.^{16 15} Esto es posible en gran medida debido a la interacción de la parte hidrofóbica de la lecitina con el fármaco.

Se obtuvo una %EE por el método directo (n=3, anexo 2.3) de 86.22 ± 1.39 % y se obtuvo una %EE por el método indirecto (n=3, anexo 2.4) de 91.79 ± 0.12 %, éste valor es mayor en 5.57 unidades porcentuales al resultado por el método directo.

En un estudio por Rabea *et al.* se comparan los métodos de determinación de eficiencia de entrapamiento tanto directo como indirecto para un sistema liposomal de hidroquinona. Este estudio determinó que el método indirecto resultó más confiable que el directo, debido al error asociado al resuspender el botón de nanopartículas y partiendo de éste hacer una mayor dilución, en lugar de tomar el sobrenadante y hacer una dilución menor para cuantificar como en el caso del método indirecto. También se hace énfasis en que la desviación estándar por el método directo es mayor que la desviación estándar del método indirecto.⁵⁰ Hecho que también ocurrió en las determinaciones realizadas del presente trabajo.

Estos resultados de EE demuestran que el sistema es capaz de encapsular eficientemente a la atorvastatina. Estos valores son superiores a la %EE obtenida para la anfotericina B (50.61 ± 2.20 %) en un sistema de liberación de tamaño similar (253 ± 8 nm) y de composición similar (nanopartículas híbridas lipídicas).¹⁵

Además, también mejora la %EE obtenida para el mismo fármaco (atorvastatina), de las micropartículas híbridas con material compuesto de montmorillonita (67.30 ± 2.65 %). Por lo tanto, el sistema propuesto en el presente trabajo posee una buena %EE para atorvastatina.

8.4 Capacidad de carga (CC)

La capacidad de carga es un parámetro que muestra cuánto representa la masa del fármaco en la masa total de nanopartículas. Al utilizar el resultado de %EE obtenido por el método indirecto para calcular la CC, se obtiene un valor de 60.69 ± 13.06 %. Con la EE por el método directo y se obtiene una CC de un valor de 57.01 ± 13.06 %

(anexo 2.5). Esto significa que, poco más de la mitad de la masa de las nanopartículas en seco se debe al fármaco encapsulado.

8.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La caracterización de la morfología de las NPG-ATV se realizó por visualización directa a través de microscopía electrónica de barrido. Las fotos se muestran a continuación (Figura 15).

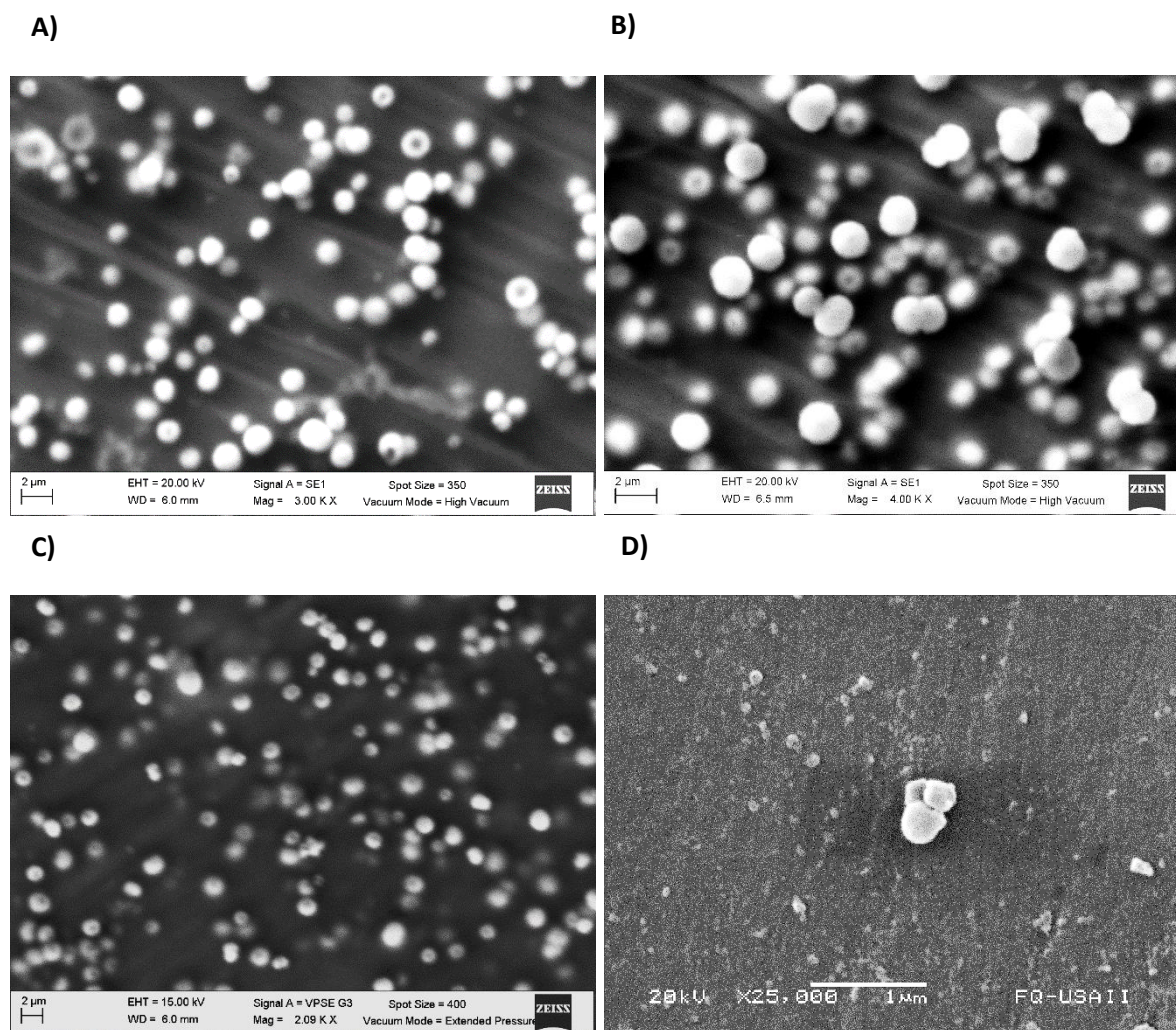


Figura 15. Imágenes de la microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema NPG-ATV. Las Imágenes de A-D muestran diferentes campos de observación

Con las imágenes obtenidas (A-D) por SEM, se observa que las NP tienen una morfología esférica de superficie lisa. De la imagen A hasta C se muestran campos

de visión con mayor carga de NP, de éstas se midieron con ImageJ, 90 partículas. Esta medición obtuvo un tamaño promedio de 835.55 ± 330.05 . (Anexo 3) Este valor de desviación estándar implica un coeficiente de variación del 39.5%, el cual es un valor de variación muy alto. Además, este valor no coincide con el tamaño promedio obtenido por DLS (236.0 ± 1.55), sin embargo se debe tener en cuenta que la microscopía electrónica sólo es capaz de observar campos que resultan poco representativos de toda la muestra y aunque la microscopía electrónica puede dar una medida de las nanopartículas, provee información limitada acerca de la distribución de tamaño y verdadero promedio de tamaño de toda la población.⁵¹

Entre los aspectos más importantes que se pueden observar en las imágenes de microscopía es que la mayoría de las partículas que aparentan tener mayor tamaño, en realidad son dos o tres NP unidas y hace que el tamaño promedio de las partículas aumente. Las partículas más grandes se observan más en la superficie del campo mientras que las más pequeñas se observan al fondo. Este fenómeno se aprecia más claramente en la figura 15B.

Haciendo énfasis en una observación más detallada de las partículas, algunas, sobre todo las de mayor tamaño se aprecian de forma aplastada lo que les da un aspecto de tener un mayor tamaño. Esto pudo haberse debido a que las preparaciones para SEM al estar deshidratadas adquirieron esa forma. Es decir, al estar en suspensión las partículas conservan su forma pero al evaporarse el disolvente, éstas se deformaron adquiriendo un aplastamiento sobre el porta muestras.

Además, como se observa en la figura 16, en la campana de distribución de tamaño para las NPG-ATV, existe un pequeño pico en la región de las micras que representa a un pequeño porcentaje (1.2%) de la población que puede estar concentrada en los campos observados por el SEM.

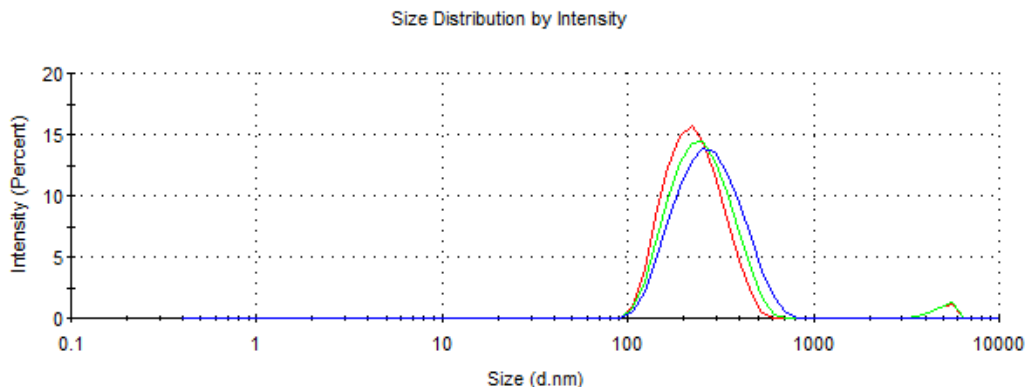


Fig 16. Distribución de tamaño de partícula (n=3) para NPG-ATV con PDI de 0.278

En las imágenes A-C, haciendo énfasis en la A, se aprecian algunas partículas con un surco o hueco en el medio, si la partícula da un indicio de que se puede ahuecar como las estructuras tipo “*core-shell*”⁵² que indican una nanocápsula.⁵³

Esto concuerda con el hecho de que este tipo de nanopartículas híbridas preparadas con el método utilizado generalmente resultan en ser nanocápsulas en lugar de nanoesferas.¹⁵

En este caso, es muy posible que esto suceda debido a que la atorvastatina, al ser un fármaco hidrofóbico se mantiene al interior de la partícula por interacciones electrostáticas con la lecitina y ésta a su vez rodeada con la gelatina, con ésta última debido a sus grupos aminos y carboxilos.⁵⁴

La figura 15D, muestra el campo de una preparación más diluida, y debido a esta dilución resulta la observación de partículas más aisladas (comparadas con las imágenes A-C) de un tamaño promedio de 262.33 ± 36.06 nm, valor de tamaño más semejante al obtenido por la técnica de DLS (236.0 ± 1.55), sin embargo, algo que se tiene que hacer notar es que en esta imagen, se observa el mismo fenómeno ya comentado para las tres imágenes anteriores; que las partículas están juntas formando flóculos.

