



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

“Desarrollo de un sistema nanoparticulado conteniendo ácido retinoico,
destinado a la regeneración de piel dañada”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. OMAR MOLINA ALEJANDRE

TUTOR: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
FES Cuautitlán

Ciudad Universitaria, CD. MX. junio 2021.



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.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU: 956600) para la realización de este proyecto.

A los programas PAPIIT IN226119 y PIAPI 2021.

A mis padres y hermanos por la confianza y que, a pesar de todo, siempre han estado ahí para apoyarme y aconsejarme por eso y más muchas gracias.

A la Dra. Flora Adriana Ganem Rondero por ser una persona maravillosa y un gran modelo para seguir y por la oportunidad y confianza que me brindó para realizar este proyecto.

A mis profesores de la Universidad por todo lo aprendido.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Miguel Lewis, Fabiola Galván, Lizbeth Olín, Katya Cardoso, Edgar García, Brandon Mares, Manuel Ramos, Alegre Flores, Sergio Miranda, Marco Espinoza, Rocío Segura y Mayahuel Martínez por sus consejos y ratos de diversión.

Jurado Asignado

Presidente: Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook

Vocal: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Vocal: Dr. José Juan Escobar Chávez

Vocal: Dra. Alma Guadalupe Vázquez Durán

Secretario: Dr. Gerardo Leyva Gómez

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Lugar de realización del proyecto de investigación

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica

L-322.



Contenido General

Abreviaturas	3
Índice de tablas	4
Índice de figuras	6
1. Resumen.....	8
2. Introducción	9
3. Marco teórico.....	10
3.1 Nanotecnología	10
3.2 Historia de la nanotecnología, nanofarmacia y nanomedicina y los sistemas de liberación submicrónicos	11
3.3 La nanotecnología en la industria farmacéutica	14
3.4 Nanotecnología farmacéutica, nanomedicina y sistemas de liberación.....	16
3.5 Métodos de preparación de nanopartículas.....	27
3.6 La piel: estructura, funciones y principales afecciones.....	32
3.7 Nanotecnología y piel.....	40
3.8 Vitamina A.....	42
3.9 Retinol o all-trans-retinol.....	43
3.9.1 El ácido retinoico: La forma activa de la vitamina A	43
3.10 Productos tópicos en el mercado que contienen vitamina A	46
3.11 Nanosistemas desarrollados que contienen vitamina A.....	47
3.12 Zeína	51
4. Justificación	56
5. Objetivo general.....	56
6. Objetivos particulares	56
7. Hipótesis.....	56
8. METODOLOGÍA.....	57
8.2 Determinaciones previas al diseño de experimentos	58
8.2.1 Elección del método de preparación de nanopartículas de zeína	58
8.2.2 Elección de estabilizantes	58
8.2.3 Pruebas de solubilidad para el ácido retinoico y zeína	58

8.2.4 Elección de variables fijas.....	59
8.2.5 Pruebas previas al diseño de experimentos.....	60
8.3 Preparación de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico empleando el diseño de experimentos	61
8.4 Validación del método analítico para la cuantificación de ácido retinoico	62
8.5 Caracterización de las dispersiones de Nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico	62
8.5.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z.....	62
8.5.2 Eficiencia del proceso.....	62
8.5.3 Eficiencia de encapsulación.....	62
8.5.4 Análisis espectrofotométrico ultravioleta/visible y por espectroscopía de infrarrojo	63
8.5.5 Caracterización por Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	64
8.6 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	64
9.0 Resultados y discusión	65
9.1 Pruebas de solubilidad para el ácido retinoico y la zeína	65
9.2 Pruebas previas al diseño de experimentos	66
9.3 Preparación de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico empleando el diseño de experimentos	69
9.4 Validación del método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de ácido retinoico	74
9.5 Caracterización de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico	75
9.5.1 Eficiencia del proceso.....	75
9.5.2 Eficiencia de encapsulación.....	76
9.5.3 Análisis espectroscópico por ultravioleta/visible de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico	79
9.5.4 Análisis espectroscópico por infrarrojo de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico.....	82
9.6 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	88
10. Conclusiones.....	90
11. Perspectivas	91
12. Referencias.....	92
13. Anexos	99
13.1 Anexo A	99
13.2 Anexo B	113

Abreviaturas

ADH Alcohol Deshidrogenasa	NNI Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos de América
ADN Ácido Desoxirribonucleico	NA No Aplica
ALDH Retinaldehído Deshidrogenasa	NC Nanocápsulas
ANOVA Análisis de la Varianza	NE Nanoesferas
AR Ácido Retinoico	NLS Nanopartículas Lipídicas Sólidas
ARN Ácido Ribonucleico	NP's Nanopartículas
BM Barra Magnética	PAMAM poliamidoamina
CA Criterio de Akaike	PC's Puntos Cuánticos
CDB Calorimetría Diferencial de Barrido	PCS's Puntos Cuánticos Semiconductores
CSM Criterio de Selección del Modelo	PEG Polietilenglicol
CV Coeficiente de Variación	PF127 Pluronic F-127
DDE diseño de experimentos	PGA Ácido Poliglicólico
E.U.A. Estados Unidos de America	PLA Ácido Polilactico
EC Estrato Córneo	PLC Poli (ϵ -caprolactona)
EITF Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier	PLGA Ácido poli lactic-co-glicólico
FDA Food and Drug Administration	PLN Portadores Lipídicos Nanoestructurados
GlyR Receptores de Glicina Individuales	PR Palmitato de Retinilo
GRAS generally recognized as safe	PVA alcohol polivinilico
H0 Hipótesis nula	R² coeficiente de correlación
H1 Hipótesis alterna	REH retinil éster hidrolasa específica
IC Intervalo de Confianza	RMN H¹ Resonancia Magnética Nuclear de H ¹
IPD índice de Polidispersión	rpm revoluciones por minuto
LRAT Retinol Aciltransferasa	SDH deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
MET Microscopio Electrónico de Transmisión	SOD Superóxido dismutasa
MIC Microscopio Iónico de Campo	UT[®] Ultraturax
mV mili Volts	UV/Vis Ultravioleta/Visible
NEM Nueva Entidad Molecular	VHS Virus del Herpes Simple
nm nanómetro(s)	

Índice de tablas

Tabla 1. Sistemas de liberación nanométricos, características generales, ventajas y desventajas..	25
Tabla 2. Métodos de preparación de sistemas de liberación más usados en el área farmacéutica [27-30]	31
Tabla 3. Propiedades físicas del ácido retinoico, retinol, palmitato de retinilo y acetato de retinilo [25, 55- 56]	45
Tabla 4. Medicamentos en el mercado que contienen vitamina A	46
Tabla 5. Sistemas nanométricos cargados con vitamina A	47
Tabla 6. Propiedades físicas de la zeína [24, 75- 77].....	51
Tabla 7. Propiedades favorables de la zeína para su aplicación en sistemas de liberación modificada [24, 74]	53
Tabla 8. Sistemas nanoparticulados de zeína cargados con Vitamina A.....	54
Tabla 9. Diseño del experimento factorial 2^4 con 2 respuestas.....	61
Tabla 10. Pruebas de solubilidad realizadas para la zeína con etanol al 85 % (v/v) y al 90 % (v/v)..	65
Tabla 11. Pruebas de solubilidad realizadas para el AR con etanol al 85% (v/v) y al 90 % (v/v)	65
Tabla 12. Preparación de NP's de zeína cargadas con AR bajo diferentes condiciones de agitación, velocidad de inyección, y distintos tipos de estabilizantes.....	66
Tabla 13. Resultados del diseño de experimentos factorial 2^4	69
Tabla 14. ANOVA para determinar factores que afectan al tamaño de partícula	69
Tabla 15. Coeficientes de regresión para el tamaño de partícula	71
Tabla 16. ANOVA para determinar factores que afectan el IPD	72
Tabla 17. Coeficientes de regresión para el IPD.....	73
Tabla 18. Resumen de la Validación del método analítico	74
Tabla 19. Condiciones de preparación y cantidades de fármaco y excipientes.....	75
Tabla 20. Eficiencia del proceso de preparación de NP's de zeína cargadas con AR.....	75
Tabla 21. Determinación de la eficiencia de encapsulación de AR en NP's de zeína	76
Tabla 22. Tamaño, IPD, Potencial Z, % de encapsulación, y rendimiento del proceso para las formulaciones 5 y 10	78
Tabla 23. Coeficiente de correlación (R^2), CA y CSM para los diferentes modelos matemáticos de liberación y exponente de liberación "n" para el modelo de Peppas - Korsmeyer	89
Tabla 24. Precisión del sistema	99
Tabla 25. Linealidad del sistema	100

Tabla 26. Exactitud y repetibilidad del método de la formulación A.....	104
Tabla 27. Exactitud y repetibilidad del método de la formulación B.....	105
Tabla 28. Linealidad del método de la formulación A.....	107
Tabla 29. Linealidad del método de la formulación B.....	109
Tabla 30. Precisión del método de la formulación A	110
Tabla 31. Precisión del método de la formulación B.....	111
Tabla 32. LD Y LC para ambas formulaciones con base al método 1	112
Tabla 33. LD Y LC con base al método 2.....	112

Índice de figuras

Figura 1. Escala nanométrica y nanoestructuras [10]	10
Figura 2. Historia y desarrollo de la nanotecnología y aplicaciones [7, 9, 12-19].....	13
Figura 3. Mercado de nanomedicina de E.U.A. por producto, 2013-2025 (miles de millones de dólares) [20]	15
Figura 4. Tipos de sistemas de liberación nanométricos	18
Figura 5. Nanocápsulas y nanoesferas [24- 25]	24
Figura 6. Método de emulsión evaporación [28].....	27
Figura 7. Método de emulsificación-difusión [29]	28
Figura 8. Método de polimerización	29
Figura 9. Método de gelación iónica	29
Figura 10. Método de nanoprecipitación [29]	30
Figura 11. Capas de la piel y apéndices asociados [31].....	32
Figura 12. Capas de la epidermis [31]	33
Figura 14. Metabolismo del palmitato de retinilo hasta el ácido 4-oxo-retinoico en la piel [46]	44
Figura 15. Aplicaciones de la zeína en liberación de fármacos [74]	52
Figura 16. Esquema general para la preparación de nanopartículas de zeína cargadas con AR por la técnica de nanoprecipitación. A) mediante agitación por alto cizallamiento con Ultraturrax®. B) mediante agitación con barra magnética	61
Figura 17. Gráfico de Pareto para el tamaño de partícula	70
Figura 18. Gráfico de pendientes de efectos principales para el tamaño de partícula	70
Figura 19. Gráfico de interacción de las pendientes para el tamaño de partícula	71
Figura 20. Gráfico de Pareto para IPD.....	72
Figura 21. Gráfico de pendientes de efectos principales para el IPD	73
Figura 24. Sistemas acuosos con PVA: a) Mezcla física de AR y NP's de zeína placebo; b) AR inyectado en el medio con estabilizante; c) Formulación 5; d) NP's de zeína placebo	79
Figura 25. Sistemas acuosos con Pluronic F-127: a) Mezcla física ARy NP's de zeína placebo; b) AR inyectado en el medio con estabilizante; c) NP's de zeína placebo; d) Formulación 10	79
Figura 26. Espectro UV/VIS de los sistemas con PVA: Línea negra (blanco); Línea roja (AR en agua); Línea café (formulación 9); Línea Azul claro (NP's de zeína placebo); Línea Azul oscuro (Mezcla física de AR y NP's de zeína placebo)	80

Figura 27. Espectro UV/VIS de los sistemas con Pluronic F-127: Línea negra (blanco); Línea roja (AR en agua); Línea café (formulación 10); Línea Azul claro (NP's de zeína placebo); Línea Azul oscuro (Mezcla física de AR y NP's de zeína placebo)	81
Figura 28. Espectros de infrarrojo de todos los componentes necesarios para la preparación de NP's de zeína con PVA como estabilizante, mezcla física y NP's de zeína cargadas con AR (5)	82
Figura 29. Espectros de infrarrojo de todos los componentes necesarios para la preparación de NP's de zeína con PF-127 como estabilizante, mezcla física y NP's de zeína cargadas con AR (10)	83
Figura 30. Termogramas de las NP's de zeína cargadas con AR utilizando PVA como estabilizante (5) y de sus componentes individuales	86
Figura 31. Termogramas para las NP's de zeína cargadas con AR con PF-127 (10) y de sus componentes individuales	87
Figura 32. Perfiles de liberación in vitro para AR en solución y para dos diferentes formulaciones de NP's de zeína cargados con AR, usando el método de diálisis. Cada punto corresponde al promedio de los resultados obtenidos; las barras de error representan la desviación estándar (n=3).....	88
Figura 33. Linealidad del sistema (las barras de error son más pequeñas que los símbolos)	100
Figura 34. Residuales del gráfico de linealidad del sistema	101
Figura 35. Espectro de absorción de UV/VIS de los sistemas AR, placebos, AR+ placebos y AR+ NP's de zeína. Línea Negra (Blanco); línea Amarilla (AR); línea roja (placebo 1); línea violeta (placebo 2); línea purpura (AR+ placebo 1); línea verde (AR+ placebo 2); línea rosa (AR+ NP's de zeína con PVA); línea cian (AR+ NP's de zeína con Pluronic F-127)	103
Figura 36. Linealidad del método de la formulación A	108
Figura 37. Linealidad del método de la formulación B	110

1. Resumen

Las nanopartículas poliméricas con base en biopolímeros proporcionan una alternativa a los otros tipos de sistemas nanoacarreadores debido a que presentan propiedades benéficas para su uso en el tratamiento dermatológico como la biocompatibilidad, la no inmunogenicidad, la baja toxicidad y la biodegradabilidad.

En el presente trabajo se eligió como molécula activa al ácido retinoico (AR), el cual es un fármaco liposoluble que se ha empleado en numerosas formulaciones tanto farmacéuticas como cosméticas y que ha demostrado ser muy prometedor para las afecciones y heridas dermatológicas como prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento, acné severo e inflamación de la piel, asociándose también con respuestas de irritación local, como eritema, ardor, picazón, descamación y prurito.

Esta investigación pretendió desarrollar, caracterizar y evaluar un sistema de liberación submicrónico (nanopartículas poliméricas), para la administración de ácido retinoico destinado al tratamiento heridas y enfermedades cutáneas locales, aprovechando las ventajas de estos sistemas de liberación y utilizando a la zeína como polímero debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Para ello, se establecieron las condiciones de preparación óptimas de nanopartículas (NP's) de zeína cargadas con AR mediante el uso de un diseño de experimentos (DDE), evaluando el efecto de diversas variables (tipo y concentración de estabilizante, tipo de agitación y relación fármaco: polímero) sobre el tamaño e índice de polidispersión (IPD) de estos sistemas. Se obtuvieron 2 formulaciones prometedoras empleando alcohol polivinílico (PVA) y Pluronic F-127 como estabilizantes. Para ambas formulaciones, se obtuvieron tamaños de partícula de 200 nm e índices de polidispersión menores a 0.4.

Los resultados obtenidos muestran tasas de encapsulación de AR en un intervalo del 48 al 75%, dependiendo del estabilizante empleado. La inclusión del AR en las formulaciones nanoparticuladas a base de zeína provocó un retardo en la velocidad de liberación *in vitro*, en comparación con el fármaco en solución. Las nanopartículas preparadas se presentan como una opción atractiva para la liberación del ácido retinoico, pudiendo ser incorporadas en una formulación que facilite su aplicación y retención en piel, con fines farmacéuticos o cosméticos.

En la actualidad no existen más de 5 publicaciones que aborden el uso de sistemas con zeína para la encapsulación de AR en sistemas nanométricos, ni mucho menos que usen dichos en una formulación tópica para tratar enfermedades de la piel, por lo que el proyecto desarrollado resulta novedoso.

2. Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y desempeña varias funciones críticas: protege el cuerpo del ambiente externo y sirve como primera línea de defensa contra la entrada de microorganismos, alérgenos, irritantes, especies reactivas de oxígeno y radiación, además funciona como barrera para la pérdida de fluidos y ayuda a regular la temperatura corporal [1- 2]. La piel se compone de dos capas principales, la epidermis y la dermis, también incluye una serie de apéndices como los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas y sebáceas. La epidermis viable comprende varias capas de queratinocitos que se fusionan y establecen una barrera efectiva contra el ambiente exterior [3, 4]. La capa más externa de la epidermis, el estrato córneo (EC), conformada por corneocitos embebidos en una matriz lipídica, es a la cual se le atribuye la función de la barrera de la piel, que impide el paso de agentes extraños incluyendo fármacos [4].

Las heridas o lesiones de la piel pueden ser de importancia y origen diverso. Son causadas por accidentes (cortes, laceraciones, contusiones), agentes externos (frío, humedad, viento, radiación solar) o son el resultado de determinadas técnicas de tratamiento cutáneo (láser, *peeling*, dermoabrasión, depilación, tatuajes) que producen efectos secundarios indeseados (eritema, enrojecimiento, hiperpigmentación, sequedad o prurito, entre otros) [5]. Aunque la piel se regenera constantemente por sí sola de forma natural, son constantes las agresiones a las que puede estar sometida, de ahí que en la farmacia se disponga de numerosos productos indicados para protegerla y regenerarla [3, 6].

La nanotecnología es un campo emergente emocionante con múltiples aplicaciones prometedoras en medicina regenerativa. La nanotecnología proporciona las herramientas para lograr atravesar la barrera de la piel o bien para regenerarla, por lo que los sistemas de liberación tópica o transdérmica con base en nanoacarreadores se han convertido en el objetivo principal de muchos investigadores [3-4]. Los avances recientes en nanotecnología han introducido un mundo de posibilidades para la reparación de la piel, incluidos los andamios nanoestructurados para la regeneración de la piel y los sistemas coloidales de administración de fármacos como nanopartículas poliméricas, micelas, nanoemulsiones, liposomas, ciclodextrinas y nanopartículas inorgánicas antimicrobianas [3].

Las nanopartículas poliméricas se consideran una alternativa prometedora para el suministro de fármacos. La encapsulación de moléculas bioactivas y agentes terapéuticos en nanopartículas poliméricas biodegradables ha sido útil en el área biomédica. Las principales ventajas de usar nanopartículas poliméricas biodegradables incluyen propiedades de liberación controlada, alta eficiencia de encapsulación, biodisponibilidad mejorada y biocompatibilidad con tejidos y células [3].

En este trabajo se presentan los resultados de la preparación y caracterización de nanopartículas a base de zeína, encapsulando ácido retinoico, destinadas al tratamiento de lesiones de la piel.

3. Marco teórico

3.1 Nanotecnología

De acuerdo con la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos de América (NNI por sus siglas en inglés), la nanotecnología está definida como la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm), donde fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas. Al abarcar la ciencia, la ingeniería y la tecnología a nanoescala, la nanotecnología implica la obtención de imágenes, la medición, el modelado y la manipulación de la materia a esta escala de longitud [7]. Asimismo, la nanotecnología es capaz de trabajar a nivel molecular, átomo por átomo, o molécula por molécula para crear grandes estructuras con una organización molecular fundamentalmente nueva [8].

Como prefijo, “nano” tiene el origen griego que significa “enano”. Así, la palabra “nano” significa muy pequeño o de tamaño miniatura. La nanotecnología funciona en la materia a dimensiones en la longitud de escala nanométrica y, por lo tanto, puede usarse para una amplia gama de aplicaciones y la creación de varios tipos de nanomateriales y nanodispositivos. Sin embargo, también es inherente que estos materiales muestren propiedades diferentes por ejemplo en cuanto a la conductancia eléctrica, la reactividad química, el magnetismo, los efectos ópticos y la resistencia física, cuando se les compara con los materiales a granel de los cuales se originaron, esto como resultado de su tamaño pequeño [8- 9]. Los productos basados en nanotecnología actualmente en el mercado incluyen procesadores y dispositivos móviles más rápidos, dispositivos de memoria de mayor densidad, autopartes más livianas, pantallas de computadora y televisión que son energéticamente más eficientes, telas resistentes a las manchas, vendas antibióticas, cosméticos, fármacos, entre otros. [8].

La figura 1 muestra la escala nanométrica. La nanoescala es el lugar donde las propiedades de las cosas más comunes se determinan justo por encima de la escala de un átomo. Los objetos en esta escala tienen al menos una dimensión (altura, longitud, profundidad) que mide entre 1 y 999 nanómetros (1-999 nm) [9].

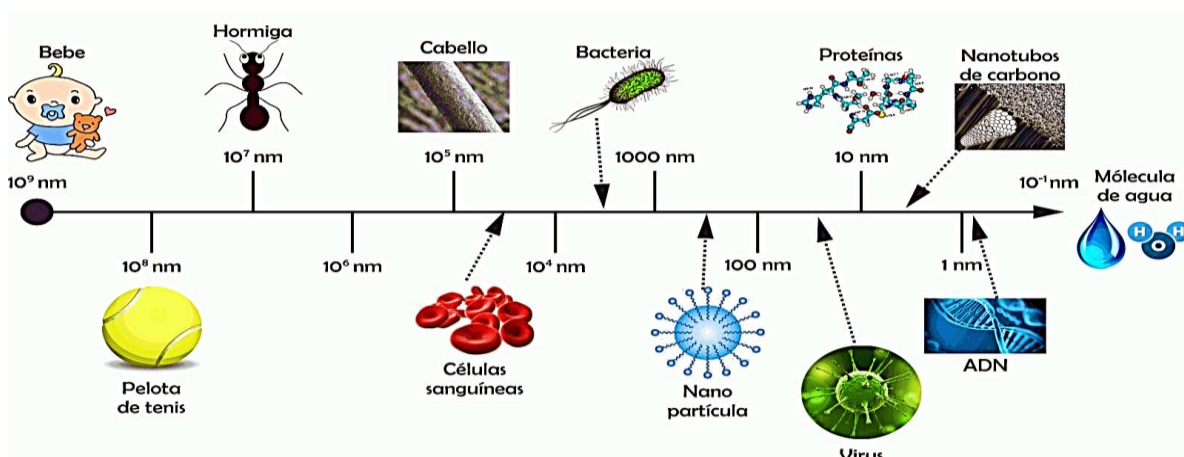
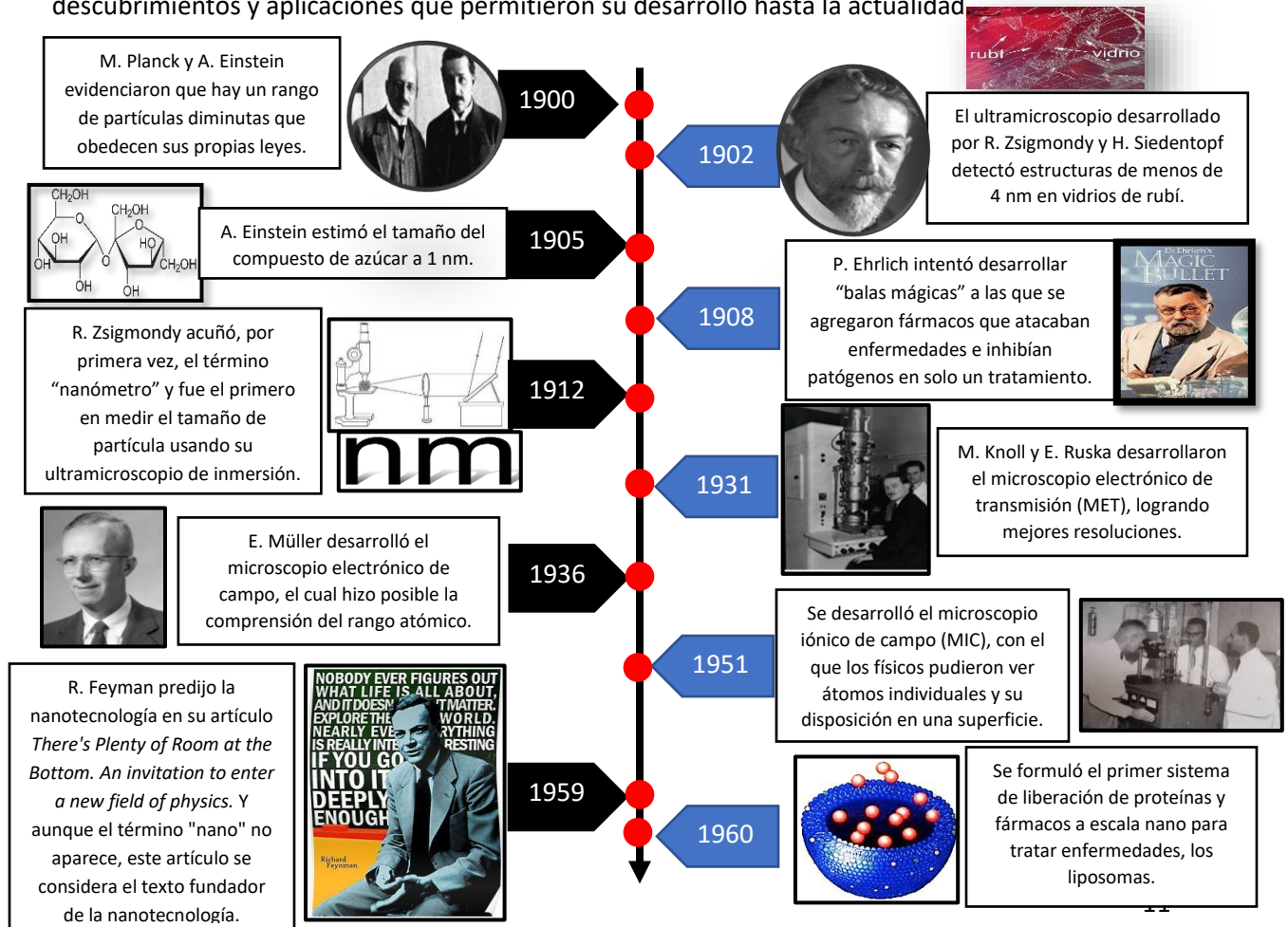
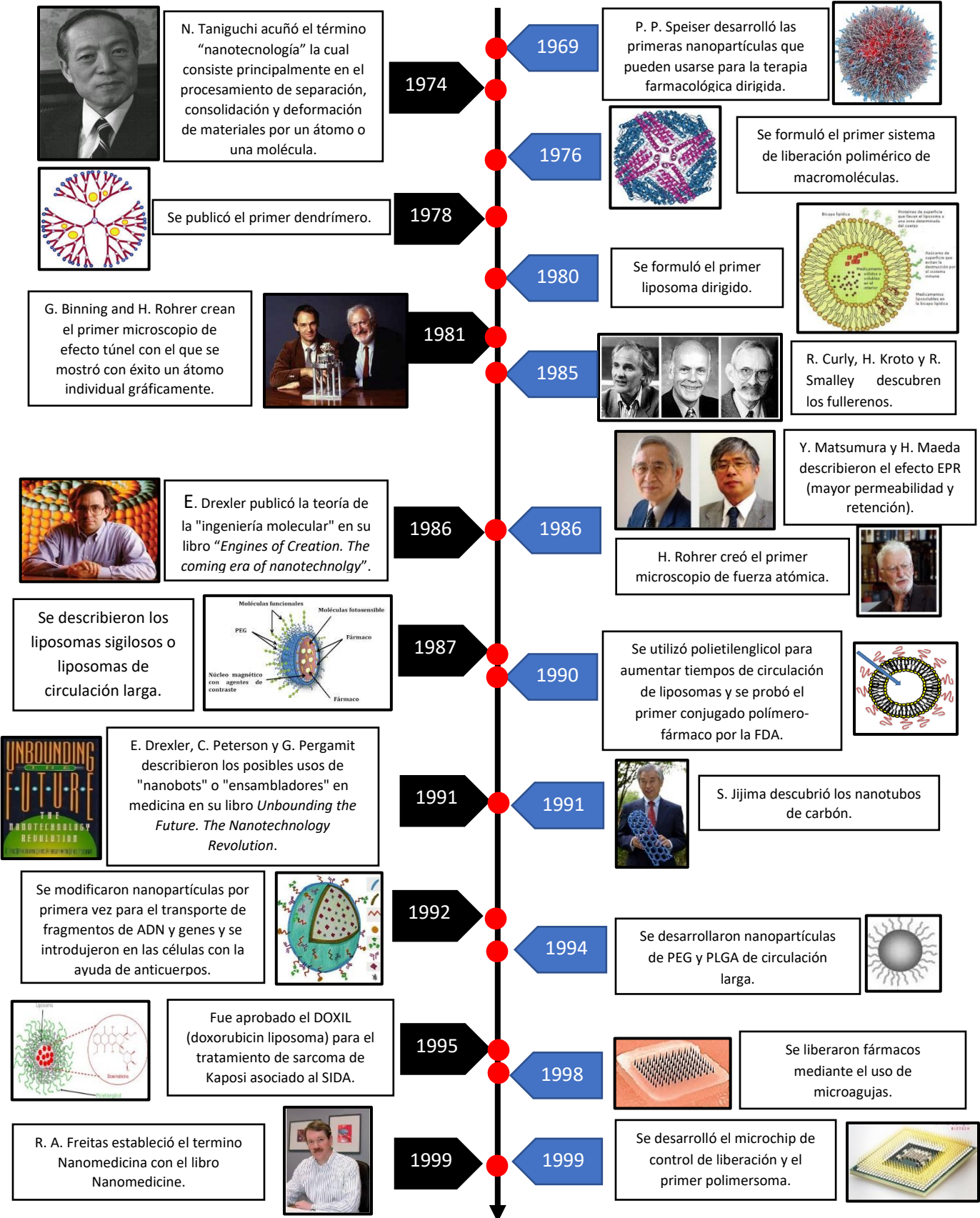


Figura 1. Escala nanométrica y nanoestructuras [10]

3.2 Historia de la nanotecnología, nanofarmacia y nanomedicina y los sistemas de liberación submicrónicos

El término de nanotecnología fue acuñado por Norio Taniguchi en 1974; sin embargo, el concepto es más antiguo. Aunque la nanotecnología es una ciencia relativamente nueva, las nanoestructuras han existido en el planeta desde hace siglos. En el mundo natural hay muchos ejemplos de estructuras que existen con las dimensiones del nanómetro, como son las moléculas esenciales del cuerpo humano (ADN, proteínas, fosfolípidos, lípidos, células, etc.), los componentes de los alimentos, virus, entre otros. Antiguamente algunas civilizaciones utilizaron nanoestructuras aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales, desconociendo el concepto moderno de las mismas, ejemplos hay muchos. La civilización egipcia utilizaba nanopartículas de oro como coloides medicinales, la pintura Azul Maya que consistía en un material híbrido nanoestructurado, la copa de Lycurgus que está compuesta por vidrio de sílica con nanopartículas de plata y oro, por mencionar algunos. Estamos rodeados de miles de millones de nanopartículas, incluyendo el polvo de arena, sustancias químicas generadas por el plancton oceánico, los productos de combustión (principalmente los gases de combustión de los motores diesel), procesos naturales, como volcanes e incendios han generado nanopartículas y otras nanoestructuras que permanecen en el ambiente a lo largo del tiempo [11]. El gran progreso de lo que es hoy en día el término de nanotecnología inició en el siglo XX, como se muestra en la figura 2, en donde se nombran diversos sucesos, descubrimientos y aplicaciones que permitieron su desarrollo hasta la actualidad.





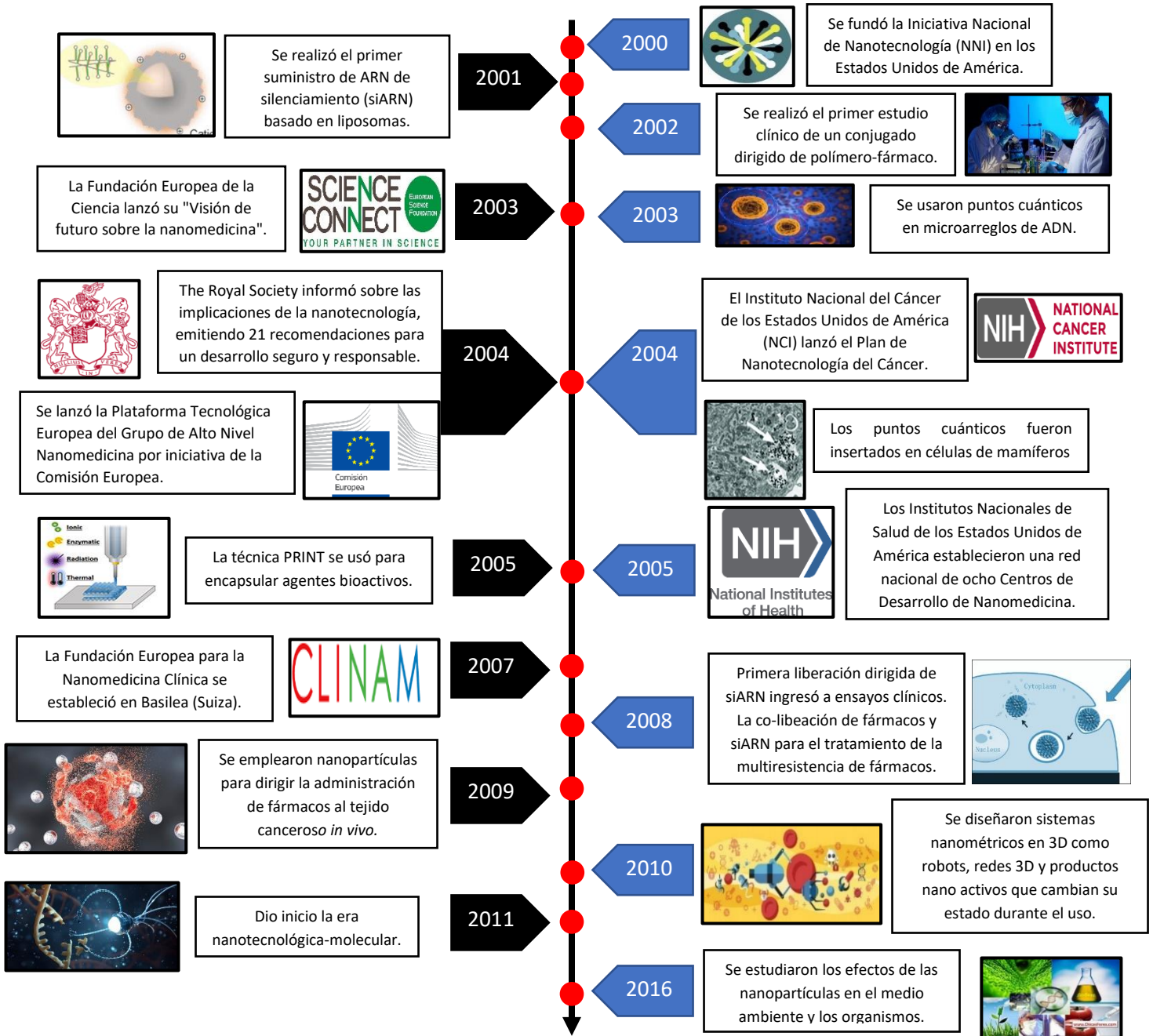


Figura 2. Historia y desarrollo de la nanotecnología y aplicaciones [7, 9, 12-19]

3.3 La nanotecnología en la industria farmacéutica

La nanotecnología, al ser un campo interdisciplinario, tiene tres áreas principales ampliamente superpuestas: nanoelectrónica, nanomateriales y nanobiotecnología que encuentran aplicaciones en los materiales, la electrónica, el medio ambiente, la metrología, la energía, la seguridad, la robótica, la salud, la tecnología de la información, la biomimética, los productos farmacéuticos, la fabricación, la agricultura, la construcción, el transporte, el procesamiento y el almacenamiento de alimentos [15].

Como se puede apreciar en la figura 2, se desarrollaron diversos sistemas de liberación nanométricos de fármacos y macromoléculas a partir de la década de los 60's, pero fue en 1908 donde P. Ehrlich y sus "balas mágicas" sentaron las bases de dichos sistemas de liberación y las futuras aplicaciones de la nanotecnología en la industria farmacéutica. Así, el conocimiento adquirido en el curso del siglo XX sobre las células y sus componentes y sobre los procesos intra e intercelulares y la comunicación celular, además de los avances en bioquímica y biotecnología, hicieron posible la producción de "balas mágicas" cada vez más sofisticadas [12].

En la industria farmacéutica, se denomina una nueva entidad molecular (NEM) a un fármaco que demuestre una potente actividad biológica pero una solubilidad en agua pobre, o una semivida de circulación muy corta, por lo que probablemente enfrentará desafíos para su desarrollo o se considerará subdesarrollable. Por otro lado, los fármacos menos activos, pero farmacéuticamente óptimos, pueden convertirse en candidatos más adecuados para el desarrollo. Sin embargo, con las tendencias emergentes y los recientes avances en nanotecnología, hay cada vez más posibilidades de resarcir algunas de las deficiencias asociadas con posibles NEM [17].

Actualmente, la aplicación de la nanotecnología al suministro de fármacos está contribuyendo a cambiar el panorama de las industrias farmacéutica y biotecnológica. El desarrollo de productos con nanotecnología puede desempeñar un papel importante al agregar un nuevo arsenal de terapias y formas farmacéuticas a las compañías farmacéuticas ya que, al usar nanotecnología, es posible lograr [13]:

- Entrega mejorada de fármacos poco solubles en agua.
- Modificación de las propiedades farmacológicas como la solubilidad, la biodisponibilidad, etc.
- Entrega dirigida de fármacos de una manera específica a las células o los tejidos.
- Transcitosis de los fármacos a través de estrechas barreras epiteliales y endoteliales.
- Suministro de macromoléculas a sitios de acción intracelulares.
- Co-entrega de dos o más fármacos para terapia combinada.
- Visualización de sitios de administración de fármacos mediante la combinación de agentes terapéuticos con modalidades de imagen.
- Lectura en tiempo real sobre la eficacia *in vivo* de un agente terapéutico.

De hecho, los productos terapéuticos actuales basados en nanotecnología han sido validados a través de la mejora de fármacos previamente aprobados, y muchas clases novedosas de nanoterapéuticas ahora están en marcha [17].

La figura 3 refleja que la liberación de fármacos nano-habilitados ha captado una parte importante de mercado y crecerá exponencialmente en el futuro. Eso también refleja que estos fármacos nano-habilitados son más efectivos para curar enfermedades debido a su creciente demanda en el mercado más grande del mundo, los E.U.A. [17].