La floculación ocurre en los coloides cuando la suma de las fuerzas de atracción es más fuerte que las fuerzas de repulsión. Existen distintos tipos de floculación, la floculación de puente, que ocurre cuando dos o más partículas coloidales se unen

por las cadenas poliméricas de la superficie de la partícula o la floculación de agotamiento, que ocurre por la influencia de algunas macromoléculas que se adsorben en la superficie de la partícula. De cualquier manera, cualquiera de las floculaciones son desestabilizaciones del sistema que lo llevan a agregarse.⁴⁹ Sin embargo estas no son las causas de floculación en el presente sistema.

Recordando que el valor de potencial Z para las NPG y NPG-ATV no es superior a ± 30.0 mV como ya se comentó anteriormente, el presente sistema tiene una ligera tendencia a flocular. Por lo tanto, es probable que al evaporarse el dispersante (agua) las partículas se aproximaron entre sí y al no tener un valor de potencial Z mayor a ± 30 mV flocularon y por eso aparecen unidas entre sí en todas las preparaciones de SEM sobre todo en la imagen 15D.

8.6 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

El estudio de microscopía infrarroja es esencial y crucial para elucidar la estructura de los materiales en la escala molecular. Por lo tanto, permite la determinación de componentes o grupos de átomos que absorben a frecuencias infrarrojas específicas.⁵⁵ Es decir, las materias primas por sí solas tendrán un espectro IR específico y característico, mientras que el análisis de un espectro IR de las NPG y las NPG-ATV puede mostrar la asociación de diferentes componentes en su síntesis e incluso evidenciar nuevas bandas debido a nuevos grupos formados por la reacción de entrecruzamiento.

Se realizó el estudio por FT-IR de las NPG y de las NPG-ATV así como de sus materias primas (gelatina, lecitina, atorvastatina y glutaraldehído). A continuación se muestran los espectros correspondientes en la figura 17.

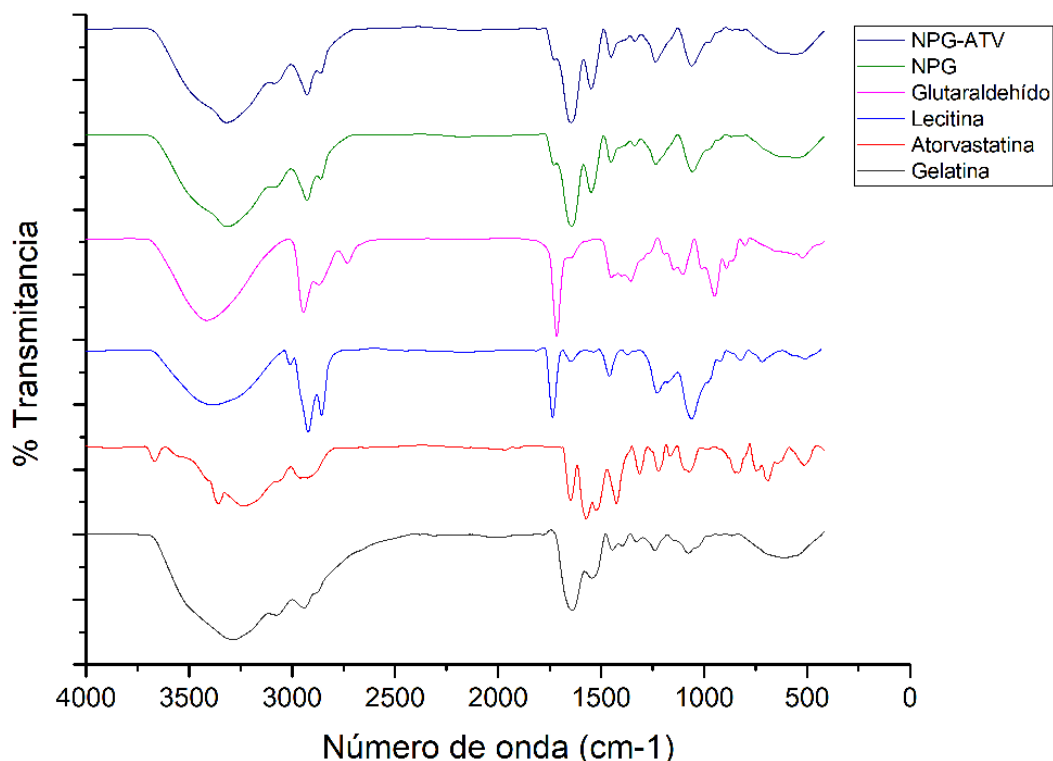


Figura 17. Espectro infrarrojo en orden descendente de las NPG-ATV, NPG, glutaraldehído, lecitina, atorvastatina y gelatina respectivamente.

El espectro infrarrojo de la materia prima principal, es decir, de la gelatina muestra señales en 3274 cm^{-1} y 1641 cm^{-1} correspondientes a los enlaces N-H y C=O respectivamente del enlace peptídico; también se muestra una señal correspondiente al estiramiento C-H en 2935 cm^{-1} y en 1531 cm^{-1} señal de la flexión del enlace C-N-H.⁵⁶

En cuanto al espectro infrarrojo de la atorvastatina cálcica, éste demuestra la presencia de una señal en 2903 cm^{-1} proveniente del estiramiento del enlace C-H, en 3244 cm^{-1} la señal del estiramiento del grupo hidroxilo de forma C-OH junto con la flexión del mismo O-H en 1071 cm^{-1} . En 1313 cm^{-1} se encuentra la señal del estiramiento del C-N, de esa misma región de la molécula el carbonilo (C=O) del grupo amídico presenta una señal en 1572 cm^{-1} . Se muestra también la señal en 3358 cm^{-1} del estiramiento del enlace N-H, una señal en 747 cm^{-1} que indica la

flexión del doble enlace C=C y por último la señal del estiramiento del enlace C-F en 690 cm^{-1} .⁵⁷

Respecto a la lecitina, las señales más importantes a notar son la del estiramiento del enlace N-H en 3446 cm^{-1} , la vibración del enlace C=O presente en 1736 cm^{-1} y 1230 cm^{-1} , el estiramiento de los enlaces C-H en el 2922 cm^{-1} y el de la vibración del PO₂ en 1230 cm^{-1} .^{58,59}

El espectro del glutaraldehído muestra la señal correspondiente a los enlaces C-H en 3423 cm^{-1} y en 2730 cm^{-1} .⁶⁰

El espectro infrarrojo de las NPG y de las NPG-ATV, muestra un espectro similar al de la gelatina, con la diferencia de que después del entrecruzamiento con el glutaraldehído, se muestran las señales de la amida A en 3321 cm^{-1} , de la amida B en 3127 cm^{-1} , de la amida I y de la amida II. El primer par originadas por una resonancia entre el primer sobre tono de la amida II y la vibración del estiramiento N-H. La amida I está asociada con la vibración del estiramiento del carbonilo (C=O) y la amida II resulta de la vibración del doblamiento del N-H y la vibración de estiramiento de C-N, sus respectivas señales se muestran en 1646 cm^{-1} y 1547 cm^{-1} . Por último, la señal más importante a notar en este espectro es de la señal en 1450 cm^{-1} que corresponde al enlace de aldimina (C=N) que comprueba el entrecruzamiento del glutaraldehído debido a la reacción entre el grupo aldehído (CHO) y el grupo amina de la gelatina. Las bandas de la atorvastatina se ven opacadas en las NPG-ATV por la de la gelatina y también en parte por las de la lecitina lo cual comprueba que el fármaco se encuentra contenido en la partícula.

8.7 Estudios de liberación de fármaco *in vitro*

Como se describió en la metodología, se evaluó el perfil de liberación a dos valores de pH siendo éstos de 2.0 y 7.0 debido a que el estómago tiene un pH promedio de 2.0 y el intestino delgado al igual que el colon tienen un pH alrededor de 7.0. Así mismo, el tiempo de tránsito en el estómago es en promedio de dos horas.⁶¹ El experimento de liberación se llevó a cabo en condiciones sink.

La confiabilidad de las curvas patrón (n=3) para cuantificar en los estudios de liberación in vitro se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las ecuaciones y resultado del ANOVA se muestran en el anexo 4.

El estudio de liberación (n=6) se monitoreó por 30 horas. Las absorbancias registradas durante este periodo de tiempo se muestran en el anexo 4.1. En el anexo 4.2 se encuentran el valor de los parámetros obtenidos de cada ajuste a los diferentes siete modelos matemáticos previamente descritos.

La adecuada selección del modelo para ajustar un perfil de disolución depende de diferentes criterios para evaluar un buen ajuste a un modelo matemático, dentro de los cuales los más utilizados en las ciencias farmacéuticas son la R^2 ajustada (R^2_{adj}), el criterio de información de Akaike (AIC) y el Criterio de selección del modelo (MSC).