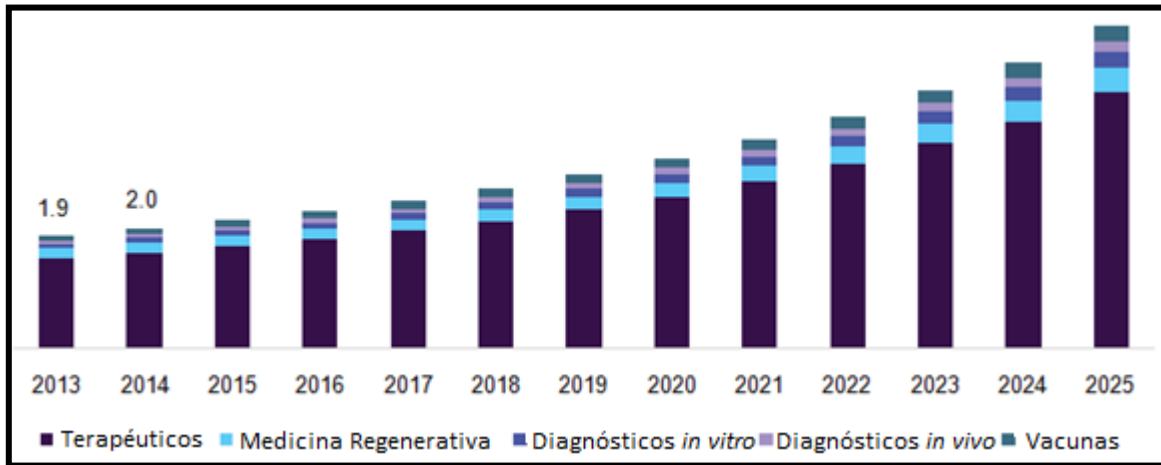


Figura 3. Mercado de nanomedicina de E.U.A. por producto, 2013-2025 (miles de millones de dólares) [20]

El tamaño del mercado mundial de nanomedicina se estimó en 138.8 mil millones de dólares en 2016. Se espera que los avances tecnológicos junto con aplicaciones relevantes en el diagnóstico temprano de enfermedades, la intervención preventiva y la profilaxis de trastornos crónicos y agudos impulsen el crecimiento en este mercado [20].

3.4 Nanotecnología farmacéutica, nanomedicina y sistemas de liberación

La nanotecnología farmacéutica es un término aplicado al diseño, caracterización y producción de materiales farmacéuticos, estructuras y productos que tienen una o más dimensiones entre aproximadamente 1 nm y 100 nm. Sin embargo, esta clasificación permanece abierta al debate, y queda un cierto grado de ambigüedad sobre lo que se considera nanotecnología, en particular con respecto al rango de tamaño considerado. Falta una definición internacionalmente aceptada de nanotecnología, y con frecuencia las partículas en rangos de mayor tamaño se consideran nanotecnología. La agencia de gobierno de Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) a menudo considera 1000 nm como un límite superior apropiado con respecto a la selección de materiales para su consideración como nanotecnología. No obstante, con el uso creciente de la nanotecnología, tanto la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) como la FDA, continúan modificando sus pautas regulatorias con respecto a la nanotecnología en reconocimiento de las propiedades clave que las nanomedicinas pueden ofrecer. Sin embargo, en general se acepta que el uso del tamaño sólo como factor de definición para las nanomedicinas puede ser engañoso. También es útil considerar si un producto exhibe diferentes propiedades físicas, químicas o biológicas que se atribuyan a sus dimensiones, incluso si estas dimensiones caen fuera del rango de nanoescala [19].

Por otra parte, de acuerdo con la Plataforma Tecnológica Europea sobre Nanomedicina, la nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología a la salud. Explora las propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas y a menudo novedosas de los materiales a escala nanométrica. La nanomedicina tiene un impacto potencial en la prevención, el diagnóstico temprano y confiable y el tratamiento de enfermedades. La NNI, por su parte, menciona que la nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología a la salud. Por otra parte, la Fundación Europea de Ciencia expone que la nanomedicina es la ciencia y la tecnología de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades y lesiones traumáticas para aliviar el dolor, y de preservar y mejorar la salud humana, utilizando conocimientos y herramientas moleculares del cuerpo humano. Entonces, el objetivo de la nanomedicina radica en el monitoreo, control, construcción, reparación, defensa y mejora integrales de todos los sistemas biológicos humanos, trabajando desde el nivel molecular utilizando dispositivos y nanoestructuras de ingeniería, en última instancia para lograr beneficios médicos [7].

Así, la nanomedicina utiliza herramientas de tamaño nanométrico para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y para obtener una mayor comprensión de la compleja fisiopatología subyacente de la enfermedad mientras que la nanotecnología farmacéutica abarca la formulación y el desarrollo de nanoestructuras para aumentar la potencia y la eficacia de los fármacos, y el uso de nanomateriales en ingeniería de tejidos e implantes para fabricar estructuras para apoyar la regeneración de tejidos dentro del cuerpo [19, 21].

Cabe mencionar que algunos autores consideran a la nanotecnología farmacéutica y a la nanomedicina como sinónimos, aunque claramente no lo son. A ambas se les pueden asignar como propósito el seguimiento, control, construcción, reparación, defensa y mejoramiento de los

sistemas biológicos humanos, trabajando desde el nivel molecular y utilizando la ingeniería de dispositivos y las nanoestructuras para lograr beneficios a la salud.

Por ello, la nanotecnología farmacéutica puede ofrecer beneficios o ventajas particulares, que incluyen:

- Solubilidad y disolución mejoradas. Debido a la alta relación superficie/volumen que ofrecen las nanopartículas, se puede aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución de los fármacos.
- Suministro mejorado de fármacos. El pequeño tamaño de partícula puede prolongar la residencia de un fármaco en la circulación sistémica, puede modificar la distribución del fármaco y puede permitir la focalización y el transporte del fármaco a través de barreras biológicas [19].

Estos beneficios explican la extensa investigación que se ha llevado a cabo en el desarrollo de nanoestructuras como liposomas, nanocápsulas, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), dendrímeros, nanopartículas poliméricas, etc., para la administración de fármacos como se observa en la figura 4. Los materiales empleados en la fabricación de nanoestructuras determinan el tipo de nanoestructuras obtenidas y estas nanoestructuras, a su vez, determinan las diferentes propiedades y las características de liberación de los fármacos incorporados [22].

Sistemas de liberación

Desarrollar un sistema de administración que optimice la acción de un fármaco al tiempo que reduzca sus efectos secundarios *in vivo* es una tarea desafiante, la cual puede lograrse mediante el uso de nanosistemas farmacéuticos (figura 4), los cuales son:

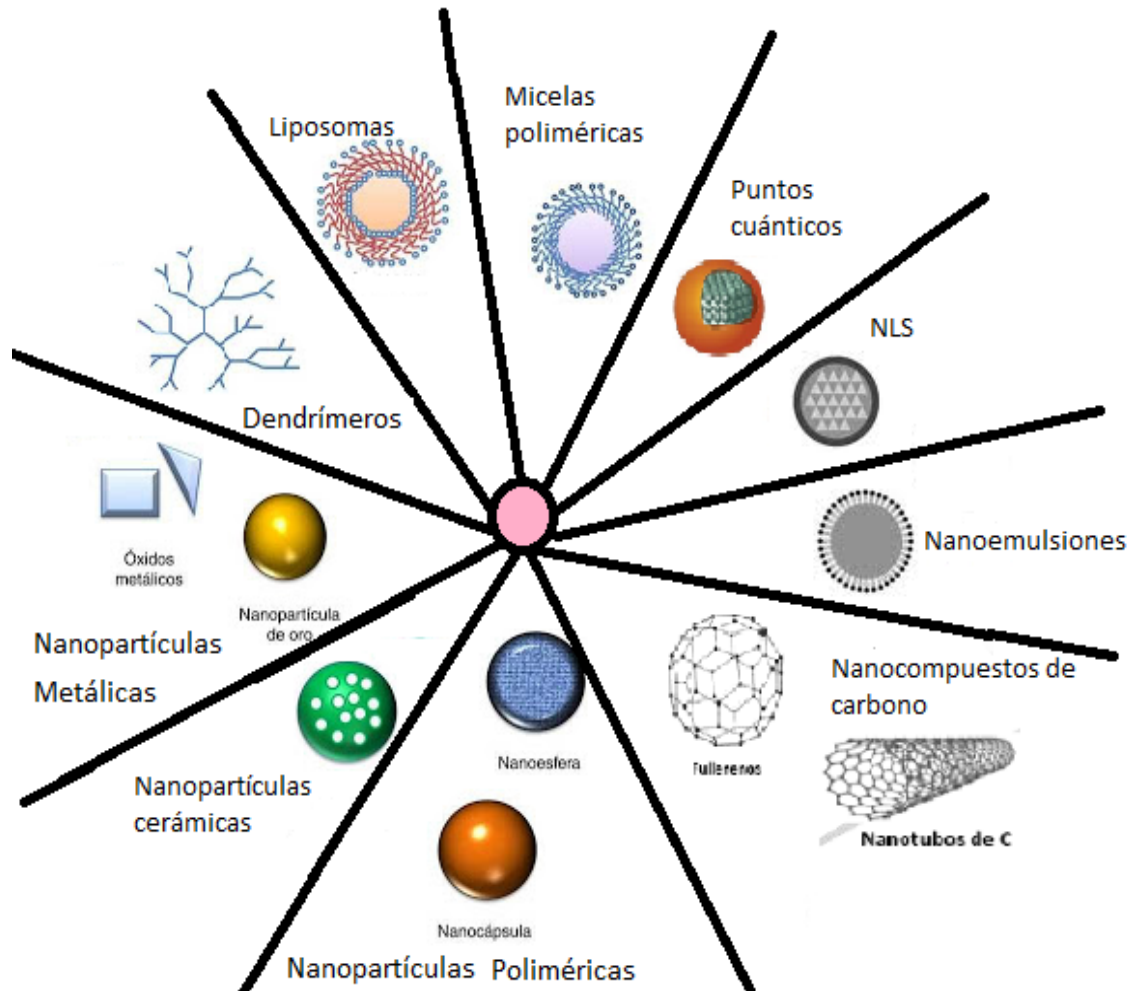


Figura 4. Tipos de sistemas de liberación nanométricos

- Liposomas

El primer tipo de nanomaterial que se aplicó en la administración de fármacos fueron los liposomas, que se describieron por primera vez en 1976. Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos anfifílicos y colesterol, que se asocian en bicapas para encapsular un interior acuoso. Las moléculas de fosfolípidos anfifílicos forman una esfera bicapa cerrada en un intento de proteger sus grupos hidrofóbicos del ambiente acuoso, mientras mantienen el contacto con la fase acuosa a través del grupo de cabeza hidrofílica. Debido a que un liposoma puede encapsular una solución acuosa con una membrana externa hidrofoba, los solutos hidrófilos no pueden pasar a través de los lípidos. Por lo tanto, los liposomas pueden transportar moléculas hidrofóbicas (en su membrana externa) así como moléculas hidrofílicas (en el núcleo acuoso interno). Los liposomas se han

investigado intensamente para su uso en la terapia contra el cáncer. La efectividad de los sistemas de administración de fármacos se puede atribuir a su tamaño pequeño, toxicidad reducida, liberación controlada del fármaco en el tiempo y modificación de su farmacocinética y distribución biológica. Las aplicaciones de los liposomas incluyen la administración de fármacos con alto peso molecular y baja solubilidad en agua para mejorar la penetración, servir como portadores y acarreadores, reducir la toxicidad, emplear otras vías de administración (nebulización, ocular, transdérmica, entre otras) y en el tratamiento de infecciones parasitarias [22- 23], entre otras.

- Dendrímeros

Los dendrímeros son polímeros globulares, producidos a partir de macromoléculas tales como la poliamidoamina (PAMAM), la polipropilenoimina y el poliaril éter, altamente ramificados y sintéticos que consisten en un núcleo iniciador y múltiples capas con grupos terminales activos. Estas capas se componen de unidades repetitivas y cada capa se denomina generación. El núcleo de un dendrímero se denota como generación cero. La estructura molecular específica de los dendrímeros les permite transportar varios fármacos utilizando sus superficies multivalentes mediante conjugación covalente o adsorción electrostática. Los dendrímeros utilizados en la administración de fármacos y en la obtención de imágenes, generalmente tienen un diámetro de 10 a 100 nm, aunque sus tamaños son en su mayoría menores de 10 nm, con múltiples grupos funcionales en su superficie, lo que los convierte en portadores ideales para la administración dirigida de fármacos. Una de las ventajas de los dendrímeros es que son similares en tamaño a muchas proteínas y biomoléculas como la insulina, el citocromo C y la hemoglobina. Los dendrímeros se pueden cargar con fármacos usando las cavidades en sus núcleos a través de la interacción hidrófoba, el enlace de hidrógeno o el enlace químico. Se ha reportado que los dendrímeros proporcionan una liberación controlada desde el núcleo interno. Sin embargo, los fármacos se incorporan tanto en el interior como en la superficie. Debido a su versatilidad, se pueden incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos en los dendrímeros. La multivalencia controlada de los dendrímeros permite la unión de varias moléculas de fármaco, grupos de direccionamiento y grupos solubilizantes en las superficies de los dendrímeros de una manera bien definida. Por ello, los dendrímeros han demostrado un gran potencial en el suministro de agentes terapéuticos anticancerígenos, cuando tienen una superficie policatiónica, que puede formar múltiples interacciones con varios receptores diana mejorando la solubilidad y permeabilidad del fármaco (conjugados de dendrímero-fármaco); y la entrega intracelular. Sin embargo, la superficie policatiónica es también la principal desventaja en las aplicaciones de administración terapéutica, debido a su efecto tóxico en las membranas celulares. Otras aplicaciones de los dendrímeros incluyen catálisis, administración de genes y ADN, biomiméticos y como soportes de fase de solución para la química combinatoria [22- 23].

- Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) están compuestas por lípidos sólidos como el gliceril behenato (Compritol), el triglicérido esteárico (tristearina), el palmitato de cetilo y el tripalmitato de glicerol (tripalmitina) con un rango de tamaño entre 50 y 1000 nm. El interés de la investigación en NLS surgió hace unos diez años debido a su potencial de escalabilidad. Los lípidos empleados son

bien tolerados por el cuerpo. Además, se considera su producción a gran escala rentable y simple mediante el uso de homogeneización a alta presión. Algunas de las características de las NLS incluyen buena tolerabilidad, focalización específica del sitio, estabilidad (estabilizada por tensioactivos o polímeros), liberación controlada de fármacos y protección de fármacos contra la degradación. Sin embargo, las NLS son conocidas por la carga insuficiente del fármaco, la expulsión del fármaco después de la transición polimórfica en el almacenamiento y el contenido relativamente alto de agua de las dispersiones. Las NLS han sido estudiadas y desarrolladas para las vías de administración como la enteral, dérmica, ocular, oral, pulmonar y rectal.

Para superar las limitaciones de NLS, se introdujeron los Portadores Lipídicos Nanoestructurados (PLN). Los PLN se componen de lípidos sólidos y una cierta cantidad de lípidos líquidos con lo que se obtiene una carga mejorada del fármaco y una mayor estabilidad en el almacenamiento, reduciendo así la expulsión del fármaco. Los PLN se han explorado para la administración cutánea en cosméticos y preparaciones dermatológicas [22].

- Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son cilindros compuestos por anillos hexagonales de átomos de carbono cuya longitud se estima entre 1-100 nm y cuyo diámetro es de 1 nm. Se han aplicado en biología como sensores para detectar ADN y proteínas, como dispositivos de diagnóstico para la discriminación de diferentes proteínas en muestras de suero y como portadores para administrar fármacos, vacunas o proteínas, esto último debido a su buena biocompatibilidad. Los nanotubos de carbono de pared simple se han utilizado como plataforma para investigar la unión de proteínas de superficie, así como para desarrollar detectores electrónicos de biomoléculas altamente específicos. Los nanotubos se clasifican en dos tipos: Nanotubos de pared simple (SWNTS) y nanotubos de pared múltiple (MWNTS). Estas son macromoléculas pequeñas que tienen un tamaño, forma y propiedades físicas notables. Sin embargo, la toxicidad de los nanotubos de carbono es preocupante, pudiendo causar reacciones inflamatorias y fibróticas [22- 23].

- Fullerenos

Un fullereno es cualquier molécula en forma de esfera hueca, estructura elipsoide o tubular compuesta enteramente de 60 o más átomos de carbono. Se les conoce comúnmente como "Buckyballs", que lleva el nombre de Buckminster Fuller, quien diseñó estructuras y edificios físicos geodésicos basados en esta geometría. Un Buckyball es una esfera geométrica hueca basada en carbono, encontrada por primera vez en el hollín desarrollado a partir de un experimento de laboratorio. Los fullerenos son similares a los nanotubos de carbono en cuanto a que su estructura molecular está completamente compuesta por un extenso esqueleto de carbono p-conjugado. Normalmente se sintetizan por métodos empíricos poco conocidos, por ejemplo, la vaporización de grafito por calentamiento resistivo, en una atmósfera inerte produce fullerenos, los cuales pueden aislarse cromatográficamente. Los fullerenos pueden unirse e inactivar de manera muy eficiente los radicales que juegan un papel crucial en el desarrollo de enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, Parkinson, Alzheimer) y enfermedades cardiovasculares; además de que se han empleado para hacer llegar fármacos y biomoléculas a las mitocondrias [22- 23].

- Nanopartículas metálicas

Se han fabricado nanopartículas (0.8 a 200 nm) de varios metales y sus óxidos, que incluyen óxido de hierro, oro, plata, gadolinio y níquel que se han estudiado para el suministro celular dirigido, siendo las nanopartículas de plata, oro y recientemente, gadolinio, son de vital importancia para el uso biomédico. Una gran cantidad de ligandos se han relacionado con nanopartículas como azúcares, péptidos, proteínas y ADN. El oro exhibe propiedades ópticas y químicas favorables a nanoescala para imágenes biomédicas y aplicaciones terapéuticas. Se han utilizado para la entrega activa de bioactivos, descubrimiento de fármacos, bioensayos, detección, imágenes, para la transfección génica, modificación en el vector de administración génica por conjugación y la modificación para dirigir proteínas y péptidos al núcleo celular debido a la capacidad de funcionalización de la superficie, como alternativa a los puntos cuánticos. El gadolinio se ha estudiado para mejorar el suministro dirigido al tumor mediante la modificación de las nanopartículas con ácido fólico, tiamina y PEG. Se informó que la modificación con folato mejora el reconocimiento, la internalización y la retención de nanopartículas de gadolinio en las células tumorales. Las nanopartículas metálicas tienen una gran área superficial, incorporando así una alta dosis de fármaco. Sin embargo, la toxicidad de las nanopartículas metálicas es preocupante [22- 23].

- Nanopartículas cerámicas

Las nanopartículas cerámicas son partículas fabricadas a partir de compuestos inorgánicos con características porosas como sílice, alúmina y dióxido de titanio (TiO_2). Se pueden sintetizar con el tamaño, la forma y la porosidad deseados. Sus tamaños son inferiores a 100 nm y pueden evitar la captación por el sistema retículo endotelial como cuerpos extraños. Las moléculas que se transportan en este tipo de partículas, como los fármacos, las proteínas y las enzimas, están protegidas de la desnaturalización a pH y temperatura fisiológicos, ya que no se modifica el volumen ni cambia la porosidad. Por lo tanto, son efectivos para la entrega de proteínas y genes. Sin embargo, estas partículas no son biodegradables, por lo que existe la preocupación de que puedan acumularse en el cuerpo y causar efectos nocivos [22].

- Puntos cuánticos

Los puntos cuánticos (PC's) son materiales semiconductores que consisten en un núcleo semiconductor recubierto por una coraza para mejorar las propiedades ópticas. Los PC's (con estreptavidina) se han utilizado para rastrear los receptores de glicina individuales (GlyR) y analizar su dinámica en la membrana neuronal de las células vivas, durante períodos que van desde milisegundos a minutos. En los últimos años, los puntos cuánticos semiconductores (PCS's) han atraído la atención de muchos grupos de investigación debido a su importancia científica y tecnológica en la microelectrónica, la optoelectrónica e imagen celular. Sus propiedades se originan a partir de su tamaño físico que oscila entre 10-100 Å de radio. Los puntos cuánticos se usan ampliamente en aplicaciones biológicas que requieren fluorescencia, incluida la tecnología de matriz de ADN, la biología celular y los ensayos de inmunofluorescencia, particularmente en la inmunotinción de proteínas, microtúbulos, actinas y antígenos nucleares. Los PC's más comúnmente utilizados son seleniuro de cadmio (CdSe), telururo de cadmio (CdTe), fosfuro de indio

(InP) y arseniuro de indio (InAs). En las bioimágenes, estas partículas sirven como agentes de contraste, proporcionando una resolución mucho mayor que los colorantes fluorescentes existentes. Estas partículas pueden absorber la luz blanca y reemitirla en nanosegundos [23].

- Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son emulsiones con un tamaño de gota inferior a 1 μm , pero generalmente entre 20 y 200 nm. Las nanoemulsiones son biodegradables, biocompatibles, fáciles de producir y se utilizan como portadores de fármacos lipofílicos que son propensos a la hidrólisis. Son empleadas como un sistema de liberación sostenida para la formación de depósitos mediante inyección subcutánea. Mejoran la absorción gastrointestinal y reducen la variabilidad inter e intra-individual para varios fármacos. Debido a su área interfacial muy grande, exhiben un excelente perfil de liberación. Las nanoemulsiones se han estudiado y desarrollado para las vías orales, oculares, pulmonares y dérmicas. La estabilidad contra la sedimentación se logra en función del tamaño de las gotas ya que la velocidad de sedimentación debido a la gravedad es menor que el movimiento y la difusión brownianos. A diferencia de las microemulsiones, las nanoemulsiones son metaestables y pueden desestabilizarse mediante la maduración de Ostwald, por lo que las pequeñas gotas se disuelven y su masa es absorbida por las grandes gotas y la floculación inducida por el agotamiento debido a la adición de polímeros espesantes. Cuando esto sucede, la nanoemulsión se vuelve opaca y se produce la formación de crema. Sin embargo, la adición de una pequeña cantidad de un segundo aceite con baja solubilidad en la fase acuosa y la adición de un segundo surfactante pueden reducir la maduración de Ostwald. Además, se deben controlar varios factores durante su producción. Estos factores incluyen seleccionar una composición apropiada, controlar el orden de adición de componentes, aplicar la cizalla de manera que rompa efectivamente las gotas y asegurar que las moléculas de la fase dispersa sean insolubles en la fase continua para que la maduración de Ostwald no ocurra rápidamente [22].

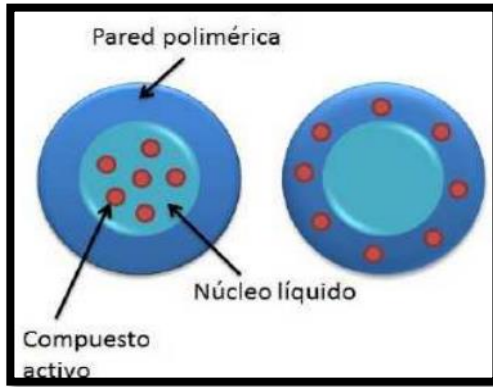
- Micelas poliméricas

Las micelas se forman cuando el tensioactivo anfifílico o las moléculas poliméricas se asocian espontáneamente en medio acuoso para formar estructuras o vesículas de núcleo-cubierta. Una micela polimérica es una nanopartícula estructurada por una cubierta hidrofílica y un núcleo hidrofóbico que se forman a partir de copolímeros de bloques anfifílicos, tales como poli (óxido de etileno) -poli (β -bencil-L-aspartato) y poli (N-isopropilacrilamida) - poliestireno, y son más estables que las micelas tensioactivas en soluciones fisiológicas. Se pueden dividir en dos categorías principales: micelas ensambladas hidrofóticamente y micelas complejas de poli-ión. Las primeras generalmente consisten en copolímeros anfifílicos con un bloque hidrofóbico y un bloque hidrofílico. El equilibrio entre esos dos bloques en un medio acuoso induce la formación espontánea de partículas de tamaño nano. Para la mayoría de los copolímeros de bloque, se usa poli (etilenglicol) (PEG) como un bloque hidrofílico. Las diferentes propiedades de micelas se originan de la naturaleza de los materiales hidrófobos formadores de núcleos, que incluyen poliésteres biodegradables como ácido poliláctico (PLA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) y ácido poliglicólico (PGA). Por lo general, tienen menos de 100 nm y su superficie hidrofílica protege su absorción inespecífica por el sistema

reticuloendotelial. El núcleo interno de una micela es hidrófobo y está rodeado por una cubierta de polímeros hidrofílicos como el poli (etilenglicol). Su núcleo hidrofóbico permite la incorporación de fármacos anfifílicos y poco solubles en agua, mientras que su capa y tamaño hidrofílicos prolongan su tiempo de circulación en la sangre y aumentan la acumulación en los tejidos tumorales. Las micelas poliméricas pueden alcanzar partes del cuerpo que son poco accesibles para los liposomas; acumulan más fármacos en los tejidos tumorales debido al aumento de la permeabilidad vascular. Por lo tanto, las micelas poliméricas pueden emplearse para administrar agentes quimioterapéuticos de manera controlada y dirigida con alta concentración en las células tumorales y efectos secundarios reducidos. Sin embargo, la capacidad de direccionamiento de las micelas poliméricas es limitada debido a la baja carga del fármaco y la baja estabilidad de la incorporación del fármaco, lo que hace que el fármaco cargado se libere antes de llegar al sitio de acción. No obstante, la manipulación de los parámetros de producción y el diseño del núcleo interno pueden mejorar la carga del fármaco y su permanencia en el sistema. Los restos lipídicos, como el colesterol y las acil carnitinas grasas, también se pueden emplear para impartir buena estabilidad a las micelas poliméricas. Esto se basa en una mayor interacción hidrofóbica entre las cadenas poliméricas en el núcleo interno debido a la presencia de acilos de ácidos grasos (por ejemplo, diacilípidos). Las micelas poliméricas se han empleado para el suministro dirigido e intracelular, la liberación sostenida y el suministro parenteral [22-23].

- Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas es el nombre colectivo de nanoesferas y nanocápsulas (figura 5). Estas son partículas coloidales sólidas que varían en tamaño de aproximadamente 10 a 500 nm. Las nanopartículas poliméricas se están desarrollando como vehículos de entrega efectivos debido a sus propiedades pasivas de direccionamiento tumoral, que conducen a la capacidad de mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios de los fármacos quimioterapéuticos. Además, esta capacidad única de las nanopartículas para acumularse preferentemente dentro y alrededor de la masa tumoral también otorga una plataforma para el diagnóstico mejorado de tumores, sentando así las bases para el desarrollo de sistemas de nanopartículas multifuncionales en la terapia contra el cáncer. Estas nanopartículas proporcionan una alternativa a los nanosistemas mencionados anteriormente debido a propiedades inherentes como biocompatibilidad, no inmunogenicidad, baja toxicidad y biodegradabilidad. Los polímeros adecuados para preparar nanopartículas incluyen: poli (alquilcianoacrilatos), poli (malonato de metilideno), poliésteres, por ejemplo, poli (ácido láctico), poli (ϵ -caprolactona) y sus copolímeros. Para la preparación de nanoesferas, también se pueden incluir macromoléculas naturales, como proteínas y polisacáridos, lípidos no polares, óxidos metálicos y sílice [23].



Las nanocápsulas (NC) son sistemas vesiculares en los que el fármaco encapsulado está confinado dentro de un núcleo o vehículo oleoso rodeado de una cubierta o membrana polimérica que controla su liberación dependiendo de su naturaleza polimérica.

Las nanoesferas (NE) son sistemas matriciales esféricos en los que el fármaco encapsulado se encuentra incrustado y/o disperso en la matriz polimérica de manera uniforme.

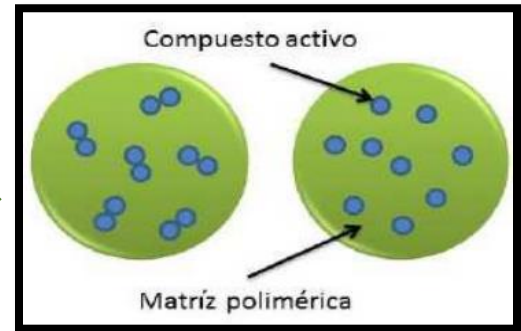


Figura 5. Nanocápsulas y nanoesferas [24- 25]

La principal ventaja de las nanocápsulas frente a las nanoesferas es su menor contenido polimérico y mayor eficiencia de encapsulación [24].

Toda la información de los tipos de sistemas de liberación nanométricos empleados en el área farmacéutica, características, ventajas y desventajas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Sistemas de liberación nanométricos, características generales, ventajas y desventajas

Sistemas de liberación nanométricos	Características	Fármacos que pueden encapsular	Ventajas	Desventajas
Liposomas [22-23,26]	Vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos anfifílicos y colesterol, que se asocian en bicapas para encapsular un interior acuoso.	Moléculas lipofílicas e hidrofílicas.	-Baja toxicidad. -Liberación controlada de fármacos. -Alta Compatibilidad. -Moderada capacidad de encapsulación de fármacos.	-Baja estabilidad. -Alto costo de preparación. -Dificultad de escalamiento.
Dendrímeros [22-23]	Son polímeros globulares, producidos a partir de macromoléculas, altamente ramificados que consisten en un núcleo iniciador y múltiples capas con grupos terminales activos con diámetros de 10 a 100 nm.	Moléculas lipofílicas e hidrofílicas.	-Son similares en tamaño a muchas biomoléculas. -Liberación controlada de fármacos -Funcionalización de superficie	-Baja capacidad de encapsulación en el interior. -Toxicidad debida a su naturaleza policatiónica. -Complicados métodos de síntesis.
NLS [22,26]	Nanoestructuras compuestas por lípidos sólidos con un rango de tamaño entre 50 y 1000 nm.	Moléculas lipofílicas.	-Escalabilidad Alta. -Liberación controlada de fármaco. -Protege al fármaco contra la degradación. -Baja toxicidad.	-Baja capacidad para encapsular. -Baja estabilidad física. -Expulsión del fármaco debido a transiciones polimórficas de lípidos.
Nanotubos de carbono [22-23]	Cilindros compuestos por anillos hexagonales de átomos de carbono cuya longitud se estima entre 1-100 nm y cuyo diámetro es de 1 nm.	Moléculas lipofílicas e hidrofílicas Transporte de macromoléculas.	-Biocompatibilidad elevada -Se usan para desarrollar detectores electrónicos de biomoléculas altamente específicos. -Alta estabilidad física.	-Alta toxicidad -Métodos de preparación costosos.
Fulerenos [22-23]	Sistemas en forma de esfera hueca, estructura elipsoide o tubular compuesta enteramente de 60 o más átomos de carbono.	Moléculas lipofílicas e hidrofílicas.	-Superconductores -Función antioxidante por sí mismos. -Alta estabilidad física.	-Alta toxicidad -Métodos de preparación costosos.
Nanopartículas metálicas [22-23]	Sistemas de tamaños de 0.8 a 200 nm de varios metales y sus óxidos	Moléculas lipofílicas e hidrofílicas Ligados a macromoléculas.	-Alta capacidad de carga. -Gran área superficial. -Efectos antimicrobianos. -Funcionalización de superficie. -Funcionan como biosensores.	-Alta toxicidad. -Métodos físicos de preparación relativamente costosos. -Muy contaminantes.

<p>Nanopartículas cerámicas [22]</p>	<p>Partículas fabricadas a partir de compuestos inorgánicos con características porosas como sílice, alúmina y titanio. Sus tamaños son inferiores a 100 nm.</p>	<p>Moléculas lipofílicas, hidrofílicas y macromoléculas</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Protección contra desnaturalización y degradación. -Capacidad de encapsulación relativamente alta. -Métodos relativamente fáciles de preparación y de bajo costo. -No se produce hinchamiento ni cambio de porosidad. -Altamente estables. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja biodegradabilidad. -Muy contaminantes. -Alta toxicidad.
<p>Puntos cuánticos [23]</p>	<p>Materiales semiconductores que consisten en un núcleo semiconductor recubierto por una carcasa para mejorar las propiedades ópticas. Su tamaño oscila entre 10-100 Å en radio.</p>	<p>Funcionalización de la superficie con fármacos lipofílicos, hidrofílicos y macromoléculas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Biosensores. -Propiedades ópticas interesantes. -Excelentes semiconductores. 	<ul style="list-style-type: none"> -Alta toxicidad. -Muy contaminantes. -Métodos de preparación costosos y difíciles.
<p>Nanoemulsiones [22,26]</p>	<p>Emulsiones con un tamaño de gota inferior a 1 µm, pero generalmente entre 20 y 200 nm.</p>	<p>Moléculas lipofílicas que se hidrolizan fácilmente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Alta estabilidad física. -Baja toxicidad. -Sistema de liberación sostenida. -Gran versatilidad. -Alta capacidad de encapsulación de fármacos. -Ofrece protección contra la degradación. 	<ul style="list-style-type: none"> -Hace uso de una gran cantidad de estabilizantes. -Mecanismo de síntesis poco conocido.
<p>Micelas poliméricas [22-23,26]</p>	<p>Sistemas nanoestructurados por una cubierta hidrofílica y un núcleo hidrofóbico formados a partir de copolímeros de bloques anfifílicos. Por lo general, tienen menos de 100 nm.</p>	<p>Moléculas lipofílicas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Alta estabilidad física. -Ofrece protección contra la degradación del fármaco. -Alta acumulación en tejidos diana. -Liberación controlada del fármaco. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja capacidad de encapsular al fármaco. -Dificultad de escalamiento. -Usa una gran cantidad de surfactante(s). -Baja capacidad de direccionamiento.
<p>Nanopartículas Poliméricas [23,26]</p>	<p>Estas son partículas coloidales sólidas (nanocápsulas y nanoesferas) que varían en tamaño de aproximadamente 10 a 500 nm.</p>	<p>Moléculas lipofílicas hidrofílicas y Macromoléculas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Biocompatibilidad (cuando se usan biopolímeros). -Baja toxicidad. -Biodegradabilidad. -Liberación controlada del fármaco. -Alta estabilidad física. -Capacidad de encapsular fármacos lipofílicos relativamente alta. 	<ul style="list-style-type: none"> -La necesidad de un proceso de purificación de NP's. -La falta de uniformidad de lote a lote de NP's al emplear biopolímeros.

3.5 Métodos de preparación de nanopartículas

Las nanopartículas se pueden preparar a partir de una variedad de materiales como proteínas, polisacáridos y polímeros sintéticos. La selección de los materiales de la matriz depende de muchos factores, que incluyen [27]:

- Tamaño de nanopartículas requerido
- Propiedades inherentes del fármaco, p. ej., solubilidad acuosa y estabilidad
- Características de la superficie, tales como carga y permeabilidad
- Grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad
- Perfil de liberación del fármaco deseado
- Antigenicidad del producto final

Los principales métodos de preparación de nanopartículas poliméricas se detallan a continuación y en la tabla 2:

Método emulsión/evaporación o evaporación de disolvente

Consiste en la obtención de una emulsión aceite en agua (o/w), a partir de una fase acuosa que contiene un agente emulsionante o estabilizante, y una fase orgánica inmisible en agua, con un principio activo, generalmente hidrófobo, y un polímero que formará la matriz. Para formar una fase dispersa homogénea se requiere de una fuente de energía que puede ser una sonda de ultrasonido o un sistema de agitación mecánica de velocidad variable. Formada la emulsión, comienza la evaporación del disolvente orgánico, que debe ser adecuadamente volátil, generalmente a presión reducida. El polímero precipita encapsulando principios activos hidrófobos (figura 6). La polimerización de una emulsión permite obtener nanopartículas de tamaño y morfología controlada. Se ha observado que el tamaño de partícula está influenciado por el tipo y las concentraciones del estabilizante, la velocidad del homogeneizador y la concentración de polímero. Para producir un tamaño de partícula pequeño y homogéneo, a menudo se suele emplear un homogeneizador o la aplicación de ultrasonido [27- 28].

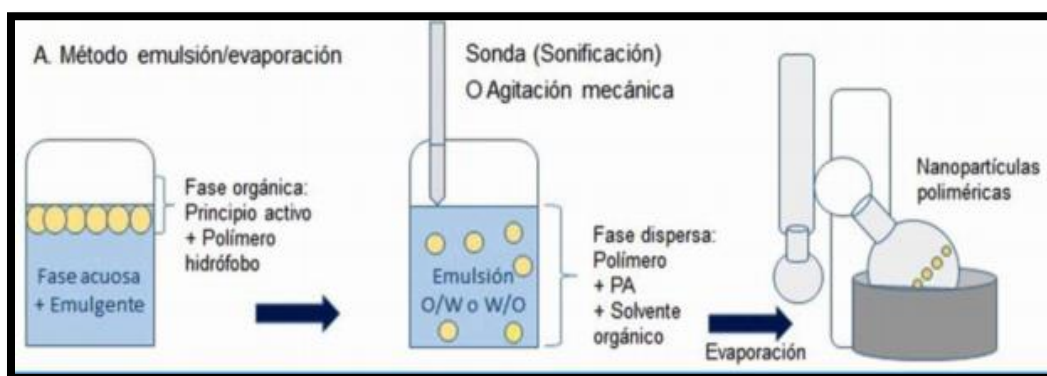


Figura 6. Método de emulsión evaporación [28]

Método de emulsificación-difusión

Este método consiste en la formación de una emulsión convencional (o / w) entre un disolvente parcialmente miscible en agua que contiene el polímero y el fármaco, y una solución acuosa que contiene un tensioactivo (figura 7). Para este método, el disolvente orgánico que contiene el polímero y el fármaco se satura mutuamente con la fase acuosa a temperatura ambiente para asegurar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. La dilución posterior con una gran cantidad de agua induce la difusión del disolvente desde las gotas dispersas hacia la fase externa, lo que resulta en la formación de partículas coloidales. En contraste con los métodos basados en la evaporación del disolvente, en esta técnica el tamaño de las gotas disminuye repentinamente en una escala de tiempo de milisegundos durante la difusión del disolvente. En general, las nanoesferas se producen mediante este método, pero las nanocápsulas se pueden obtener simplemente agregando una pequeña cantidad de aceite, por ejemplo, miglyol, en la fase orgánica. Finalmente, dependiendo de su punto de ebullición, el disolvente puede eliminarse por evaporación o filtración [29].

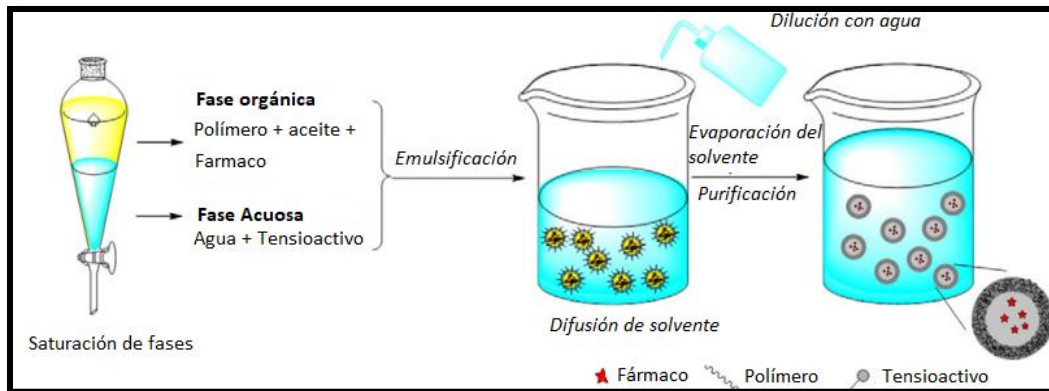


Figura 7. Método de emulsificación-difusión [29]

Método de polimerización

En este método, los monómeros se polimerizan para formar nanopartículas en una solución acuosa (figura 8). El fármaco se incorpora disolviéndolo en el medio de polimerización o mediante adsorción en las nanopartículas después de completarse la polimerización. La suspensión de nanopartículas se purifica para eliminar diversos estabilizantes y tensioactivos empleados para la polimerización por ultracentrifugación, resuspendiendo las partículas en un medio isotónico sin tensioactivo. Se ha informado de esta técnica para fabricar nanopartículas de polibutilcianoacrilato o poli (alquilcianoacrilato). La formación de nanocápsulas y su tamaño de partícula dependen de la concentración de los tensioactivos y estabilizadores utilizados [27].