Para modelos de liberación con el mismo número de parámetros, el coeficiente de determinación R^2 se puede usar para discriminar el modelo más apropiado, sin embargo cuando se comparan modelos con diferentes números de parámetros el coeficiente ajustado R^2_{adj} es más adecuado. El criterio de información de Akaike se ha utilizado desde hace décadas para seleccionar el modelo más óptimo. Cuando se comparan modelos con diferente número de parámetros, el modelo con un menor valor de AIC se considera el mejor, sin embargo no se puede conocer la diferencia estadísticamente significativa al comparar dos valores de AIC que se parecen debido a que la distribución de valores del AIC es indeterminada.

Por último el MSC es una forma recíproca modificada y normalizada del AIC para que no dependa del escalamiento de los puntos de los datos, por lo que el modelo más apropiado será aquel con el mayor valor de MSC. Generalmente un valor mayor de 2 a 3 indica un buen ajuste al modelo.

Finalmente, la selección del modelo no sólo se debe basar en el buen ajuste de los parámetros anteriores, sino también en la plausibilidad mecánica del modelo.⁶²

Dicho esto, es evidente el descarte de los modelos de orden cero y primero orden debido a que su valor de R^2 y R^2_{adj} son igual a 0.5707 y 0.8001 respectivamente.

Además de valores de AIC muy altos (157.0373 y 141.7508 respectivamente) y sus valores de MSC son muy bajos y menores a 2.

Esto concuerda con el hecho de que una cinética de liberación de orden cero describe el perfil de liberación de formas farmacéuticas de tipo transdermales así como de sistemas reservorio o sistemas osmóticos. Por otra parte, la liberación de primer orden se presenta en sistemas matriciales porosos que contienen fármacos hidrofílicos³⁰. Todos estos sistemas mencionados no son como el sistema presentado en este trabajo.

El modelo de Hixson-Crowell también es fácilmente descartable debido a que presentó un valor de R^2 y R^2_{adj} ambos iguales a 0.7335, un valor relativamente alto de AIC igual a 147.5012 y un valor de MSC igual a 1.1098, es decir, una valor inferior a 2.

Este modelo describe la cinética de liberación de un sistema erosionable, en el que el área de la partícula cambia con el tiempo.³⁰ Un tipo de sistema que no corresponde al preparado por lo que tampoco se esperaba una cinética de liberación que se describiera con este modelo.

De los modelos restantes, el modelo de Weibull y el de Peppas-Sahlin muestran los valores más altos de R^2 y R^2_{adj} , siendo los valores de ésta última igual a 0.9693 y 0.9932 respectivamente. No obstante, se debe recordar que de estos modelos el modelo de Peppas-Sahlin es un modelo semi-empírico y el modelo de Weibull es completamente un modelo empírico.

En el caso del modelo de Weibull esto quiere decir que la ecuación de este modelo se puede aplicar a casi todo tipo de curvas de disolución²⁸. Debido a ello, carece de fundamento para explicar la cinética de liberación en un sistema. Pese a esto, resulta útil cuando se usa para comparar perfiles de liberación entre diferentes tipos de sistemas matriciales.³⁰

De los modelos restantes, tanto el modelo de Higuchi como el de Korsmeyer-Peppas y el recién mencionado, el modelo de Peppas-Sahlin, tienen valores de R^2_{adj} superiores a 0.9, lo cual ya demuestra un buen ajuste. Sin embargo, dentro de ellos,

el modelo de Peppas-Sahlin sigue teniendo el mayor valor de R^2_{adj} (0.9932), en segundo lugar le sigue la R^2_{adj} de Higuchi (0.9433) y por último la R^2_{adj} de Korsemeier-Peppas (0.9405). El menor valor de AIC lo tiene el modelo Peppas-Sahlin (75.7998), mientras que Higuchi y Korsemeier-Peppas tienen un valor de AIC muy cercano entre sí (116.5521 y 118.4272, respectivamente). Finalmente estos tres modelos superan el valor de 2 en el parámetro MSC, siendo el modelo de Higuchi y el de Korsemeier-Peppas (de valor 2.6573 y 2.5635) superados notoriamente por el valor de MSC del ajuste al modelo Peppas-Sahlin (4.6949). (Anexo 4.2)

Teniendo en cuenta esto, si el criterio de selección sólo se hiciera con base en los parámetros de ajuste, el modelo seleccionado sería el modelo de Peppas-Sahlin, no obstante retomando lo ya mencionado en la selección del mejor modelo, ésta no sólo se debe hacer basándose en los parámetros sino en la plausibilidad mecánica del sistema. Además, es necesario hacer esto, debido a que los valores de R^2_{adj} son muy cercanos, así como los de AIC y no se puede conocer si realmente son estadísticamente diferentes.

Estos últimos tres modelos, son los modelos más empleados para describir la liberación de sistemas poliméricos. El modelo de Peppas-Sahlin proviene del modelo de Korsemeier-Peppas en el cual, bajo algunas situaciones experimentales, el mecanismo de liberación se deriva de la ecuación de Fick seguida de un comportamiento anómalo (no Fickiano). En este caso el valor de $n=0.489$, es decir, prácticamente un valor de $n=5$ indica un comportamiento de liberación por difusión de Fick (Anexo 4.3).

Este tipo de comportamiento se confirma por el Modelo de Peppas-Sahlin, el cual tiene dos componentes. Una contribución por parte de la difusión de Fick (caso I) y el segundo término de la ecuación 8 corresponde a la contribución caso II (de relajamiento). Sin embargo, el resultado de la constante k_2 del ajuste a este modelo es igual a cero, lo que elimina esta parte de la ecuación y por lo tanto la contribución del caso II. Al quedar sólo el primer término de la ecuación, confirma que la cinética

de liberación es mejor modelada por un mecanismo de difusión de acuerdo a las leyes de Fick.

Retomando el modelo de Korsmeyer-Peppas y su parámetro “n”, si éste toma un valor de 0.5, (el que indica un modelo de liberación controlado por la difusión) se convierte entonces en la misma ecuación que el modelo de Higuchi (Ecuación 4). Por estas razones, estos últimos tres modelos mencionados presentan un buen ajuste a los datos obtenidos.

A pesar de todo, debido a que la segunda parte de la ecuación en el modelo de Peppas-Sahlin se invalida debido al valor de cero de k_2 , resulta de mayor interés enfocarse en los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Ya se mencionó que los parámetros de éstos son muy similares, pero siguiendo el criterio de selección del modelo que no sólo se debe basar en el buen ajuste de los parámetros, sino también en la plausibilidad mecánica del modelo, el mejor modelo para explicar la liberación de ATV de las NPG-ATV es el modelo de Korsmeyer-Peppas con un mecanismo de difusión Fickiana.

El proceso en el que se da esta cinética de liberación por difusión de Fick se da en tres pasos. Primero, las pequeñas moléculas de disolvente se absorben en la superficie del polímero, luego las moléculas difunden por el polímero y por último, las moléculas del disolvente se desorben corriente abajo de la superficie del polímero.

El caso II de difusión no Fickiana explica la difusión en sistemas poliméricos que presentan límites definidos, es decir, regiones que separan al polímero seco del polímero hidratado o hinchado y se asume que estos límites se mueven de manera lineal con respecto al tiempo.⁶³

Este tipo de liberación caso II de relajamiento es un tipo de mecanismo asociado a estreses y a transiciones de estado en polímero vítreos hidrofílicos. Generalmente se refiere a la erosión de las cadenas poliméricas que da lugar a la liberación del fármaco.

Ya que con el modelo de Peppas-Sahlin se elimina esta parte de la ecuación, se infiere que no ocurre la difusión de la atorvastatina hacia el medio a causa de la erosión de la gelatina sino que sólo se debe a la contribución del hinchamiento del polímero y subsecuente relajación de las cadenas poliméricas abriendo paso para la difusión de las partículas. Esto concuerda con el hecho de que la gelatina no se encuentra en un estado vítreo y por lo tanto no presenta este comportamiento.

Korsmeyer-Peppas no sólo explica este mecanismo sino que además corresponde con el hecho de que éste es empleado para describir la liberación de fármaco de un sistema polimérico y esta ecuación se ha usado para modelar los datos de la cinética de liberación de microcápsulas o microesferas poliméricas (figura 18).²⁸

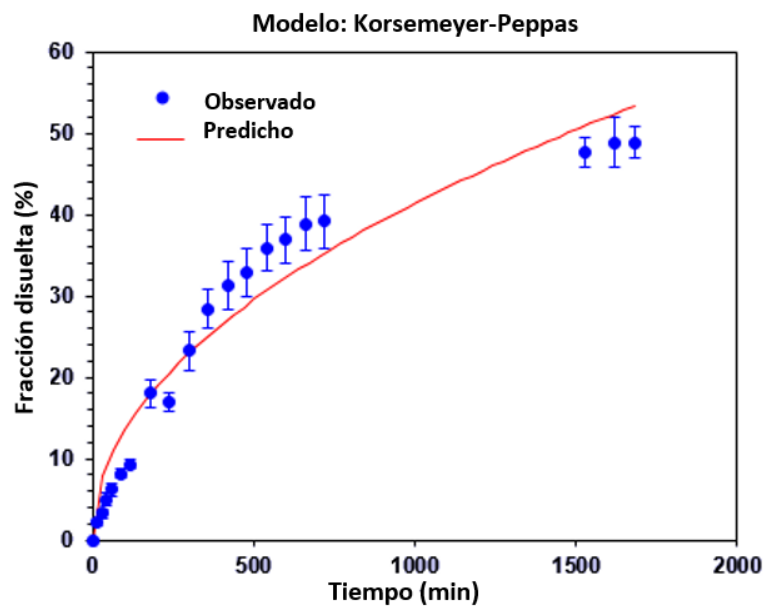


Fig 18. Ajuste del modelo de Korsmeyer-Peppas a los datos obtenidos de la liberación de atorvastatina de las NPG-ATV.