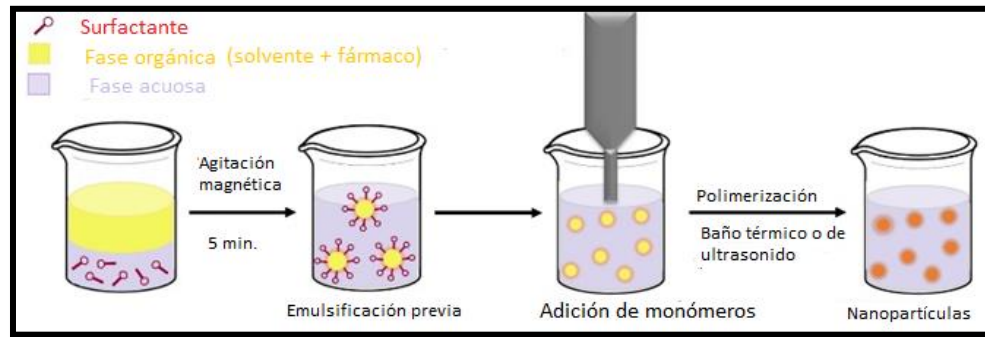


Figura 8. Método de polimerización

Método de coacervación o gelificación iónica

Diversas investigaciones [27] se han centrado en la preparación de nanopartículas utilizando polímeros hidrofílicos biodegradables como el quitosano, la gelatina y el alginato de sodio. El método implica una mezcla de dos fases acuosas, una de las cuales es el polímero quitosano, un copolímero di-bloque de óxido de etileno u óxido de propileno y el otro es un polianión tripolifosfato de sodio. En este método, el grupo amino cargado positivamente de quitosano interactúa con tripolifosfato cargado negativamente para formar coacervados con un tamaño en el rango de nanómetros. Los coacervados se forman como resultado de la interacción electrostática entre dos fases acuosas, mientras que la gelificación iónica implica la transición del material de liberación de líquido a gel.

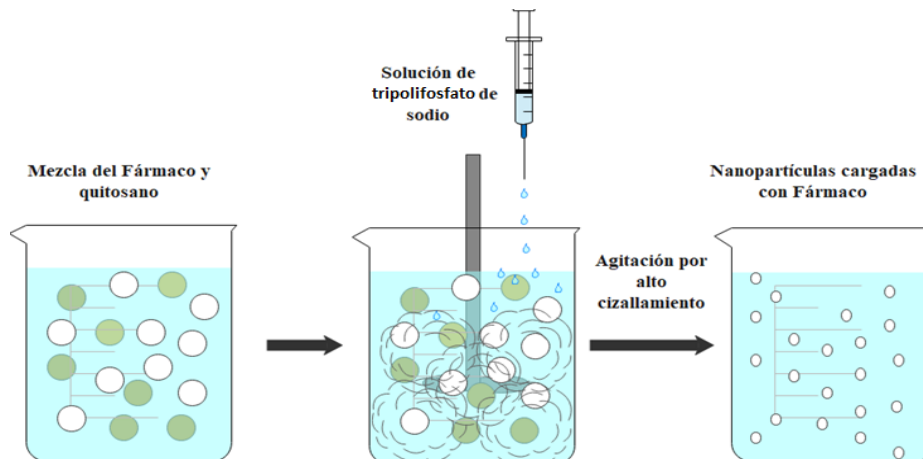


Figura 9. Método de gelación iónica

Método de nanoprecipitación o desplazamiento de disolvente

En este método, las moléculas bioactivas y el polímero se disuelven en disolventes polares volátiles como acetona, etanol, metanol o acetonitrilo y se añade a una solución acuosa, por goteo, que contiene tensioactivos o estabilizantes, el solvente es evaporado y las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa (figura 10) [28].

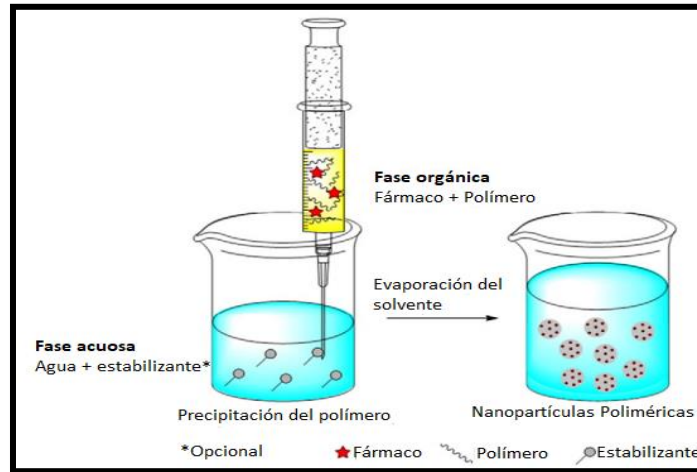


Figura 10. Método de nanoprecipitación [29]

La formación rápida de las nanopartículas se puede explicar como un proceso debido a las diferencias en la tensión superficial, conocido como el efecto Gibbs-Marangoni, donde se genera una turbulencia interfacial, la cual conlleva a la formación continua de remolinos en la interfase de ambos líquidos. Por lo tanto, se da un desplazamiento del disolvente desde la fase orgánica hasta la acuosa, formando nanocápsulas debido a la agregación del polímero en la superficie de las gotas de aceite. Cuando no se tienen fases oleosas, que generalmente constituyen un núcleo, se forman nanoesferas.

Una vez obtenidas las nanopartículas, ya sean nanocápsulas o nanoesferas, estas deben pasar por unos pasos consecutivos en donde se remueve el disolvente orgánico, el disolvente acuoso y se purifican las nanocápsulas. Primero se requiere eliminar el disolvente orgánico utilizando un equipo de rotaevaporación (facilita la remoción del disolvente aumentando la presión y no la temperatura); posteriormente, se purifica la muestra ya sea realizando diafiltración (diálisis) o una filtración en gel. Después de este paso, se debe recuperar la fracción de nanocápsulas por medio de ultracentrifugación y finalmente, se realiza la caracterización fisicoquímica de los nanosistemas [30].

Se prefiere este método cuando se usan proteínas como polímeros formadores de las nanopartículas, por ejemplo, la zeína, dadas sus propiedades, como se verá más adelante. De la misma manera el activo lipofílico que interesa encapsular y la proteína se disuelven inicialmente en una disolución de etanol, acetona o metanol que se introduce posteriormente en una solución acuosa. Cuando el etanol, miscible con el agua, pasa a la fase acuosa tiene lugar la formación de nanopartículas que encapsulan el agente activo. Mediante este método se han encapsulado diferentes sustancias que incluyen el aceite de pescado, el aceite de lino, los aceites esenciales, la curcumina, la tangeretina, entre otras. Dada la simplicidad del método, se pueden encapsular ingredientes funcionales no polares al ser disueltos en etanol junto con la proteína [24].

Tabla 2. Métodos de preparación de sistemas de liberación más usados en el área farmacéutica [27-30]

Sistemas de liberación nanométricos	Métodos de preparación
Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> • Sonicación • Electroformación • Extrusión de dispersión laminar • Homogenización por Alto cizallamiento • Evaporación de fase inversa
Dendrimeros	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento Divergente de Tomalia • Crecimiento convergente • Acoplamiento Ortogonal
NLS	<ul style="list-style-type: none"> • Homogenización por Alto cizallamiento • Dispersión por ultrasonido • Homogenización por alta presión • Emulsificación/evaporación <ul style="list-style-type: none"> • Microemulsión • Difusión de disolventes
Micelas Poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Fundición en solución • Disolución directa
Nanoemulsiones	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsificación espontánea • Emulsificación por alta presión • Homogeneización ultrasónica
NP's cerámicas	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de plantilla • Prensado en caliente • Hidrólisis controlada en medio micelar
NP's metálicas	<ul style="list-style-type: none"> • Deposición en fase gaseosa • Litografía con haz de electrones <ul style="list-style-type: none"> • Coprecipitación • Ablación láser • Emulsificación • Biosíntesis
Nanomateriales de Carbono	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de plantilla • Descarga de arco de carbono • Deposición de vapor químico catalítico <ul style="list-style-type: none"> • Ablación láser
NP's Poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación de disolvente • Emulsificación-difusión <ul style="list-style-type: none"> • Polimerización • Gelificación iónica • Nanoprecipitación.

3.6 La piel: estructura, funciones y principales afecciones

La piel es el órgano que cubre la superficie externa del cuerpo, siendo el más grande del organismo. Representa más del 10% de la masa corporal y es el órgano que le permite al cuerpo interactuar más íntimamente con su entorno. En los adultos abarca una superficie de alrededor de 2 m² y pesa 4.5-5 kg. Su espesor varía entre 0.5 mm en los párpados hasta 4 mm en el talón. Sin embargo, en gran parte del cuerpo mide 1-2 mm. Esencialmente, la piel consta de 3 capas (figura 11): el estrato córneo (EC), que es la capa externa de la piel (epidermis no viable), y forma la barrera de control de la velocidad de difusión para casi todos los compuestos. Se compone de células muertas, llamados corneocitos ricos en queratina. Estas células densas están rodeadas por una mezcla compleja de lípidos intercelulares como ceramidas, ácidos grasos libres, colesterol y sulfato de colesterol. Su característica más importante es que están estructurados como matrices de bicapa ordenadas. Las otras capas son: las capas restantes de la epidermis (epidermis viable), la dermis y el tejido subcutáneo. También hay varios apéndices asociados: folículos pilosos, conductos sudoríparos, glándulas y uñas [25, 31].

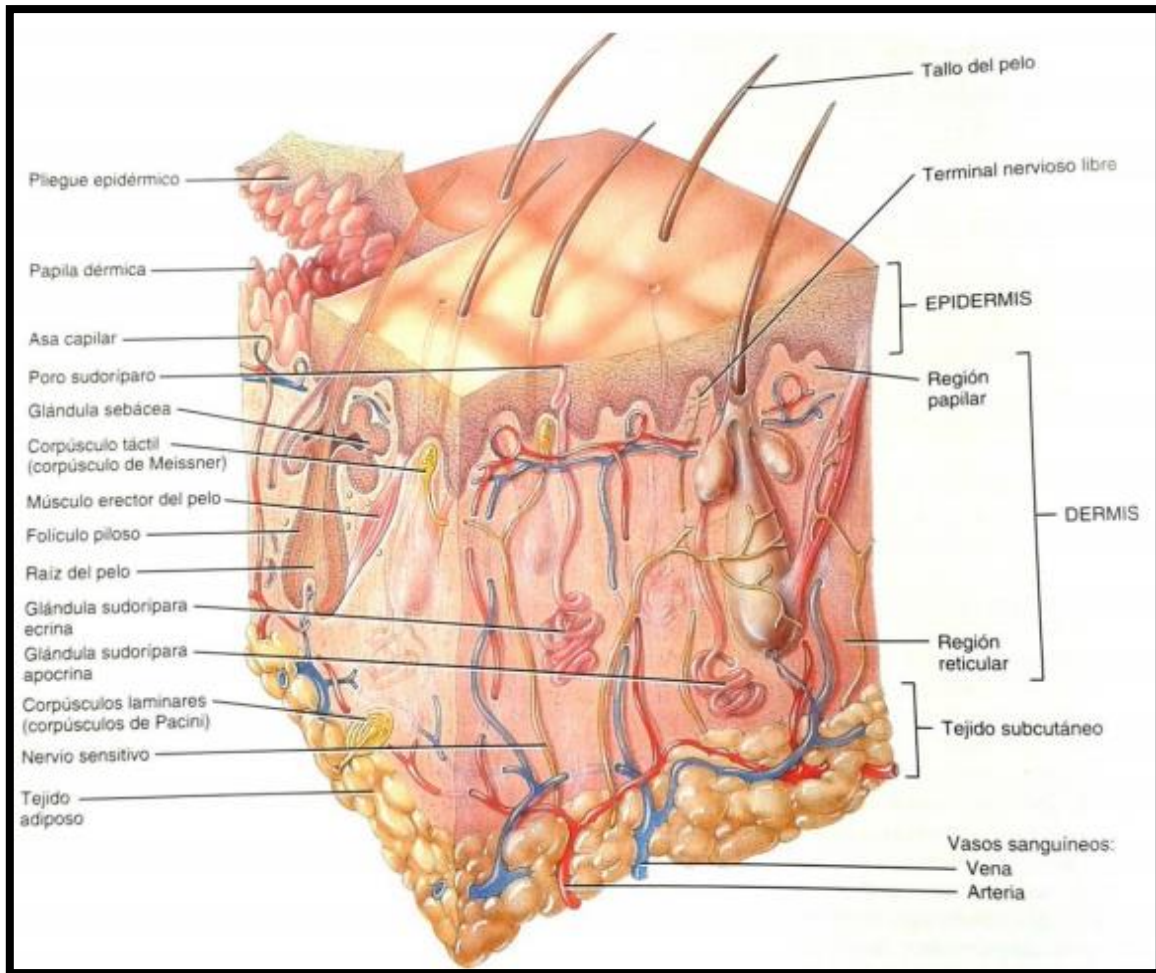


Figura 11. Capas de la piel y apéndices asociados [31]

Epidermis

La epidermis es la capa más externa la cual sirve de barrera física y química entre el interior del organismo y el ambiente externo.

La epidermis está compuesta por un epitelio pavimentoso o plano estratificado queratinizado. Contiene cuatro principales tipos de células: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Aproximadamente el 90% de las células epidérmicas son queratinocitos que se encuentran en distintos estadios del desarrollo y que están distribuidos en 5 estratos (figura 12): basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo [31].

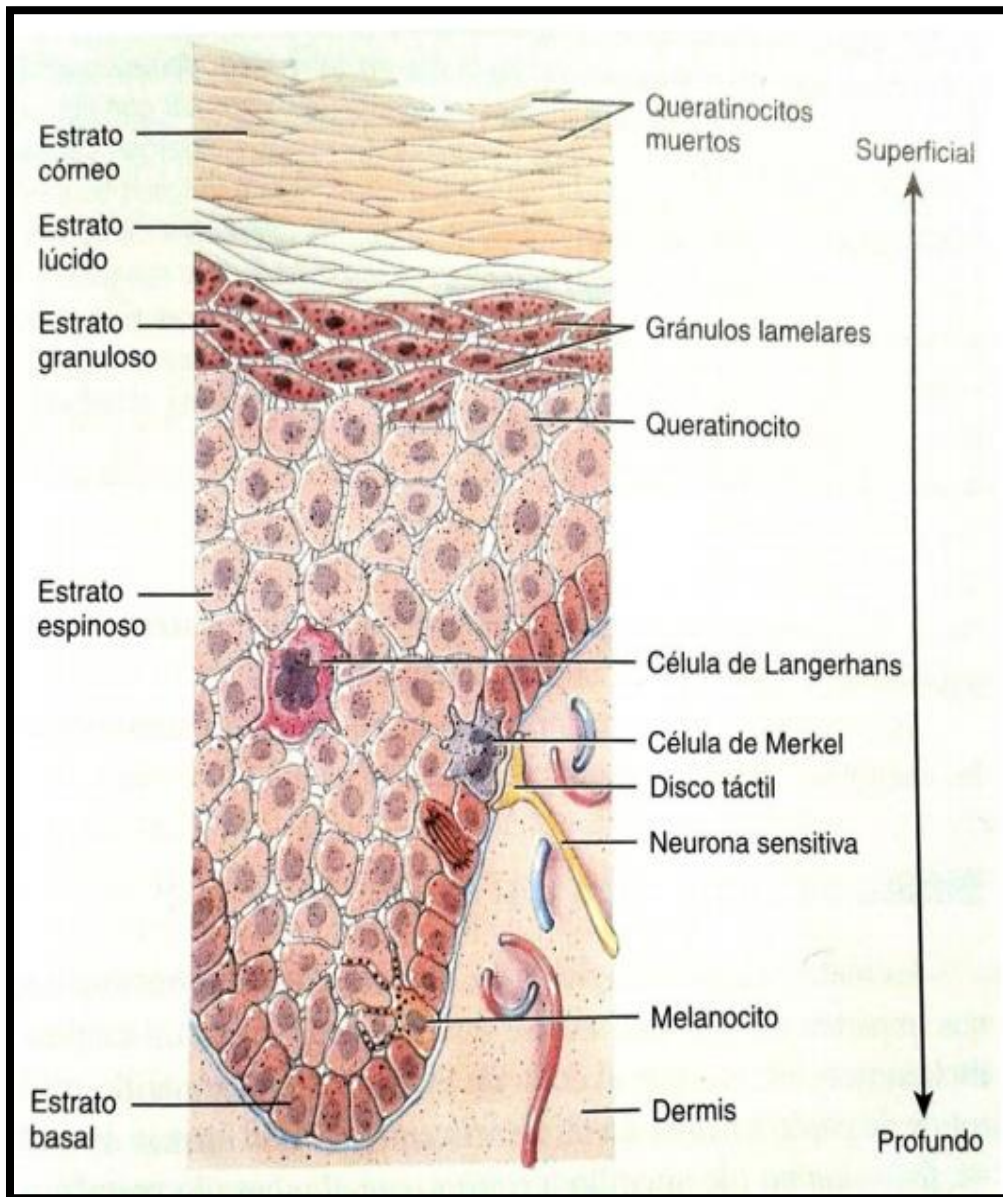


Figura 12. Capas de la epidermis [31]

Estrato córneo

El estrato córneo es la capa heterogénea más externa de la epidermis y tiene un grosor aproximado de 10-20 μm . El estrato córneo consta de aproximadamente 15 a 25 capas de células aplanadas, apiladas, hexagonales y cornificadas, incrustadas en una matriz intercelular de lípidos. Estos dominios lipídicos forman una estructura continua, por lo que se considera que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la barrera cutánea que ayuda a evitar la pérdida de agua transepidérmica. Cada célula tiene aproximadamente 40 μm de diámetro y 0,5 μm de grosor.

Las propiedades de barrera del estrato córneo pueden estar relacionadas en parte con su muy alta densidad (1,4 g/cm^3 en estado seco) y su baja hidratación del 15-20%, en comparación con el 70% habitual para el cuerpo. Cada célula del estrato córneo está compuesta principalmente de queratinas agrupadas insolubles (70%) y lípidos (20%) encerrados en una envoltura celular, que representan aproximadamente el 5% del peso del estrato córneo. La barrera de permeabilidad se encuentra dentro de las bicapas lipídicas en los espacios intercelulares del estrato córneo y consta de ceramidas (40–50%), ácidos grasos (15–25%), colesterol (20–25%) y sulfato de colesterol (5–10%).

La función de barrera se ve facilitada aún más por la descamación continua de esta capa córnea con una renovación total del estrato córneo que ocurre una vez cada 2-3 semanas. Las células del estrato córneo se originan en la epidermis viable atravesando el estrato espinoso y el estrato granuloso hasta llegar a la capa más externa por lo que sufren muchos cambios morfológicos antes de la descamación. Por lo tanto, la epidermis consta de varios estratos celulares a diferentes niveles de diferenciación. Los orígenes de las células de la epidermis se encuentran en la lámina basal entre la dermis y la epidermis viable. En esta capa hay melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y dos tipos principales de células queratinicas. La primera de ellas funciona como células madre que tienen la capacidad de dividirse y producir nuevas células y la segunda sirve para anclar la epidermis a la membrana basal [25, 31- 32].

Al alcanzar el EC, las células se vuelven anucleadas y aplanadas y reciben el nombre de corneocitos. Estos corneocitos ricos en proteínas, están empaquetados densamente en una matriz lipídica extracelular que se encuentra dispuesta en bicapas. A este arreglo se le conoce como de “ladrillos y cemento” [32].

Dermis

La dermis tiene un grosor de aproximadamente 0.1–0.5 cm y consiste en fibras de colágeno (70%) y elastina. En la dermis, los glucosaminoglucanos o los mucopolisacáridos ácidos están unidos covalentemente a las cadenas de péptidos para formar proteoglicanos, la sustancia fundamental que promueve la elasticidad de la piel. Las principales células presentes son los fibroblastos, que producen los componentes del tejido conectivo de colágeno, laminina, fibronectina y vitronectina; mastocitos, que participan en las respuestas inmunes e inflamatorias; y melanocitos involucrados en la producción del pigmento melanina. Los nervios, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos también están presentes en la dermis [25].

Dentro de la dermis hay una extensa red vascular que proporciona nutrición, reparación, respuesta inmune, intercambio de calor, y regulación térmica. Los vasos sanguíneos de la piel derivan de aquellos en los tejidos subcutáneos (hipodermis), con una red arterial que irriga la capa papilar, los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y apocrinas, el área subcutánea y la propia dermis. Estas arterias se alimentan en arteriolas, capilares, vénulas y, por lo tanto, en las venas. De particular importancia en esta red vascular es la presencia de anastomosis arteriovenosas a todos los niveles en la piel. Estas anastomosis arteriovenosas permiten una derivación directa de hasta el 60% del flujo sanguíneo de la piel entre las arterias y las venas, siendo fundamentales para las funciones de regulación de calor y control de vasos sanguíneos de la piel. Los cambios en el flujo sanguíneo son más evidentes en la piel en relación con diversas respuestas fisiológicas e incluyen efectos psicológicos, como shock ("drenaje de color de la piel") y vergüenza ("rubor"), efectos de temperatura y fisiológicos. respuestas al ejercicio, hemorragia y consumo de alcohol [25].

El sistema linfático es un componente importante de la piel al regular su presión intersticial, movilizar mecanismos de defensa y eliminar desechos. Existe como una malla densa y plana en las capas papilares de la dermis y se extiende hacia las regiones más profundas de la dermis. También están presentes en la dermis una serie de diferentes tipos de fibras nerviosas que irrigan la piel, incluidas las de presión, dolor y temperatura. Los apéndices epidérmicos, como los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas, están incrustados en la dermis [25].

Hipodermis

La capa más profunda de la piel es el tejido subcutáneo o hipodermis. La hipodermis actúa como un aislante térmico, un amortiguador y una región de almacenamiento de energía. Esta capa es una red de células grasas dispuestas en lóbulos y unidas a la dermis mediante la interconexión de las fibras de colágeno y elastina. Además de las células grasas (posiblemente el 50% de la grasa corporal), las otras células principales en la hipodermis son fibroblastos y macrófagos. Una de las funciones principales de la hipodermis es transportar los sistemas vascular y neural de la piel. También ancla la piel al músculo subyacente. Los fibroblastos y los adipocitos pueden ser estimulados por la acumulación de líquido intersticial y linfático dentro de la piel y el tejido subcutáneo [25].

Apéndices de la piel

Existen cuatro apéndices de la piel: los folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas, las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas y las uñas, pero estas ocupan solo alrededor del 0.1% de la superficie total de la piel humana [25].

Los folículos pilosebáceos tienen aproximadamente del 10 al 20% de la flora residente y no se pueden descontaminar mediante lavado. Los folículos pilosos se distribuyen por toda la superficie de la piel, con la excepción de las plantas de los pies, las palmas de las manos y los labios. Un músculo liso, el erector pilorum, une el folículo al tejido dérmico y permite que el cabello se levante en respuesta al miedo. Cada folículo está asociado con una glándula sebácea que varía en tamaño de 200 a 2000 μm de diámetro. El sebo secretado por esta glándula que consiste en triglicéridos, ácidos

grasos libres y ceras, protege y lubrica la piel, además de mantener un pH de aproximadamente 5. Las glándulas sebáceas están ausentes en las palmas, las plantas de los pies y las uñas. Las glándulas sudoríparas o las glándulas ecrinas responden a la temperatura a través de los nervios parasimpáticos, excepto en las palmas, las plantas y las axilas, donde responden a los estímulos emocionales a través de los nervios simpáticos. Las glándulas ecrinas son estructuras epidérmicas que son tubos simples en espiral que surgen de una bola en espiral, de aproximadamente 100 μm de diámetro, ubicada en la dermis inferior. Secreta una solución salina diluida con un pH de aproximadamente 5, esta secreción es estimulada por factores que controlan la temperatura, como el ejercicio y la temperatura ambiental alta, así como el estrés emocional a través del sistema nervioso autónomo (simpático). Estas glándulas tienen una superficie total de aproximadamente 1 / 10,000 de la superficie corporal total. Las glándulas apocrinas están limitadas a regiones corporales específicas y también son tubos en espiral. Estas glándulas son aproximadamente diez veces más grandes que los conductos ecrinos, se extienden hasta los tejidos subcutáneos y se combinan con los folículos pilosos [25].

La función de las uñas se considera como protección. La placa de la uña consiste en capas de células queratinizadas aplanadas fusionadas en una masa densa pero elástica. Las células de la placa ungueal se originan en la matriz ungueal y crecen distalmente a una velocidad de aproximadamente 0.1 mm / día. En el proceso de queratinización, las células experimentan cambios en la forma y otros cambios, similares a los experimentados por las células epidérmicas que forman el estrato córneo. Esto no es sorprendente porque la membrana basal de la matriz ungueal muestra muchas similitudes bioquímicas con la membrana basal epidérmica. Por lo tanto, los componentes principales son proteínas de queratina altamente plegadas con pequeñas cantidades de lípidos (0.1–1.0%). El plastificante principal de la placa de la uña es el agua, que normalmente está presente en una concentración de 7-12% [25].

Funciones de la piel

Muchas de las funciones de la piel pueden clasificarse como esenciales para la supervivencia del cuerpo de mamíferos y humanos en un ambiente relativamente hostil. La piel es un órgano importante para mantener la homeostasis del cuerpo, especialmente en términos de su composición, regulación del calor, control de la presión arterial y funciones excretoras, además, la importancia del papel protector y homeostático permite la supervivencia de los humanos en un ambiente de temperatura variable, contenido de agua (humedad y baño), y la presencia de peligros ambientales, como calor, presión, productos químicos, bacterias, alérgenos, hongos y radiación. [25, 31- 32].

Finalmente, la piel es un órgano que se encuentra en un estado continuo de regeneración y reparación. Para cumplir con cada una de estas funciones, la piel debe ser resistente, robusta y flexible, con una comunicación efectiva entre cada uno de los componentes intrínsecos mencionados anteriormente. La epidermis juega un papel en la temperatura, la presión y la regulación del dolor [25, 32].

Las funciones de los apéndices son las siguientes: el folículo piloso y la glándula sebácea cumplen con la protección (cabello) y lubricación (sebo); las glándulas ecrinas y apocrinas tienen las funciones de enfriamiento y glándula sexual secundaria vestigial, respectivamente; y las uñas tienen la función de proteger. La hipodermis actúa como un aislante térmico, un amortiguador y una región de almacenamiento de energía. Una de las funciones principales de la hipodermis es transportar los sistemas vascular y neural de la piel [25].

Principales afecciones de la piel

En México, la Fundación Mexicana para la Dermatología y la Academia Mexicana de Dermatología, señalan que los padecimientos de la piel son uno de los problemas más serios de salud pública, debido a que dichos padecimientos no están considerados como enfermedades catastróficas.

Los 9 trastornos o afecciones cutáneas más comunes según Rodney Goodie son [33]:

- Acné
El acné afecta a más del 80% de la población mexicana, lo que la convierte en la afección cutánea más común en México. El acné a menudo aparece en la cara, el cuello, los hombros, el pecho y la parte superior de la espalda. Las rupturas ocurren cuando los poros se obstruyen e inflaman por el sebo y la acumulación de piel muerta. El acné se materializa durante la pubertad y puede durar hasta la mediana edad [34].
- Herpes labial
Aproximadamente el 90 % de la población mexicana son portadores del virus del herpes simple (VHS) altamente contagioso, que es la causa más común de herpes labial. El herpes labial aparece como un grupo de ampollas en el labio o la boca, no son graves y tienden a desaparecer en dos semanas. Los portadores de VHS deben evitar el contacto con otros durante un brote de herpes labial [35].
- Urticaria
La urticaria es el resultado de una reacción alérgica. A menudo aparecen como ronchas con picazón en la piel y pueden ser tan pequeñas como la punta de un bolígrafo o tan grandes como un plato de comida. Los antihistamínicos y las cremas para la piel se pueden usar para aliviar la picazón que experimentan las personas.
- Rosácea
La Rosácea es un padecimiento frecuente caracterizado por el enrojecimiento de la cara, con lesiones parecidas al acné y puede llegar a deformar la nariz. Este padecimiento se observa en edad adulta con mayor frecuencia entre los 30 y 50 años. Se presenta en personas de piel blanca y predomina en mujeres. Se caracteriza inicialmente por enrojecimiento fácil de las mejillas, barbilla, frente, nariz y en ocasiones pecho o espalda. Conforme avanza el padecimiento el enrojecimiento es persistente con la aparición de finos vasos sanguíneos. Da una erupción parecida al acné, aunque esta no tiene espinillas. La mitad de los pacientes puede tener enrojecimiento de los ojos. En las fases más avanzadas produce crecimiento de la nariz, mentón, mejillas o párpados, que ocasiona alteración en la autoestima del paciente [36].
- Eczema

La dermatitis atópica, más comúnmente conocida como eczema, es una enfermedad común entre los niños. Se caracteriza por parches secos y escamosos en la piel. Aparece en el cuero cabelludo, la frente, la cara, las mejillas y las manos. El eccema puede ser duradero y debe tratarse con cremas y antihistamínicos para aliviar la picazón. Se estima que en México existen al menos 12 millones de personas que padecen dermatitis atópica y se sabe que hasta el 75% de los casos graves llegan a presentar al menos una comorbilidad alérgica: 60% rinitis, 40% asma, 30% alergia alimentaria y 13% poliposis nasal [37].

- **Psoriasis**
En México, cerca de 2.5 millones de personas viven con la enfermedad de las cuales entre 25 y 30% cursan con un cuadro clínico de moderado a severo. La psoriasis hace que el cuerpo genere nuevas células de la piel en cuestión de días. Estas células se apilan en la superficie de la piel y crean parches escamosos. Las placas aparecen con mayor frecuencia en las rodillas, los codos, la espalda baja y el cuero cabelludo [38].
- **Queratosis Pilaris**
La queratosis pilar aparece como pequeñas protuberancias en la piel parecidas a la piel de gallina o pequeños granos. Las protuberancias son tapones inofensivos de células muertas de la piel, a menudo en los brazos y los muslos. El tratamiento de la piel seca ayuda a minimizar la apariencia de las protuberancias y alivia la picazón que causan.
- **Melanoma**
El melanoma con frecuencia se ve como un lunar benigno en la piel, pero tiende a crecer rápidamente. Como la forma más grave de cáncer de piel, puede ser mortal si no se detecta a tiempo. Cada año se diagnostican 16 mil mexicanos con estas neoplasias. El melanoma es altamente tratable si el dermatólogo lo detecta temprano durante un examen de detección [39].
- **Lupus**
El lupus es una enfermedad autoinmune que ataca partes del cuerpo, como la piel, los riñones y los pulmones. El lupus a menudo aparece como una erupción generalizada en la espalda, un parche grueso y escamoso en la cara, dolor en la boca o la nariz o un brote similar a una quemadura solar. El lupus se desencadena con frecuencia por la luz solar, la luz ultravioleta y el estrés, entre otros factores ambientales. Afecta a 9 mujeres por cada hombre, entre 17 y 35 años. El 40% de los pacientes presenta manifestaciones cutáneas como principal signo de alerta [40].

Asimismo, las heridas o lesiones de la piel pueden ser de importancia y origen diverso. Suelen estar causadas por accidentes (cortes, laceraciones, contusiones), agentes externos (frío, humedad, viento, radiación solar) o son el resultado de determinadas técnicas de tratamiento cutáneo (láser, *peeling*, dermoabrasión, depilación, tatuajes) que comportan efectos secundarios indeseados (eritema, enrojecimiento, hiperpigmentación, sequedad o prurito, entre otros) [5].

Existen diferentes tipos de heridas, entre las cuales están:

- **Agudas:** Este tipo de heridas se caracterizan por la curación completa en el tiempo previsto y por no presentar normalmente complicaciones. Hay diferentes tipos de heridas agudas:

cortantes, contusas, punzantes, raspaduras, avulsivas, magulladuras, por aplastamiento y quemaduras.

- **Crónicas:** Este tipo de heridas se caracterizan por retrasarse en su tiempo de curación y por la ausencia de crecimiento de los tejidos. Se asocian a una excesiva inflamación y/o pobre perfusión de oxígeno. A veces pueden aparecer enfermedades concomitantes. Las heridas crónicas más frecuentes son las úlceras por presión, las vasculares (arteriales y venosas), las neuropáticas (pie diabético) y las neoplásicas.

Las heridas también se pueden clasificar de una manera general en función de si son abiertas o cerradas, y de si tienen la consideración de simples o complejas.

- **Abiertas:** En este caso hay separación de los tejidos blandos y una mayor probabilidad de infección.
- **Cerradas:** Habitualmente son las heridas producidas por golpes, pero también se incluyen en este grupo los cortes e incisiones de escasa importancia y los arañazos. No hay separación de los tejidos blandos y la lesión va acompañada de hematoma.
- **Simple:** Son las heridas que solo afectan a la piel y no alcanzan a comprometer órganos internos. En este grupo se incluirían cortes, raspones, arañazos, etc.
- **Complejas:** Son heridas extensas y profundas que cursan con abundante hemorragia. En este grupo se encuadran las lesiones de músculos, nervios, tendones, órganos internos y vasos sanguíneos, independientemente de que se produzca perforación visceral o no.

Las agresiones a la piel que derivan en lesiones no sólo provienen de traumatismos producidos por utensilios cortantes, golpes o intervenciones quirúrgicas. También factores externos como la exposición al sol sin una fotoprotección adecuada, o tecnológicos, como determinadas técnicas de intervención y tratamiento dermatológico, así como prácticas con finalidad estética, pueden causar lesiones cutáneas de mayor o menor relevancia [5].

La inflamación es una característica principal de muchos procesos de enfermedades dermatológicas. La inflamación tiene muchos efectos sobre la fisiología cutánea, y la función de barrera de la piel es un portal de entrada para microbios, alérgenos y otros estímulos proinflamatorios, que pueden causar una mayor inflamación [41].

Aunque la piel se regenera constantemente por sí sola de forma natural, son constantes las agresiones a las que puede estar sometida, de ahí que en la farmacia se desarrollen y dispongan de numerosos productos indicados para protegerla y regenerarla [6].

3.7 Nanotecnología y piel

La gran superficie de la piel (casi 2 m²) la convierte en una ruta potencialmente interesante para la administración de fármacos [1]. La nanotecnología promete transformar el diagnóstico y el tratamiento de afecciones dermatológicas debido a su interacción a nivel nanométrico con el tejido de la piel [42].

Como ya se mencionó, la piel forma una barrera para el ambiente externo y es impermeable a los fármacos debido a la cohesión de las células epidérmicas y los lípidos del estrato córneo. Por ello, la nanotecnología se puede utilizar para modificar la permeación y penetración del fármaco controlando la liberación de sustancias activas y aumentando el período de permanencia en la piel, además de garantizar un contacto directo con el estrato córneo y los apéndices de la piel y proteger el fármaco contra la inestabilidad química o física [42].

Por tanto, la búsqueda de nuevas estrategias capaces de mejorar la penetración tópica y transdérmica de fármacos es esencial. Se han propuesto diferentes sistemas de nanoacarreadores en un intento por favorecer el transporte de fármacos a través de la piel, permitiendo la retención de activos (hidrofílicos y lipofílicos) y, en algunos casos, permitiendo una liberación controlada. La penetración de la piel es esencial para una serie de desafíos y preocupaciones actuales como, la contaminación por microorganismos y productos químicos, el suministro de fármacos a la piel (tratamientos dermatológicos) y a través de la piel (tratamientos transdérmicos), y el cuidado y protección de la piel (cosméticos) [25].

La piel representa un vehículo maravilloso a través del cual los nanomateriales pueden investigarse para la administración de fármacos, tanto con respecto a la administración de ingredientes activos, como a su eficacia. La entrega tópica de fármacos se destina principalmente a un efecto local, donde puede:

- Eliminar potencialmente la necesidad de terapias farmacológicas administradas por vía sistémica.
- Minimizar la dosis total requerida para llegar al sitio objetivo (piel).
- Reducir los efectos adversos fuera del objetivo [1, 25, 41].

Los tipos de acarreadores nanoestructurados más comúnmente utilizados para la administración tópica y / o transdérmica de fármacos son las nanopartículas poliméricas, las micro- y nanoemulsiones, las nanopartículas y vesículas a base de lípidos (liposomas y nanopartículas sólidas), las nanopartículas metálicas y los dendrímeros [1, 25].

En general, las principales ventajas de las micropartículas y nanopartículas sobre las formulaciones convencionales como cremas, soluciones, pomadas, lociones, geles y espumas, es que las segundas tienen diferentes características de absorción y propiedades estéticas, y también tienen algunas limitaciones importantes, como pobre penetración y liberación incontrolada de fármacos. Además, los puntos finales de tolerabilidad y seguridad, como irritación, sequedad, eritema, picazón, escozor y ardor, serán factores clave para determinar su utilidad. Puede ocurrir que, al usar un sistema

tradicional, el suministro de fármacos a veces es rápido y las concentraciones tópicas o plasmáticas pueden provocar efectos tóxicos. Sin embargo, para el caso de las nanopartículas, se necesita una cantidad menor del fármaco debido a la naturaleza específica del suministro [25]. La mayoría de los nanomateriales no son absorbidos sistémicamente. Existe evidencia que indica que sólo las partículas de menos de 10 nm exhiben absorción transdérmica [42].

Hasta ahora, solo unos pocos productos farmacéuticos tópicos en el mercado se benefician de los nanoacarreadores, pero varios ensayos clínicos han demostrado un efecto mejorado en comparación con las formulaciones convencionales, por ejemplo, el aciclovir encapsulado en etosomas mejoró el tiempo de formación de costras de las lesiones con 1.8 días en comparación con una crema comercial [43].

Las nanopartículas basadas en polímeros (nanoesferas y nanocápsulas) son de interés para la administración en piel debido a la liberación controlada de ingredientes activos encapsulados, que deben difundir a través de la matriz polimérica para penetrar en la piel. Son estructuralmente estables debido a su matriz rígida y pueden mantener su estructura durante largos períodos de tiempo cuando se aplican tópicamente. La mayoría de los sistemas poliméricos se retienen en el estrato córneo y pueden mejorar la liberación del fármaco a través de la piel, lo que depende de las características de absorción del fármaco, así como de las propiedades de liberación a partir del sistema que lo contiene [42].

La aplicación cutánea de liposomas, nanopartículas poliméricas y lipídicas, tiene sentido cuando se consideran los efectos superficiales (formación de película y efectos oclusivos), efectos locales en la piel (administración de fármacos en la epidermis y la dermis) y efectos sistémicos (penetración más profunda de fármacos y administración transdérmica). En usos potenciales, aparte de aquellos relacionados con los efectos superficiales, el nanoacarreador tiene que superar la barrera del estrato córneo para entregar el fármaco más o menos profundamente en las capas de la piel. Los avances recientes en el estudio de los mecanismos de penetración tratan sobre el control de la ruta de penetración intercelular por el estado cristalino de los lípidos, y la penetración a través de los apéndices de la piel (la vía folicular) que parece contribuir mucho más de lo que se pensaba anteriormente. Las aplicaciones que dependen de la penetración en la piel que han recibido atención especial incluyen la administración transdérmica de nano y micropartículas por los folículos capilares, especialmente para las nanopartículas que penetran en los folículos capilares dirigidos de manera muy eficiente al sistema inmunitario de la piel para desarrollar nuevas estrategias de vacunación y problemas relacionados con enfermedades de la piel [25].

Existen datos limitados sobre la penetración de nanopartículas en la piel a través de la piel herida o enferma. Sin embargo, es probable que la administración de fármacos en forma de nanopartículas para efectos locales se use en la piel enferma ya que, hipotéticamente, las nanopartículas podrían penetrar estas lesiones de manera más eficiente debido a la alteración en el estrato córneo, inflamación y aumento de la rotación de queratinocitos.

3.8 Vitamina A

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada especifica que el término “vitamina A” debe usarse como el descriptor genérico para los retinoides que exhiben cualitativamente la actividad biológica del retinol, como el retinal y el ácido retinoico, los cuales son extremadamente importantes desde el punto de vista fisiológico. La vitamina A en los alimentos se encuentra en dos formas:

- Ciertos carotenoides, también conocidos como provitamina A, están presentes en alimentos de origen vegetal y, cuando se ingieren, actúan como precursores de la conversión a vitamina A en tejidos de vertebrados.
- Ésteres de retinilo que son la forma más abundante de vitamina A en la mayoría de los tejidos y la forma que se usa a menudo para preparar dietas, suplementos y alimentos fortificados. En un éster de retinilo, el grupo de alcohol C-15 del retinol se esterifica con un ácido graso, generalmente un ácido alifático de cadena larga como el ácido palmítico (véase figura 13) [44- 45].

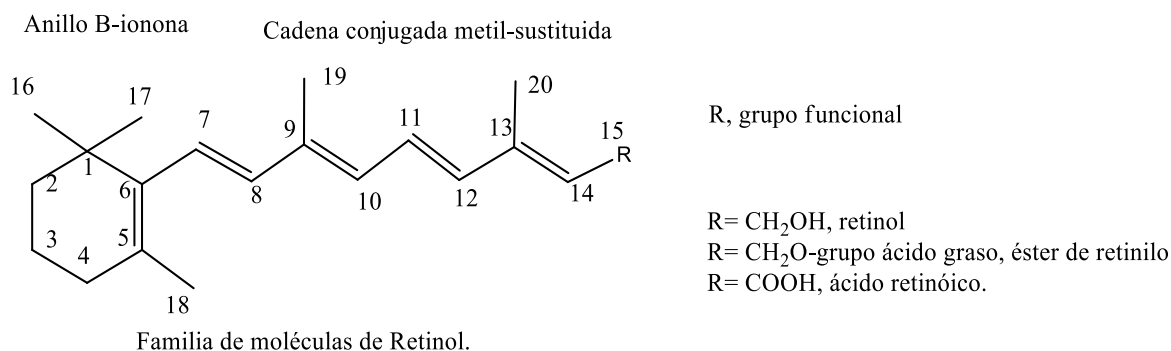


Figura 13. Vitamina A y familia ilustrada por el sistema numérico IUPAC [44]

La vitamina A y sus derivados naturales y sintéticos, denominados colectivamente retinoides, ejercen una amplia variedad de profundos efectos en la embriogénesis, reproducción, regulación de la inflamación, crecimiento y diferenciación de células normales y tumorales. Se han sintetizado miles de análogos de ácido retinoico, de los cuales se han establecido tres generaciones para el tratamiento sistémico y tópico de diversos trastornos de la piel [46].

Los retinoides se encuentran entre los fármacos más eficaces utilizados en el tratamiento de trastornos dermatológicos y tienen una amplia gama de efectos biológicos. Son potentes reguladores de la proliferación celular, la diferenciación celular y la morfogénesis. Debido a estas propiedades, los retinoides son agentes terapéuticos importantes para el tratamiento de numerosos trastornos queratinizantes como la psoriasis y el acné. Los niveles celulares de ácido retinoico están estrictamente regulados a través de un equilibrio de absorción, biosíntesis, catabolismo y transporte de eflujo. Un efecto secundario importante de todos los retinoides es la teratogenicidad, especialmente al comienzo del embarazo, que puede persistir hasta 2 años

después de la interrupción de los retinoides administrados por vía oral, como el etretinato, que puede persistir en el cuerpo durante varios años [46].

3.9 Retinol o all-trans-retinol

La vitamina A (all trans-retinol; retinol) y sus derivados son reguladores importantes en el crecimiento de células epidérmicas, la diferenciación de células normales y el mantenimiento de las células, además de tener efectos antioxidantes [47- 48]. Por ello, han sido empleados extensivamente en las industrias farmacéuticas y cosméticas debido a que son efectivos para el tratamiento de enfermedades de la piel [49]. Pueden inducir la biosíntesis del colágeno y reducir la expresión de la metaloproteasa-1, también ayuda a mantener la salud de la piel (previene el acné, la dermatitis y para tratar otros problemas como la psoriasis, ictiosis e incluso cáncer). El retinol es, en este momento, la sustancia que más se usa como un compuesto antienvjecimiento y, en comparación con la tretinoína, causa menos irritación en la piel. El retinol tiene efectos positivos no sólo en el envejecimiento extrínseco de la piel sino también intrínseco al neutralizar las moléculas de oxígeno inestables (radicales libres) y tiene un fuerte efecto positivo en la propagación y el metabolismo del colágeno [47, 50].

3.9.1 El ácido retinoico: La forma activa de la vitamina A

El retinol es precursor del ácido retinoico (AR) o tretinoína, el cual es la forma biológicamente activa de la vitamina A [51- 52]. La piel humana tiene la capacidad de convertir el retinol en su metabolito biológicamente activo, el ácido retinoico y sus isómeros cis [48- 51]. Cuando se aplica retinol tópicamente a la piel humana, penetra y se convierte secuencialmente en retinaldehído y luego en ácido retinoico. El ácido retinoico juega un papel clave importante en la reproducción, el desarrollo embrionario, el crecimiento y la diferenciación celular, el mantenimiento de la integridad celular epitelial y la función inmune [45].

Por ello, debido a su gran funcionalidad, la tretinoína y otros derivados sintéticos han sido ampliamente utilizados tópicamente en formulaciones farmacéuticas y cosméticas para prevenir y reparar los síntomas del envejecimiento de la piel, el acné y la psoriasis [53]. Sin embargo, el uso de tretinoína puede estar limitado por su tendencia a causar irritación que puede manifestarse como eritema, descamación, ardor y prurito [46]. Para aumentar la estabilidad y disminuir la toxicidad del ácido retinoico, sus precursores retinol y ésteres de retinilo (como el palmitato) se emplean en formulaciones para uso dermatológico [54].

Los ésteres de retinilo, y en particular el palmitato de retinilo (PR), son la principal forma de almacenamiento de retinol en humanos y animales y puede hidrolizarse enzimáticamente de nuevo a retinol y a ácido retinoico *in vivo* [48], como se muestra en la figura 14.

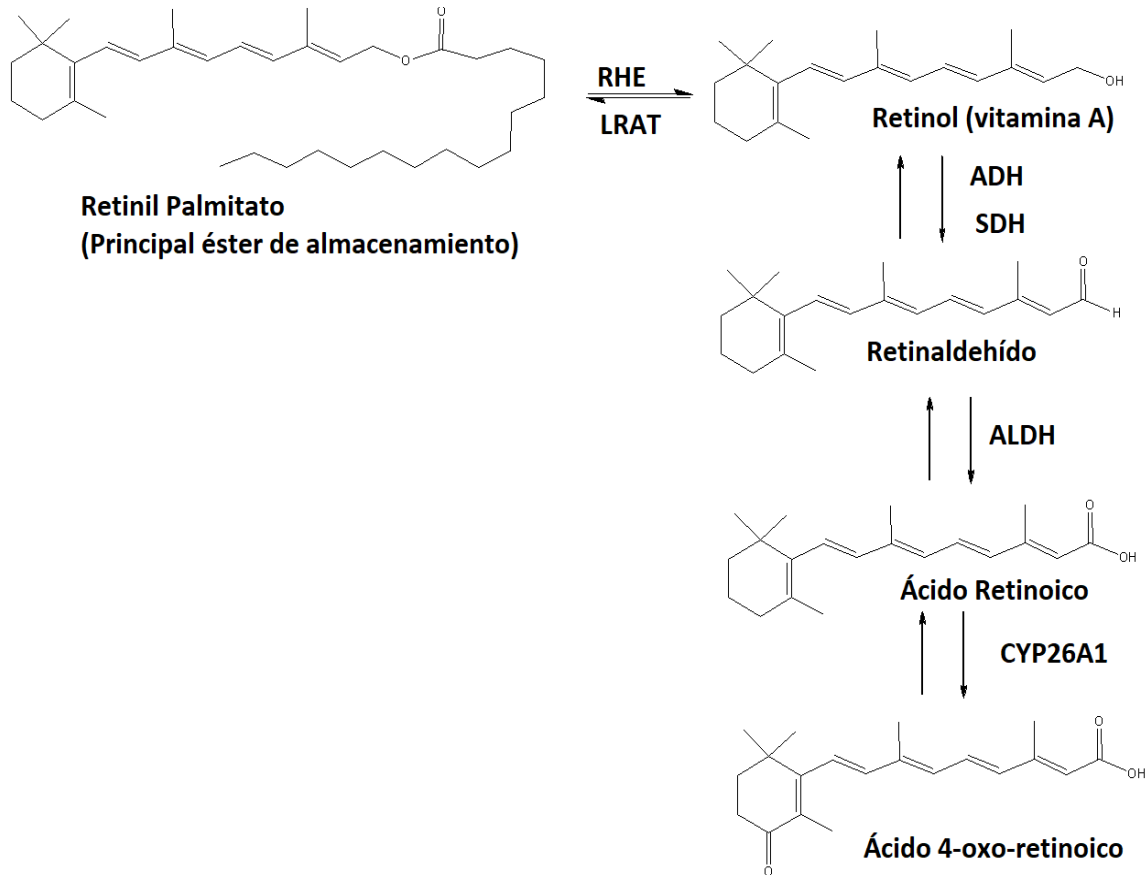


Figura 14. Metabolismo del palmitato de retinilo hasta el ácido 4-oxo-retinoico en la piel [46]

Para ser activo, el PR debe convertirse enzimáticamente en la piel en retinol mediante la escisión del enlace éster y luego debe convertirse en tretinoína mediante procesos oxidativos [54]. La demanda de retinol da como resultado la liberación de complejos de proteínas de unión retinol-retinol que son absorbidos por la piel humana. El almacenamiento de retinol en la piel humana se produce a través de la esterificación mediada por lecitina: retinol aciltransferasa (LRAT) y la mayor actividad esterificante se encuentra en la capa basal de la epidermis. La hidrólisis de éster de retinilo (PR) a retinol está regulada por una hidrolasa específica de éster de retinilo (REH). El ácido retinoico se deriva de los precursores de retinol mediante la conversión a retinaldehído por alcohol deshidrogenasa (ADH) o la deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDH) y, posteriormente, al ácido retinoico por la actividad retinaldehído deshidrogenasa (ALDH). Debido a que la escisión del β -caroteno implica retinaldehído como producto intermedio, puede funcionar como precursor del ácido retinoico (AR) en las células epidérmicas. En la piel humana, el metabolito primario del AR es el ácido 4-hidroxi todo-trans-retinoico, que se metaboliza aún más en ácido 4-oxo all-trans-retinoico funcionalmente activo. Varias vías están involucradas en la transformación metabólica del ácido retinoico, especialmente las enzimas específicas del citocromo P450 (CYP) como CYP26A1 y CYP2S1. La expresión constitutiva fuerte de CYP26A1 ocurre principalmente en los queratinocitos epidérmicos basales, así como en las glándulas sudoríparas ecrinas y las glándulas sebáceas que verifican la capacidad de la piel humana para metabolizar el ácido retinoico [46].

Las propiedades físicas del ácido retinoico, retinol y algunos derivados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físicas del ácido retinoico, retinol, palmitato de retinilo y acetato de retinilo [25, 55- 56]

Propiedad	Ácido Retinoico	Retinol	Palmitato de retinilo	Acetato de retinilo
Fórmula	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	C ₂₀ H ₃₀ O	C ₃₆ H ₆₀ O ₂	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
Peso molecular (g/mol)	300.043	286.46	524.88	328.50
Densidad	--	--	0.9 g/mL	--
Punto de fusión	180-181 °C	63-64°C	28-29°C	57-59°C
Estado físico	Polvo cristalino amarillo fuerte	Polvo cristalino amarillo	Polvo cristalino amarillo o aceite amarillo	Polvo cristalino amarillo
Absorción UV	349 nm (en etanol al 90%)	325 nm	326 nm (en etanol al 80%)	326 nm
Fluorescencia:				
Excitación	--	325 nm	325 nm	325 nm
Emisión	--	470 nm	470 nm	470 nm
Solubilidad:	Parcialmente			
Agua	soluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Metanol	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Etanol	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Éter	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Cloroformo	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble

3.10 Productos tópicos en el mercado que contienen vitamina A

Actualmente, dentro del mercado existe una gran variedad de productos de administración tópica disponibles que se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Medicamentos en el mercado que contienen vitamina A

Nombre del medicamento	Forma de la vitamina A	Usos
Vitacilina® [57]	Palmitato de retinilo	Recomendado para furúnculos, dermatosis secundariamente infectada, úlceras, quemaduras y heridas leves
Serum Retinol 2,5%(noche) [58]	Retinol	Promueve la síntesis de colágeno, mejora la textura de la piel, incrementa la hidratación de la piel, es el mejor principio activo para revertir el fotoenvejecimiento, cierra el poro, regula la producción de grasa, favorecen la renovación celular, tiene efecto antioxidante porque previene la disminución de la enzima superóxido dismutasa (SOD) durante el estrés oxidativo, previene la hiperqueratinización y mejora las arrugas finas y profundas
Retacnyl® [59]	Ácido retinoico	Tratamiento tópico para acné, lesiones no inflamatorias e inflamatorias. Fotoenvejecimiento: como tratamiento coadyuvante para la disminución de arrugas finas, hiperpigmentación moteada y rugosidad de la piel facial debidas a exposición solar crónica.
Tretinoína [60]	Ácido retinoico	Para el tratamiento de acné, fotodermatosis y fotoenvejecimiento cutáneo.
HT5 Antiarrugas de L’Oreal Paris [61]	Palmitato de retinilo	Crema facial antiarrugas para mayores de 45 años está formulada con retinopéptidos que actúan efectivamente para mejorar la suavidad y firmeza de la piel. Reduce visiblemente los signos de la edad, como las arrugas, la pérdida de la firmeza y la sequedad.
Revitalif día de L’Oreal Paris [62]	Palmitato de retinilo	Antiarrugas y reafirmante. Pro-retinol A y Elasti-flex. Acción intensiva.
Platsul-A® [63]	Palmitato de retinilo	Para lesiones cutáneas como raspaduras, quemaduras y laceraciones

La vitamina A y muchos de sus derivados retinoides han demostrado ser bastante prometedores para las afecciones dermatológicas (prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento, acné severo e inflamación de la piel). No obstante, la alta lipofilia de los retinoides o la inestabilidad a la oxidación, calor, luz, humedad y metales limitan su uso [64].

3. 11 Nanosistemas desarrollados que contienen vitamina A

Dado que el retinol y sus análogos tienen problemas de estabilidad y solubilidad, en la última década han sido desarrollados diversos sistemas a escala nanométrica, que se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Sistemas nanométricos cargados con vitamina A

Autores	Tipo de sistema	Resultados obtenidos
<p>Syed et al. [55]</p>	<p>Nanopartículas de quitosano cargadas con retinol</p>	<ul style="list-style-type: none"> Las NP's tenían una forma esférica y sus tamaños de partícula fueron de alrededor de 50-200 nm <ul style="list-style-type: none"> Eficiencias de encapsulación del 60 al 80%. Se realizó caracterización morfológica y espectroscópica (FTIR y RMN H¹). Las NP's se reconstituyeron completamente en solución acuosa igual que la solución acuosa original y el potencial zeta de las nanopartículas de quitosano reconstituido fue similar a su solución original.
<p>Jeon et al. [53]</p>	<p>NLS cargadas con PR de superficie modificada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El método de preparación fue fusión en caliente usando Gelucire 50 / 13[®] y Precirol ATO5[®]. <ul style="list-style-type: none"> Se añadió fosfato de dicetilo (FDC) para cargar negativamente las superficies de NLS. Se realizaron estudios de permeabilidad de la piel <i>in vitro</i> y antienvjecimiento <i>in vivo</i>. Las NLS eran menores a 100 nm de tamaño con un í (IPD) uniforme, y un alto valor de potencial zeta. Las NLS negativas modificadas con FDC (FDCmod-NLS) mejoraron la distribución del PR en la piel 4.8 veces y entregaron PR a una profundidad mayor que las NLS neutras.
<p>Shields et al. [65]</p>	<p>Partículas de retinol encapsuladas con silicona</p>	<ul style="list-style-type: none"> Las partículas se preparan mediante la polimerización sol-gel de monómeros de silano, que permite su síntesis rápida y fácil a escala. <ul style="list-style-type: none"> Estas partículas pueden: encapsular retinol (> 85%), proteger el retinol de la degradación y liberar lentamente el retinol sobre varias horas Para demostrar que la liberación controlada de retinol de las partículas puede reducir la irritación, se realizó un estudio en humanos y se descubrió que las formulaciones que contienen las partículas de silicona eran 12-23% menos irritantes que las formulaciones idénticas que contienen partículas de Microsponge[®]. Finalmente, se mostró que las partículas de silicona pueden encapsular otros activos, incluyendo betametasona, N, N-

		dietil-meta-toluamida (DEET), homosalato e ingenol mebutato.
Eke et al. [66]	Micro/nanopartículas cargadas con PR y agua del Mar Muerto de PHBV	<ul style="list-style-type: none"> • Los tamaños de las partículas estaban en el rango de micras y se cargaron con palmitato de retinilo y agua del mar muerto por emulsificación (O/W). • Las partículas no fueron citotóxicas como se determinó con la prueba de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio usando fibroblastos de ratón L929, fibroblastos de embrión de ratón BALB / 3T3 y queratinocitos humanos HaCaT. • La prueba de Ames mostró que los portadores no eran genotóxicos. Las partículas penetraron en la membrana de las células de osteosarcoma humano Saos 2 y se acumularon en su citoplasma. No fue posible detectar la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que indicó una respuesta inflamatoria baja o nula hacia las partículas. • En las pruebas con piel humana intacta, el 1,2% de las partículas de PHBV cargadas con PR penetraron en la piel humana, pero cuando la piel carecía de estrato córneo aumentaba al 6,9%.
Fernández-Gutiérrez et al. [67]	Nanopartículas de quitosano cargadas con PR	<ul style="list-style-type: none"> • El PR encapsulado en las NP's tienen una morfología pseudoesférica, diámetros hidrodinámicos promedio entre 230 y 350 nm y valores de potencial zeta entre +12.5 y +30 mV, dependiendo de la carga de PR y el procedimiento. • La eficiencia de encapsulación varía de aproximadamente de 35% a 64%, y la capacidad de carga entre 4% y 10%. • La actividad antioxidante estudiada por el ensayo de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y la citotoxicidad de las NP's cargadas con PR evaluada contra fibroblastos dérmicos humanos depende del contenido de PR y la concentración de NP's. Los nanosistemas desarrollados ofrecen un potencial prometedor para aplicaciones antioxidantes.
Ro et al. [68]	Micro y Nanopartículas de pectinato cargadas con PR	<ul style="list-style-type: none"> • Las PMP /PNP se prepararon con un método de gelificación ionotrópica, y la actividad antioxidante de las partículas se midió con un ensayo DPPH. • PMP y PNP presentaron diámetros medios de tamaño de partícula de 593- 843 μm (PMP) y 530 nm (PNP). • La actividad antioxidante de PNP fue mayor que PMP debido en gran parte al área superficial más grande disponible para PNP.

		<ul style="list-style-type: none"> • La estabilidad de PR en PMP y PNP fue similar pero mucho mayor que PR en geles a granel de pectina. <ul style="list-style-type: none"> • PMP y PNP mostraron la capacidad de liberar constantemente PR siendo capaz de permear a través de la membrana artificial modelo y la piel entera de la rata. • PR se depositó en serie en todas las capas de la piel.
<p>Clares et al. [64]</p>	<p>Nanoemulsiones, Liposomas y NLS cargadas con PR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se produjeron nanoportadores de forma esférica con una superficie cargada negativamente (> 40 mV) y un tamaño medio inferior a 275 nm con una adecuada compatibilidad con la piel. • Las propiedades reológicas mostraron que las dispersiones acuosas de NLS siguieron un comportamiento no newtoniano, el líquido pseudoplástico se ajustó a la ecuación de Herschel-Bulkley, mientras que los LP y las NE mostraron un comportamiento newtoniano. • Las NLS ofrecieron una fotoprotección significativamente mejor que los LP y los NE para PR. • La cantidad acumulada de fármaco que permeó a través de la piel humana al final de las 38 h fue de 6.67 ± 1.58 mg, 4.36 ± 0.21 mg y 3.64 ± 0.28 mg para NE, LP y NSL, respectivamente. • El flujo de NEs fue significativamente mayor que el de NLS y LP: NES (0.37 ± 0.12 mg / h) > LP (0.15 ± 0.09 mg / h) > NLS (0.10 ± 0.05 mg / h). Los LP ofrecieron una retención en piel significativamente mayor que las NE y las NLS. NE fue el sistema que más perturbó la piel.
<p>Algahtani et al. [69]</p>	<p>Nanoemulsión cargada con PR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se usó un método de emulsión de baja energía para la nanoencapsulación de PR. • El tamaño de gota de la nanoemulsión optimizada estaba en 16,71 nm con bajo índice de polidispersión (IPD) (0,015), potencial zeta negativo (-20,6 mV) y una eficiencia de encapsulación > 98%. • Se demostró la influencia de vórtice en el tamaño de gota e IPD durante la preparación de nanoemulsión. • El sistema de administración de nanoemulgel cargado con PR mostró una mejora significativa en la permeación en piel después de la aplicación tópica. • El empleo del enfoque de nanoencapsulación y la posterior dispersión del sistema en el hidrogel para el desarrollo de un sistema de suministro tópico de PR también dio como

		<p>resultado una mejora en su estabilidad UV y de almacenamiento.</p>
<p>Errico et al. [70]</p>	<p>Nanocápsulas de PLGA cargadas con PR en aceite de girasol</p>	<ul style="list-style-type: none"> Las NP's tenían una forma esférica y sus tamaños de partícula fueron de alrededor de 50-200 nm <ul style="list-style-type: none"> Eficiencias de encapsulación del 60 al 80%. Se realizó caracterización morfológica y espectroscópica (FTIR y RMN H¹). Las NP's se reconstituyeron completamente en solución acuosa igual que la solución acuosa original y el potencial zeta de las nanopartículas de quitosano reconstituido fue similar a su solución original.
<p>Teixeira et al. [71]</p>	<p>Nanocápsulas de PDLA y núcleo de PR.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El método de preparación fue fusión en caliente usando Gelucire 50 / 13[®] y Precirol ATO5[®]. <ul style="list-style-type: none"> Se añadió fosfato de dicetilo (FDC) para cargar negativamente las superficies de NLS. Se realizaron estudios de permeabilidad de la piel <i>in vitro</i> y antienvjecimiento <i>in vivo</i>. Las NLS eran menores a 100 nm de tamaño con un í (IPD) uniforme, y un alto valor de potencial zeta. Las NLS negativas modificadas con FDC (FDCmod-NLS) mejoraron la distribución del PR en la piel 4.8 veces y entregaron PR a una profundidad mayor que las NLS neutras.

3.12 Zeína

La zeína es una proteína que se encuentra en el maíz cuya función es almacenar nitrógeno. El contenido de proteína en el maíz en peso seco varía de un 6 a un 12 %, de los cuales la mitad es zeína. La zeína ha demostrado ser un excipiente eficaz para el suministro controlado de fármacos. La zeína es una proteína hidrófoba clasificada como “Generalmente Reconocida Como Segura” (GRAS por sus siglas en inglés) por la FDA y se ha utilizado como un material ideal en la tecnología de alimentos y la administración de fármacos desde que se anunció la primera zeína comercial en 1939. Por lo general, la zeína se puede aplicar en diversas formulaciones, como micro/nanopartículas, nanofibras, recubrimientos de película, polvos y geles (Figura 15). Una característica notable de la zeína es su hidrofobicidad como resultado de la abundante presencia de grupos hidrófobos ya que sólo es soluble en hasta 70% de etanol, algunos ácidos orgánicos como el ácido acético o soluciones altamente alcalinas (pH > 11). Hay cuatro tipos de zeína que se encuentran en el maíz: alfa, beta, gamma y delta. La zeína alfa es la forma más abundante con aproximadamente el 35% de la zeína total y es más soluble en etanol al 95%. La beta zeína es más soluble en etanol al 60% y es físicamente menos estable. La gamma zeína solo constituye el 5-10% del contenido total de zeína, y es la única en que más de un cuarto (25.8%) de su composición de aminoácidos es prolina. Es de destacar que la α -zeína es el componente principal de la zeína comercialmente disponible [73-74]. Las propiedades físicas de la zeína se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Propiedades físicas de la zeína [24, 75- 77]

Propiedad	Descripción
Estado físico y color	Polvo amorfo color crema
Peso molecular	35 KDa (varía 9.6 a 44 kDa)
Tamaño	< 200 nm
Valor de volumen	0.805 L/Kg
Forma	Esférica
Constante dieléctrica (500V, 60 ciclos, 25-90°C)	4.9-5.0
Coefficiente de difusión	3.7×10^{-14} m ² /s
Coefficiente de viscosidad de Einstein	25
Temperatura de transición vítrea	165°C
Punto isoeléctrico, pH	6.2 (varía entre 5 y 9)
Índice de refracción	1.44
Volumen específico parcial	0.771
Coefficiente de sedimentación	1.5 s
Gravedad específica a 25 °C	1.25
Punto de degradación térmica	320 °C
Solubilidad	Disolventes primarios: glicoles, glicol-éteres, aminoalcoholes, ácidos, nitro-alcoholes, amidas y aminas Disolventes secundarios: alcoholes y cetonas con pequeñas cantidades de agua.

Se ha descrito la estructura de la zeína en el maíz como una estructura agregada estabilizada por enlaces disulfuro. La estructura secundaria de zeína también cambia en varios disolventes. Se descubrió que, en mezclas hidroalcohólicas (disolventes típicos para prolamina), la proteína no es completamente soluble y se comporta como un coloide hinchado en solución. La falta de lisina y triptófano y los pocos residuos de arginina e histidina en la estructura de la zeína son las principales diferencias entre la zeína y otras proteínas, lo que resulta en su solubilidad única [72].

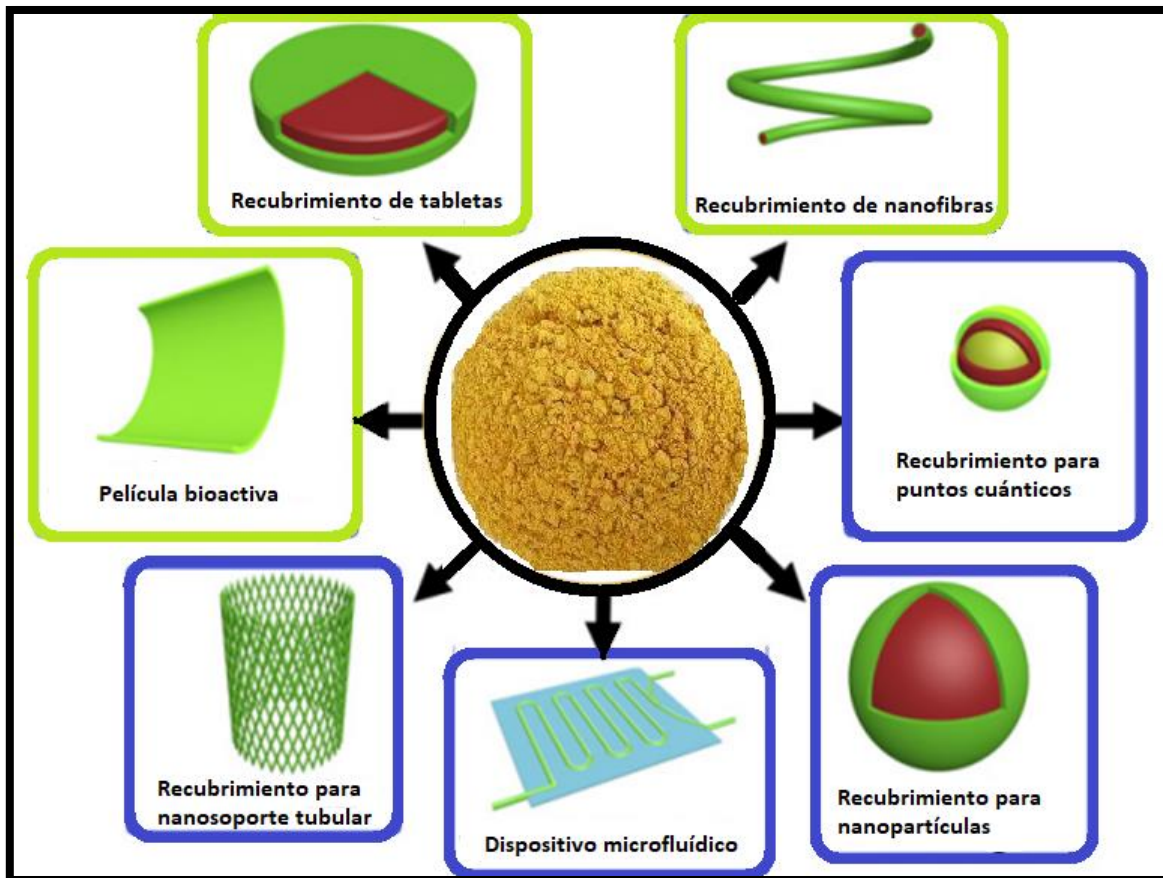


Figura 15. Aplicaciones de la zeína en liberación de fármacos [74]

La hidrofobicidad, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad de la zeína se han explotado en varias formulaciones de liberación sostenida, particularmente en sistemas de administración de fármacos en nanopartículas para mejorar la eficacia de la terapia y el cumplimiento del paciente. La repetición de bloques esféricos de unidades de zeína (aproximadamente 20 nm) explica la formación de nanopartículas. La adición de surfactantes puede mejorar la eficiencia de encapsulación de fármacos poco solubles en agua en nanopartículas de zeína. Se notó que la combinación de zeína y otras sustancias hidrófobas y algunos plastificantes han ayudado a una mejor encapsulación de fármacos (ver tabla 7). Las nanopartículas de zeína también han demostrado ser prometedoras en el suministro transdérmico de fármacos poco solubles en agua [73-76].

Las nanopartículas de biopolímeros suelen tener propiedades únicas que difieren del mismo polímero a granel. Por ejemplo, la zeína a granel es insoluble en agua, pero su formación en

nanopartículas de zeína permite que la proteína se disperse en agua. Aunque la proteína aún es insoluble, las NP's de zeína pueden ser lo suficientemente pequeñas como para permanecer uniformemente dispersas y para proporcionar funcionalidad [72].

Generalmente, la zeína es empleada para encapsular compuestos funcionales o bioactivos como sabores, nutracéuticos y antimicrobianos. El agente de encapsulación puede entonces mejorar la estabilidad o apuntar al suministro del ingrediente funcional. La naturaleza hidrofóbica de la zeína le permite asociarse con ingredientes funcionales lipofílicos como el resveratrol, la curcumina y varios aceites esenciales antimicrobianos [72].

Tabla 7. Propiedades favorables de la zeína para su aplicación en sistemas de liberación modificada [24, 74]

Propiedad	Ventajas
Insoluble en agua; soluble en solución acuosa con alcohol (2/3 aminoácidos hidrofóbicos y 1/3 hidrofílicos)	Fácil precipitación para la formación de nanopartículas. Más adecuada para sistemas de liberación modificada que proteínas hidrofílicas. Permite encapsular compuestos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.
Viabilidad Comercial	Económico, biocompatible y biodegradable
Resistente al agua	Protección para compuestos encapsulados sensibles a la hidrólisis
Carácter protector y antioxidante	Protección para compuestos encapsulados sensibles a la degradación por humedad y oxígeno.
Estructura	Alta carga útil y liberación sostenida del compuesto encapsulado
Peso molecular elevado	Se puede conseguir alto efecto de permeabilidad y retención.
Núcleo y recubrimiento	Para sistemas encapsulados, ácidos grasos, aceites, aceites esenciales, vitaminas liposolubles, pigmentos/colorantes alimentarios, sabores, suplementos alimenticios y nutricionales, agentes antimicrobianos y antioxidantes naturales.
Biosensor	Para detectar alérgenos y otros componentes de alimentos.

La fabricación de NP's de zeína por precipitación líquida antidisolvente o nanoprecipitación ha demostrado ser una forma prometedora de crear un sistema de suministro de nutracéuticos hidrofóbicos, como resveratrol, curcumina, quercetina, aceites esenciales, compuestos bioactivos de vegetales crucíferos, y α -tocoferol. Además, se ha demostrado que la encapsulación de carotenoides mejora su estabilidad digestiva, foto oxidativa y de almacenamiento [72].

Debido a su naturaleza bioadhesiva con superficies biológicas a través de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno, la zeína es un buen candidato para la unión de nanopartículas coloidales a

la mucosa. Las nanopartículas de zeína también han demostrado ser prometedoras en el suministro transdérmico de fármacos poco solubles en agua. Por ejemplo, se ha cargado flutamida en nanopartículas de zeína (por nanoprecipitación), que luego se incorporaron en geles (quitosano y Carbómero® 934) para administración transdérmica. Los resultados indicaron una mejor penetración y localización de flutamida en la piel después de la administración transdérmica de las nanopartículas de zeína cargadas con el fármaco [73].

En la actualidad, existen pocas investigaciones sobre la encapsulación de vitamina A en nanopartículas de zeína, las cuales se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Sistemas nanoparticulados de zeína cargados con Vitamina A

Autor	Sistema submicrónico	Resultados obtenidos
Park et al. [49]	NP's de zeína cargadas con retinol revestidas con quitosano.	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepararon NP's de zeína cargadas con retinol por nanoprecipitación empleando TWEEN 20 como estabilizante. • Su tamaño fue de 300 nm. Al recubrir con quitosano el tamaño aumentó a >500 nm. • La eficiencia de encapsulación aumentó de 64.9% a >80% después del recubrimiento con quitosano. • El perfil de liberación se mejoró con un recubrimiento de quitosano, y se observó una velocidad de liberación lenta. • El análisis FTIR mostró reticulación entre zeína y retinol a través de interacciones electrostáticas. • La estabilidad fotoquímica frente a la luz ultravioleta se mejoró (> 90%) después de la encapsulación.
Afonso [24]	NP's de zeína cargadas con PR	<ul style="list-style-type: none"> • Se abordó la encapsulación de quercetina y PR con zeína, empleando el método de nanoprecipitación, utilizando caseinato de sodio como estabilizante. <ul style="list-style-type: none"> • Los sistemas fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas (UV/Vis y FTIR), morfológicas, así como la evaluación de la eficiencia de encapsulación siendo del 44% sin estabilizante y del 85% con alginato.
Park et al. [78]	NP's de zeína cargadas con Retinol revestidas con pectina.	<ul style="list-style-type: none"> • Fue empleado el método de nanoprecipitación y se usó caseinato de sodio como estabilizante y pectina como revestimiento. • Los tamaños fueron >400 nm. Se evaluó el efecto por liofilización aumentando su tamaño después de la liofilización y posterior re-dispersión.

		<ul style="list-style-type: none"> • Se valoró la eficiencia de proceso y la eficiencia de encapsulación de retinol, siendo ambas > 90%. • Se realizaron caracterizaciones morfológicas, espectroscópicas, colorimétricas. • Finalmente se evaluó la estabilidad bajo irradiación UV/Vis, siendo la formulación más estable la que está recubierta con pectina y con caseinato de sodio como estabilizante.
<p>Jain et al. [79]</p>	<p>NP's de zeína cargadas con β-caroteno.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se desarrollaron NP's de zeína cargadas con β-caroteno (βC) mediante la técnica de separación de fases usando como estabilizantes Pluronic® F-68 y Tween 80 al 1%. • Se obtuvieron tamaños de entre 80-135 nm con eficiencias de encapsulación de entre 55 y 70%. Los experimentos <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> realizados en las formulaciones demostraron que estas nanoestructuras son muy superiores a la de βC puro. • Los estudios de toxicidad confirmaron que los βC-NPs mejoraron la toxicidad hepática y renal inducida por metotrexato (MTX).

4. Justificación

Aunque los retinoides han sido muy utilizados para afecciones de la piel, hay dos claras desventajas que limitan su uso: Su alta capacidad para irritar la piel y su facilidad para degradarse casi con cualquier factor (temperatura, humedad, presencia de metales, aire, radiación UV, etc.). Por ello, se ha decidido emplear a la nanotecnología y las grandes ventajas que ofrece para lidiar con estas desventajas. Por un lado, poder incrementar la biodisponibilidad del AR, reduciendo la dosis y con ello los efectos de irritación sobre la piel, sin que pierda su actividad biológica y, por otro lado, aumentar la estabilidad fisicoquímica del AR al encapsularlo en NP's de zeína. De este modo, al emplear una proteína biodegradable, biocompatible y bioadhesiva se podrá dar paso al diseño de un sistema submicrónico adecuado para tratar heridas y enfermedades de la piel.

5. Objetivo general

Desarrollar, caracterizar y evaluar una formulación nanoparticulada conteniendo ácido retinoico como principio activo, destinada al tratamiento de lesiones y regeneración de la piel.

6. Objetivos particulares

- Preparar nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico (AR) por el método de nanoprecipitación definiendo las condiciones óptimas de preparación mediante el uso de un diseño de experimentos (DDE).
- Caracterizar las nanopartículas preparadas midiendo el tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de carga y eficiencia de encapsulación, y morfología.
- Llevar a cabo pruebas de liberación *in vitro* a partir de la suspensión de nanopartículas empleando celdas tipo Franz o por el método de bolsa de diálisis.
- Desarrollar y validar un método analítico (espectrofotométrico) para la cuantificación del principio activo en los siguientes medios: a) en el sistema y b) en el medio de liberación.