Es importante hacer notar que el porcentaje liberado total acumulado fue de 48.82% en un periodo de tiempo de 28 horas. Este periodo de 28 horas ya puede ser considerado un periodo de liberación prolongada y agregando que el tiempo de vida

media de la atorvastatina es de 14 horas, esto puede prolongar su dosificación por más tiempo.

En un estudio llevado a cabo por García-Guzmán *et al.* En el cual se prepararon micropartículas híbridas con material compuesto de montmorillonita para la liberación de atorvastatina, la máxima cantidad de porcentaje total acumulado liberado se llevó a cabo en 48 horas.³⁶ Esto concuerda con el hecho de que se tratan de micropartículas y se espera que partículas más pequeñas, en este caso nanopartículas liberen más rápido el contenido.

Además, este efecto de liberación prolongada se debe a que se ha reportado que la gelatina entrecruzada tiene una influencia significativa en la tasa de liberación del fármaco comparada a una matriz nanoparticulada no entrecruzada.

Finalmente, la liberación de la atorvastatina de las ATV-NPG se puede deber predominantemente a tres mecanismos, como la desorción, la difusión y la biodegradación eventual del polímero en cuestión.⁶⁴ Como ya se abordó, en este caso la difusión es el principal mecanismo que explica la cinética de liberación del fármaco de las NPG.

9. Conclusiones

- Se obtuvo la mejor formulación para sintetizar nanopartículas híbridas de gelatina lecitina (NPG) modificando diferentes variables en el método de desolvatación en un paso y utilizando la menor cantidad de reactivo, por lo tanto disminuyendo la cantidad de residuos generados.
- Las nanopartículas híbridas fueron cargadas con el fármaco y se demostró que tiene una alta eficiencia de entrapamiento (>80.0 %) y capacidad de carga (>60.0%)
- Las NPG-ATV fueron caracterizadas tanto por el tamaño, PDI, potencial Z y carga en superficie demostrando una buena consistencia y reproducibilidad en el método de preparación, así como de condiciones adecuadas para ser catalogado como un sistema de liberación nanoparticulado.
- La caracterización por FT-IR demostró la factibilidad de la reacción de entrecruzamiento, en el paso final de la síntesis y la microscopía electrónica de barrido demostró la morfología esférica de las partículas.
- Las nanopartículas preparadas presentaron una liberación prolongada de atorvastatina por casi 28 horas con un mecanismo de cinética de liberación explicado por el modelo de Korsmeyer-Peppas.
- El presente sistema de liberación (NPG-ATV), formulado con materiales de baja toxicidad y además de bajo costo se puede tomar en cuenta para planear una estrategia para formular una forma farmacéutica y tratar la hipercolesterolemia con uno de los fármacos ya reconocidamente seguros y eficaces.

10. Perspectivas

- Evaluar las mejores condiciones para preservar la formulación, como liofilizarla y determinar las condiciones para hacerlo.
- Estudiar las nanopartículas con microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Realizar estudios de estabilidad de la formulación.
- Realizar estudios de liberación *in vivo* y farmacocinética en animales.
- Elegir y formular la forma farmacéutica adecuada para administrar la presente formulación intencionada para su administración por vía oral.

11. Anexos

11.1 Anexo 1: Formulación

1.0.- Resultados desglosados de tamaño de partícula, PDI y potencial Z por dos niveles de volumen de metanol

Los resultados desglosados del tamaño de partícula y potencial Z por la variación del volumen de metanol como segundo agente desolvatante (n=2) fueron los siguientes:

Repetición	5.0 mL de metanol			10.0 mL de metanol		
	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV) (n=3)	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV) (n=3)
1	354.3±4.155	0.371±0.028	19.1±0.321	238.5±8.664	0.085±0.018	15.1±0.500
2	364.9 ±19.96	0.403 ± 055	20.0 ±1.01	239.5±6.357	0.273±0.016	16.8±0.529
3	331.5±12	0.371±0.130	15.0 ±0.80	248.8±0.195	0.268±0.057	17.3±1.50
Promedio	350.23	0.381	18.03	242.26	0.208	16.40
Desv. Est (M)	17.07	0.018	2.66	5.68	0.107	2.66

Tabla 11. Resultados desglosados de tamaño de partícula y potencial Z por la variación del volumen de metanol

1.1.- Complemento estadístico de la tabla 5 y comparación de medias

Resumen estadístico para tamaño de partícula por volumen de metanol

	<i>5.0 mL Metanol</i>	<i>10.0 mL Metanol</i>
Recuento	3	3
Promedio	350.233	242.267
Desviación Estándar	17.0673	5.68008
Coefficiente de Variación	4.87313%	2.34456%
Mínimo	331.5	238.5
Máximo	364.9	248.8
Rango	33.4	10.3
Sesgo Estandarizado	-0.715133	1.18218
Curtosis Estandarizada		

Tabla 12. Resumen estadístico para tamaño de partícula por volumen de metanol

Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar las pruebas que comparan las desviaciones estándar. En este caso, ambos valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro del rango esperado.

Comparación de medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de 5.0 mL Metanol: 350.233 +/- 42.3976
[307.836, 392.631]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de 10.0 mL Metanol: 242.267 +/- 14.1101
[228.157, 256.377]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: 107.967 +/- 28.834 [79.1327, 136.801]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = 10.3962 valor-P = 0.000483416

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

1.2.- Resumen estadístico para potencial Z por volumen de metanol y comparación de medias

	<i>5.0 mL metanol</i>	<i>10.0 mL metanol</i>
Recuento	3	3
Promedio	18.0333	16.4
Desviación Estándar	2.66521	1.15326
Coefficiente de Variación	14.7793%	7.03205%
Mínimo	15.0	15.1
Máximo	20.0	17.3
Rango	5.0	2.2
Sesgo Estandarizado	-1.06951	-0.970881
Curtosis Estandarizada		

Tabla 13. Resumen estadístico para potencial Z por volumen de metanol

Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar las pruebas que comparan las desviaciones estándar. En este caso, ambos valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro del rango esperado.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de 5 mL metanol: 18.0333 +/- 6.62074 [11.4126, 24.6541]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de 10 mL metanol: 16.4 +/- 2.86485 [13.5352, 19.2648]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: 1.63333 +/- 4.6551 [-3.02177, 6.28844]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $media_1 = media_2$

Hipótesis Alt.: $media_1 \neq media_2$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0.974172$ valor-P = 0.385133

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

1.3.- Resultados desglosados de tamaño de partícula para cantidad de lecitina (n=3).

Condición A: 100 mg	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV)± DE (n=3)
1	354.3±4.155	0.371±0.028	19.1±0.321
2	364.9 ±19.96	0.403 ± 055	20.0 ±1.01
3	331.5±12.00	0.371±0.130	15.0 ±0.80
Promedio	350.23	0.381	18.03
Desv. Est (M)	17.06	0.018	2.66

Tabla 14. Resultados de tamaño de partícula y potencial Z bajo las condiciones A

Condición B: 50 mg	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV)± DE (n=3)
1	223.8±5.255	0.118±0.014	17.8±1.395
2	296.0±7.002	0.340±0.078	17.3±1.00
3	219.9±2.122	0.160±0.034	18.4±0.723
Promedio	246.56	0.206	17.83
Desv. Est (M)	42.85	0.117	0.55

Tabla 15. Resultados de tamaño de partícula y potencial Z bajo las condiciones B

Condición C: 20 mg 19.118.1	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)	Potencial Z (mV)± DE (n=3)
1	170.1±2.937	0.261±0.026	18.1±0.100
2	177.3±4.050	0.265±0.035	15.7±0.737
3	206.4±10.34	0.277±0.023	15.3±1.51
Promedio	184.60	0.267	16.37
Desv. Est (M)	19.22	0.008	1.51

Tabla 16. Resultados de tamaño de partícula y potencial Z bajo las condiciones C

1.3.1.- Complemento estadístico del análisis del efecto de la cantidad de lecitina sobre el tamaño de partícula.

Lecitina (mg)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
20	3	184.6	19.2195	10.4114%	170.1	206.4	36.3
50	3	246.567	42.8549	17.3807%	219.9	296.0	76.1
100	3	350.1	17.287	4.93773%	331.1	364.9	33.8
Total	9	260.422	76.615	29.4195%	170.1	364.9	194.8

Tabla 17. Resumen estadístico para tamaño de partícula por la cantidad de lecitina (mg)

1.4.- Complemento estadístico. Tabla ANOVA del análisis del efecto de la cantidad de lecitina sobre el tamaño de partícula

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	41949.3	2	20974.6	25.12	0.0012
Intra grupos	5009.55	6	834.924		
Total (Corr.)	46958.8	8			

Tabla 18. Tabla ANOVA para tamaño de partícula por cantidad de lecitina (mg)

La razón-F, que en este caso es igual a 25.1216, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Tamaño entre un nivel de Lecitina y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

1.5.- Prueba de Múltiple Rangos para tamaño de partícula por cantidad de lecitina (mg)

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Lecitina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
20	3	184.6	X
50	3	246.567	X
100	3	350.1	X

Tabla 19. Prueba de Múltiple Rangos para tamaño por cantidad de lecitina

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
20 – 50	*	-61.9667	57.7294
20 – 100	*	-165.5	57.7294
50 – 100	*	-103.533	57.7294

Tabla 20. Contraste entre los niveles de cantidad de lecitina

El asterisco (*) que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

1.6.- Tabla ANOVA para potencial Z por cantidad de lecitina (mg)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.96889	2	2.48444	0.77	0.5045
Intra grupos	19.4	6	3.23333		
Total (Corr.)	24.3689	8			

Tabla 21. Tabla ANOVA para potencial Z por cantidad de lecitina

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Potencial Z entre un nivel de Lecitina y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

1.7.- Complemento estadístico. Tamaño de partícula por cantidad de entrecruzante (glutaraldehído)

Resumen Estadístico para Tamaño

<i>Glutaraldehído</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
25	3	184.6	19.2195	10.4114%	170.1	206.4
50	3	189.767	2.83784	1.49544%	186.7	192.3
100	3	196.333	14.888	7.58304%	180.6	210.2
300	3	213.267	9.74491	4.56936%	202.7	221.9
500	3	214.4	7.43572	3.46816%	209.1	222.9
Total	15	199.673	16.2858	8.15621%	170.1	222.9

Tabla 22. Resumen estadístico para tamaño de partícula por cantidad de entrecruzante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2214.47	4	553.617	3.69	0.0427
Intra grupos	1498.7	10	149.87		
Total (Corr.)	3713.17	14			

Tabla 23. Tabla ANOVA para tamaño por cantidad de glutaraldehído

La razón-F, que en este caso es igual a 3.69398, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Tamaño entre un nivel de Glutaraldehído y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

1.8.- Prueba de Múltiple Rangos para tamaño por cantidad de glutaraldehído.