7. Hipótesis

Si se incorpora ácido retinoico en nanopartículas a base de zeína, optimizando el método de preparación al estudiar las variables críticas mediante un diseño de experimentos, se contará con un nanoacarreador que posea características tecnológicas adecuadas (i.e., tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta, contenido de principio activo, estabilidad, liberación sostenida) para ser evaluado como un sistema de aplicación tópica destinado al tratamiento y regeneración de piel dañada.

8. METODOLOGÍA

8.1 Materiales

Reactivos

Zeína (Sigma-Aldrich, USA)

Alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado (Laboratorios Silanes S.A. de C.V., México)

Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, USA)

Etanol Absoluto (Meyer[®], México)

Ácido retinoico 99.9 % de pureza (Alifarma, México)

Tween 20 (Farmacia París, México)

Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, USA)

Agua Destilada de calidad Mili-Q (Millipore Inc., Bedford, USA)

Equipo

Balanza electrónica ATX224 (Shimadzu, Japan)

Estación de agitación magnética multiplaza RT5 (IKA[®], USA)

ULTRA TURRAX[®] T18 digital (IKA[®], USA)

Microbalanza (E. Metter, Zürich)

Zeta-sizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA)

Rotavapor R-3 (BUCHI, USA)

Espectrofotómetro UV/Vis U-5100 (HITACHI, Japan)

Centrífuga Z326K (HERMLE, Germany)

Liofilizadora (LABCONCO[®], USA)

Calorímetro Diferencial de Barrido Q20 (TA Instruments, USA)

8.2 Determinaciones previas al diseño de experimentos

8.2.1 Elección del método de preparación de nanopartículas de zeína

Se realizó una búsqueda bibliográfica intensiva en bases de datos como Wiley®, Elsevier®, Google Académico® y BIDI UNAM, considerando como criterios de inclusión artículos con información sobre NP's de zeína y cualquier otro tipo de NP's conteniendo AR; excluyendo artículos donde no hubiera información sobre la molécula, métodos de preparación y métodos de caracterización. Acerca de los métodos para la preparación de NP's de zeína cargadas con AR, Zhang *et al.* [80] dieron un panorama amplio sobre el uso de la zeína como polímero para la elaboración de micro y nanopartículas. Este autor presenta un resumen en una tabla donde menciona ejemplos de activos que fueron encapsulados con zeína y los estabilizantes empleados. En esta tabla, la estructura y propiedades fisicoquímicas de los activos es muy similar a la del retinol por lo que de esta publicación se pudo extraer información clave como los tipos de estabilizantes empleados, la cantidad de estabilizante y el método de elaboración de nanopartículas, siendo la nanoprecipitación el método más factible. De acuerdo con los trabajos de Park *et al.* [49, 78], Afoso [24] y Liu *et al.* [81] se reportó la técnica de nanoprecipitación para elaborar dispersiones de NP's a base de zeína por lo que en este trabajo se decidió emplear este método además de ser un procedimiento sencillo, reproducible y escalable.

8.2.2 Elección de estabilizantes

Se decidió probar con alcohol polivinílico (PVA) que no se ha reportado como estabilizante en la elaboración de NP's de zeína pero que promete ser un buen agente debido a que posee propiedades interesantes como su solubilidad en agua, elevada biodegradabilidad, baja toxicidad, biocompatibilidad, buena resistencia química, capacidad de formar películas, y su alta capacidad adhesiva [82-84]. Se eligieron además otros estabilizantes como el Pluronic F-68 que se ha reportado como estabilizante para NP's de zeína [80, 85], el Pluronic F-127 que se ha reportado en la encapsulación de PR con PLGA como polímero [70] y finalmente TWEEN 20 que se ha reportado como estabilizante de NP's de zeína [49, 86] y en la encapsulación de PR con ácido poliláctico, en la preparación de nanocápsulas, nanoesferas y nanoemulsiones [71].

8.2.3 Pruebas de solubilidad para el ácido retinoico y zeína

Se eligieron 2 disolventes, etanol:agua: 90:10 (90 % v/v) y 85:15 (85 % v/v).

Así, se pesaron por triplicado ± 10 mg de AR. Posteriormente, se fueron añadiendo volúmenes conocidos de la mezcla etanol: agua al 90% (v/v), bajo agitación constante, registrando el volumen total donde se observó la completa solubilización del AR. El mismo procedimiento se realizó para la prueba con la mezcla etanol: agua al 85% (v/v). Esta metodología se siguió también para las pruebas de solubilidad con zeína. Cada prueba se realizó por triplicado.

8.2.4 Elección de variables fijas

Las variables que se consideraron en la preparación de las NP's de zeína cargadas con AR y que pudieron tener influencia sobre el tamaño de partícula e IPD fueron:

- Tipo de estabilizante
- Cantidad de estabilizante (concentración de estabilizante en la fase acuosa)
- Cantidad de zeína
- Cantidad de AR
- Volumen de fase orgánica
- Volumen de fase acuosa
- Velocidad de agitación en rpm
- Tipo de agitación (en Ultra turrax[®] o con barra magnética)
- Velocidad de inyección de la fase orgánica en la fase acuosa
- Tiempo de agitación
- Tiempo en rotavapor para eliminar disolventes

Una vez analizadas las variables, se realizaron una serie de pruebas para determinar cuáles fueron las variables fijas:

Para determinar la cantidad de zeína en la fase orgánica, se prepararon formulaciones de NP's placebo con distintas cantidades de zeína en un rango de concentraciones de 4 a 12 mg/ mL. No obstante, con concentraciones mayores a 7 mg/mL se observó la presencia de agregados, mientras que en concentraciones menores a 4 mg/mL, aunque las NP's formadas exhibían tamaños menores 90 nm e IPD's de 0.4 con el paso del tiempo ambas respuestas aumentaban considerablemente hasta que después de una semana los sistemas precipitaban. En las concentraciones de 5 a 6 mg/mL, las NP's obtenidas presentaron un tamaño promedio de 95 nm e IPD's menores a 0.3 siendo estables hasta por 1 mes a 4°C, por lo que se decidió emplear la concentración de 5 mg/mL

La cantidad de AR en la fase acuosa se determinó con base a lo que describe y Park et al [70], quienes reportan una relación zeína:retinol 100:1. Otros autores como Park et al [40] manejan relaciones zeína:retinol 1000:1 y Afonso [24] maneja relaciones de más de 2000:1. Asimismo, se prepararon NP's de zeína cargadas con 15 mg de AR (0.6mg/mL) obteniéndose tamaños por encima de los 100 nm, sin embargo, las dispersiones mostraron una coloración amarilla intensa con turbidez, lo que podría atribuirse al exceso de AR. Por lo tanto, con base a lo reportado en la literatura se eligió una relación zeína:AR 125:1.

El volumen de la fase acuosa se fijó en 50 mL debido a que era el volumen mínimo requerido para cubrir el útil de dispersión (S18N-19G de 12.7 mm de diámetro) en un tubo con diámetro 7.5 cm.

Se probaron volúmenes de inyección de fase orgánica de entre 3 y 10 mL con las concentraciones de zeína y AR previamente determinadas. Volúmenes superiores a 7 mL presentaban pequeñas cantidades de aglomerados y cierta turbidez. Por otro lado, al emplear volúmenes menores a 4 mL,

la estabilidad de las dispersiones era pobre, precipitando al cabo de 3 semanas. Se eligió un volumen de inyección de 5 mL al obtener dispersiones estables y con tamaños de alrededor de 100 nm e IPD's menores a 0.3.

El tiempo de agitación se monitoreó con NP's de zeína placebo y NP's de zeína cargadas con AR. Al agitar por más de 10 minutos, no se observó diferencia en los tamaños e IPD's de las dispersiones. Además, para poder inyectar los 5 mL de la fase orgánica, la bomba tarda entre 4 y 5 minutos, dependiendo de la velocidad de inyección programada. Así, al monitorear el tamaño a los 6 minutos el tamaño no presentaba gran variación, pero el IPD era de más de 0.4, aunque a los 7 minutos se reducía a 0.3, por lo que se consideraron como mínimo 7 minutos de agitación.

Los 10 minutos de evaporación se establecieron con base a los tamaños obtenidos antes y después de evaporar parte del disolvente. En un intervalo de 3 a 9 minutos se observó que los tamaños de las NP's no eran repetibles, mientras que, a los 10 minutos, los tamaños no presentaban variación alguna. Tiempos mayores a 15 minutos comenzaban a desestabilizar a las dispersiones debido a la posible desnaturalización de la zeína, observándose un cambio en el color de las dispersiones pasando de ser ligeramente aperlado a un gris turbio.

Por tanto, las variables fijas fueron:

- Cantidad de zeína en la fase orgánica: 5 mg/mL o 0.5 % (p/v)
- Cantidad de AR en la fase orgánica: 0.04 mg/mL o 0.004 % (p/v)
- Volumen de fase orgánica a inyectar: 5 mL
- Volumen de fase acuosa: 50 mL
- Tiempo de agitación: 7 minutos
- Tiempo de evaporación: 10 minutos en el rotavapor

8.2.5 Pruebas previas al diseño de experimentos

Ya establecidas las variables fijas, se llevaron a cabo una serie de experimentos empleando las condiciones previas. De este modo se eligieron los niveles para establecer el DDE factorial 2^4 . Así, para la preparación de NP's, se adicionaron 5 mL de la fase orgánica (conteniendo zeína y AR) a 50 mL de la fase acuosa (con estabilizantes) por goteo empleando un Inyector Cole-Parmer® y finalmente, se evaporó parte del disolvente con ayuda de un rotavapor. La agitación se realizó empleando un homogeneizador Ultraturrax® o una parrilla multiplaza con agitación magnética como se muestra en la figura 16. Las variables con las que se prepararon distintos lotes, para establecer los niveles a empelar fueron: Tipo de estabilizante, concentración de estabilizante, velocidad de agitación y velocidad de inyección (tabla 9).

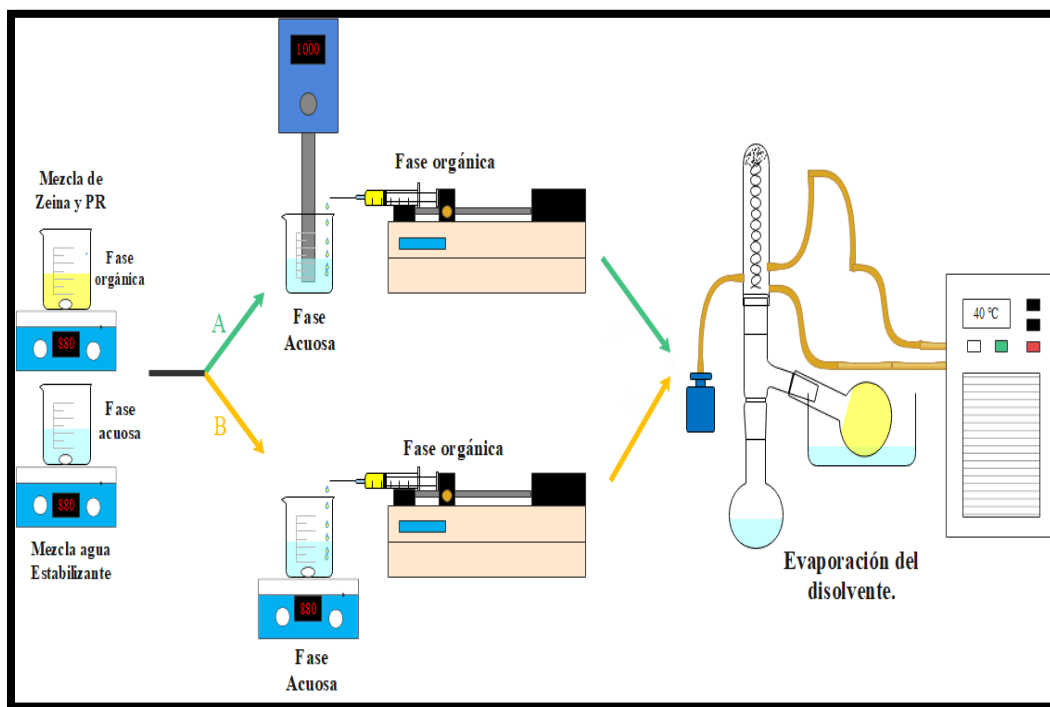


Figura 16. Esquema general para la preparación de nanopartículas de zeína cargadas con AR por la técnica de nanoprecipitación. A) mediante agitación por alto cizallamiento con Ultraturrax®. B) mediante agitación con barra magnética

8.3 Preparación de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico empleando el diseño de experimentos

Una vez finalizados los ensayos previos, se seleccionaron los factores y se establecieron niveles. Con los datos obtenidos se elaboró un diseño experimental factorial, 2 niveles y 4 factores (2^4), utilizando como variables de respuesta el tamaño de partícula e índice de polidispersión, empleando el software Statgraphics® Centurion XVI con la finalidad de seleccionar las mejores formulaciones. Los factores y niveles se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Diseño del experimento factorial 2^4 con 2 respuestas

Factor	Unidades	Tipo de factor	Low (-1)	High (+1)
Tipo de Estabilizante	N/A	Categorico	PVA	PF-127
Concentración de estabilizante	% p/v	Numérico	0.1	1.0
Velocidad de inyección	mL/h	Numérico	70	120
Velocidad de agitación	rpm	Numérico	1000	3000
Respuesta 1: Tamaño de partícula en nm				
Respuesta 2: Índice de Polidispersión (IPD)				

8.4 Validación del método analítico para la cuantificación de ácido retinoico

La validación del método analítico se llevó a cabo de acuerdo con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. Para la cuantificación de AR se empleó un método espectrofotométrico por UV/Vis. Este método se empleó para determinar la cantidad de AR encapsulado en las NP's de zeína, así como para cuantificar el AR en el medio receptor durante las pruebas de liberación.

8.5 Caracterización de las dispersiones de Nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico

8.5.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z

Se empleó un Zetasizer Nano-ZS90 Malvern Instruments (Worcestershire, West Midlands, United Kingdom) para determinar el tamaño de partícula y el IPD mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. Las muestras se filtraron a través de papel filtro Merck®(AP1504700) para, posteriormente colocar 1.5 mL en celdas cuadradas de poliestireno. Las condiciones del instrumento fueron 25°C y un ángulo de 90°. La medición se realizó por triplicado para cada una de las formulaciones preparadas de acuerdo con el DDE. El potencial zeta se determinó mediante el empleo del mismo equipo, por la técnica de dispersión de luz electroforética. Para ello, se tomó 1 mL de cada una de las muestras, llevándose a un volumen de 10 mL de aforo empleando agua desionizada. Posteriormente las muestras de cada formulación se colocaron en una celda de potencial zeta. Se consideraron los valores de viscosidad, índice de refracción y constante dieléctrica del agua a 25°C. Para la caracterización de las nanopartículas, el análisis de cada muestra se realizó por quintuplicado.

8.5.2 Eficiencia del proceso

Se tomaron 35 mL de cada una de las formulaciones seleccionadas para posteriormente someterlas a un proceso de liofilización empleando una Liofilizadora LABCONCO® por 48 horas. Una vez obtenido el liofilizado, se determinó la cantidad de sólido de cada una de las formulaciones. Finalmente se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia del proceso} = \frac{\text{Cantidad de sólidos totales después de liofilizar}}{\text{Cantidad de sólidos teóricos}} \times 100$$

8.5.3 Eficiencia de encapsulación

Se tomaron 35 mL de cada una de las formulaciones seleccionadas para posteriormente someterlas a un proceso de liofilización empleando una Liofilizadora LABCONCO® por 48 horas. Una vez obtenido el liofilizado, fueron pesados ± 10 mg de cada formulación y se adicionaron 5 mL de una solución de etanol al 30 % (v/v), sometiéndose a agitación magnética de 1000 rpm por 1.5 horas. La

solución obtenida se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos. Se tomó el sobrenadante y se llevó a un volumen final de 10 mL con etanol absoluto. Finalmente, se tomó lectura de cada experimento empleando un espectrofotómetro UV/VIS HITACHI a una longitud de onda de 349 nm. La determinación se llevó a cabo mediante la diferencia entre la totalidad del activo en la dispersión de nanopartículas, y la cantidad de fármaco en el sobrenadante. Cada determinación se realizó por triplicado. La ecuación empleada para determinar el % encapsulación fue:

$$\% \text{ Encapsulación AR} = \left(\frac{\text{AR encapsulado } (\mu\text{g})}{\text{AR Total } (\mu\text{g})} \right) 100$$

8.5.4 Análisis espectrofotométrico ultravioleta/visible y por espectroscopía de infrarrojo

La caracterización espectrofotométrica por UV/Vis se realizó en medio acuoso, para ello se prepararon distintas dispersiones del AR y de zeína con los estabilizantes.

- Dispersión de AR en PVA 0.1 %
- NP's de zeína placebo en PVA 0.1 %
- Dispersión de AR en Pluronic F-127 0.1 %
- NP's de zeína placebo en Pluronic F-127 0.1 %

Se realizó un barrido por el espectro UV/VIS empleando un espectrofotómetro Hitachi obteniendo el espectro UV/VIS de las formulaciones de NP's de zeína cargadas con AR (previamente centrifugadas a 7000 rpm por 20 minutos a 20°C para separar el AR no encapsulado), de las dispersiones de AR con los estabilizantes, así como de las mezclas físicas de NP's con AR.

Para el análisis por FTIR, se obtuvo el espectro de infrarrojo empleando un FTIR Perkin-Elmer® Frontier a una resolución de 4 cm⁻¹ con 16 barridos por espectro de cada uno de los componentes individuales de las formulaciones, así como de diversas mezclas físicas (en estado sólido):

- AR
- PVA
- Pluronic F-127
- zeína
- Mezcla zeína-AR
- Mezcla zeína-PVA
- Mezcla zeína- Pluronic F-127
- Mezcla PVA-AR
- Mezcla Pluronic F-127- AR
- Mezcla zeína- AR- PVA
- Mezcla zeína-AR- Pluronic F-127

Además, se prepararon dispersiones de AR en solución de PVA y de Pluronic F-127; así como NP's placebo de zeína en solución de PVA y de Pluronic F-127. Posteriormente se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla dispersión de AR con NP's de zeína en PVA
- Mezcla dispersión de AR con NP's de zeína en Pluronic F-127

Un volumen de 25 mL de las dispersiones de AR con estabilizantes y NP's de zeína placebo con estabilizantes, así como las mezclas físicas de las dispersiones fueron sometidas a centrifugación a 7000 rpm por 20 minutos a 20 °C y posteriormente se liofilizaron por 48 horas en una liofilizadora LABCONCO®.

8.5.5 Caracterización por Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

Las propiedades térmicas de las muestras sólidas y los liofilizados fueron caracterizadas empleando un Calorímetro Diferencial de Barrido (Q20). Cada muestra fue pesada (aproximadamente 2 mg) en celdas de aluminio tzero, sellándolas con ayuda de una prensa. Para el análisis las muestras se calentaron en un rango de temperatura de 35 a 220 °C, con una rampa de calentamiento de 3 °C/min. Se usó una celda vacía como referencia, calibrando con In metálico. El nitrógeno fue usado como gas de transferencia a una velocidad de flujo de 50 mL/min.

8.6 Estudios de liberación *in vitro*

Un volumen de 3.5 mL (equivalente a 240 µg de AR) de cada una de las formulaciones seleccionadas (formulaciones 5 y 10) se colocó en bolsas de diálisis (dialysis tube Spectrum Laboratories, Inc., Switzerland) de 20 cm de largo con punto de corte de PM de 6-8 KDa, sumergiéndose en recipientes cerrados con agitación constante que contenían 8 mL de etanol al 50 % (v/v) (medio receptor), manteniéndose a 37 °C con un recirculador de agua. Se tomaron 7 mL del medio receptor a intervalos de tiempo de 1 hora hasta completar 6 horas, reponiendo el volumen con medio fresco, asegurando las condiciones *sink*. Las muestras tomadas se aforaron a 10 mL con etanol absoluto y se determinó la cantidad de AR por espectrofotometría UV/Vis. Cada medición se realizó por triplicado. Asimismo, con fines comparativos se realizó el mismo estudio empleando una solución de AR en etanol al 90 %. Muestras de NP's placebo se colocaron de la misma manera en las bolsas de diálisis, tomando muestras del medio a los tiempos antes indicados, con el fin de emplearlas como blanco para corregir las absorbancias obtenidas con las formulaciones con AR. Los datos de liberación *in vitro* se ajustaron a diferentes modelos matemáticos como el de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas empleando el software DDSolver.

9.0 Resultados y discusión

9.1 Pruebas de solubilidad para el ácido retinoico y la zeína

La tabla 10 muestra los resultados de las pruebas de solubilidad de la zeína. Como se puede observar, la zeína tiene un valor de solubilidad mayor en etanol al 90% (v/v) que en etanol al 85% (v/v).

Tabla 10. Pruebas de solubilidad realizadas para la zeína con etanol al 85 % (v/v) y al 90 % (v/v)

Corrida	Cantidad de zeína (mg)	Disolvente	Volumen de disolvente empleado para solubilizar (μ L)	Solubilidad (mg/mL)
1	10.2	Etanol al 85 %	150	68.00
2	10.1	Etanol al 85 %	150	67.33
3	10.0	Etanol al 85 %	150	66.66
Promedio	10.1		150	67.33
1	10.1	Etanol al 90%	100	101
2	10.2	Etanol al 90%	100	102
3	10.0	Etanol al 90%	100	100
Promedio	10.1		100	101

Tabla 11. Pruebas de solubilidad realizadas para el AR con etanol al 85% (v/v) y al 90 % (v/v)

Corrida	Cantidad de AR (mg)	Disolvente	Volumen de disolvente empleado para solubilizar (mL)	Solubilidad (mg/mL)
1	10.1	Etanol al 85 %	13.0	0.78
2	10.2	Etanol al 85 %	13.1	0.77
3	10.1	Etanol al 85 %	13.0	0.78
Promedio	10.13		13.03	0.78
1	10.3	Etanol al 90%	8.2	1.26
2	10.2	Etanol al 90%	8.1	1.26
3	10.1	Etanol al 90%	8.0	1.26
Promedio	10.2		8.1	1.26

De la misma manera, en la tabla 11 se presenta la solubilidad del AR que como se observa fue mayor en etanol al 90%. Por lo tanto, se decidió emplear etanol al 90% para disolver tanto a la zeína como al AR, para constituir la fase orgánica. Por otra parte, la fase acuosa consistió en soluciones (% p/v) de los estabilizantes.

9.2 Pruebas previas al diseño de experimentos

Se realizaron una serie de pruebas para delimitar la magnitud de los niveles y el tipo de estabilizantes a emplear en el DDE. Las condiciones de preparación de las NP's de prueba fueron:

- 5 mL de volumen inyectado de la fase orgánica
- 50 mL de fase acuosa
- Concentración de zeína en la fase orgánica de 5 mg/mL
- Concentración de AR en la fase orgánica de 0.6 mg/mL

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Preparación de NP's de zeína cargadas con AR bajo diferentes condiciones de agitación, velocidad de inyección, y distintos tipos de estabilizantes

Experimento	Fase acuosa	Tipo de Agitación	Velocidad de agitación (rpm)	Velocidad de inyección de F.O.	Tamaño (nm)	IPD
1	Agua destilada	UT®	1000	80 mL/h	191.9	0.264
2	Agua destilada	BM	660	80 mL/h	175.7	0.248
3	PVA 0.1%	BM	660	120 mL/h	128.4	0.247
4	PVA 0.1%	BM	1100	190 mL/h	133.1	0.276
5	PVA 0.1%	UT®	1000	120 mL/h	186.8	0.255
6	PVA 0.1%	UT®	3000	210 mL/h	160.1	0.268
7	PVA 1.5%	BM	660	80 mL/h	301.4	0.253
8	PVA 1.5%	UT®	1000	80 mL/h	382.7	0.244
9	P F-68 0.1%	BM	660	120 mL/h	203.2	0.248
10	P F-68 0.1%	BM	1100	60 mL/h	288.2	0.151
11	P F-68 0.1%	UT®	1000	70 mL/h	227.7	0.252
12	P F-68 0.1%	UT®	3000	170 mL/h	266.8	0.251
13	P F-68 1.5%	BM	660	60 mL/h	764.5	0.510
14	P F-68 1.5%	BM	1100	190 mL/h	438.5	0.134
15	P F-68 1.5%	UT®	3000	80 mL/h	944.8	0.113
16	P F-68 1.5%	UT®	5000	160 mL/h	881.0	0.143
17	P F-127 0.1%	BM	660	120 mL/h	200.6	0.198
18	P F-127 0.1%	UT®	3000	150 mL/h	208.7	0.244
19	P F-127 1.5%	BM	1100	190 mL/h	436.5	0.210
20	P F-127 1.5%	UT®	1000	75 mL/h	452.1	0.214
21	TWEEN 20 0.1%	BM	660	120 mL/h	351.1	0.064
22	TWEEN 20 0.1%	UT®	3100	70 mL/h	370.3	0.081
23	TWEEN 20 1.53%	BM	1100	190 mL/h	136.9	0.455
24	TWEEN 20 1.53%	UT®	1000	160 mL/h	325.8	0.679

En un inicio, se prepararon las NP's sin estabilizante (sólo con agua destilada), obteniendo tamaños similares tanto con UltraTurrax® (UT®) como con barra magnética (BM) menores a 200 nm y con IPD's no mayores a 0.270. Las formulaciones preparadas se almacenaron en frascos ámbar y se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Sin embargo, solo fueron estables durante 18 y 24 horas, y posteriormente presentaron aglomeración y precipitación.

Al emplear Pluronic F-68 en concentración de 1.5 % mostró que las NP's obtenidas tenían tamaños entre 400 y 945 nm, siendo los lotes con tamaños más grandes aquellos que fueron preparados con UT®. Al emplear una concentración de 0.1 %, los tamaños de partícula disminuyeron a menos de 300 nm, pero se observó que, al aumentar la velocidad de agitación, ya sea con BM o con UT® los tamaños aumentaban y, de la misma manera, se presentaron diversos agregados de los componentes de la fase orgánica, por lo que se descartó el uso de este estabilizante.

Al emplear PVA al 1.5 % los tamaños de las formulaciones fueron superiores a 300 nm con IPD's mayores a 0.240, siendo el experimento 8 de la tabla 12 el que presentó el mayor tamaño. El PVA es considerado como un estabilizante del tipo estérico, por lo que, al adicionar una gran cantidad de este, combinado con velocidad de agitación moderada, este tiende a aglomerarse, obteniéndose así tamaños mayores [82-84]. Por otro lado, al emplear PVA al 0.1 %, los tamaños disminuyeron, llegando a ser menores a 190 nm con IPD's no mayores a 0.28. No obstante, aquellas formulaciones realizadas con UT® presentaron los tamaños mayores. A pesar de que se observa una alta variación en los tamaños al emplear PVA al 0.1 %, todos los sistemas fueron relativamente estables, observando un aumento en el tamaño y una disminución en el IPD después de 3 semanas. Al comparar las formulaciones preparadas con UT® y aquellas con BM, los de UT® fueron aún más estables ya que se observó un aumento en el tamaño de aproximadamente 50 nm, mientras que, con BM, el aumento fue mayor a 100 nm. Por ello, se decidió emplear PVA en el DDE.

Al emplear Pluronic F-127 al 1.5 % se obtuvieron tamaños de partícula entre 400 y 455 nm. Con este estabilizante, los tamaños fueron similares (20 nm de diferencia) al emplear BM o UT. Con Pluronic F-127 al 0.1 % los tamaños oscilaron entre 200 y 210 nm, siendo la diferencia entre BM y UT de casi 8 nm. En cuanto a la estabilidad de las NP's con este estabilizante, al emplear una concentración al 1.5 % las formulaciones conservaron su tamaño e IPD durante 1 semana en condiciones de almacenamiento a 4°C, tiempo en el que después se presentó aglomeración y posterior precipitación. Las formulaciones con Pluronic F-127 al 0.1 %, preparadas con UT®, mantuvieron su estabilidad hasta por 40 días, con un incremento de alrededor de 50 nm mientras que el tamaño de las NP's con Pluronic F-127 al 0.1 % preparadas con BM se incrementó en casi 100 nm. Por tanto, se decidió emplear al Pluronic F-127 como el segundo nivel para el DDE.

De acuerdo con Wang *et al.* [86], las NP's de zeína que emplean Tween 20 como estabilizante, disminuyen su tamaño e IPD conforme aumenta la concentración de Tween 20. En cuanto al tamaño de partícula, los resultados de estos autores coinciden con lo encontrado en este trabajo, puesto que aun concentración de 1.53 % se encontraron tamaños de entre 100 a 350 nm, con IPD's mayores a 0.4. La agitación con BM mostró un tamaño muy pequeño comparado con la agitación con UT®. Por otro lado, una concentración de 0.1 % arrojó tamaños mayores a 300 nm, a pesar de obtener

IPD's menores a 0.1, lo que lo convertiría en un buen candidato, no obstante, al momento del goteo de la fase orgánica en la fase acuosa se obtuvieron aglomerados. Wang *et. al* [86] menciona que a concentraciones de aproximadamente de 0.003 % de Tween 20 se obtienen racimos de partículas en la dispersión, lo mismo que se presenta aquí, pero a concentraciones mayores. La estabilidad física de las NP's de zeína es resultado de la formación de una capa de un estabilizante de tipo polimérico alrededor de la nanopartícula. No obstante, cuando una molécula de surfactante más pequeña con una alta solubilidad acuosa y rápida difusión es empleada como estabilizante, las moléculas de surfactante prefieren unirse a la zeína y formar complejos zeína/ surfactante [86] por lo que quizás, la estabilidad de las NP's de zeína preparadas con Tween 20 no es tan buena si se compara con las NP's con estabilizantes poliméricos. Además, se observó la presencia de un líquido oleoso al final del goteo, por ende, se descartó su uso como estabilizante.

Una vez finalizadas las pruebas previas al DDE, se establecieron los niveles y algunas de las variables fijas se modificaron como se indica a continuación. La cantidad de AR cambió de 0.6 mg/mL a 0.04 mg/mL, ya que se observó en una serie de pruebas que el IPD no era mayor a 0.5 para una concentración de 0.04 mg/mL. Adicionalmente, el tiempo empleado para preparar la fase orgánica fue menor debido a la rápida disolución del AR en la fase orgánica. En cuanto a la velocidad de inyección, se decidió trabajar con velocidades no mayores a 120 mL/h, ya que se el volumen era expelido a gran velocidad, provocando pérdidas de zeína y AR de la fase orgánica. De acuerdo con las pruebas preliminares, se observó que de manera general una concentración de estabilizante de 1.5 % (p/v) incrementa de manera importante el tamaño de partícula, por lo que para el diseño de experimentos se decidió trabajar con una concentración menor, de 1.0 % (p/v), esto con el fin de obtener tamaños más pequeños. De este modo, se eligieron dos niveles: 0.1 y 1.0 % (p/v). Finalmente, a pesar de que los tamaños fueron menores con BM, los sistemas de NP's resultaron inestables debido a que se observó formación de precipitados en los días subsecuentes a su preparación, por lo que se optó por elegir la agitación por alto cizallamiento debido a la gran estabilidad presentada ya que el homogeneizador tipo rotor estator (UT®) imprime la energía necesaria para lograr la dispersión de una fase en otra gracias al principio bajo el cual funciona.

9.3 Preparación de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico empleando el diseño de experimentos

En la tabla 13 se muestran los resultados de tamaño de partícula e IPD obtenidos de acuerdo con el DDE factorial 2⁴. Las condiciones empleadas aparecen en la tabla 9.

Tabla 13. Resultados del diseño de experimentos factorial 2⁴

Experimento	Factor A: Tipo de Estabilizante	Factor B: Cantidad de estabilizante (%)	Factor C: Velocidad de inyección (mL/h)	Factor D: Velocidad de agitación (rpm)	Respuesta 1: Tamaño (nm)	Respuesta 2: IPD
16	PF-127	1.00	120.00	3000.00	368.7	0.307
14	PF-127	0.10	120.00	3000.00	173.3	0.277
12	PF-127	1.00	70.00	3000.00	376.2	0.272
15	PVA	1.00	120.00	3000.00	146.0	0.323
9	PVA	0.10	70.00	3000.00	89.3	0.327
13	PVA	0.10	120.00	3000.00	91.4	0.315
5	PVA	0.10	120.00	1000.00	96.6	0.334
8	PF-127	1.00	120.00	1000.00	302.7	0.166
2	PF-127	0.10	70.00	1000.00	205.5	0.280
10	PF-127	0.10	70.00	3000.00	209.9	0.366
6	PF-127	0.10	120.00	1000.00	174.9	0.267
1	PVA	0.10	70.00	1000.00	100.9	0.300
3	PVA	1.00	70.00	1000.00	162.5	0.329
11	PVA	1.00	70.00	3000.00	157.3	0.339
4	PF-127	1.00	70.00	1000.00	265.5	0.176
7	PVA	1.00	120.00	1000.00	166.2	0.302

Utilizando el software estadístico Statgraphics® se determinaron los factores que influyen de manera significativa en el tamaño de partícula e IPD. Los resultados del análisis estadístico para el tamaño de partícula se muestran en las tablas 14 y 15 y en las figuras 17 a 19.

Tabla 14. ANOVA para determinar factores que afectan al tamaño de partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tipo de Estabilizante	71088.9	1	71088.9	115.00	0.0001
B: Cantidad de Estabilizante	40330.7	1	40330.7	65.24	0.0005
C: Velocidad de inyección	139.831	1	139.831	0.23	0.6544
D: Velocidad de agitación	1178.21	1	1178.21	1.91	0.2259
AB	5464.91	1	5464.91	8.84	0.0310
AC	47.9556	1	47.9556	0.08	0.7918
AD	3071.93	1	3071.93	4.97	0.0762
BC	523.266	1	523.266	0.85	0.3998
BD	1707.76	1	1707.76	2.76	0.1574
CD	219.781	1	219.781	0.36	0.5770
Error total	3090.95	5	618.191		
Total (corr.)	126864.	15			

Con base en la tabla 14, se acepta la hipótesis alterna (al menos una media es diferente), con un 95% de confianza, para los factores:

- Tipo de estabilizante (A)
- Cantidad de estabilizante (B)
- La interacción Tipo de estabilizante-Cantidad de estabilizante (AB)

El gráfico de Pareto es una herramienta que permite deducir de manera rápida los factores que influyen en el tamaño de partícula.

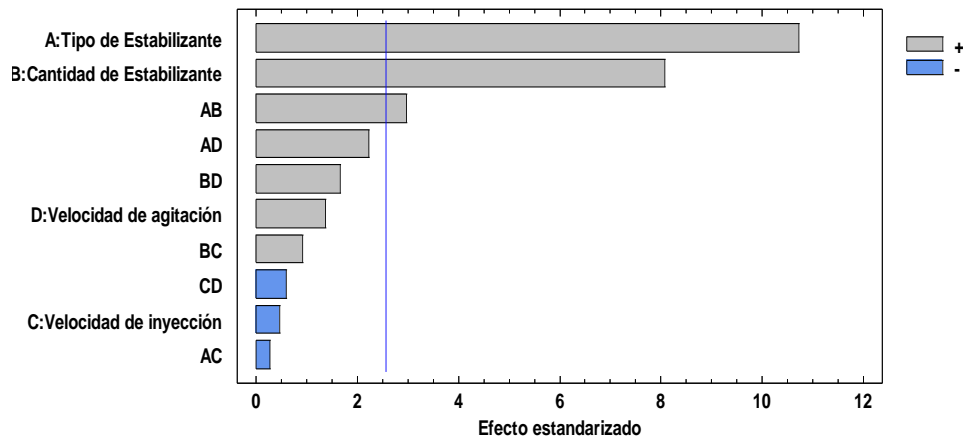


Figura 17. Gráfico de Pareto para el tamaño de partícula

En la figura 17, los factores A, B y AB rebasan el valor límite de t, por lo tanto, son los factores que se consideran influyen en el tamaño de partícula, siendo el tipo de estabilizante (A) el que mayor impacto tiene mientras que la interacción Tipo de estabilizante- Cantidad de estabilizante (AB) es el que menor impacto presenta.

Por otra parte, de acuerdo con la figura 18 a mayor pendiente mayor influencia en el tamaño

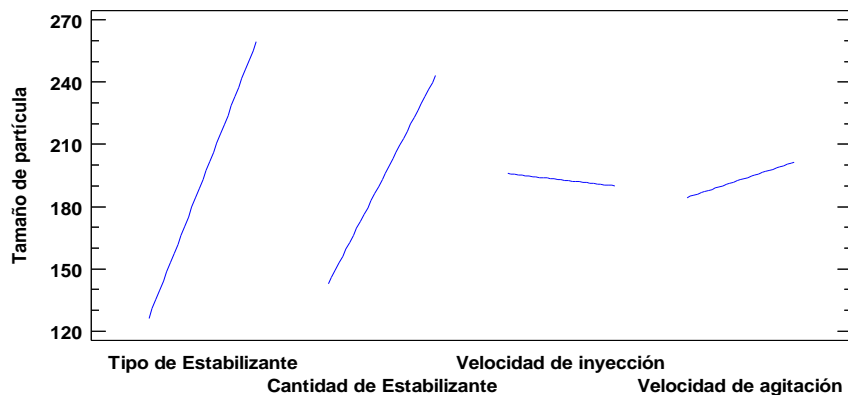


Figura 18. Gráfico de pendientes de efectos principales para el tamaño de partícula

La figura 18 muestra las pendientes de los factores que influyen en el tamaño de partícula, confirmando lo observado en el gráfico de Pareto, la velocidad de inyección y la velocidad de agitación son los factores que no afectan al tamaño debido al bajo valor de la pendiente, mientras que el tipo de estabilizante y la cantidad de estabilizante presentaron gran influencia en el tamaño.

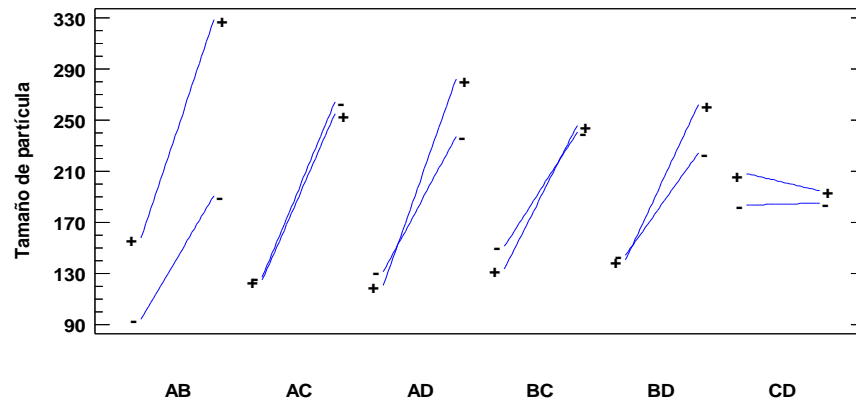


Figura 19. Gráfico de interacción de las pendientes para el tamaño de partícula

La figura 19, muestra el comportamiento entre las pendientes de los factores, siendo las interacciones que influyen en el tamaño aquellas que presenten pendientes lo más alejadas una de otra, por lo que la interacción AB es la que influye sobre el tamaño de partícula.