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Glutaraldehído</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
25	3	184.6	X
50	3	189.767	X
100	3	196.333	XX
300	3	213.267	X
500	3	214.4	X

Tabla 24. Prueba de Múltiple Rangos para tamaño por cantidad de glutaraldehído

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
25 - 50		-5.16667	22.2718
25 - 100		-11.7333	22.2718
25 - 300	*	-28.6667	22.2718
25 - 500	*	-29.8	22.2718
50 - 100		-6.56667	22.2718
50 - 300	*	-23.5	22.2718
50 - 500	*	-24.6333	22.2718
100 - 300		-16.9333	22.2718
100 - 500		-18.0667	22.2718
300 - 500		-1.13333	22.2718

Tabla 25. Contraste entre los niveles de cantidad de glutaraldehído para tamaño de partícula

El asterisco (*) que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

1.9.- Resumen estadístico para Potencial Z por cantidad de glutaraldehído.

<i>Glutaraldehído</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
25	3	16.3667	1.51438	9.2528%	15.3	18.1
50	3	16.4667	3.5019	21.2666%	12.9	19.9
100	3	17.5	2.25167	12.8667%	15.2	19.7
300	3	17.7667	2.07926	11.7032%	15.4	19.3
500	3	16.7	2.00749	12.0209%	14.8	18.8
Total	15	16.96	2.08354	12.285%	12.9	19.9

Tabla 26. Resumen estadístico para potencial Z por cantidad de glutaraldehído.

1.10.- Complemento estadístico. Tabla ANOVA para potencial Z por cantidad de glutaraldehído

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.816	4	1.204	0.22	0.9240
Intra grupos	55.96	10	5.596		
Total (Corr.)	60.776	14			

Tabla 27. Tabla ANOVA para potencial Z por cantidad de glutaraldehído

La razón-F, que en este caso es igual a 0.215154, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Potencial Z entre un nivel de cantidad de glutaraldehído y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

1.11.- Prueba de Múltiple Rangos para potencial Z por cantidad de glutaraldehído.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Glutaraldehído	Casos	Media	Grupos Homogéneos
25	3	16.3667	X
50	3	16.4667	X
500	3	16.7	X
100	3	17.5	X
300	3	17.7667	X

Tabla 28. Prueba de Múltiple Rangos para potencial Z por cantidad de glutaraldehído.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
25 - 50		-0.1	4.30365
25 - 100		-1.13333	4.30365
25 - 300		-1.4	4.30365
25 - 500		-0.333333	4.30365
50 - 100		-1.03333	4.30365
50 - 300		-1.3	4.30365
50 - 500		-0.233333	4.30365
100 - 300		-0.266667	4.30365
100 - 500		0.8	4.30365
300 - 500		1.06667	4.30365

Tabla 29. Contraste entre los niveles de cantidad de glutaraldehído para potencial Z.

En ninguna columna se señala (*) lo que significa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza.

1.12.- Resultados desglosados de tamaño de partícula antes del entrecruzamiento.

25 µL	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)
1	161.4±3.853	0.205±0.011
3	182.2±4.313	0.206±0.028
3	191.2±5.303	0.241±0.013
Promedio	178.26	0.217
Desv. Est (M)	15.28	0.020

Tabla 30. Resultados de tamaño de partícula antes de entrecruzar con 25 µL de glutaraldehído.

50 µL	Tamaño de partícula d(nm) ± DE (n=3)	PDI ± DE (n=3)
1	164.7±1.980	0.237±0.006
2	175.1±13.08	0.255±0.014
3	167.4±12.52	0.222±0.037
Promedio	169.07	0.233
Desv. Est (M)	3.03	0.021

Tabla 31. Resultados de tamaños de partícula antes de entrecruzar con 50 µL de glutaraldehído.

100 μ L	Tamaño de partícula d(nm) \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)
1	172.5 \pm 8.937	0.239 \pm 0.043
2	164.0 \pm 5.797	0.215 \pm 0.051
3	172.6 \pm 4.252	0.265 \pm 0.042
Promedio	169.70	0.239
Desv. Est (M)	4.94	0.025

Tabla 32. Resultados de tamaños de partícula antes de entrecruzar con 100 μ L de glutaraldehído

300 μ L	Tamaño de partícula d(nm) \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)
1	175.4 \pm 1.706	0.218 \pm 0.041
2	162.7 \pm 3.064	0.242 \pm 0.021
3	179.3 \pm 2.758	0.231 \pm 0.052
Promedio	172.47	0.233
Desv. Est (M)	8.68	0.013

Tabla 33. Resultados de tamaños de partícula antes de entrecruzar con 300 μ L de glutaraldehído

500 μ L	Tamaño de partícula d(nm) \pm DE (n=3)	PDI \pm DE (n=3)
1	171.4 \pm 1.015	0.242
2	181.1 \pm 4.455	0.216
3	178.9 \pm 3.394	0.213
Promedio	177.13	0.224
Desv. Est (M)	5.08	0.016

Tabla 34. Resultados de tamaños de partícula antes de entrecruzar con 500 μ L de glutaraldehído

Comparación de la media de tamaño de partícula de los 5 grupos antes de entrecruzar

Medias y 95.0% de Fisher LSD

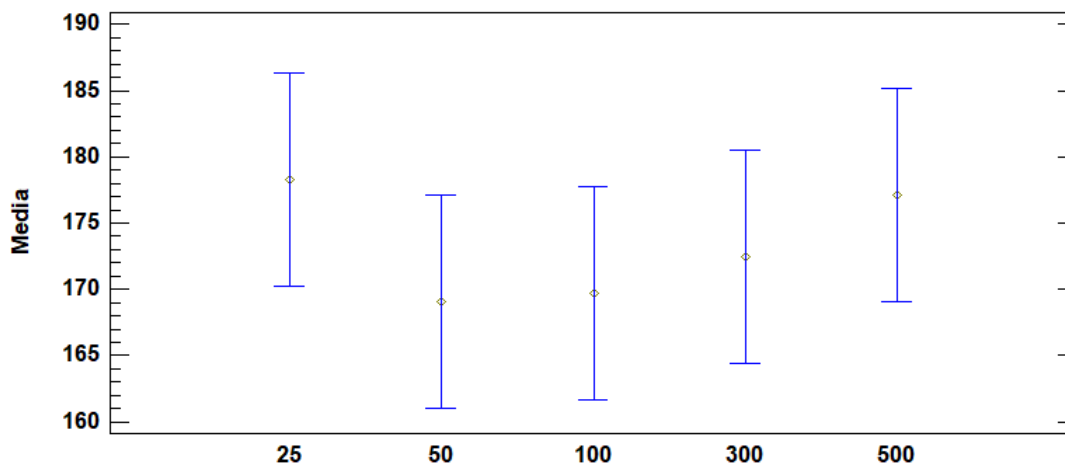


Figura 19. Gráfico de medias y 95% de Fisher LSD que demuestra que todos los grupos tienen el mismo tamaño antes de entrecruzar.

1.13.- Efecto del entrecruzamiento. Prueba-T entre antes y después de entrecruzar con 25 μ L de glutaraldehído.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Antes: 178.267 +/- 37.9686 [140.298, 216.235]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Después: 184.6 +/- 47.7439 [136.856, 232.344]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

Suponiendo varianzas iguales: -6.33333 +/- 39.3631 [-45.6965, 33.0298]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -0.446718 valor-P = 0.678198

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias se extiende desde -45.6965 hasta 33.0298. Puesto que el intervalo contiene el valor de 0, no hay diferencia significativa entre las medias de las dos muestras de datos, con un nivel de confianza del 95.0%.

1.14.- Efecto del entrecruzamiento. Prueba-T antes y después de entrecruzar con 50 μ L de glutaraldehído.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Antes: 169.067 +/- 13.4059 [155.661, 182.473]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Después: 189.767 +/- 7.04958 [182.717, 196.816]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

suponiendo varianzas iguales: -20.7 +/- 9.77384 [-30.4738, -10.9262]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -5.88025 valor-P = 0.00417972

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias se extiende desde -30.4738 hasta 10.9262. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

1.15.- Efecto del entrecruzamiento. Prueba-T entre antes y después de entrecruzar con 100 µL de glutaraldehído.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Antes: 169.7 +/- 12.2632 [157.437, 181.963]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Después: 196.333 +/- 36.9839 [159.349, 233.317]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

Suponiendo varianzas iguales: -26.6333 +/- 25.143 [-51.7764, -1.49028]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -2.94102 valor-P = 0.0423456

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias se extiende desde -51.7764 hasta -1.49028. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

1.16.- Efecto del entrecruzamiento: Prueba-T entre antes y después de entrecruzar con 300 µL de glutaraldehído.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Antes: 172.467 +/- 21.5624 [150.904, 194.029]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Después: 213.267 +/- 24.2077 [189.059, 237.474]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

Suponiendo varianzas iguales: -40.8 +/- 20.9192 [-61.7192, -19.8808]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -5.41508 valor-P = 0.00563533

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, se extiende desde -61.7192 hasta 19.8808. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

1.17.- Efecto del entrecruzamiento: Prueba-T entre antes y después de entrecruzar con 500 µL de glutaraldehído.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Antes: 177.133 +/- 12.6333 [164.5, 189.767]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Después: 214.4 +/- 18.4714 [195.929, 232.871]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

Suponiendo varianzas iguales: -37.2667 +/- 14.4405 [-51.7072, -22.8261]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -7.16519 valor-P = 0.00200837

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, se extiende desde -51.7072 hasta -22.8261. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

11.2 Anexo 2: NPG-ATV

2.1.- Comparación de medias y prueba-T entre NPG y NPG-ATV

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Tamaño NPG: 179.3 +/- 14.4785 [164.822, 193.778]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Tamaño NPG-ATV: 236.0 +/- 3.87239 [232.128, 239.872]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias suponiendo varianzas iguales: -56.7 +/- 9.6712 [-66.3712, -47.0288]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -16.2777 valor-P = 0.0000833538

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias se extiende desde -66.3712 hasta -47.0288. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

2.2.- Curva patrón de atorvastatina. Eficiencia de entrampe

Se preparó una curva patrón de atorvastatina cálcica en metanol a partir de una solución stock. La curva comprende 7 puntos de concentración en un intervalo de 1-30 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Desv. Est (M)
30	1.328	1.331	1.377	1.345	0.027
25	1.138	1.099	1.15	1.129	0.026
20	0.87	0.872	0.951	0.898	0.046
15	0.657	0.665	0.726	0.682	0.038
10	0.449	0.449	0.501	0.466	0.030
5	0.223	0.23	0.258	0.237	0.018
1	0.023	0.006	0.044	0.024	0.019

Tabla 35. Concentraciones y absorbancias de la curva patrón atorvastatina en metanol

Se analizó la linealidad y confiabilidad de estas curvas patrón mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se obtuvo la ecuación promedio de dichas curvas. Los resultados de dicho análisis son:

Ecuacion de forma lineal: $Y = a + b \cdot X$

Parámetro	Intercepto (a)	Pendiente (b)
valor	0.000514	0.045507

Tabla 36. Valores de la pendiente e intercepto de la curva patrón atorvastatina en metanol

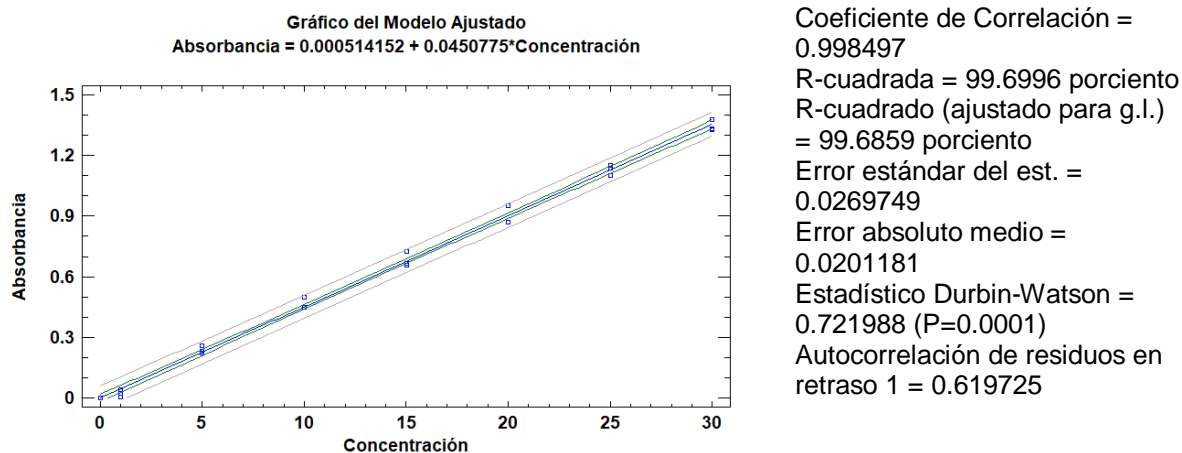


Figura 20. Gráfico del ajuste de la curva patrón atorvastatina en metanol

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5.31263	1	5.31263	7301.10	0.0000
Residuo	0.0160082	22	0.000727647		
Total (Corr.)	5.32863	23			

Tabla 37. Tabla ANOVA del ajuste de la curva patrón de atorvastatina en metanol

Debido a que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.6996% de la variabilidad en la absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.998497, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

2.3.- Eficiencia de entrapamiento: método directo

	1	2	3
	0.955	0.96	0.869
	1.048	0.963	1.094
	0.969	0.962	0.934
Promedio	0.990667	0.961667	0.965667
SD	0.050143	0.001528	0.115794
Cantidad de ATV en mg	4.390983	4.26238	4.280118
%EE	87.81966	85.2476	85.60237
Promedio %EE	86.22321		
STDV.S	1.393901		

Tabla 38. Datos de absorbancia del experimento de eficiencia de entrapamiento por el método directo

2.4.- Eficiencia de entrapamiento: método indirecto.

	1	2	3
	0.08	0.076	0.083
	0.073	0.061	0.06
	0.079	0.086	0.082
Promedio	0.077333	0.074333	0.075
STDV.S	0.003786	0.012583	0.013
%EE	91.64891	91.86919	91.85941
Promedio %EE	91.79251		
STDV.S	0.124451		

Tabla 39. Datos de absorbancia del experimento eficiencia de entrapamiento por el método indirecto

2.5.- Capacidad de carga

	Masa NPG-ATV (mg) en 1.0 mL		
	1	2	3
	1.8	1.3	1.1
	2.1	1.4	1.3
	2.1	1.5	1.5
Promedio	2	1.4	1.3
%CC (EE 91.79%)	45.895	65.56429	70.60769
%CC promedio	60.68899		
STDEV.S	13.05778		
%CC (EE 86.22%)	43.11	61.58571	66.32308
%CC promedio	57.00626		
STDEV.S	13.0643		

Tabla 40. Datos de masa de las NPG-ATV del experimento capacidad de carga

11.3 Anexo 3. Mediciones de SEM

Partícula	Imagen A	Imagen B	Imagen C	Imagen D
1	850	1320	836	300
2	702	885	688	218
3	1235	725	1018	269
4	894	732	580	
5	2528	605	1107	
6	1140	813	761	
7	761	620	788	
8	604	782	881	
9	522	468	870	
10	765	514	676	
11	1416	511	931	
12	1300	476	1244	
13	960	614	799	
14	570	426	435	
15	626	512	820	
16	820	444	922	
17	751	519	863	
18	1238	555	1402	
19	716	1574	1062	
20	559	728	914	
21	710	434	567	
22	636	877	609	
23	971	713	984	
24	657	1489	1045	
25	934	596	939	
26	1054	485	618	
27	702	512	618	
28	808	555	676	
29	1000	720	986	
30	900	1439	1589	
Promedio	835.5556			262.3333
Desv. Est	330.0468			36.06245
CV	39.50029			13.7468

Tabla 41. Medidas de partículas (en nm) en el campo de las imágenes de SEM. El tamaño fue medido con el software ImageJ

11.4 Anexo 4. Estudios de liberación *in vitro*

Se prepararon curvas patrón de atorvastatina cálcica en los medios amortiguadores pH 2.0 y pH 7.0 de HCl/KCl y NaOH/KH₂PO₄ respectivamente, ambas en un intervalo de 1 a 30 µg/mL a partir de una disolución stock de 100 µg/mL (n=3)

Concentración (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Desv. Est (M)
1	0.035	0.035	0.042	0.037	0.004
3	0.107	0.109	0.126	0.114	0.010
6	0.216	0.211	0.227	0.218	0.008
9	0.323	0.324	0.339	0.329	0.009
15	0.527	0.526	0.546	0.533	0.011
18	0.630	0.632	0.655	0.639	0.014
24	0.849	0.847	0.879	0.858	0.018
30	1.047	1.042	1.094	1.061	0.029

Tabla 42. Absorbancias tomadas a una $\lambda=244.15$ nm de diferentes concentraciones de atorvastatina cálcica para la curva patrón en la solución amortiguadora HCl/KCl a pH 2.0

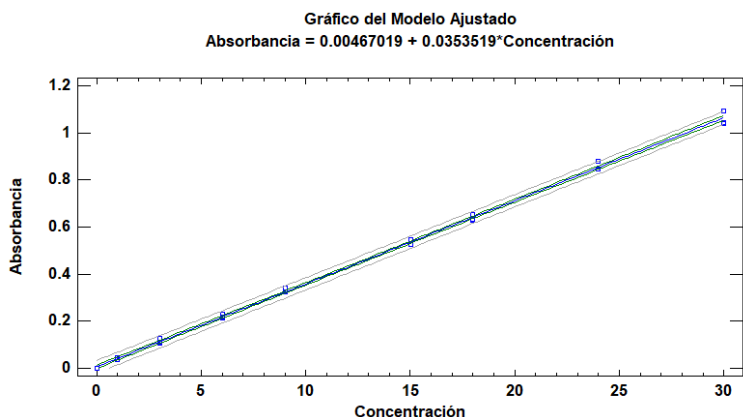
Concentración (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Desv. Est (M)
1	0.031	0.035	0.030	0.032	0.003
3	0.120	0.121	0.110	0.117	0.006
6	0.233	0.226	0.223	0.227	0.005
9	0.349	0.339	0.336	0.341	0.007
15	0.579	0.544	0.547	0.557	0.019
18	0.690	0.635	0.643	0.656	0.029
24	0.891	0.875	0.843	0.870	0.024
30	1.098	1.077	1.088	1.088	0.010