Asimismo, si los valores de las pendientes en términos codificados son grandes, en consecuencia, tienen influencia en el tamaño de partícula. Los coeficientes de cada uno de los factores se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Coeficientes de regresión para el tamaño de partícula

Coefficiente	Estimado
Constante	149.286
A: Tipo de Estabilizante	22.9343
B: Cantidad de Estabilizante	17.3611
C: Velocidad de inyección	-0.101333
D: Velocidad de agitación	0.0100379
AB	41.0694
AC	-0.06925
AD	0.0138562
BC	0.508333
BD	0.0229583
CD	-0.0001483

Por lo tanto, se puede escribir la ecuación del modelo ajustado, tomando en cuenta únicamente los factores que influyen en el tamaño de partícula. Así la ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Tamaño} = 149.286 + 22.9343 \cdot \text{Tipo de estabilizante} + 17.3611 \cdot \text{Cantidad de estabilizante} + 41.0694 \cdot \text{Tipo de estabilizante} \cdot \text{Cantidad de estabilizante}$$

Del mismo modo, para el IPD los resultados del análisis estadístico se muestran en las tablas 16 y 17 y figuras 20 y 21:

Tabla 16. ANOVA para determinar factores que afectan el IPD

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tipo de Estabilizante	0.0131103	1	0.0131103	12.11	0.0177
B: Cantidad de Estabilizante	0.003969	1	0.003969	3.67	0.1137
C: Velocidad de inyección	0.00060025	1	0.00060025	0.55	0.4899
D: Velocidad de agitación	0.008649	1	0.008649	7.99	0.0368
AB	0.00511225	1	0.00511225	4.72	0.0818
AC	0.000196	1	0.000196	0.18	0.6881
AD	0.00540225	1	0.00540225	4.99	0.0758
BC	0.00024025	1	0.00024025	0.22	0.6574
BD	0.001681	1	0.001681	1.55	0.2679
CD	0.00027225	1	0.00027225	0.25	0.6373
Error total	0.0054115	5	0.0010823		
Total (corr.)	0.044644	15			

Con un 95% de confianza, se acepta la hipótesis alterna para los factores tipo de estabilizante (A) y velocidad de agitación (D), por lo que ambos tienen influencia sobre el IPD.

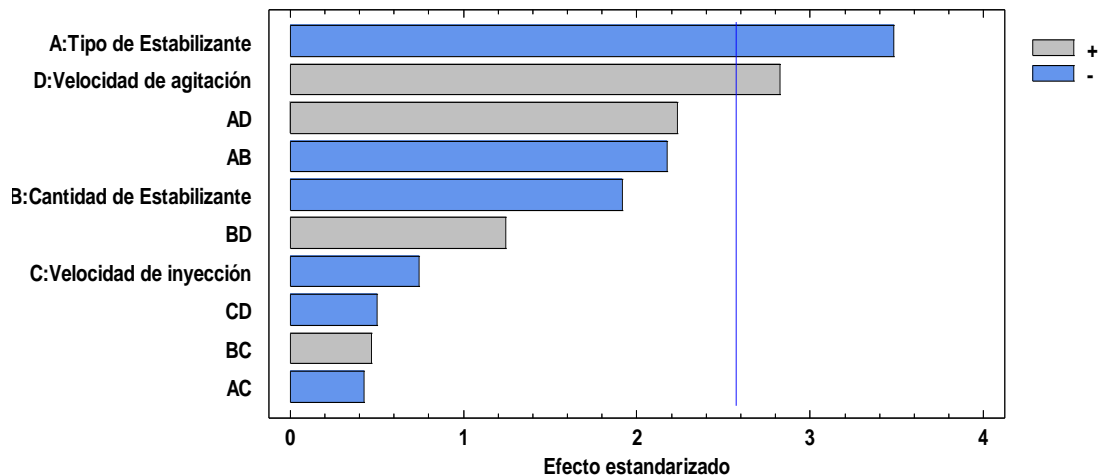


Figura 20. Gráfico de Pareto para IPD

En la figura 20, se aprecia que los factores A y D rebasan el límite de t, por lo que el tipo de estabilizante y la velocidad de agitación influyen directamente sobre el IPD.

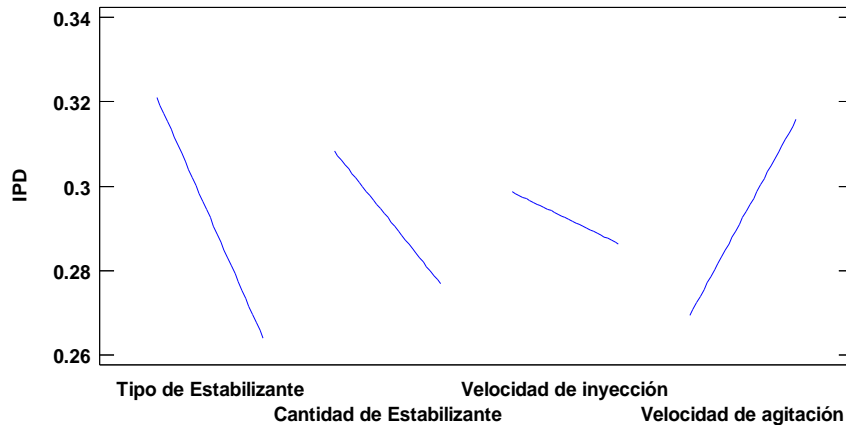


Figura 21. Gráfico de pendientes de efectos principales para el IPD

En la figura 21, se aprecia que tanto las pendientes del tipo de estabilizante como de la velocidad de agitación presentan comportamientos lineales con pendientes positiva (velocidad de agitación) y negativa (Tipo de estabilizante). Lo que indica que, al aumentar la velocidad de agitación, el IPD tenderá a aumentar su valor, mientras que al usar Pluronic F-127, el valor de IPD disminuirá y viceversa.

Tabla 17. Coeficientes de regresión para el IPD

Coeficiente	Estimado
Constante	0.300228
A: Tipo de Estabilizante	0.0302278
B: Cantidad de Estabilizante	-0.113278
C: Velocidad de inyección	-0.000104444
D: Velocidad de agitación	0.0000263972
AB	-0.0397222
AC	-0.00014
AD	-0.000018375
BC	-0.000344444
BD	-0.000022777
CD	-1.65E-7

De esta manera, tomando en cuenta únicamente los factores que influyen en el IPD, se puede escribir ecuación del modelo ajustado, la cual es:

$$\text{IPD} = 0.300228 + 0.0302278 \cdot \text{Tipo de estabilizante} + 0.0000263972 \cdot \text{Velocidad de agitación}.$$

Así, una vez conocidos los factores que afectan tanto el tamaño de partícula, como el IPD, se seleccionaron 4 formulaciones que presentaron el menor tamaño de partícula e IPD, dos con PVA y dos con PF-127. De acuerdo con esto, se seleccionaron las formulaciones 9, 5, 6 y 10 de la tabla 13.

9.4 Validación del método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de ácido retinoico

La tabla 18 muestra el resumen de la validación del método analítico que se desarrolló en el laboratorio L-322, empleando un espectrofotómetro UV/Vis U-5100 HITACHI.

El rango de la curva de calibración fue de 1.0712- 5.356 µg/mL. Para información detallada sobre todo el procedimiento seguido en esta validación consulte el anexo A.

Tabla 18. Resumen de la Validación del método analítico				
Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado: Formulación A (PVA)	Resultado: Formulación B (Pluronic F-127)	Veredicto
Especificidad	Respuesta debida únicamente al analito de interés.	Respuesta debida únicamente al analito de interés	Respuesta debida únicamente al analito de interés.	Cumple
Precisión de sistema	CV ≤ 1.5 %	0.6254		Cumple
Linealidad del sistema	r ² = 0.98	0.9997		Cumple
	y= mx + b	Abs= (0.1379 ± 0.0006) ([AR µg/mL]) - (0.0035 ± 0.0022)		
	IC (β1) NO incluye al cero	(0.13655313-0.13928705)		
Precisión de método	CV ≤ 3.0 %	0.9974	2.1410	Cumple
Exactitud y Repetibilidad del método	El promedio aritmético del % recobro está entre 97-103%	100.0486888	99.95362165	Cumple
	CV del % recobro ≤ 3.0 %	1.59454815	1.44599412	
Linealidad del método	r ² = 0.98	0.996410052	0.997969002	Cumple
	IC (β1) DEBE incluir la unidad	(0.96410077-1.03603587)	(0.97264133-1.02668389)	
	IC (β0) DEBE incluir el cero	(-0.11791819-0.11820007)	(-0.08710639-0.08761096)	
	El promedio aritmético del % recobro está entre 97-103%	100.017473	99.9261599	Cumple
	% CV del % recobro ≤ 3.0 %	1.397935387	1.634705001	
LD Método 1.	Informativo	0.1670 µg/mL	0.1482 µg/mL	Cumple
LC Método 1.	Informativo	0.5059µg/mL	0.4492 µg/mL	
LD Método 2.	Informativo	0.0131 µg/mL	0.0243 µg/mL	Cumple
LC Método 2.	Informativo	0.0396 µg/mL	0.736 mL	

9.5 Caracterización de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico

9.5.1 Eficiencia del proceso

Las formulaciones 5, 9, 6 y 10 de la tabla 13 fueron preparadas bajo las condiciones que se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de preparación y cantidades de fármaco y excipientes

Formulación	Condiciones de preparación
5	PVA 0.1 %, 120 mL/h, 1000 rpm
9	PVA 0.1 %, 70 mL/h, 3000 rpm
10	Pluronic F-127 0.1 %, 120 mL/h, 1000 rpm
6	Pluronic F-127 0.1 %, 70 mL/h, 3000 rpm

Todas las formulaciones contenían 0.04 mg/mL de AR y 5 mg/mL de zeína

Una vez obtenidas las 4 formulaciones, se liofilizaron 35 mL de cada una de ellas por 48 horas; obteniéndose las cantidades de sólidos reales por cada formulación como se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Eficiencia del proceso de preparación de NP's de zeína cargadas con AR



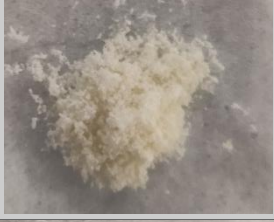
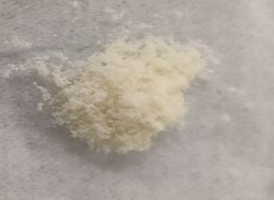
Formulación	Cantidad teórica de sólidos en 35 mL	Cantidad real de sólidos obtenidos en 35 mL	% eficiencia del método
5	54.4230 mg	49.1000 mg	90.22%
9	54.8649 mg	49.4000 mg	90.04%
10	53.7068 mg	48.7000 mg	90.12%
6	54.4999 mg	48.5000 mg	88.99%



Como se aprecia en la tabla 20, en todas las formulaciones la eficiencia del proceso fue de alrededor del 90%. Lo que implica que del 100% de sólidos totales agregados, únicamente ese porcentaje se transformó en nanopartículas. Asimismo, no se observó alguna diferencia significativa al emplear el PVA como estabilizante (formulaciones 9 y 5) que al emplear Pluronic F-127 (formulaciones 6 y 10). Por tanto, la formación y obtención de NP's no depende del tipo de estabilizante.

9.5.2 Eficiencia de encapsulación

Las formulaciones 9, 5, 6 y 10 fueron preparadas por triplicado y 35 mL de cada una se liofilizó por 48 horas hasta obtener sólidos como los que se muestran en la tabla 21, determinándose el contenido de AR de acuerdo con lo descrito en la sección 8.5.3. Los resultados del procedimiento anterior se resumen en la tabla 21. Cada determinación se realizó por triplicado.

Tabla 21. Determinación de la eficiencia de encapsulación de AR en NP's de zeína

Formulación	Apariencia del liofilizado	Cantidad promedio total de fármaco en el liofilizado (μg)	Cantidad promedio de liofilizado pesado (mg)	Cantidad de fármaco encapsulado (μg)	% Encapsulación
5		27.26 \pm 0.39	10.63 \pm 0.15	20.35 \pm 0.037	74.66 \pm 0.59%
9		27.49 \pm 0.84	10.47 \pm 0.32	19.54 \pm 1.45	71.05 \pm 3.54%
6		25.05 \pm 4.73	9.33 \pm 1.76	15.74 \pm 0.68	46.08 \pm 1.23%
10		28.68 \pm 0.73	10.40 \pm 0.26	11.57 \pm 2.40	54.84 \pm 1.39%

<p>Formulación 9 con exceso de fármaco. (15 veces más)</p>		<p>NA</p>	<p>NA</p>	<p>NA</p>	<p>NA</p>
<p>NP's de zeína en agua</p>		<p>NA</p>	<p>NA</p>	<p>NA</p>	<p>NA</p>

NA: No Aplica

La eficiencia de encapsulación del AR fue mayor al 70% para formulaciones con PVA (5 y 9) y mayor al 45% para formulaciones con Pluronic F-127, existiendo una diferencia de aproximadamente el 25% de encapsulación del AR.

Estos resultados sugieren que la presencia de PVA en la superficie de las nanopartículas, además de estabilizarlas, permite la incorporación de una mayor cantidad de fármaco debido a que los grupos OH y NH presentes en la zeína son capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos OH del PVA, lo que mejora la compatibilidad de estos materiales y, por lo tanto, mejora la capacidad de encapsular una mayor cantidad de AR [83]. La apariencia y consistencia al tacto de los liofilizados puede ser importante, pues como se visualiza en la tabla 21, los liofilizados de las formulaciones 5 y 9 son esponjosos y suaves, mientras que los liofilizados obtenidos con las formulaciones 6 y 10 son polvos de apariencia granular; asimismo, los liofilizados con PVA muestran un color amarillo muy tenue, mientras que los liofilizados con Pluronic F-127 son de un color amarillo más intenso, lo que podría indicar que parte del AR que no fue encapsulado es responsable del aumento en la coloración. Por otro lado, con fines comparativos, se preparó la formulación 9, pero incluyendo una mayor cantidad de AR. De esta manera, al comparar la formulación 9 y la formulación 9 con un exceso de AR, es evidente el gran cambio en la coloración del liofilizado, siendo más notorio cuando se adicionan 15 veces más de AR que en la formulación original.

Los resultados obtenidos coinciden con los de Park [78], quien muestra la apariencia de sus sistemas liofilizados al emplear caseinato de sodio, siendo de textura algodonosa similar a los obtenidos en este trabajo. Podría resultar que el PVA al tener grupos OH ricos en electrones, actúe de la misma manera que un estabilizante como el caseinato de sodio. Esto también explicaría el aumento en la encapsulación del AR, al formar probablemente un caparazón alrededor de las NP's de zeína debido a los puentes de hidrógeno formados por los grupos hidroxilo y amino de la zeína con los grupos hidroxilo del PVA. Por otro lado, el PVA, al ser un polímero con gran número de grupos OH, podría actuar también como crioprotector, de la misma manera que los azúcares comúnmente empleados en la crioprotección al someter algún material a liofilizar.

Con el objetivo de comprobar que el procedimiento propuesto para determinar % de encapsulación de AR era el adecuado, se prepararon 4 mezclas físicas de NP's de zeína placebo adicionadas con AR, a las mismas proporciones de AR, zeína y estabilizantes que las formulaciones 5, 9, 6 y 10 de la tabla 13. Posteriormente, 35 mL de cada una de las mezclas se liofilizó y cada liofilizado se trató como se describe en la sección 8.5.3. Dado que solo son mezclas físicas, se supuso que todo el AR se encontraba fuera de la NP's de zeína. Así, este procedimiento logró determinar el 98.3% de AR para el liofilizado con PVA y el 99.6 % del AR para el liofilizado con Pluronic F-127. Por lo que se demuestra que el procedimiento elegido para determinar % de encapsulación fue adecuado. Para más información acerca de la determinación del % de Encapsulación de AR, consulte el Anexo B.

Para las pruebas de caracterización y liberación, de las cuatro formulaciones mencionadas, se seleccionaron dos, una con PVA (formulación 5) y otra con Pluronic F-127 (formulación 10). Estas formulaciones fueron elegidas con base a los valores de tamaño e IPD, mayor tasa de encapsulación y rendimiento del proceso. La tabla 22 muestra el resumen de las propiedades de ambas.

Tabla 22. Tamaño, IPD, Potencial Z, % de encapsulación, y rendimiento del proceso para las formulaciones 5 y 10

Formulación	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)	% Encapsulación	% eficiencia del proceso
5	97.61±2.13	0.299±0.04	8.1±0.8	74.66±0.59%	90.22%
10	163.80±0.95	0.225±0.01	-11.57±0.3	54.84±1.39%	90.12%

9.5.3 Análisis espectroscópico por ultravioleta/visible de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico

Una vez determinada la eficiencia de encapsulación, se caracterizaron los sistemas mediante inspección visual y por espectrofotometría UV/Vis. Para esta prueba, todas las determinaciones se realizaron en medio acuoso, como se muestra en las figuras 24 y 25.

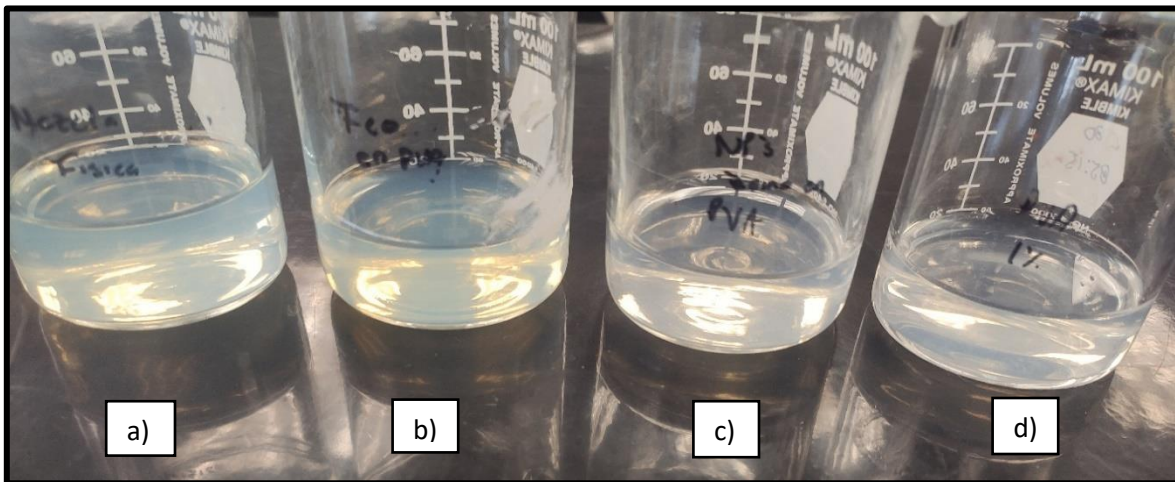


Figura 24. Sistemas acuosos con PVA: a) Mezcla física de AR y NP's de zeína placebo; b) AR inyectado en el medio con estabilizante; c) Formulación 5; d) NP's de zeína placebo

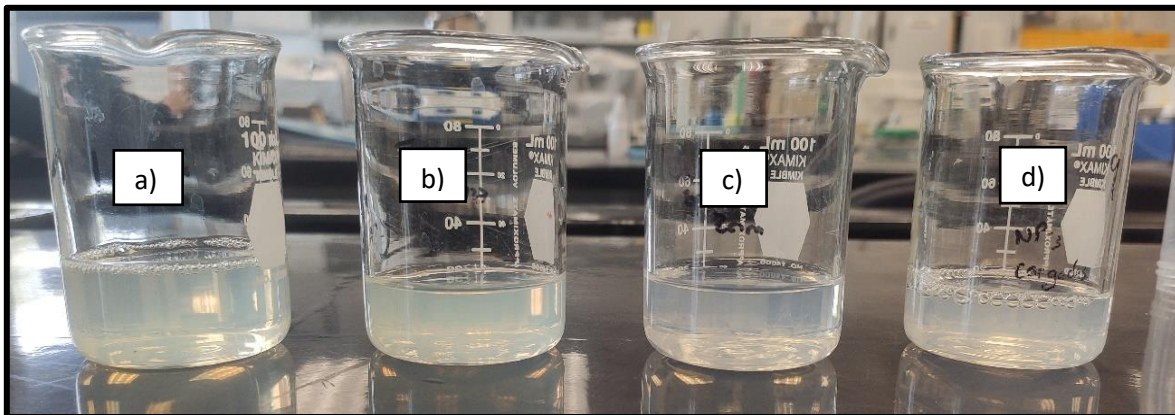


Figura 25. Sistemas acuosos con Pluronic F-127: a) Mezcla física AR y NP's de zeína placebo; b) AR inyectado en el medio con estabilizante; c) NP's de zeína placebo; d) Formulación 10

En la figura 24 es posible apreciar la similitud en la coloración de las NP's de zeína placebo (d) con la formulación 5 (c); mientras que el AR en agua y la mezcla física (b y a respectivamente) muestran coloración amarilla que es característico del AR en dispersión acuosa, lo anterior podría servir como un indicio cualitativo de la encapsulación del AR, debido a la diferencia notoria en la coloración. Asimismo, en la figura 25, se puede apreciar que la formulación 10 (d) exhibe una coloración similar a la mezcla física (a) en comparación con las NP's placebo (c), lo que indicaría que la encapsulación

de AR fue menor al emplear Pluronic F-127 que, al usar el PVA. Estos resultados se comprobaron de manera cuantitativa al determinar el % de encapsulación mostrado en la tabla 21.

El AR muestra una señal a 349 nm en el espectro de UV/Vis, mientras que al estar en medio acuoso, existe un desplazamiento batocrómico hasta una longitud de onda de 435 nm. Como se observa en las figuras 26 y 27.

De las figuras 26 y 27, las NP's de zeína placebo y cada mezcla física de AR con las NP's muestran un comportamiento similar; sin embargo, la señal de las mezclas físicas es mayor, lo que se debe a la adición de la absorbancia del AR sobre el espectro de la zeína, la cual se encuentra en la misma proporción que en las formulaciones, lo que indica que no existe ningún tipo de interacción.

Por otro lado, las señales de las formulaciones 5 y 10 (la señal café) muestra un ensanchamiento de la banda que se encuentra entre 310 y 380 nm, lo que podría ser un indicativo de algún tipo de interacción entre la zeína y el AR debido al fenómeno de encapsulación presentado según Afonso [24] donde discutió de manera similar el comportamiento del PR encapsulado en NP's de zeína, produciéndose un ensanchamiento de banda a 326 nm, longitud a la que absorbe el PR, lo que indica que efectivamente ocurrió la encapsulación.

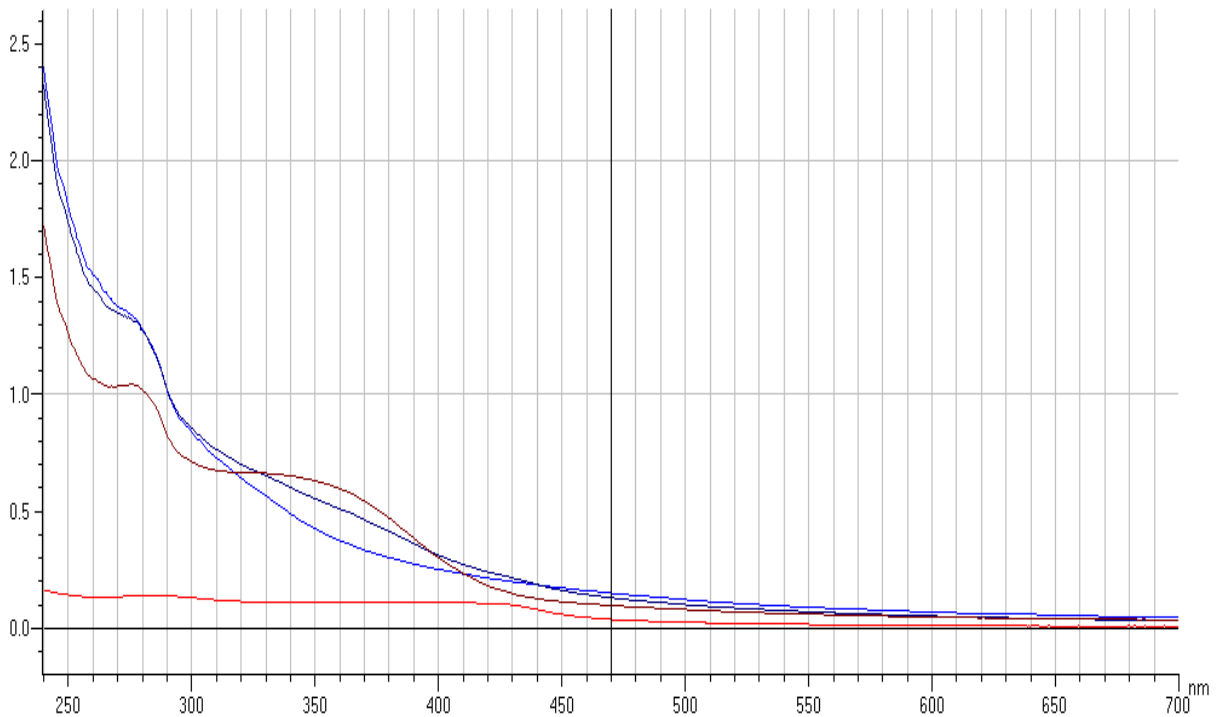


Figura 26. Espectro UV/VIS de los sistemas con PVA: Línea negra (blanco); Línea roja (AR en agua); Línea café (formulación 9); Línea Azul claro (NP's de zeína placebo); Línea Azul oscuro (Mezcla física de AR y NP's de zeína placebo)

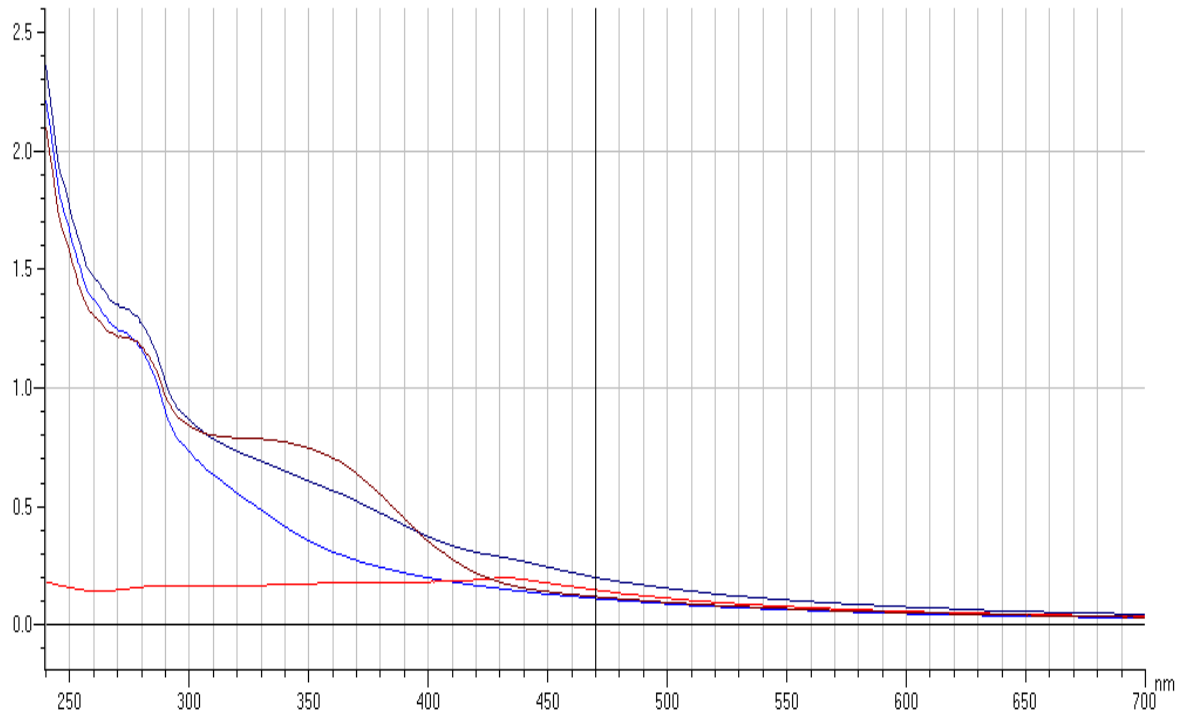


Figura 27. Espectro UV/VIS de los sistemas con Pluronic F-127: Línea negra (blanco); Línea roja (AR en agua); Línea café (formulación 10); Línea Azul claro (NP's de zeína placebo); Línea Azul oscuro (Mezcla física de AR y NP's de zeína placebo)

9.5.4 Análisis espectroscópico por infrarrojo de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con ácido retinoico

En las figuras 28 y 29 se muestran los espectros de IR de las formulaciones 5 y 10, así como sus mezclas físicas y componentes individuales.

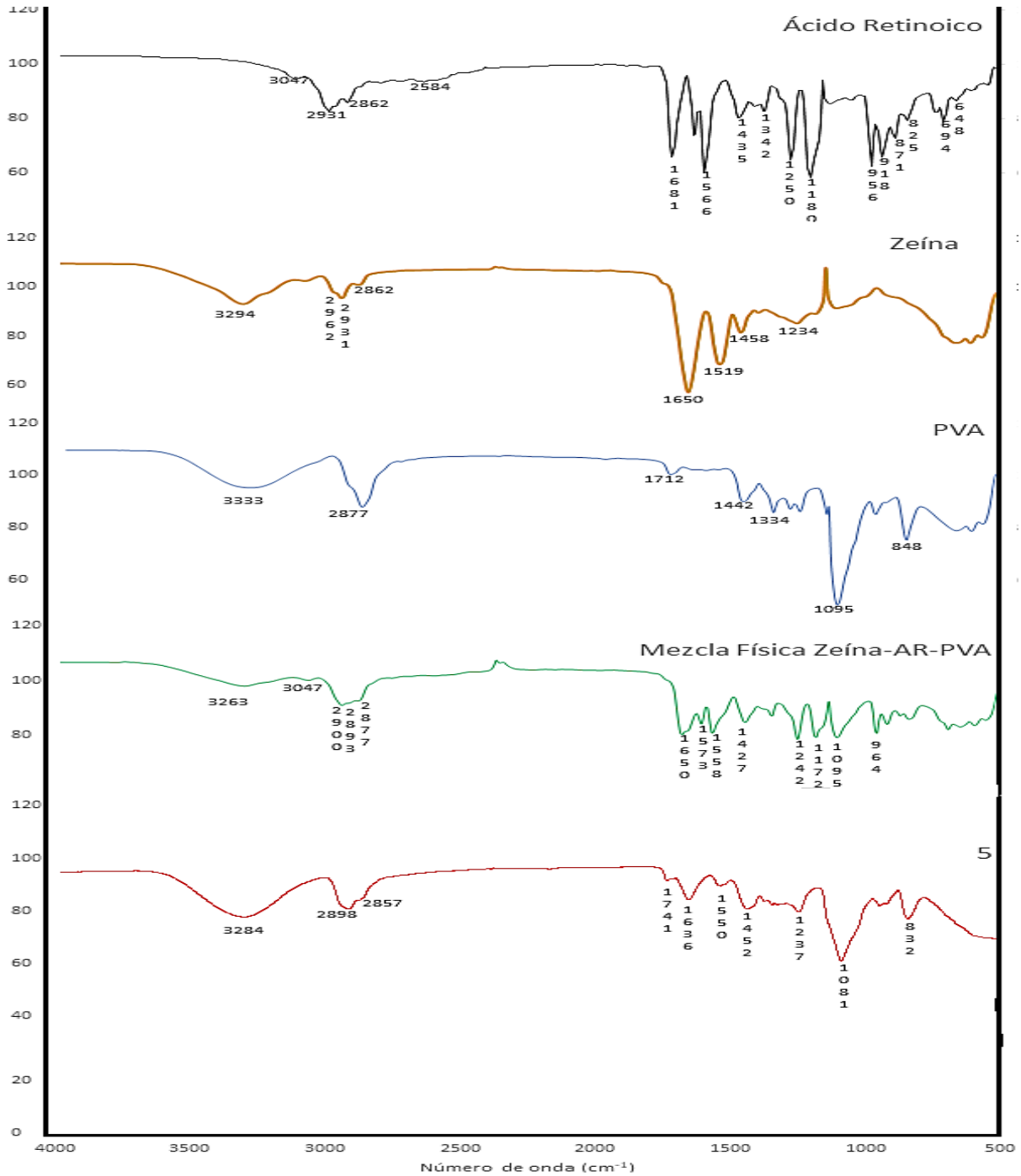


Figura 28. Espectros de infrarrojo de todos los componentes necesarios para la preparación de NP's de zeína con PVA como estabilizante, mezcla física y NP's de zeína cargadas con AR (5)

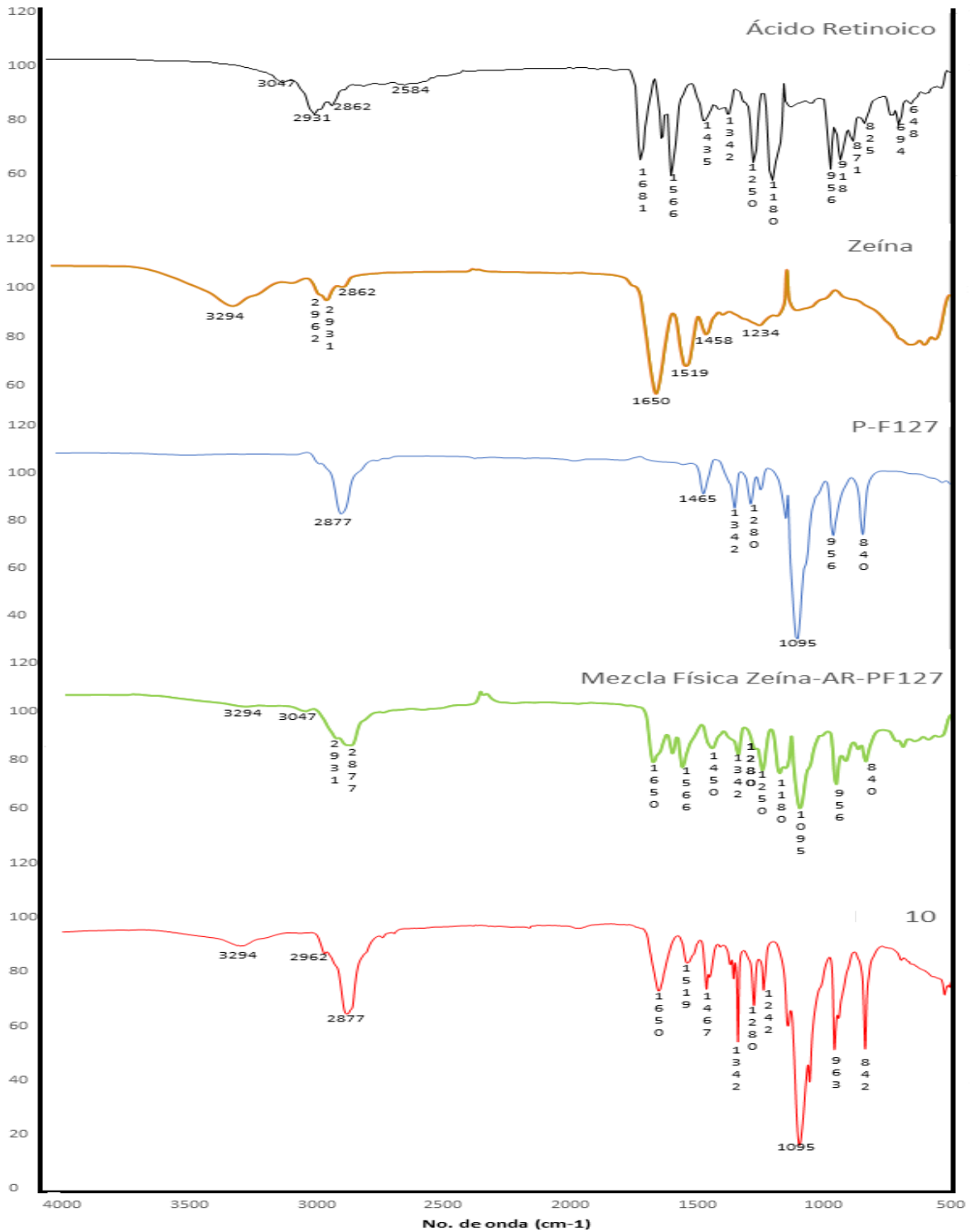


Figura 29. Espectros de infrarrojo de todos los componentes necesarios para la preparación de NP's de zeína con PF-127 como estabilizante, mezcla física y NP's de zeína cargadas con AR (10)

El AR presenta diversas bandas características en el espectro de IR. La banda presente a 3047 cm^{-1} corresponde a la tensión del enlace =C-H a lo largo de la cadena alifática presente en su estructura. A 2931 cm^{-1} existe una banda que se atribuye a la tensión los metilos y metilenos que componen al AR. La tensión del enlace C=O se encuentra a 1681 cm^{-1} . La banda de flexión de los alquenos alifáticos del AR se encuentra a 1581 cm^{-1} . A 1566 cm^{-1} aparece una banda de flexión del ciclohexeno presente. A 1435 cm^{-1} se aprecia una señal que corresponde a la tensión del enlace C-O-H de la función ácida [24, 49, 78].

De la misma forma, la zeína exhibe diversas bandas en su espectro de IR. Las principales se muestran a 3294 cm^{-1} que corresponden a la tensión del enlace O-H y/o N-H de los aminoácidos que componen a la zeína. A 2962 cm^{-1} se presenta banda de tensión del enlace C-H (metilos y metilenos). La banda correspondiente al enlace C=O de los grupos carbonilos proteicos se observa a 1650 cm^{-1} . Asimismo, a 1519 cm^{-1} se tiene la flexión del enlace N-H de los aminoácidos. La señal de tensión del enlace C-O-H , de la función ácida, se exhibe a 1458 cm^{-1} y a 1234 cm^{-1} se tiene la banda de tensión C-N característica del grupo amida [24,49, 78].

El PVA, es un polímero sintético formado a partir de n cantidad de monómeros de alcohol vinílico. Las principales bandas que presenta su espectro de infrarrojo (figura 28) son a 3333 cm^{-1} que corresponde a la tensión del enlace O-H . A 2877 cm^{-1} se muestra la banda característica de la tensión de los enlaces C-H de los metilenos. A 1442 cm^{-1} se observa la flexión de los metilos y metilenos del polímero. A 1095 cm^{-1} se exhibe la señal de tensión del enlace C-O de los grupos alcoholes del polímero y a 848 cm^{-1} se presenta una pequeña banda que indica la flexión del enlace C-C correspondiente a una cadena alifática de más de 5 átomos de C.

El Pluronic F-127 es un tensioactivo no iónico hidrófilo de la clase más general de copolímeros conocidos como poloxámeros. Es un copolímero tribloque que consiste en un bloque hidrofóbico central de polipropilenglicol flanqueado por dos bloques hidrofílicos de polietilenglicol (PEG). Las bandas características del espectro de IR de este polímero (figura 29) corresponden a la tensión de enlaces C-H de metilos y metilenos a 2877 cm^{-1} , flexión de metilos y metilenos a 1465 cm^{-1} que componen a la cadena del tensioactivo. La banda a 1342 cm^{-1} pertenece a la flexión del enlace O-H en el plano de la función alcohol de los extremos del polímero mientras que a 1095 cm^{-1} se encuentra la tensión del enlace C-O-C de la función éter formada por el polipropilenglicol y el polietilenglicol. A 840 cm^{-1} se exhibe la banda indicativa de la flexión del enlace C-C correspondiente a una cadena tipo alifática de más de 5 átomos de C.