Tabla 43. Absorbancias tomadas a una $\lambda=244.15$ nm de diferentes concentraciones de atorvastatina cálcica para la curva patrón en la solución amortiguadora NaOH/ KH₂PO₄ a pH 7.0

Se analizó la linealidad y confiabilidad de estas curvas patrón mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se obtuvo la ecuación promedio de dichas curvas. Los resultados de dicho análisis son: Ecuación de forma lineal: $Y = a + b \cdot X$

Parámetro	Intercepto (a)	Pendiente (b)
valor	0.00467019	0.0353519

Tabla 44. Valores de la pendiente y del intercepto de la curva patrón de atorvastatina en la solución amortiguadora HCl/KCl a pH 2.0



Coeficiente de Correlación = 0.999431
 R-cuadrada = 99.8862 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.8817 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0124232
 Error absoluto medio = 0.00923424
 Estadístico Durbin-Watson = 0.468238 (P=0.0000)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.655773

Figura 21. Gráfico del ajuste de la curva patrón de atorvastatina en la solución amortiguadora HCl/KCl a pH 2.0

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	3.38767	1	3.38767	21950.00	0.0000
Residuo	0.0038584	25	0.000154336		
Total (Corr.)	3.39153	26			

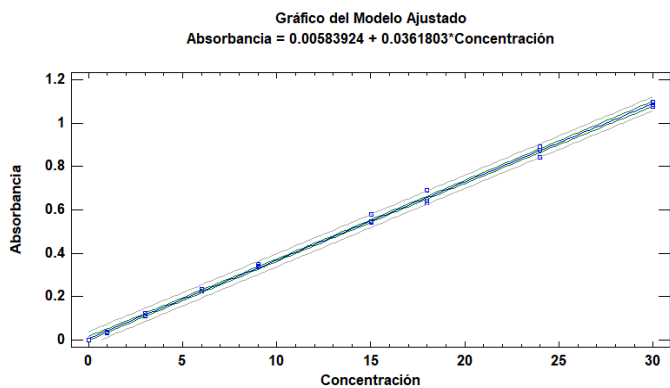
Tabla 45. Tabla ANOVA del ajuste de la curva patrón de atorvastatina en la solución amortiguadora HCl/KCl a pH 2.0

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo ajustado explica 99.8862% de la variabilidad en la absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.999431, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables

Parámetro	Intercepto (a)	Pendiente (b)
valor	0.00583924	0.0361803

Tabla 46. Valores de la pendiente e intercepto de la curva patrón en la solución amortiguadora NaOH/KH₂PO₄ a pH 7.01



Coefficiente de Correlación =
0.999262

R-cuadrada = 99.8525 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.8466 por ciento
Error estándar del est. = 0.0144815
Error absoluto medio = 0.0105836
Estadístico Durbin-Watson = 0.757162 (P=0.0001)
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.617161

Fig 22. Gráfico del ajuste de la curva patrón en la solución amortiguadora NaOH/ KH₂PO₄ a pH 7.01

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	3.5483	1	3.5483	16919.80	0.0000
Residuo	0.00524283	25	0.000209713		
Total (Corr.)	3.55355	26			

Tabla 47. Tabla ANOVA del ajuste de la curva patrón en la solución amortiguadora NaOH/ KH₂PO₄ a pH 7.01

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-cuadrada indica que el modelo ajustado explica el 99.8525% de la variabilidad en la absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.999262 lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables.

4.1.- Valores de absorbancia medidos durante el estudio de liberación *in vitro*

	Repetición					
	Absorbancia					
Tiempo min	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0
15	0.030	0.044	0.036	0.051	0.035	0.034
30	0.050	0.070	0.046	0.060	0.061	0.045
45	0.069	0.098	0.091	0.068	0.084	0.085
60	0.096	0.113	0.098	0.089	0.120	0.090
90	0.115	0.138	0.136	0.140	0.127	0.137
120	0.164	0.153	0.141	0.154	0.146	0.143
180	0.119	0.163	0.129	0.186	0.135	0.151
240	0.255	0.310	0.287	0.273	0.267	0.286
300	0.345	0.421	0.379	0.356	0.339	0.429
360	0.455	0.497	0.429	0.440	0.425	0.520
420	0.487	0.561	0.482	0.458	0.476	0.569
480	0.496	0.595	0.513	0.496	0.498	0.585
540	0.531	0.595	0.591	0.550	0.554	0.658
600	0.544	0.591	0.597	0.583	0.575	0.679
660	0.570	0.666	0.615	0.603	0.592	0.715
720	0.564	0.691	0.624	0.603	0.605	0.700
1530	0.732	0.780	0.778	0.743	0.765	0.817
1620	0.746	0.768	0.791	0.776	0.750	0.880
1680	0.746	0.769	0.883	0.803	0.791	0.771
1740	0.738	0.760	0.763	0.723	0.671	0.768
1800	0.727	0.766	0.771	0.734	0.723	0.773

Tabla 48. Valores de absorbancia a cada tiempo de cada repetición del estudio de liberación *in vitro*

Anexo 4.2.- Parámetros de ajuste a diferentes modelos matemáticos de liberación de fármaco

Parámetro	Modelo						
	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsemeyer-Peppas	Hixson-Crowell	Peppas-Sahlin	Weibull
R ²	0.5707	0.8001	0.9433	0.9436	0.7335	0.9939	0.9725
R ² adj	0.5707	0.8001	0.9433	0.9405	0.7335	0.9932	0.9693
AIC	157.0373	141.7508	116.5521	118.4272	147.5012	75.7998	106.0732
MSC	0.6330	1.3974	2.6573	2.5635	1.1098	4.6949	3.1812

Tabla 49. Parámetros de ajuste a diferentes modelos matemáticos del estudio de liberación.

Anexo 4.3.- Parámetros de las ecuaciones de los modelos matemáticos ajustados

Modelo	Ecuación	Parámetros
Orden cero	$Q = Q_0 + k_0 * t$	K0=0.038
Primer orden	$Q = 100 * (1 - e^{-k_1*t})$	K1=0.001
Higuchi	$Q = kH * t^{0.5}$	kH=1.311
Korsemeyer-Peppas	$Q = kKP * t^n$	kKP=1.429 n=0.489
Hixson-Crowell	$Q = 100 * (1 - (1 - kHC * t)^3)$	kHC = 0
Peppas-Sahlin	$Q = k_1 * t^m + k_2 * t^{2m}$	K1=0.195 K2=0 m=0.867
Weibull	$Q = 100 * \left(1 - e^{-\left(\frac{(t - T_i)^\beta}{\alpha}\right)}\right)$	$\alpha=69.461$ $\beta=0.526$ Ti=37.275

Tabla 50. Parámetros determinados de las ecuaciones para cada modelo matemático

4.4.- Prueba control del experimento de liberación

Para comprobar que los datos obtenidos del estudio de liberación no estuvieran influenciados por alguna interacción del fármaco con la membrana de celulosa. Se realizó un experimento control, es decir, del fármaco sin el sistema nanoparticulado, en el cual se demuestra que el fármaco no tiene afinidad por la membrana de celulosa y por lo tanto el comportamiento de la cinética de liberación se debe solamente al sistema.

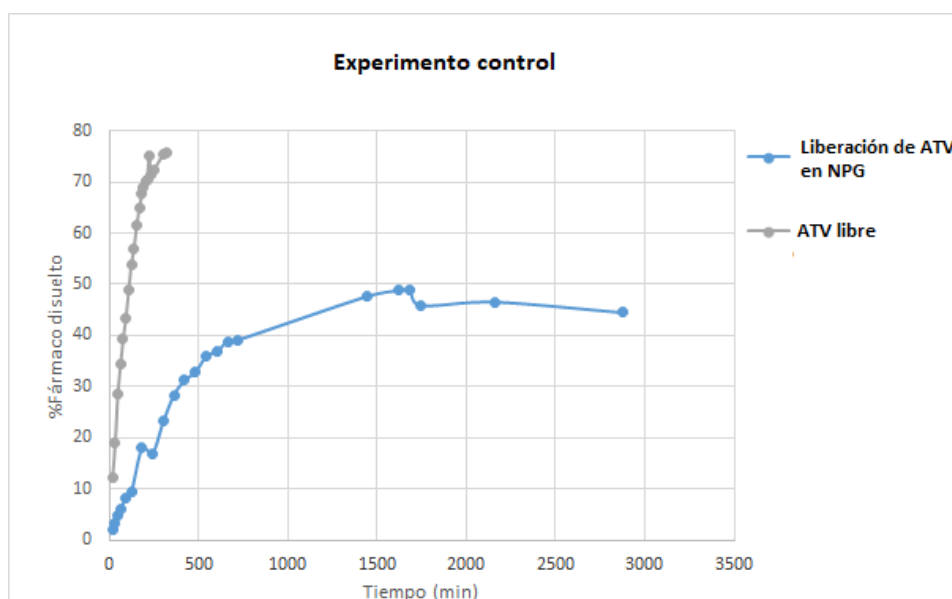


Fig 23. Perfiles de liberación de atorvastatina (ATV) libre contra ATV en el sistema nanoparticulado NPG-ATV.