En el espectro de IR de la mezcla física zeína-AR- PVA (figura 28) se presenta una banda a 3263 cm^{-1} que puede corresponder a la tensión del enlace O-H y/o N-H de los aminoácidos que componen a la zeína, así como a la tensión del enlace O-H del PVA. La banda a 3047 cm^{-1} se debe a la tensión del enlace =C-H del AR. Adicionalmente, las bandas que se encuentran entre 2900 cm^{-1} y 2893 cm^{-1} pueden deberse a las tensiones de metilos y metilenos presentes en el AR, zeína y PVA y que debido a la mezcla y conjugación de cada componente las señales disminuyeron sus respectivas frecuencias. La banda a 2877 cm^{-1} pertenece a la tensión C-H - del PVA. Además, se presenta a 1650 cm^{-1} la banda de los grupos carbonilos de la zeína y/o del AR. Mientras que las bandas que van de 1573 a 1558

cm^{-1} quizá se deban tanto a las bandas de flexión del ciclohexeno del AR como a la flexión de N-H de los aminoácidos de la zeína. A 1427 cm^{-1} se presenta una banda que puede tratarse de la tensión del enlace C-O-H de la función ácida tanto del AR como de los aminoácidos de la zeína. Las bandas presentes a 1242 y 1172 cm^{-1} son muy parecidas a las presentes en el espectro de AR en la región de la huella dactilar. A 1095 cm^{-1} se muestra la banda de tensión del enlace C-O de los grupos alcoholes del PVA. Mientras que, a números de onda más bajos, se presentan diversas bandas resultado de la mezcla de todos los componentes en el área de la huella dactilar. Como se aprecia, el espectro de IR de la mezcla física de zeína-AR-PVA es complejo ya que presenta múltiples bandas producto de la combinación física lo que puede provocar en algunas ocasiones el aumento o disminución de las frecuencias y además varias bandas pueden estar traslapadas en una sola.

Por otro lado, el espectro de IR de la formulación 5 (figura 28) presenta menos bandas en comparación a la mezcla física, desapareciendo bandas del AR, como la de 3047 cm^{-1} y 1581 cm^{-1} , correspondientes a los alquenos y 1566 cm^{-1} que corresponde al ciclohexeno del AR. Así, también se presentó la disminución de intensidad de algunas otras bandas como las de la parte de la huella dactilar y la conservación de las señales de 3284 cm^{-1} correspondiente las tensiones de las aminas y grupos OH de los aminoácidos de la zeína y PVA respectivamente, así como la banda a 1081 cm^{-1} que muy probablemente se deba a la tensión del enlace C-O del PVA. Lo anterior descrito puede ser un indicativo de que se presentó una encapsulación de AR.

Del mismo modo, en el espectro de IR de la mezcla física zeína- AR-PF127 (figura 29) se observan diversas bandas. Se presenta una banda a 3263 cm^{-1} que puede corresponder a la tensión del enlace O-H y/o N-H de los aminoácidos que componen a la zeína mientras que la banda a 3047 cm^{-1} que se debe a la tensión del enlace =C-H del AR. Las señales que se encuentran entre 2931 cm^{-1} y 2877 cm^{-1} pueden deberse a las tensiones de metilos y metilenos presentes en el AR, zeína y PF127. Además, se presenta a 1650 cm^{-1} la banda de los grupos carbonilos de la zeína y/o del AR y la banda a 1342 cm^{-1} corresponde a la flexión del enlace O-H en el plano de la función alcohol de los extremos del PF-127 mientras que a 1095 cm^{-1} se encuentra la tensión del enlace C-O-C de este PF127. Finalmente, en la región de la huella dactilar se presentan una gran cantidad de bandas debido a la mezcla de los componentes de la formulación. En la figura 29, el espectro de IR de la formulación 10 presentó una disminución de la cantidad de bandas en comparación con la mezcla física, resaltando la desaparición de la mayoría de las bandas del AR y la conservación de las frecuencias de las bandas provenientes de la zeína (3263 cm^{-1} , 2962 cm^{-1} , 1519 cm^{-1}) así como las propias del PF-127 (2877 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} y el área de la huella dactilar que es prácticamente igual a la del espectro de IR del PF-127). Por tanto, se puede aseverar que también se presentó una encapsulación del AR. Park, *et al.* [49] y Park, *et al.* [78] mencionan que el ligero cambio presentado en las bandas a 1650 cm^{-1} y las señales a 1573 y a 1467 cm^{-1} puede ser debido al entrelazamiento entre los grupos amida de la zeína y los grupos hidroxilo del AR lo que indica un tipo de interacción entre la zeína y al AR debido al efecto de encapsulación.

9.5.5 Análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido

La figura 30 muestra todos los eventos térmicos que presentan las NP's de zeína cargadas con AR (formulación 5), el PVA, la zeína y la mezcla física de los componentes.

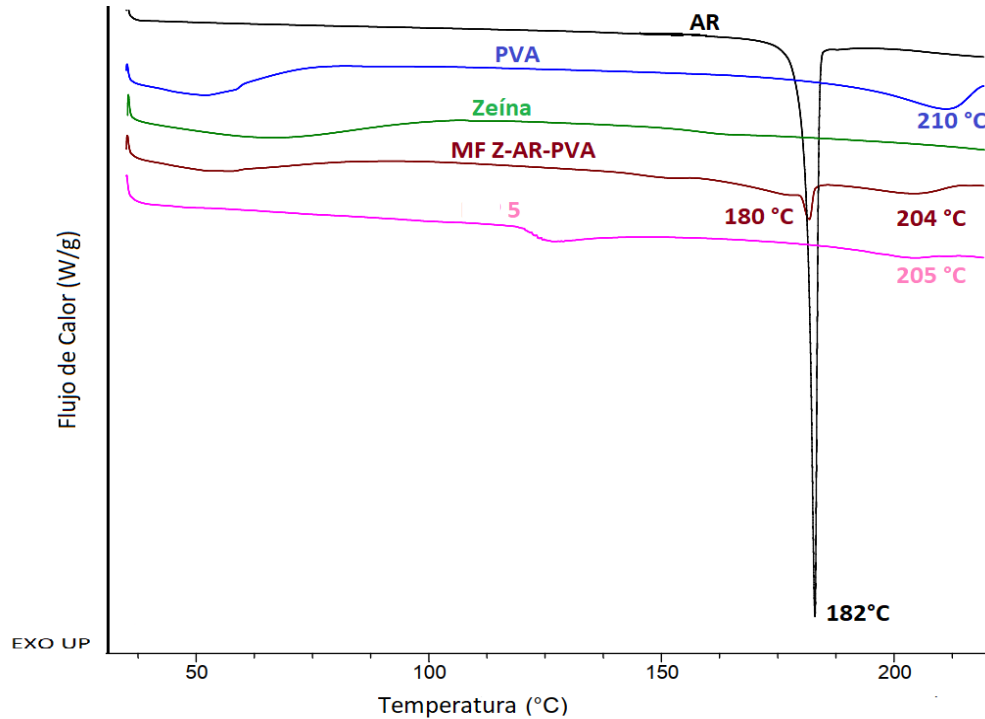


Figura 30. Termogramas de las NP's de zeína cargadas con AR utilizando PVA como estabilizante (5) y de sus componentes individuales

El termograma de la zeína muestra, aunque muy ligeramente, la temperatura de transición vítrea, la cual está reportada a 165 °C. El AR puro muestra una fuerte y bien definida señal endotérmica a 182 °C, que es atribuido al punto de fusión del AR cristalino. El PVA presentó dos señales, la primera señal endotérmica alrededor de 50 °C fue atribuible a la temperatura de transición vítrea (Tg), la cual es característica de polímeros semicristalinos que cambian de un estado vítreo a un estado viscoso. La segunda señal endotérmica fue ligera y ancha a los 210 °C, señal que se debió al punto de fusión de este polímero. Por su parte, la mezcla física de zeína-AR- PVA mostró 2 señales endotérmicas; una a 180°C que se debió al punto de fusión del AR y a 204 °C que es atribuyó al punto de fusión del PVA; sin embargo, ambas temperaturas fueron menores a las de sus componentes puros lo que se puede imputar al efecto de mezclado. Las NP's de zeína liofilizadas presentaron una ligera señal endotérmica a 205°C que correspondió al punto de fusión del PVA y otra a 120°C que puede atribuirse a una Tg del liofilizado. Esto se puede deber a que cuando se liofiliza la dispersión de NP's, al eliminar el agua, el PVA (componente mayoritario) adopta una forma semicristalina en combinación con la zeína y por lo tanto presenta un comportamiento diferente al del PVA puro. No se observó señal alguna cercana a la temperatura de fusión del AR por lo que se puede inferir que se encapsuló, encontrándose disperso molecularmente dentro de las NP's.

Park, *et. al* [78] realizaron un estudio por CDB en donde se observó que, a diferencia de la mezcla física, no hubo señales cerca del punto de fusión del retinol. Atribuyendo este hecho a la encapsulación del retinol en NP's de zeína recubiertas con pectina. En el presente trabajo, se observó un resultado similar al de Park confirmando, como ya se mencionó que el AR se encuentra encapsulado.

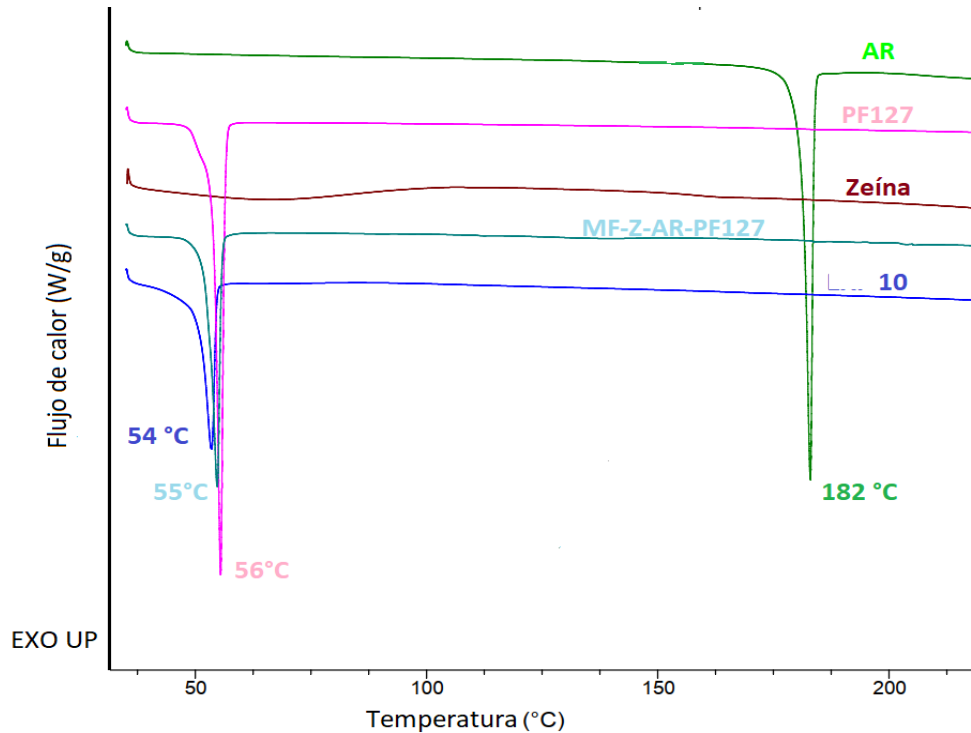


Figura 31. Termogramas para las NP's de zeína cargadas con AR con PF-127 (10) y de sus componentes individuales

Del mismo modo, la figura 31 los eventos térmicos para las NP's de zeína cargadas con AR con PF-127 como estabilizante y sus componentes individuales. El PF-127 exhibe una señal endotérmica fuerte a 56°C que corresponde a su punto de fusión. Sin embargo, la mezcla física de zeína-AR-PF127 no muestra una señal cercana a 182 °C donde debería estar presente el punto de fusión del AR. Esto podría deberse a que el Pluronic F-127, al presentar un punto de fusión menor al AR, se propicia una interacción molecular con el fármaco similar al efecto de encapsulación del fármaco en las NP's, lo que hace que el punto de fusión del AR no se alcance a visualizar en su termograma. Adicionalmente, la formulación 10 sólo mostró la señal a 54 °C que es muy cercana al punto de fusión del PF-127; no obstante, dado que no se presentó la señal del AR en la mezcla física no se puede concluir realmente si existió una encapsulación del fármaco, al menos por este método.

9.6 Estudios de liberación *in vitro*

Como se observa en la figura 32 y como era de esperarse, la mayor cantidad liberada y la mayor tasa de liberación correspondió al AR en solución etanólica, mientras que las dispersiones de NP's de zeína cargadas con AR empleando PVA y PF-127 como estabilizantes presentaron perfiles muy similares entre sí. La inclusión de AR en las nanopartículas prolongó la liberación en relación con el AR en solución. Para comprender el mecanismo de liberación predominante, la elección de un modelo matemático adecuado, al que se ajusten los datos obtenidos, permite predecir lo que ocurre en el proceso de liberación. Para ello, fue empleado el complemento de Excel® DDSolver, el cual proporciona una serie de criterios estadísticos para evaluar el ajuste a un modelo matemático descriptivo como son el coeficiente de correlación (R^2), el Criterio de Akaike (CA) y el criterio de selección del modelo (CSM). La tabla 23 muestra los criterios estadísticos obtenidos para los perfiles de liberación de cada formulación.

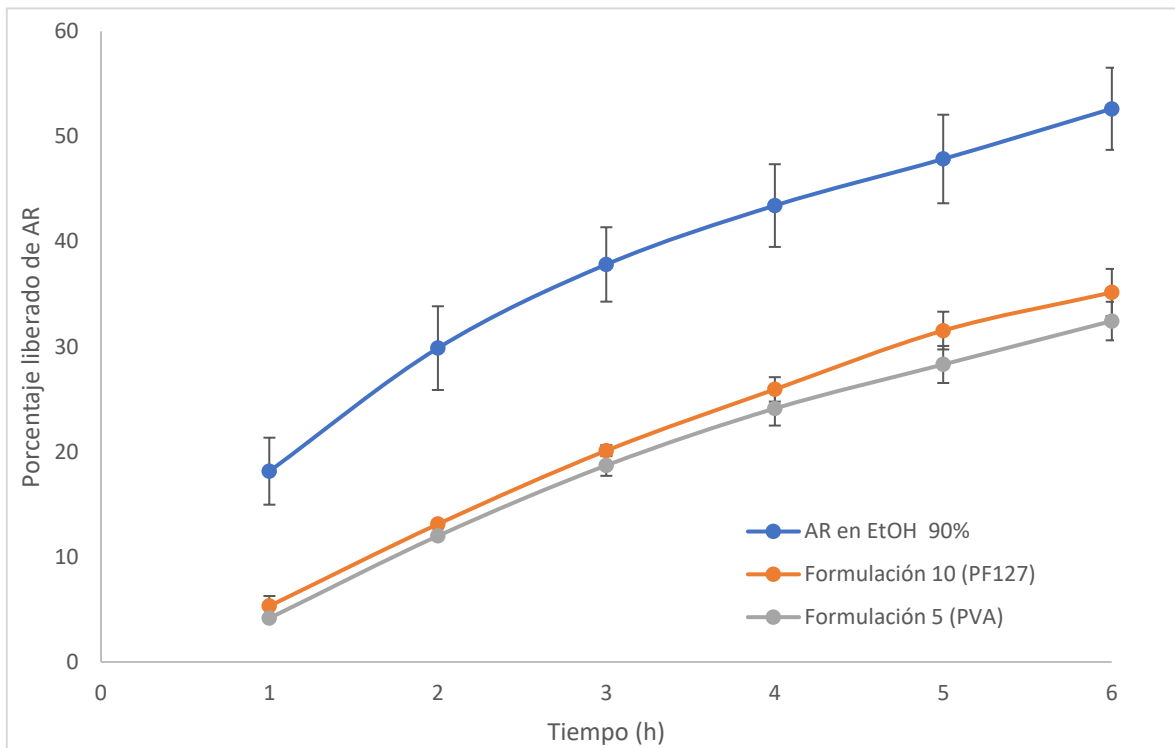


Figura 32. Perfiles de liberación *in vitro* para AR en solución y para dos diferentes formulaciones de NP's de zeína cargados con AR, usando el método de diálisis. Cada punto corresponde al promedio de los resultados obtenidos; las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$)

La solución de AR en etanol al 90% presenta un coeficiente de correlación alto de 0.9886, AC ≈ 16 y CSM ≈ 4.0 para el modelo de Peppas-Korsmeyer. El valor de n del modelo de Peppas-Korsmeyer es muy cercano a 0.5, lo que corresponde a una liberación Fickiana, donde el mecanismo dominante es la difusión. En este caso, se trata únicamente de la difusión del fármaco a través de la membrana

de diálisis. Para el modelo de Higuchi, el coeficiente de correlación también es alto y de hecho coincide con el mecanismo de liberación indicado para un exponente “n” cercano a 0.5, el cual indica una dependencia con la raíz cuadrada del tiempo. En este caso, tanto el modelo de Peppas-Korsmeyer como el de Higuchi presentan el menor valor de CA y el mayor valor para el CSM.

Tabla 23. Coeficiente de correlación (R^2), CA y CSM para los diferentes modelos matemáticos de liberación y exponente de liberación “n” para el modelo de Peppas - Korsmeyer

Modelos cinéticos de liberación					
Formulación	Orden Cero	Orden 1	Higuchi	Peppas - Korsmeyer	n
	R^2 (CA)(CSM)				
AR en EtOH 90%	0.6245 ⁽³⁶⁾ (0.7)	0.8841 ⁽²⁹⁾ (1.9)	0.9813 ⁽¹⁷⁾ (3.8)	0.9883 ⁽¹⁶⁾ (4.0)	0.55
Formulación 10 (PF-127)	0.9809 ⁽¹⁶⁾ (3.7)	0.9894 ⁽¹³⁾ (4.3)	0.8326 ⁽³⁰⁾ (1.5)	0.9872 ⁽¹⁵⁾ (3.9)	0.91
Formulación 5 (PVA)	0.9814 ⁽¹⁶⁾ (3.7)	0.9879 ⁽¹³⁾ (4.1)	0.8220 ⁽³⁰⁾ (1.4)	0.9811 ⁽¹⁷⁾ (3.5)	0.93

Por otro lado, para las dispersiones de NP’s de zeína cargadas con AR, tanto la formulación 10 como la 5, exhiben coeficientes de correlación elevados para una cinética de primer orden ($R^2 = 0.9894$, $AC \approx 13$ y $CMS \approx 4.3$ para la formulación 10; $R^2 = 0.9879$, $AC \approx 13$ y $CSM \approx 4.1$ para la formulación 5). A partir de estos valores se puede asumir que la velocidad de liberación de ambas formulaciones en el medio es dependiente de la concentración del AR, siguiendo una cinética de primer orden. De acuerdo con el gráfico de liberación, ésta tiende a ser más lenta para las NP’s en comparación a la liberación del AR en etanol al 90%, para la cual se observa una liberación inicial de AR rápida y tiende a disminuir con el tiempo [87].

A las 6 horas, el % liberado para la solución de AR fue de 52.6 % mientras que para la formulación 10 y para la 5 fue de 35.2 % y 32.4 %, respectivamente, lo que implica que la cantidad liberada a partir de las NP’s se redujo un 33.1 % para la formulación 10, mientras que para la formulación 5 se redujo un 38.4 % en relación con AR en solución.

Se realizó una prueba de t para dos muestras independientes suponiendo varianzas iguales, comparando la cantidad de AR liberada a las 6 horas. Se encontró que no existe diferencia significativa ($t_{calculada} = 1.63$, $t_{(0.05, 4)} = 2.78$) entre la cantidad de AR liberado para las formulaciones 5 y 10 a pesar de que la formulación 5 contenía 1.39 veces más AR que la formulación 10.

10. Conclusiones

- Se desarrollaron y caracterizaron formulaciones nanoparticuladas conteniendo ácido retinoico como principio activo, empleando zeína como biopolímero, PVA y PF-127 como estabilizantes.
- Las mejores condiciones para la preparación de NP's de zeína al emplear el diseño de experimentos fueron, para la formulación 5 PVA al 0.1 %, una velocidad de inyección de 120 mL/h y una velocidad de agitación de 3000 rpm mientras que para la formulación 10 PF-127 al 0.1 %, una velocidad de inyección de 70 mL/h y una velocidad de agitación de 3000 rpm.
- Las 2 formulaciones elegidas (formulación 5 con PVA y formulación 10 con PF127) presentaron tamaños nanométricos de aproximadamente 97 y 164 nm, respectivamente con IPD's menores a 0.3. No obstante, la tasa de encapsulación fue mayor para la formulación 5 (75 %) que para la formulación 10 (54.84 %).
- El método analítico para la cuantificación de AR por espectrofotometría UV/Vis fue lineal, exacto y preciso para un rango de concentración de 1.0712 a 5.356 $\mu\text{g/mL}$.
- Los resultados obtenidos con las técnicas de FTIR-ATR y CDB, permiten asumir que el AR se encuentra incorporado en las nanopartículas para la formulación 5 (PVA). Sin embargo, el análisis por CDB no es concluyente para la formulación 10 (PF-127).
- Los estudios de liberación *in vitro* sugieren que la liberación a partir de una solución del fármaco se ajusta a los modelos de Higuchi y Peppas-Korsmeyer, mostrando una dependencia con la raíz cuadrada del tiempo.
- La inclusión de AR en las nanopartículas de zeína prolonga su liberación en relación con el fármaco libre, en solución.
- Para las formulaciones 5 y 10 (con PVA y PF-127 respectivamente), la liberación de AR sigue una cinética de primer orden sin que se presentaran diferencias significativas en la cantidad de AR liberado a las 6 horas.
- Las nanopartículas preparadas poseen características tecnológicas adecuadas, por lo que representan una buena opción para la liberación en piel del AR.

11. Perspectivas

Realizar estudios de estabilidad para las dos formulaciones con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-073 como parámetro de calidad.

Incorporar las nanopartículas en una forma farmacéutica que facilite su aplicación y retención en la piel.

Demostrar la eficacia *in vivo* de ambas formulaciones, para el tratamiento de afecciones de la piel.

12. Referencias

- [1] Goyal, R., Macri, L., Kaplan, H. & Kohn, J. (2016). Nanoparticles and nano fibers for topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 240, 77 –92.
- [2] Zouboulis, C., Ganceviciene, R., Liakou, A., Theodoridis, A., Elewa, R. & Makrantonaki, E. (2019) Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. *Clinics in Dermatology*. 34, 365-372.
- [3] Alberti, T., Coelho, D.S., Voytena, A., Pitz, H., de Prá, M., Mazzarino, L., Kuhnen, S., Ribeiro-do-Valle, R., Maraschin, M. & Veleirinho, B. (2017). Nanotechnology: A Promising Tool towards Wound Healing. *Current Pharmaceutical Design*. 23, 1-14.
- [4] Labouta, H. I. & Schneider, M. (2013). Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 9, 39 -54.
- [5] Breve guía para farmacéuticos sobre la piel dañada y su tratamiento. Heridas cutáneas leves. (2014). Recuperado de: https://www.clubdelafarmacia.com/blastoactiva/Heridas_cutaneas_leves.pdf
- [6] Divins, J, D. (2010). Cicatrizantes y protectores dermatológicos. *Farmacia profesional*. 24 (4), 36-39.
- [7] Boisseau, P. & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Competes Rendus Physique*. 12, 620–636.
- [8] Pal Singh, S. (2016). Nanotechnology: A Journey towards Finding Solutions. *Journal of Materials Science Research*. 5 (1), 61-76.
- [9] Pratima-Nikalje, A. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal chemistry*. 5 (2), 81-89.
- [10] Passaretti, M.G., Castillo, L.A. & Ciolino, A.E. (2017). Una mirada al universo nanotecnológico (parte 1). Recuperado de: <https://www.revistaconciencia.com/ver-articulo/fisica/una-mirada-al-universo-nanotecnologico--parte-1/>
- [11] La seguridad y salud en la exposición a nanopartículas. (2011). Instituto Riojano de la Salud Laboral Logroño. Área de Higiene Industrial. España.
- [12] Krukemeyer, M.G., Krenn, V., Huebner, F., Wagner, W. & Resch, R. (2015). History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 6 (6), 1-7.
- [13] Farokhzad, C.O. & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. Perspective. *ACS NANO*. 3(1), 16-20.

- [14] Niska, K., Zielinska, E., Radomski, M. W. & Inkielewicz-Stepniak, I. (2017). Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chemico-Biological Interactions*. doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.018, 1-14.
- [15] Ocheke, N. A., Olorunfemi, O.O. & Ngwuluka, N.C. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8(3), 265-274.
- [16] Hulla, J.E., Sahu, S.C. & Hayes, A.W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*. 34(12), 1318–1321.
- [17] Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C. & Langer, R. (2010). Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Letters*. 10, 3223–3230.
- [18] Reisner, D.E., Bawa, R., Brauer, S., Alvelo, J., Zhenh, W., Gericke, M., & Vulpe, C. (2012). Bionanotechnology. In Abo-Farajad, Z.O. *Handbook of Research on Biomedical Engineering Education and Advanced Bioengineering Learning: Interdisciplinary Concepts*. Vol 1, (436-489), USA, Medical Information Science Reference.
- [19] Perrie, I. (2018). Pharmaceutical Nanotechnology and nanomedicines. In Aulton, M.E., and Taylor, K.M., *Aulton's pharmaceuticals the design and manufacturing of medicines*. 5, 784-803. London, England. Elsevier.
- [20] (2017). Nanomedicine Market Size, Growth, Global Industry Report, 2018-2025. Recuperado de: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nanomedicine-market>
- [21] Duncan, R. & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*. 8, 2101 –2141.
- [22] Ocheke, N. A., Olorunfemi, O.O. & Ngwuluka, N.C. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8(3), 275-287.
- [23] Dash, R., Hosen. Z. M., Junandi, M. & Kanam, U.H. (2013). Pharmaceutical Nanotechnology - A Short Review. *International Conference on Engineering Research, Innovation and Education (ICERIE)*. 1122-1128.
- [24] Afonso, M. (2016). Encapsulación de antioxidantes en nanopartículas de zeína (tesis de maestría). Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- [25] Escobar-Chávez, J.J., Rodríguez-Cruz, I.M., Domínguez-Delgado, C.L., Díaz-Torrez, R. Revilla-Vázquez, A.L. & Casas, N. (2012). Nanocarrier Systems for Transdermal Drug Delivery. In Demir-Sezer, A. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. 201-240. Intechopen.
- [26] Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Saman, S. (2020). Review: Potential of Nanoparticles as Permeation Enhancers and Targeted Delivery Options for Skin: Advantages and Disadvantages, *Drug Design, Development and Therapy*. 14, 3271-3289.

- [27] Chandrababu, D., Patel, H.B., Patel, L.H. & Dimeshbhai, M.J. (2012). A Review on Pharmaceutical Nanotechnology. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. 2 (2), 324-338.
- [28] Urrejola, M.C., Soto, L.V., Zumarán, C.C., Peñaloza, J., Álvarez, B. Fuentevilla, I. & Haida, Z.S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Autoensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*. 36(4), 1463-1471.
- [29] Crucho, C. & Barros, M.T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C*. 80, 771 –784.
- [30] Rivera, C.A. (2017). ESTUDIO DEL PROCESO DE NANOENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA POR MEDIO DE NANO-PRECIPITACIÓN (tesis de licenciatura). Universidad ISECI. Cali, Colombia.
- [31] Tortora, Gerard & Derrickson, Bryan. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México, D.F.:Editorial Médica Panamericana. 147-151.
- [32] Prow, T.W., Grice, J.E., Lin, L.L, Faye, R., Butler, M., Becker, W., Wurm, E., Yoong, C., Robertson, T.A., Soyer, P.H & Roberts, M.S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63, 470–491.
- [33] Goodie, R. (10, 11, 2018). Nine common skin disorders. Recuperado de: <https://offeringhope.org/9-common-skin-disorders/>
- [34] Fundación Mexicana para la Dermatología A.C. (2014). Boletín: El acné afecta a 8 de cada 10 personas. Recuperado de: <https://fmd.org.mx/boletin-el-acne-afecta-a-8-de-cada-10personas/#:~:text=%2D%20El%20acn%C3%A9%20es%20una%20de,incluso%20en%20edades%20m%C3%A1s%20avanzadas.>
- [35] (2012). Portadora de herpes labial 90 por ciento de la población en México. Recuperado de: <https://www.quadratin.com.mx/sucesos/Portadora-de-herpes-labial-90-de-la-poblacion-en-Mexico-IMSS/>
- [36] Fundación Mexicana para la Dermatología A.C. (2017). Rosácea. Recuperado de: <https://fmd.org.mx/rosacea/#:~:text=La%20Ros%C3%A1cea%20es%20un%20padecimiento,blanca%20y%20predomina%20en%20mujeres.>
- [37] SANOFI. (2021). 75% de los pacientes con dermatitis atópica grave presentan una comorbilidad alérgica. Recuperado de: <https://www.sanofi.com.mx/es/centrodeinformacion/pacientes-con-dermatitisatopica#:~:text=Se%20estima%20que%20en%20M%C3%A9xico,alimentaria%20y%2013%25%20poliposis%20nasal.>
- [38] Fundación Mexicana para la Dermatología A.C. (2018). Al menos 2,5 millones de mexicanos en edad productiva sufren psoriasis, enfermedad de la piel que se puede controlar. Recuperado de: <https://fmd.org.mx/al-menos-2-5-millones-de-mexicanos-en-edad-productiva-sufren-psoriasis-enfermedad-de-la-piel-que-se-puede-controlar/>
- [39] Fundación Mexicana para la Dermatología A.C. (2020). La autoexploración para detectar cáncer de piel. Recuperado de: <https://fmd.org.mx/la-autoexploracion-para-detectar-cancer-de-piel/>

- [40] Fundación Mexicana para la Dermatología A.C. (2018). Manchas en mejillas y nariz principal signo de alerta para detectar lupus. Recuperado de: <https://fmd.org.mx/manchas-en-mejillas-y-nariz-principal-signo-de-alerta-para-detectar-lupus/>
- [41] Landriscina, A., Rosen, J & Friedman, A.J. (2015). Nanotechnology, Inflammation, and the Skin Barrier: Innovative Approaches for Skin Health and Cosmesis. *Cosmetics*. 2, 177-186.
- [42] Gupta, S., Bansal, R., Gupta, S., Jindal, N., & Jindal, A. (2013). Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. *Indian Dermatology Online Journal*. 4(4), 267–272.
- [43] Madsen J.T. & Andersen K.E. (2012) Nanotechnology and Skin. In: Rustemeyer T., Elsner P., John SM., Maibach H.I. (eds) *Kanerva's Occupational Dermatology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [44] AC Ross. (2016). Retinol: Properties and Determination. Pennsylvania State University, State College, PA, USA. Elsevier.
- [45] Gonçalves, A., Estevinho, B.N. & Rocha F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 51, 76-87.
- [46] Baron, J.M., (2010). Retinoid Pharmacology. In Krieg, T., Bickers, D.R., & Miyachi, Y. Therapy of Skin Diseases. A Worldwide Perspective on Therapeutic Approaches and Their Molecular Basis. 77-86. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [47] Zouboulis, C., Ganceviciene, R. Liakou, A., Theodoridis, A., Elewa, R. & E. Makrantonaki. (2019) Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. *Clinics in Dermatology*. 37, 365-372.
- [48] Tolleson, W., Cherng, S.H., Xia, Q., Boudreau, M., Yin, J., Wamer, W., Howard, P., Yu, H. & Fu, P. (2005). Photodecomposition and Phototoxicity of Natural Retinoids. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2(1), 147–155.
- [49] Park, C.E., Park, D.J. & Kim, B.K. (2015). Effects of a Chitosan Coating on Properties of Retinol Encapsulated Zein Nanoparticles. *Food Science and Biotechnology*. 24(5), 1725-1733.
- [50] Jee, J.P., Lim, S.J., Park, J.S. & Kim, C.K. (2006). Stabilization of all-trans-retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 63, 134–139.
- [51] Shao, Y., He, T., Fisher, G. J., Voorhees, J.J. & Quan, T. (2017). Molecular basis of retinol anti-ageing properties in naturally aged human skin in vivo. *International Journal of Cosmetic Science*. 39, 56–65.
- [52] Carafa, M., Marianecchi, C., Codecà, A., Squillaci, P., Scalzo, M., Cerreto, F. & Santucci, E. (2006). Retinyl palmitate-loaded vesicles: influence on vitamin light-induced degradation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 16 (6) 407-412.
- [53] Jeon, H.S., Seo, J.E., Kim, M.S., Kang, M.H., Oh, D.H., Jeon, S.O., Jeong, S.H. Choi, Y.W. & Lee, S. (2013). A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: Effect of surface modification with

dicetyl phosphate on skin permeation in vitro and anti-wrinkle effect in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*. 452, 311–320.

[54] Carlotti, M.E., Rossatto, V. & Gallarate, M. (2002). Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *International Journal of Pharmaceutics*. 240, 85–94

[55] Syed, B., Baig, M.D., Khalandar, D. & Varma R.K. (2013). Design & evaluation of novel retinol-encapsulated chitosan nanoparticles. *Journal of drug delivery research*. 2 (3), 24-36.

[56] Woollard, D. & Indyk, H. (2003). Retinol. Properties and determination. *Physiology*. Elsevier Science Ltd.

[57] (2019). Vitacilina. Recuperado de: <http://www.vitacilina.com/>.

[58] (2020). Serum Retinol 2.5% (noche). Recuperado de: <https://www.madeintribe.com/comprar-cosmetica-facial-online/1051-serum-retinol-5060373520319.html>

[59] (2020). Retacnyl[®] cream 0.025%. Recuperado de: https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-retacnyl+cream+0.025%25-mexico-d10ad01-mx_1

[60] (2020). TRETIONIA de BIORESEARCH. Recuperado de: http://www.farmacopedia.com.mx/tretinoina_bioresearch.html

[61] (2020). Retinol péptidos 45 + crema de día. Recuperado de: <https://www.loreal-paris.com.mx/ht5-antiarrugas/retino-peptidos-45/crema-de-dia-45>

[62] (2020). Clásico crema de día antiarrugas Revitalift[®]. Recuperado de: <https://www.loreal-paris.es/revitalift/clasico/crema-dia-antiarrugas>

[63] (2019). Folleto de información al paciente. Plastul-A. Recuperado de: http://www.grunenthal.cl/cms/cda/common/inc/display_file.jsp?fileID=79900306

[64] Clares, B., Calpena, A.C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Fanguero, J.F. & Souto, E.B. (2014). Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*. 473, 591–598.

[65] Shields, C.W., White, J.P., Osta, E.G., Patel, J., Rajkumar, S., Kirby, N., Therrien, J.P. & Zauscher, S. (2018). Encapsulation and controlled release of retinol from silicone particles for topical delivery. *Journal of Controlled Release*. 278, 37–48.

[66] Eke, G., Goñi-de-Cerio, F., Suarez-Merino, B., Hasirci, N. and Hasirci, V. (2015). Biocompatibility of Dead Sea Water and retinyl palmitate carrying poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) micro/nanoparticles designed for transdermal skin therapy. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 30(5), 455-471.

[67] Fernández-Gutiérrez, M., Bossio, O., Gómez-Mascaraque, M.G. Vázquez-Lasa, B. & San Román, J. (2015). Bioactive Chitosan Nanoparticles Loaded with Retinyl Palmitate: A Simple Route Using Ionotropic Gelation. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 216, 1321–1332.

- [68] Ro, J., Kim, Y., Kim, H., Park, K., Lee, K.E. Khadka, P., Yun, G., Park, J., Chang, S.T., Lee, J., Jeong, J.H. and Lee, J. (2015). Pectin Micro- and Nano-capsules of Retinyl Palmitate as Cosmeceutical Carriers for Stabilized Skin Transport. *Korean Journal of Physiology Pharmacology*. 19, 59-64.
- [69] Algahtani, M.S., Ahmad, M.Z. and Ahmad, J. (2020). Nanoemulgel for Improved Topical Delivery of Retinyl Palmitate: Formulation Design and Stability Evaluation. *Nanomaterials*. 10, 848, 1-18.
- [70] Errico, C., Goñi-de-Cerio, F., Alderighi, M., Ferri, M., Suarez-Merino, B., Soroka, Y., Frušić Zlotkin, M. and Chiellini, F. (2012). Retinyl palmitate-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for the topical treatment of skin diseases. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 27(6), 604–620.
- [71] Teixeira, Z., Dreiss, C., Lawrence, M.J., Heenan, M.K., Machado, D., Justo, G., Guterres, S. & Durán, N. (2012). Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives. *Journal of Colloid and Interface Science*. 382, 36–47.
- [72] Cheng, C.J. (2018). Novel applications of zein nanoparticles (tesis de doctorado). Department of Food Science West Lafayette, Indiana. USA.
- [73] Tran, P., Duan, W., Lee, B.J., & Tran, T. (2019). The use of zein in the controlled release of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 566, 557–564.
- [74] Yong, Z., Lili, C., Xiaoxia, C., Heng, Z., Nianqiu, S., Chunlei, L., Yan, C. & Wei, K. (2015). Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes, and current landscape. *Journal of Controlled Release*. 206, 206–219.
- [75] Kasai, M. (2018). Zein and zein -based nanomaterials for food and nutrition applications: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 79, 184–197.
- [76] Patel, A. & Velikov, K. (2014). Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 19, 450–458.
- [77] Paliwal, R. & Palakurthi, S. (2014). Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 189, 108–122.
- [78] Park, H. (2018). Characteristics of O/W emulsion, protein-based particle, and inclusion complex for the improvement of retinol stability and bioaccessibility (Thesis for master's degree). Seoul National University. South Korea.
- [79] Jain, A., Sharma, G., Kushwah, V., Ghoshal, G., Jain, A., Singh, B., Shivhare, U. S., Jain, S. and Katare, O. P. (2018). Beta carotene-loaded zein nanoparticles to improve the biopharmaceutical attributes and to abolish the toxicity of methotrexate: a preclinical study for breast cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 46 (S1), S402–S412.
- [80] Zhang, Y., Cui, L., Feng, L., Nianqiu, S., Chunlei, L., Yu, X., Chen, Y., & Kong, W. (2016). Design, fabrication, and biomedical applications of zein-based nano/micro-carrier systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 513, 191–210.

- [81] Liu, Q., Jing, Y., Han, C., Zhang, H. & Tian Y. (2019). Encapsulation of curcumin in zein/caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*. 93, 432–442.
- [82] Guzman-Puyol, S., Ceseracciu, L., Heredia-Guerrero, J., Anyfantis, G., Cingolani, R., Athanassiou, A., & Bayer, I. (2015) Effect of trifluoroacetic acid on the properties of polyvinyl alcohol and polyvinyl alcohol–cellulose composites. *Chemical Engineering Journal*. 277, 242–251.
- [83] Tian, H., Yan, J., Rajulu, A., Xiang, A., & Luo, x. (2017). Fabrication and properties of polyvinyl alcohol/starch blend films:Effect of composition and humidity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 96, 518–523.
- [84] Rachmawati, H., Al Shaal, L., Muller, R., &Keck, C. (2013). Development of Curcumin Nanocrystal: Physical Aspects. *Journal of Pharmaceutical Science*. 102(1), 204-214.
- [85] Pascoli, M., de Lima, R. & Fraceto, L.F. (2018). Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini review. *Frontiers in chemistry*. 6.
- [86] Wang, X., & Chu, X. (2018) Role of surfactant in the formation of zein/Tween-20 nanoparticles studied by fluorescence and circular dichroism. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* .558, 110–116
- [87] (2015). Mathematical models for drug release. In Bruschi, M. *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*. (63-86), Woodhead publishing. Elsevier.

13. Anexos

13.1 Anexo A

Procedimiento para la validación del método analítico para la cuantificación de AR por espectrofotometría UV/Vis

Precisión del sistema

Se pesaron 2.57 mg de AR (pureza 99.9%), disolviéndose en aproximadamente 50 mL de etanol al 90%. La solución obtenida se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, obteniéndose una solución STOCK de AR de 25.7 µg/mL.

Seguidamente, se tomó una alícuota de 3 mL y se colocó y aforó con etanol 90% en un matraz volumétrico de 25 mL, obteniendo una solución A de concentración 3.084 µg/mL. La solución A se preparó por sextuplicado como se muestra en la tabla 24.

Tabla 24. Precisión del sistema

Solución	AR (µg/mL)	Absorbancia a 351 nm
A1	3.084	0.4359
A2	3.084	0.4406
A3	3.084	0.4398
A4	3.084	0.4428
A5	3.084	0.4431
A6	3.084	0.4382
	Promedio	0.44006667
	Desviación estándar	0.00275221
	%CV	0.62540779

Criterio de Aceptación:

$CV \leq 1.5\%$ para métodos fisicoquímicos. **Aceptado**

Linealidad del sistema

Se pesaron 2.678 mg de AR (pureza 99.9%) en un vaso de precipitados. Posteriormente se disolvieron en aproximadamente 60 mL de etanol al 90% y se incorporó a un matraz volumétrico de 100 mL para su posterior aforo. Así, se obtuvo una solución STOCK de AR de 26.78 µg/mL.

Posteriormente, se tomaron alícuotas sucesivas de 1 mL a 5 mL de la solución STOCK, colocándose en matraces volumétricos de 25 mL y se aforaron con etanol al 90%, obteniendo los puntos de una curva de calibración, que se muestran en la tabla 25. Cada punto se preparó aleatoriamente por triplicado y las lecturas fueron realizadas de manera aleatoria.

Tabla 25. Linealidad del sistema

Solución	Conc. AR ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 351nm	Abs. / Conc.
1	1.0712	0.1454	0.135735624
2	2.1424	0.2905	0.135595594
3	3.2136	0.4367	0.135891212
4	4.2848	0.5824	0.13592233
5	5.356	0.7408	0.138312173
1	1.0712	0.1464	0.136669156
2	2.1424	0.2957	0.138022778
3	3.2136	0.4349	0.135331093
4	4.2848	0.5833	0.136132375
5	5.356	0.7384	0.137864078
1	1.0712	0.1459	0.13620239
2	2.1424	0.2925	0.136529126
3	3.2136	0.4405	0.137073687
4	4.2848	0.5832	0.136109037
5	5.356	0.7395	0.138069455
Pendiente	0.1379	Promedio	0.136630674
Intercepto	-0.00348	Desviación estándar	0.000995656
r²	0.9997	%C.V.	0.728720613

IC(β_1): (0.13655313-0.13928705).

Criterios de Aceptación:

$r^2 \geq 0.98$. **Aceptado**

IC(β_1), no debe incluir el cero. **Aceptado**

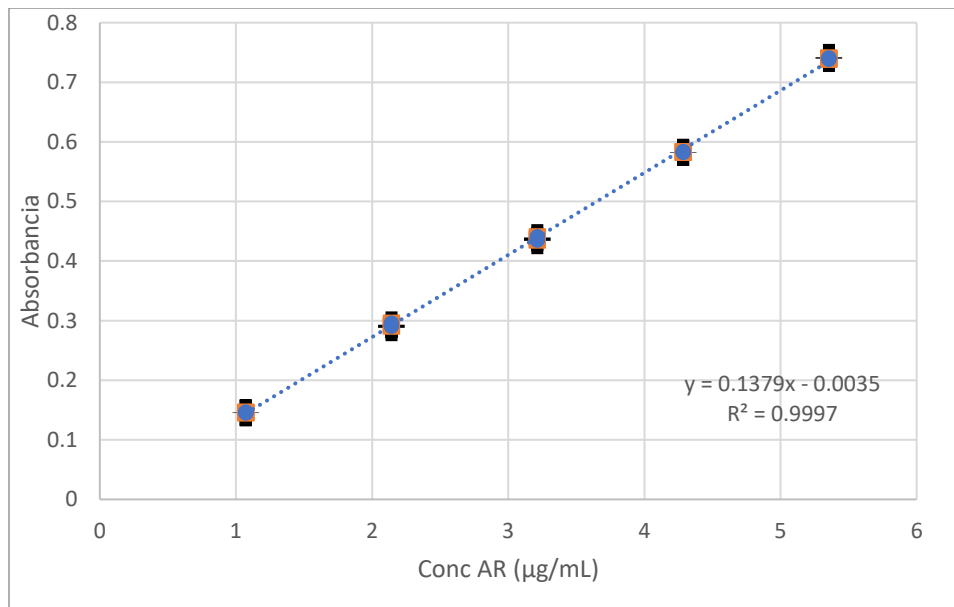


Figura 33. Linealidad del sistema (las barras de error son más pequeñas que los símbolos)

Análisis de residuales

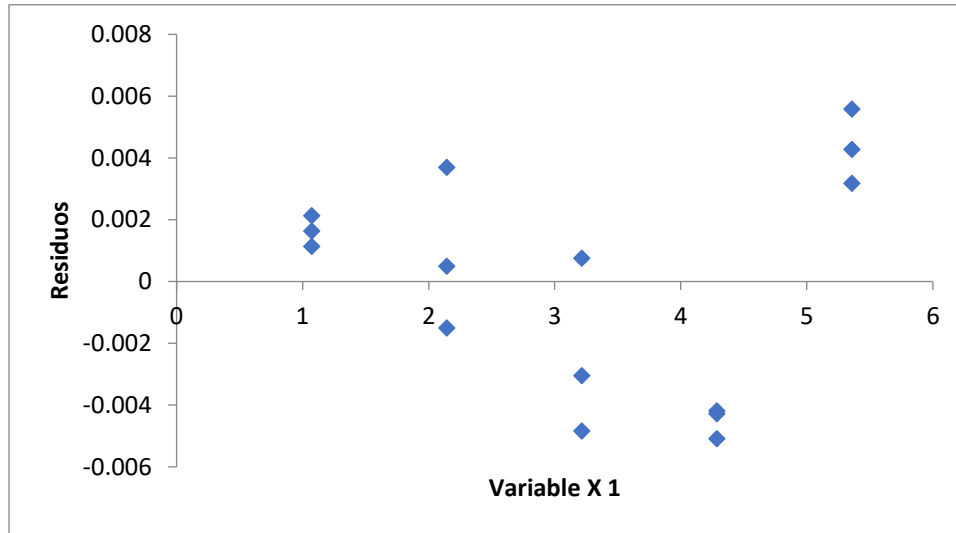


Figura 34. Residuales del gráfico de linealidad del sistema

A partir de la figura 34, gráfico de residuales, se observa la homocedasticidad de los datos por lo que es posible utilizar este modelo.

Especificidad

Se determinó el espectro UV/Vis del AR y de los placebos (zeína con PVA y zeína con P F-127) y de los placebos cargados con AR.

Preparación de soluciones:

Se pesaron 1.76 mg de AR (pureza 99.9%). Posteriormente se agregaron 5 mL de etanol al 90% hasta completar la disolución para llevar a un aforo de 10 mL obteniéndose una concentración de 176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AR (Solución A).

A partir de la solución A, se tomó 1 mL, llevándose a un aforo de 50 mL con etanol al 90%, obteniendo la solución "AR" que se muestra en la figura 35.

Por otra parte, se prepararon las soluciones placebo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Placebo 1: Se prepararon 10 mL una solución acuosa de PVA al 4% w/v (Solución B). Se pesaron 12.6 mg de zeína y se colocaron en un matraz de 10 mL, disolviéndose en 5 mL de etanol al 90%. Posteriormente se agregaron 2.7 mL de la solución B y se completó el aforo con etanol al 90% (solución C). Finalmente, se tomó 1 mL de la solución C y se llevó a 50 mL con etanol al 90%.
- Placebo 2: Fueron pesados 12.7 mg de zeína y 0.1 g de Pluronic F-127 en un vaso de precipitados. Se agregaron 7 mL de etanol al 90% manteniendo en agitación la mezcla hasta su completa disolución; transfiriéndose a un matraz volumétrico de 10 mL (solución D)

llevando al aforo con etanol al 90%. Así, se tomó 1 mL de la solución D y se llevó a un volumen final de 50 mL con etanol al 90%.

Las soluciones de AR+ Placebos se prepararon como se describe a continuación.

- AR+Placebo1: Se mezclaron 1mL de la solución A y 1mL de la solución C, llevando a un volumen final de 50 mL con etanol al 90%.
- AR+Placebo2: Se tomó 1 mL de la solución A y 1mL de la solución D; llevado a un volumen final de 50 mL con etanol al 90%.

Las soluciones de AR+ NP's de zeína con estabilizantes se prepararon como se describe a continuación:

Se prepararon 2 lotes de nanopartículas de zeína con estabilizantes (PVA Y P F-127). Las condiciones fueron:

1. 5 mL de Fase orgánica inyectada
 2. Velocidad de agitación de 660 rpm
 3. Velocidad de inyección de 70 mL/h
 4. La concentración de estabilizantes fue del 1.0% p/v
- Solución AR+ NP's zeína con PVA: Se mezcló 1 mL de la solución A con 2 mL de NP's de zeína con PVA, en un matraz de 50 mL, llevándose hasta el aforo.
 - Solución AR+ NP's zeína con P F-127: Se mezcló 1 mL de la solución A con 2 mL de NP's de zeína con P F-127, en un matraz de 50 mL, llevándose hasta el aforo.

Todas las soluciones mencionadas anteriormente fueron medidas en un espectrofotómetro UV/Vis mediante un barrido entre las longitudes de 500 a 200 nm, como se observa en la figura 35.

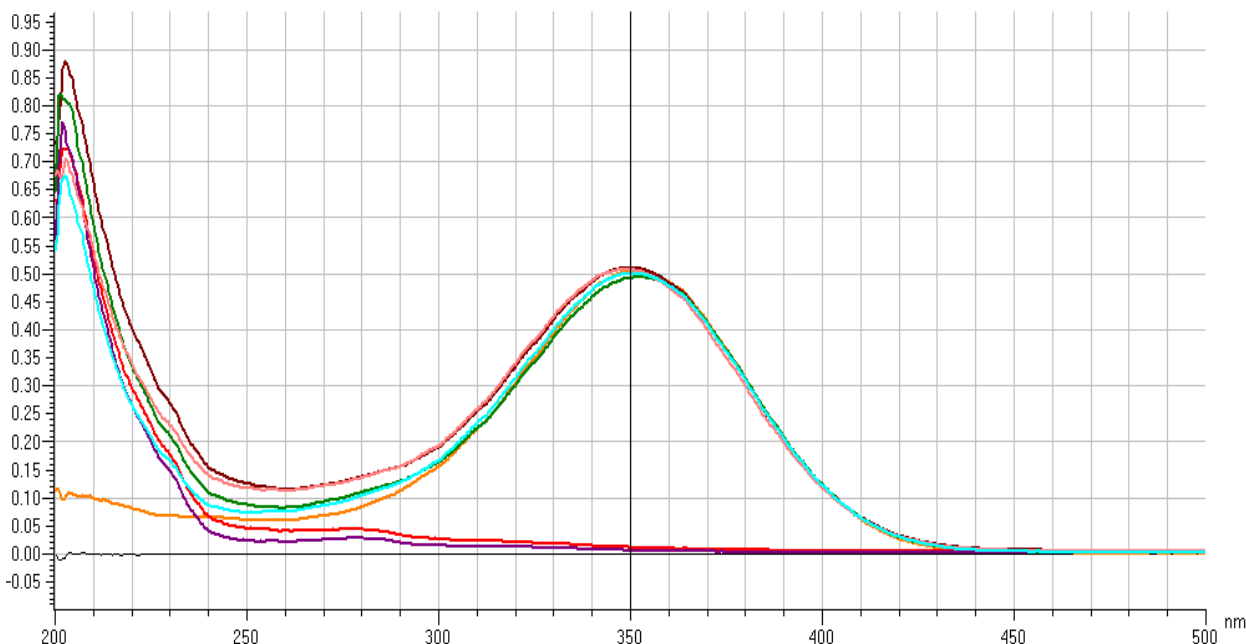


Figura 35. Espectro de absorción de UV/VIS de los sistemas AR, placebos, AR+ placebos y AR+ NP's de zeína. Línea Negra (Blanco); línea Amarilla (AR); línea roja (placebo 1); línea violeta (placebo 2); línea púrpura (AR+ placebo 1); línea verde (AR+ placebo 2); línea rosa (AR+ NP's de zeína con PVA); línea cian (AR+ NP's de zeína con Pluronic F-127)

Criterio de aceptación:

La respuesta del método se atribuye únicamente al analito. **Aceptado**

Exactitud y repetibilidad del método

Debido a que se tienen 2 formulaciones de diferente composición, pero con el mismo analito, se realizó esta prueba para cada una.

Formulación A. NP's de zeína+ PVA 0.1% p/v

Se pesaron 1.8, 2.092, 2.637, 3.215 y 3.536 mg de AR (99.9% pureza), los cuales se disolvieron, de manera individual, en 40 mL de etanol al 90%, se adicionaron 25 mL de placebo de NP's de zeína con PVA*, conservándose en agitación por 20 minutos. Las soluciones fueron incorporadas a matraces volumétricos de 100 mL, aforándose con etanol al 90%. Así se obtuvieron 5 soluciones STOCK.

Consecutivamente, se tomaron alícuotas de 3 mL de cada una de las soluciones STOCK correspondientes, aforando a 25 mL con etanol al 90%. Cada sistema se realizó por sextuplicado.

Se calculó el promedio, desviación estándar (desvest), coeficiente de variación (%C.V.), intervalos de confianza y recobros, como se muestra en la tabla 26.

Tabla 26. Exactitud y repetibilidad del método de la formulación A

Conc. AR ($\mu\text{g/mL}$)		Absorbancia	Abs/Conc. AR	Conc. estimada AR ($\mu\text{g/mL}$)	% Recobro
2.16		0.295	0.13657407	2.13479181	98.8329543
2.5104		0.348	0.13862333	2.50882145	99.9371197
3.1644		0.4412	0.13942612	3.16654905	100.067913
3.858		0.5265	0.13646967	3.76852505	97.6807945
4.2432		0.6015	0.14175622	4.29781228	101.287054
2.16		0.2994	0.13861111	2.16584333	100.270525
2.5104		0.3528	0.14053537	2.54269584	101.286482
3.1644		0.449	0.14189104	3.22159492	101.807449
3.858		0.5339	0.13838777	3.82074806	99.0344235
4.2432		0.6076	0.14319382	4.34086097	102.301588
2.16		0.2967	0.13736111	2.14678899	99.3883792
2.5104		0.3499	0.13938018	2.52223006	100.471242
3.1644		0.4437	0.14021615	3.18419195	100.625457
3.858		0.5287	0.13703992	3.78405081	98.0832248
4.2432		0.6065	0.14293458	4.33309809	102.118639
2.16		0.3008	0.13925926	2.17572336	100.727933
2.5104		0.3569	0.14216858	2.5716302	102.439062
3.1644		0.4434	0.14012135	3.18207481	100.558552
3.858		0.5307	0.13755832	3.79816514	98.4490704
4.2432		0.5918	0.13947021	4.2293578	99.6737792
2.16		0.2884	0.13351852	2.08821454	96.676599
2.5104		0.3506	0.13965902	2.52717008	100.668024
3.1644		0.4348	0.13740362	3.1213832	98.6406018
3.858		0.5213	0.13512182	3.73182781	96.7295958
4.2432		0.6008	0.14159125	4.29287227	101.170632
2.16		0.3003	0.13902778	2.17219478	100.564573
2.5104		0.3534	0.14077438	2.54693013	101.455152
3.1644		0.447	0.14125901	3.20748059	101.361414
3.858		0.5276	0.1367548	3.77628793	97.8820096
4.2432		0.6014	0.14173265	4.29710656	101.270422
Pendiente	0.1417	Promedio	0.1392607	Promedio	100.048689
Intercepto	-0.0075	Desvest	0.00234771	Desvest	1.59532452
r^2	0.9953	%C.V.	1.68583461	%C.V.	1.59454815

Criterios de Aceptación:

- El intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico: **Aceptado.**
- El CV del porcentaje de recobro: no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico: **Aceptado.**

***El placebo de NP's de zeína con PVA se preparó bajo las siguientes condiciones:**

- 3000 rpm de agitación.
- 15 min de evaporación.

Formulación B. NP's de zeína+ Pluronic F-127 0.1% p/v.

Se pesaron 1.497, 2.103, 2.507, 3.055 y 3.743 mg de AR (99.9% pureza), los cuales se disolvieron en 40 mL de etanol al 90%, posteriormente se adicionaron 25 mL de placebo de NP's de zeína con **Pluronic F-127****, manteniéndose en agitación por 20 minutos. Estas soluciones fueron incorporadas a matraces volumétricos de 100 mL, aforándose con etanol al 90%. Así se obtuvieron 5 soluciones STOCK.

A continuación, se tomaron alícuotas de 3 mL de cada una de las soluciones STOCK correspondientes, adicionándose a matraces de 25 mL, completando el volumen de aforo con etanol al 90%. Cada sistema se realizó por sextuplicado.

Se calculó el promedio, desviación estándar (desvest), coeficiente de variación (%C.V.), intervalos de confianza y recobros, como se muestra en la tabla 27.

Tabla 27. Exactitud y repetibilidad del método de la formulación B

Conc. AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. / Conc. AR	Conc. estimada AR (µg/mL)	% Recobro
1.7964	0.2545	0.141672233	1.766513827	98.3363297
2.5236	0.3594	0.142415597	2.518054162	99.780241
3.0084	0.428	0.142268315	3.009528586	100.037514
3.666	0.5295	0.144435352	3.73671013	101.928809
4.4916	0.627	0.139593909	4.435234274	98.7450858
1.7964	0.255	0.141950568	1.770096002	98.5357383
2.5236	0.3578	0.141781582	2.506591202	99.3260105
3.0084	0.424	0.140938705	2.980871185	99.084935
3.666	0.5271	0.143780687	3.71951569	101.459784
4.4916	0.6321	0.140729361	4.47177246	99.558564
1.7964	0.2601	0.144789579	1.806634188	100.569705
2.5236	0.3603	0.14277223	2.524502078	100.035746

3.0084	0.4279	0.142235075	3.008812151	100.0137	
3.666	0.5261	0.143507911	3.71235134	101.264357	
4.4916	0.6265	0.13948259	4.431652099	98.665333	
1.7964	0.2469	0.13744155	1.712064766	95.3053198	
2.5236	0.3595	0.142455223	2.518770598	99.8086304	
3.0084	0.4178	0.138877809	2.936452214	97.6084368	
3.666	0.5302	0.144626296	3.741725176	102.065608	
4.4916	0.6346	0.141285956	4.489683336	99.9573278	
1.7964	0.2626	0.146181251	1.824545064	101.566748	
2.5236	0.3643	0.144357267	2.553159478	101.171322	
3.0084	0.4333	0.144030049	3.047499642	101.299682	
3.666	0.5266	0.143644299	3.715933515	101.362071	
4.4916	0.6317	0.140640306	4.46890672	99.4947618	
1.7964	0.2624	0.146069918	1.823112194	101.486985	
2.5236	0.361	0.143049612	2.529517123	100.234472	
3.0084	0.4313	0.143365244	3.033170941	100.823393	
3.666	0.5176	0.141189307	3.651454363	99.6032287	
4.4916	0.6316	0.140618043	4.468190285	99.4788112	
Pendiente	0.1396	Promedio	0.142339527	Promedio	99.9536216
Intercepto	0.0079	Desvest	0.002064248	Desvest	1.44532349
r ²	0.9982	%C.V.	1.450227874	%C.V.	1.44599412

Criterios de Aceptación:

El intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico: **Aceptado.**

El CV del porcentaje de recobro: no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico: **Aceptado.**

****El placebo de NP's de zeína con Pluronic F-127 se preparó bajo las siguientes condiciones:**

- 3000 rpm de agitación.
- 15 min de evaporación.
- 14 min de agitación.

Linealidad del método

Debido a que se tienen 2 formulaciones de diferente composición, pero con el mismo analito, se realizó esta prueba para cada una de ellas.

Formulación A. NP's de zeína+ PVA 0.1% p/v

Se pesaron 1.8, 2.092, 2.637, 3.215 y 3.536 mg de AR (99.9% pureza), los cuales se disolvieron, en 40 mL de etanol al 90%, posteriormente se adicionaron 25 mL de placebo de NP's de zeína con PVA, manteniéndose en agitación por 20 minutos. Las soluciones se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL y se aforaron con etanol al 90%. Así se obtuvieron 5 soluciones Stock.

Consecutivamente, se tomaron alícuotas de 3 mL de cada una de las soluciones Stock correspondientes y se aforaron con etanol al 90%. Cada sistema se realizó por sextuplicado.

Se calculó el promedio, desviación estándar (desvest), coeficiente de variación (%C.V.), intervalos de confianza y recobros, como se muestra en la tabla 28.

Tabla 28. Linealidad del método de la formulación A

Conc. AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. /Conc. AR	Conc. estimada AR(µg/mL)	% Recobro
2.16	0.295	0.13657407	2.12816901	98.5263432
2.16	0.2994	0.13861111	2.15915493	99.9608764
2.16	0.2967	0.13736111	2.14014085	99.0805947
2.5104	0.3528	0.14053537	2.53521127	100.988339
2.5104	0.3569	0.14216858	2.56408451	102.138484
2.5104	0.3534	0.14077438	2.53943662	101.156653
3.1644	0.4412	0.13942612	3.15774648	99.7897383
3.1644	0.4437	0.14021615	3.17535211	100.346104
3.1644	0.4434	0.14012135	3.17323944	100.27934
3.858	0.5339	0.13838777	3.81056338	98.7704349
3.858	0.5287	0.13703992	3.77394366	97.8212458
3.858	0.5276	0.1367548	3.76619718	97.6204558
4.2432	0.6015	0.14175622	4.28661972	101.023278
4.2432	0.6065	0.14293458	4.32183099	101.853106
4.2432	0.6008	0.14159125	4.28169014	100.907102
	Promedio	0.13961685	Promedio	100.017473
	Desvest	0.00207929	Desvest	1.39817965
	%C.V.	1.48928445	%C.V.	1.39793539

IC (β_1): (0.96410077-1.03603587)

IC (β_0): (-0.11791819-0.11820007)

Criterios de Aceptación:

Cantidad recuperada vs cantidad adicionada:

- $r^2 \geq 0.98$. **Aceptado.**
- El IC (β_1) debe incluir la unidad. **Aceptado.**
- El IC (β_0) debe incluir el cero. **Aceptado.**
- El intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico. **Aceptado.**
- El CV del porcentaje de recobro: no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico. **Aceptado.**

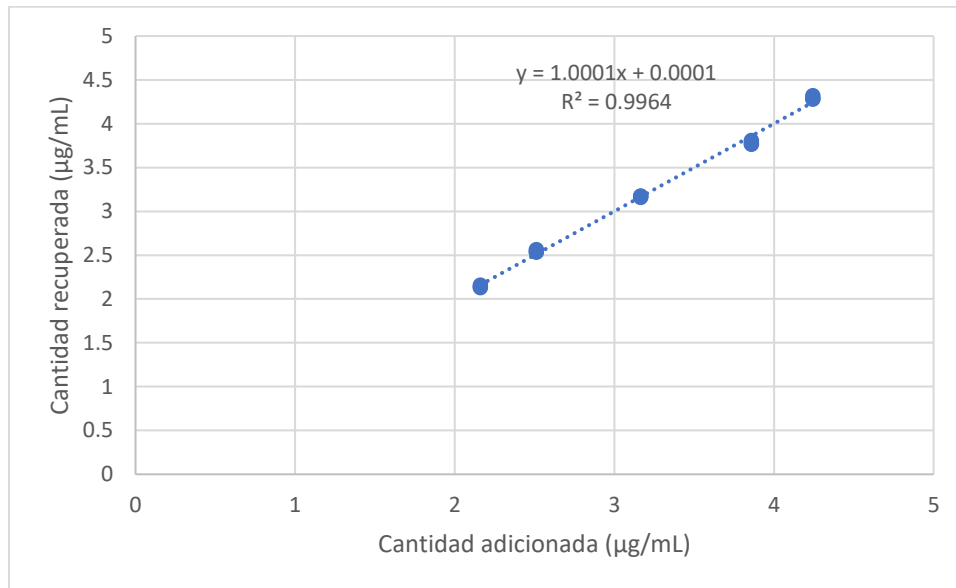


Figura 36. Linealidad del método de la formulación A

Formulación B. NP's de zeína+ Pluronic F-127 0.1% p/v

Fueron pesados 1.497, 2.103, 2.507, 3.055 y 3.743 mg de AR (99.9% pureza), los cuales se disolvieron, en 40 mL de etanol al 90%, posteriormente se adicionaron 25 mL de placebo de NP's de zeína con Pluronic F-127, conservándose en agitación por 20 minutos. Las soluciones se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL, aforándose con etanol al 90%. Así se obtuvieron 5 soluciones Stock.

A continuación, se tomaron alícuotas de 3 mL de cada una de las soluciones Stock correspondientes, adicionándose a matraces de 25 mL y se aforaron con etanol al 90%. Cada sistema se realizó por sextuplicado.

Se calculó el promedio, desviación estándar (desvest), coeficiente de variación (%C.V.), intervalos de confianza y recobros, como se muestra en la tabla 29.

Tabla 29. Linealidad del método de la formulación B

Conc. AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. /Conc. AR	Conc estimada AR (µg/mL)	% Recobro
1.7964	0.2545	0.141672233	1.779443255	99.0560707
1.7964	0.2469	0.13744155	1.725196288	96.0363109
1.7964	0.2624	0.146069918	1.835831549	102.195032
2.5236	0.3594	0.142415597	2.528194147	100.182047
2.5236	0.3578	0.141781582	2.516773733	99.7295028
2.5236	0.361	0.143049612	2.539614561	100.634592
3.0084	0.428	0.142268315	3.017844397	100.313934
3.0084	0.4178	0.138877809	2.945039258	97.8938724
3.0084	0.4333	0.144030049	3.055674518	101.571417
3.666	0.5295	0.144435352	3.742326909	102.082022
3.666	0.5266	0.143644299	3.721627409	101.517387
3.666	0.5176	0.141189307	3.65738758	99.7650731
4.4916	0.627	0.139593909	4.438258387	98.812414
4.4916	0.6317	0.140640306	4.471805853	99.5593074
4.4916	0.6316	0.140618043	4.471092077	99.5434161
	Promedio	0.141848525	Promedio	99.9261599
	Desvest	0.002255311	Desvest	1.63349793
	%C.V.	1.58994304	%C.V.	1.634705

IC (β_1): (0.97264133-1.02668389)

IC (β_0): (-0.08710639-0.08761096)

Criterios de Aceptación:

Cantidad recuperada vs cantidad adicionada:

- $r^2 \geq 0.98$. **Aceptado.**
- El IC (β_1) debe incluir la unidad. **Aceptado.**
- El IC (β_0) debe incluir el cero. **Aceptado.**
- El intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico. **Aceptado.**
- El CV del porcentaje de recobro: no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico. **Aceptado.**

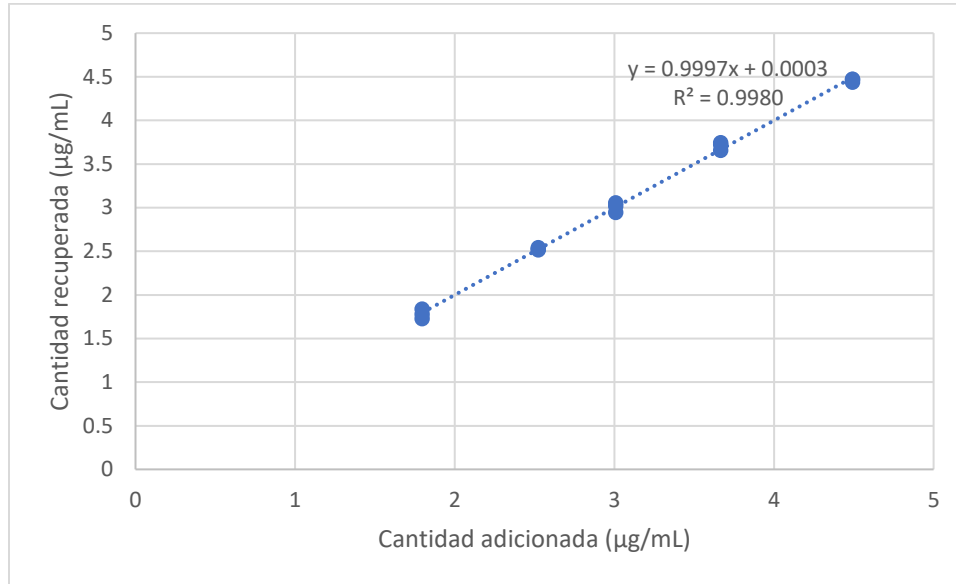


Figura 37. Linealidad del método de la formulación B

Precisión del método

Debido a que se tienen 2 formulaciones de diferente composición, pero con el mismo analito, se realizó esta prueba para cada una.

Formulación A. NP's de zeína+ PVA 0.1% p/v

Se pesaron 2.595 mg (día 1) y 2.555 mg (día 2) de AR (99.9% pureza), los cuales se disolvieron, en 40 mL de etanol al 90%, posteriormente se adicionaron 25 mL de placebo de NP's de zeína con PVA, conservándose en agitación por 20 minutos. Las soluciones fueron incorporadas a matraces volumétricos de 100 mL, aforándose con etanol al 90%. De cada una de las soluciones, se tomaron alícuotas de 3 mL y se aforaron con etanol al 90% a 25 mL. Cada sistema se realizó por triplicado.

Se calculó promedio, desviación estándar (desvest), coeficiente de variación (% C.V.), como se muestra en la tabla 30.

Tabla 30. Precisión del método de la formulación A

Día 1		17/03/2020	
Sistema PVA	Conc. AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. /Conc. AR
2	3.114	0.4334	0.139177906
1	3.114	0.4308	0.138342967
3	3.114	0.4253	0.13657675
Día 2		18/03/2020	
Sistema PVA	Conc. AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. /Conc. AR
2	3.066	0.4356	0.142074364
1	3.066	0.4252	0.138682322

3	3.066	0.4321	0.140932811
	PROMEDIO	0.4304	0.13929785
	DESVEST	0.00429278	0.00195405
	% C.V.	0.9973942	1.40278611

Criterios de aceptación:

El CV del porcentaje del contenido: no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico.

Aceptado.

Formulación B. NP's de zeína+ Pluronic F-127 al 0.1% p/v

Se pesaron 2.622 mg (día 1) y 2.656 mg (día 2) de AR (99.9% pureza), los cuales se disolvieron en 40 mL de etanol al 90%, posteriormente se adicionaron 25 mL de placebo de NP's de zeína con Pluronic F-127, manteniéndose en agitación por 20 minutos. Las soluciones fueron se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL, aforándose con etanol al 90%. Se tomaron alícuotas de 3 mL de cada una de las soluciones Stock correspondientes y se aforaron a 25 mL con etanol al 90%. Cada sistema se realizó por triplicado.

Se calculó promedio, desviación estándar (desvest), coeficiente de variación (% C.V.), como se muestra en la tabla 31.

Tabla 31. Precisión del método de la formulación B

Día 1		17/03/2020	
Sistema PF127	Conc AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. /Conc. AR
2	3.1464	0.4499	0.142988813
3	3.1464	0.4439	0.141081871
1	3.1464	0.4400	0.13984236
Día 2		18/03/2020	
Sistema PF127	Conc. AR (µg/mL)	Absorbancia	Abs. /Conc. AR
2	3.1872	0.4652	0.145958835
3	3.1872	0.4403	0.147904116
1	3.1872	0.4530	0.147307982
	PROMEDIO	0.44871667	0.14169154
	DESVEST	0.00960696	0.00269983
	% C.V.	2.14098561	1.90543048

Criterios de aceptación:

El CV del porcentaje del contenido: no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico.

Aceptado.

Límites de detección y cuantificación

Los procedimientos para determinar los límites de detección y cuantificación de ambas formulaciones se realizaron con base a dos metodologías, empleando las siguientes ecuaciones:

$$LC = \frac{(Desvest)*10}{b_1}$$

$$LD = \frac{(Desvest)*3.3}{b_1}$$

Donde:

- b₁: es el valor de la pendiente correspondiente a la linealidad del sistema.
- Desvest: es el valor de la desviación estándar de:
 - La regresión lineal de la curva de la linealidad del método (método 1).
 - Los blancos preparados por sextuplicado (método 2).

Método 1. LD y LC con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión:

Tabla 32. LD Y LC para ambas formulaciones con base al método 1

Formulación A (PVA)		Formulación B (Pluronic F-127)	
Desvest de regresión	0.00718496	Desvest de regresión	0.00629148
b₁ (pendiente)	0.1420097	b₁ (pendiente)	0.14005273
LD (µg/mL)	0.16696312	LD (µg/mL)	0.14824332
LC (µg/mL)	0.50594883	LC (µg/mL)	0.44922219

Método 2. LD Y LC con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos:

Se prepararon 6 soluciones placebo empleando las formulaciones A y B como se describe a continuación.

Se adicionaron 25 mL de cada placebo en matraces de 100 mL, completando el aforo con etanol al 90%. Posteriormente se tomó una alícuota de 3 mL, incorporándose a matraces de 25 mL y aforando con etanol al 90% para, finalmente, obtener los valores de absorbancia a 351 nm como se muestra en la tabla 33.

Tabla 33. LD Y LC con base al método 2

Formulación A (PVA)	Absorbancia	Formulación B (Pluronic F-127)	Absorbancia
1	0.0046	1	0.0031
2	0.0049	2	0.0033
3	0.0042	3	0.0030
4	0.0048	4	0.0045
5	0.0052	5	0.0054
6	0.0058	6	0.0048
Desvest	0.00054559	Desvest	0.00101472
b₁ (pendiente)	0.13792009	b₁ (pendiente)	0.13792009
LD (µg/mL)	0.01305424	LD (µg/mL)	0.02427922
LC (µg/mL)	0.0395583	LC (µg/mL)	0.07357339

13.2 Anexo B

Procedimiento para la determinación del % de encapsulación

El procedimiento para determinar la cantidad de AR encapsulado se resume en 6 pasos. Se tomará como ejemplo la formulación 10, repetición 3.

Paso 1. Se procedió a determinar la cantidad de AR en la dispersión acuosa de NP's de zeína. Para ello, se tomaron 5 mL de la dispersión de NP's y se llevó a un volumen de 10 mL con etanol absoluto; posteriormente, se tomó la lectura de absorbancia a 349 nm, con un espectrofotómetro UV/Vis HITACHI y finalmente se determinó la cantidad de AR empleando la curva de calibración que se encuentra en el anexo A. gráfico 1. Linealidad del sistema.

La absorbancia obtenida fue de 0.2543. Así, empleando la ecuación de la recta se determinó que la cantidad de AR fue de:

$$\text{Con. de AR } (\mu\text{g/mL}) = \frac{0.2543 + 0.00348}{0.1379 \text{ mL}/\mu\text{g}} = 1.8693 \mu\text{g/mL}$$

Entonces, la concentración total de AR en la dispersión es de:

$$\text{Con. total de AR } (\mu\text{g/mL}) = (1.8693 \mu\text{g/mL}) \frac{10 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 3.7386 \mu\text{g/mL}$$

La CANTIDAD TOTAL DE SÓLIDOS (ST), obtenidos después de liofilizar 35 mL de la dispersión, fue de 48.7 mg.

Paso 2. Se obtiene la cantidad de AR real que debe de estar en liofilizado con base a la concentración de AR determinado en el paso 1.

$$\text{Cantidad de AR en el liofilizado } (\mu\text{g}) = \frac{3.7386 \mu\text{g}}{\text{mL}} (35 \text{ mL}) = 130.8510 \mu\text{g AR}$$

Paso 3. Una vez determinada la cantidad de AR en el liofilizado (ST), se determinó la cantidad de AR en la cantidad de sólido liofilizado pesado para la prueba. Para este caso, el peso de los ST fue de 10.3 mg Entonces la cantidad de AR es:

$$\text{Cantidad de AR } (\mu\text{g}) = \frac{(10.3 \text{ mg de ST})(130.8510 \mu\text{g AR})}{48.7 \text{ mg de ST}} = 27.6749 \mu\text{g}$$

Paso 4. Una vez determinada la cantidad total de AR que hay en los ST, se determinará la concentración de AR en el sobrenadante de la solución de 10.3 mg en 10 mL de etanol al 30%, empleando la curva de calibración del anexo A.

$$\text{Con. de AR en el sobrenadante } (\mu\text{g/mL}) = \frac{0.1969 + 0.00348}{0.1379 \text{ mL}/\mu\text{g}} = 1.4530 \mu\text{g/mL}$$

Dado que se usaron 10 mL de NP's para liofilizar, la cantidad de AR en el sobrenadante es:

$$\text{Cantidad total de AR en el sobrenadante} (\mu\text{g}) = \frac{1.4530 \mu\text{g}}{\text{mL}} (10\text{mL}) = 14.5308 \mu\text{g}$$

Paso 5. Para obtener la concentración de AR encapsulada, se restó la cantidad de AR en el sobrenadante de la cantidad de AR total:

$$\text{Cantidad de AR encapsulado} (\mu\text{g}) = 27.6749\mu\text{g} - 14.5308\mu\text{g} = 13.1441 \mu\text{g AR}$$

Paso 6. Se determina el % de encapsulación de AR mediante la ecuación:

$$\% \text{ Encapsulación AR} = \left(\frac{\text{AR encapsulado} (\mu\text{g})}{\text{AR Total} (\mu\text{g})} \right) 100 = \left(\frac{13.1441 \mu\text{g AR}}{27.6749 \mu\text{g AR}} \right) 100 = 47.5410\%$$