12. Bibliografía

- 1 Salud, S. d. Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. *Diario Oficial de la Federación*, 26 (2012).
- 2 Russel, D. Cholesterol Biosynthesis and Metabolism. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 103-110 (1992).
- 3 Shepherd, J. The Role Of The Exogenous Pathway In Hypercholesterolaemia. *European Hearts Journal Supplements* **3** (2001).
- 4 Pública, I. N. d. S. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. (2006).
- 5 Stancu C., S. A. Statins: mechanism of action and effects. *J.Cell.Mol.Med.* **5**, 378-387 (2001).
- 6 DrugBank. *Atorvastatin*, <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01076>> (2019).
- 7 Haque T., K. B. Atorvastatin: A Review of its Pharmacological Properties And Use in Familial Hypercholesterolemia. *Clinical Lipidology* **5**, 615-625 (2010).
- 8 Anselmo, A., Mitragotri S. . An Overview of Clinical and Commercial Impact of Drug Delivery Systems. *J Control Release* **190**, 15-28 (2014).
- 9 Davis, S. S. Drug delivery systems. *Interdisciplinary Science Reviews* **25**, 175-183, doi:10.1179/030801800679206 (2000).
- 10 Briefing, E. S. F. P. ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine. (2005).
- 11 S., K. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. *Nanotechnologies for the Life Sciences* **1**, 330-352 (2005).
- 12 Patra A., e. a. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* **16** (2018).
- 13 Initiative, U. S. N. N. *What It Is and How It Works*, <<https://www.nano.gov/>> (2019).
- 14 Hawthorne, G. H., Bernuci, M. P., Bortolanza, M., Issy, A. C. & Del-Bel, E. in *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* (eds Anton Ficai & Alexandru Mihai Grumezescu) 653-668 (Elsevier, 2017).
- 15 Sanyog Jain, e. a. Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B. *Molecular Pharmaceutics* **9** (2012).

- 16 Xue Jia , Q. Z. Blending Lecithin and Gelatin Improves the Formation of Thymol Nanodispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2956–2962 (2014).
- 17 Moon, J. J., Suh, H., Polhemus, M. E., Ockenhouse, C. F., Yadava, A., & Irvine, D. J. Antigen-Displaying Lipid-Enveloped PLGA Nanoparticles as Delivery Agents for a Vaccine. *PloS one* **7** (2012).
- 18 Li, J., Xu, W., Yuan, X., Chen, H., Song, H., Wang, B., & Han, J. Polymer–lipid hybrid anti-HER2 nanoparticles for targeted salinomycin delivery to HER2-positive breast cancer stem cells and cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 6909–6921 (2017).
- 19 Sebastian, F. *Gelatin Nanoparticles as a Modern Platform for Drug Delivery*, (2010).
- 20 Arnold, G. *et al.* The impact of lecithin on rheology, sedimentation and particle interactions in oil-based dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **418**, 147-156, doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.11.006> (2013).
- 21 Muller-Goymann, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **58**, 343-356, doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.028 (2004).
- 22 Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews* **8**, 409-427, doi:10.1007/s12551-016-0218-6 (2016).
- 23 Instruments, M. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. *DLS Technincal Note*.
- 24 Instruments, M. Zetasizer Nanoseries User Manual. *MAN0485* (2013).
- 25 Mehmet Gumustas, C. T. S.-T., AysenGumustas, Sibel A.Ozkan, BengiUslu. in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* Ch. 5, 67-108 (2017).

- 26 GmbH, B. M. Particle charge detector Operation Manual (2003).
- 27 G., S. Review: In-Vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* **2** (2011).
- 28 K.H, R. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy* **3** (2014).
- 29 Costa P, S. L. J. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* **13**, 123-133 (2001).
- 30 Shaikh, H. K. Mathematical Models For Drug Release Characterization: A Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4** (2015).
- 31 Shilpi, D., Kushwah, V., Agrawal, A. & Jain, S. *Improved Stability and Enhanced Oral Bioavailability of Atorvastatin Loaded Stearic Acid Modified Gelatin Nanoparticles*. Vol. 34 (2017).
- 32 Andalib, S., Molhemazar, P. & Danafar, H. *In vitro and in vivo delivery of atorvastatin: A comparative study of anti-inflammatory activity of atorvastatin loaded copolymeric micelles*. Vol. 32 (2017).
- 33 Saikat Ghosh, T. R. Nanoparticulate drug-delivery systems: lymphatic uptake and its gastrointestinal applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **4**, 123-130 (2014).
- 34 Huacuja F., e. a. Efecto de las estatinas más allá del colesterol. *Revista de Endocrinología y Nutrición* **14**, 73-88 (2006).
- 35 Convention, U. S. P. *The United States Pharmacopeia USP 30: The National Formulary: NF 25: by authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc.*, (2006).
- 36 García-Guzmán, P. *et al.* Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **167**, 397-406, doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.020> (2018).
- 37 Bahareh Azimi, e. a. Producing Gelatin Nanoparticles as Delivery System for Bovine Serum Albumin. *Iranian Biomedical Journal* **18** (2014).
- 38 L. Ovesen, F. B., U. Tage-Jensen, B. R. Gram, and S. J. Rune. Intraluminal pH in the Stomach, Duodenum, and Proximal Jejunum in Normal Subjects

- and Patients With Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Gastroenterology* **90** (1986).
- 39 P. K. Yeap, e. a. Density of Lecithin and Its Effective Molecular Volume in Lecithin-Water Dispersions. *Journal for the advancement of science & arts* **3** (2012).
- 40 Mudhakhir, D., Wibisono, C. & Rachmawati, H. *Encapsulation of Risperidone into Chitosan-based Nanocarrier via Ionic Binding Interaction*. Vol. 13 (2014).
- 41 Gülen Melike Demir, A. K., Zelihagül Değim, Derya Bektaş, Özlem Çoban. . Stirring Speed Effects on Physical Characteristics of Theophylline Microsphere. *Proceedings of the 5th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications* (2014).
- 42 Guang Wei L., P. G. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (2010).
- 43 L. Zhang, L., Zhang Lipid-polymer hybrid nanoparticle: synthesis, characterization and applications. *World Scientific Publishing Company* **1**, 163-173 (2010).
- 44 Thongnuanchan, B., Ninjan, R., Kalkornsurapranee, E. et al. Glutaraldehyde as Ambient Temperature Crosslinking Agent of Latex Films from Natural Rubber Grafted with Poly(diacetone acrylamide). *J Polym Environ* **26** (2018).
- 45 Rojas, J. 569-588 (2015).
- 46 Matsuda, S., Iwata, H., Se, N. & Ikada, Y. *Bioadhesion gelatin films cross-linked with glutaraldehyde*. Vol. 45 (1999).
- 47 M. Danaei, M. D., S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani et al. . Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **10** (2018).
- 48 Moraila-Martínez C., G.-G. G., Chávez-Páez M.,González-Tovar E. . An experimental/theoretical method to measure the capacitive compactness of an aqueous electrolyte surrounding a spherical charged colloid. *The Journal of Chemical Physics* **148**, doi:10.1063/1.5024553 (2018).

- 49 Matusiak, J. & Grządka, E. *Stability of colloidal systems-a review of the stability measurements methods*. Vol. LXXII (2017).
- 50 Rabea K., e. a. A Comparison of Explanation Methods of Encapsulation Efficacy of Hydroquinone in a Liposomal System. *Journal of Paramedical Sciences* **7** (2016).
- 51 Bhatia, S. in *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Ch. 2, (Springer International Publishing Switzerland, 2016).
- 52 in *Nanoparticle Technology Handbook (Third Edition)* (eds Makio Naito, Toyokazu Yokoyama, Kouhei Hosokawa, & Kiyoshi Nogi) 49-107 (Elsevier, 2018).
- 53 Carena, E. *et al.* *Encapsulation of VEGF165 in magnetic PLGA nanocapsules for potential local delivery and bioactivity into human brain endothelial cells*. Vol. 3 (2015).
- 54 Venditti, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *Journal of King Saud University - Science*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.10.004> (2017).
- 55 Escobar-Barrios, V., R. Rangel Mendez, J., V. Perez Aguilar, N., Andrade Espinosa, G. & L. Davila Rodriguez, J. (2012).
- 56 S. Hermano, L. S., W. Fatimah. Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis. *J.Food Pharm.Sci.* **1**, 68-73 (2013).
- 57 al, L. N. e. Improved Dissolution rate of Atorvastatin Calcium Using solid dispersions with PEG-4000. *J. Pharm. Sci. & Res.* **2**, 484-491 (2010).
- 58 Nilesh C., D. P., Mlind B. Isolation of Soya Lecithin from Soya sluge its standardization and behavioural study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **6** (2013).
- 59 J.M. Nzai, A. P. Determination of phospholipids in vegetable oil by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75** (1998).
- 60 Project, D. o. E. O. T. P. (ed California State University Affordable Learning Solutions Program) (LibreTexts, 2015).

- 61 Maurer JM, S. R., van Rieke HM, Wanke C, Jordanov V, Stellaard F, et al. Gastrointestinal pH and Transit Time Profiling in Healthy Volunteers Using the IntelliCap System Confirms Ileo-Colonic Release of ColoPulse Tablets. *PLoS ONE* **10** (2015).
- 62 Zhang, Y. *et al.* DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal* **12**, 263-271, doi:10.1208/s12248-010-9185-1 (2010).
- 63 D. De Kee, Q. L. a. J. H. Viscoelastic (Non-Fickian) Diffusion. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **83** (2005).
- 64 Elzoghby, A. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release* **172**, 1075–1091 (2013).

13. Abreviaturas

ATV: Atorvastatina cálcica

CBF: Clasificación biofarmacéutica

CC: Capacidad de carga

EE: Eficiencia de entrapamiento

FT-IR: Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier

HMG-CoA: 3-hidroxil-3-metilglutaril coenzima A

NPL: Nanopartícula híbrida de lípido-polímero

NPG: Nanopartículas de gelatina-lecitina

NPG-ATV: Nanopartículas de gelatina-lecitina con atorvastatina

PDI: Índice de polidispersidad

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SLF: Sistemas de liberación de fármacos