

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS
DE POLI(D,L ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)
CARGADAS CON COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA
LA TUBERCULOSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

P R E S E N T A:

CAROLINA CASTAÑEDA FERNANDEZ



TUTOR: DRA. ANNA KOZINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMx, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACEPTACIÓN DE LA PRUEBA ESCRITA POR EL JURADO

(anexo III)

**SR. DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA
P R E S E N T E.**

LA PRUEBA ESCRITA que presenta:

CAROLINA CASTAÑEDA FERNANDEZ

de la carrera: INGENIERÍA QUÍMICA

cuyo título es: FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS DE POLI(D,L ÁCIDO LÁCTICO -CO- GLICÓLICO) CARGADAS CON COMPUESTO ACTIVOS CONTRA LA TUBERCULOSIS dentro de la opción: TESIS

ES DE ACEPTARSE

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria D.F. a 25 de octubre, 2021 .

EL JURADO REVISOR

PRESIDENTE: TATIANA EUGENIEVNA KLIMOVA BERESTNEVA

 19/11/2021

VOCAL: JOSE LUIS LOPEZ CERVANTES

 26/10/2021

SECRETARIO: ANNA KOZINA

 28.10.2021

SUPLENTES: MARIO LUIS CHIN AUYON

ARTURO ANTONIO GARCIA FIGUEROA

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que afecta casi siempre a los pulmones. Esta condición es la responsable de 1.5 millones de muertes al año, sin embargo, es posible curarla y prevenirla. Para combatir esta enfermedad de forma activa, se administran cuatro antibióticos durante un período entre seis y nueve meses, lo que desafortunadamente presenta varias complicaciones como:

- Deserción del paciente por la larga duración;
- Pobre competencia (estabilidad, permeabilidad) de los fármacos para alcanzar los sitios donde es necesario el efecto;
- Alta toxicidad;
- Efectos secundarios por el modo de administración.

En los últimos años, se ha optado por la nanomedicina para mejorar el desempeño del tratamiento utilizando nanomateriales como medio de transporte de los fármacos a través del organismo, ofreciendo una entrega más directa en los sitios de interés, así como una liberación prolongada y controlada que logre disminuir las dosis y por ende, la deserción de los pacientes en el tratamiento.

Una de las formas de encapsulación más recientes es la creación de reservorios con materiales diversos en forma de partículas coloidales. Estas pueden ser entre 100 y 1000 nm aproximadamente dependiendo de la vía de administración. De preferencia, el material de las partículas debe ser no tóxico pero lo suficientemente resistente a los factores de degradación dentro del organismo para poder proteger el fármaco.

Además debe eliminarse fácilmente al terminar su función. Los reservorios utilizados para la encapsulación de fármacos antituberculosis van desde partículas poliméricas, nanoemulsiones, liposomas, partículas lípidas, micelas y hasta dendrímeros.

De todos estos reservorios, las partículas poliméricas muestran ventaja para la encapsulación de fármacos debido a su alta estabilidad, simplicidad y biodisponibilidad. Además, su superficie puede ser modificada en tal forma que el sistema inmune del organismo no las detecte y con eso extender el tiempo de circulación del reservorio en el sistema sanguíneo.

Hay una amplia variedad de materiales poliméricos que son biocompatibles y biodegradables. El poli(D,L ácido láctico-co-glicólico) o PLGA es un polímero que ha comenzado a utilizarse recientemente para la encapsulación de fármacos aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés). Debido a las propiedades fisicoquímicas de este polímero, una de las principales ventajas que ofrece es el control en las propiedades de las partículas creadas, principalmente en el perfil de liberación del fármaco y su biodisponibilidad: inyectado, tomado o administrado por vías respiratorias. La obtención de las partículas PLGA cargadas con el fármaco dependerá principalmente del control en sus propiedades y las del fármaco a encapsular. Los antibióticos hidrofóbicos han mostrado una gran complejidad al tratar de ser encapsulados por su baja permeabilidad y alta toxicidad dentro del organismo. El método de emulsión por extracción y evaporación de disolvente es uno de los más utilizados para la encapsulación de este tipo de compuestos y ha sido estudiado por diversos autores para mejorar la eficiencia de encapsulación. A pesar de esto, la metodología sigue siendo un tema de estudio debido a los diversos efectos que tienen las variables de fabricación en las partículas, y su relación con el tipo de compuesto y propiedades de los polímeros que serán utilizados. En este proyecto se desea analizar los parámetros óptimos que permitan obtener un alto rendimiento de encapsulación utilizando la metodología de emulsión por extracción y evaporación de disolvente. Como meta principal, se pretende realizar un estudio sistemático para visualizar el efecto de las variables de fabricación encapsulando a la rifampicina, fármaco hidrofóbico antituberculosis, en

el polímero PLGA para determinar las variables principales que afectan su encapsulación y posteriormente, en conjunto con el departamento de Química Orgánica, aplicar esta metodología en la encapsulación de compuestos con carácter hidrofóbico y antituberculosis, para poder comparar y concluir los parámetros generales que influyen más en el perfil de liberación y la obtención de partículas con altas dosis y eficiencias de encapsulación de este tipo de compuestos.

Agradecimientos

- A DGAPA UNAM PAPIIT (claves de los proyectos: IN100619 y IN204619) por el apoyo económico.
- A CONACYT por el apoyo económico para el proyecto CB 2017-2018-A1-S-21124, del que es parte este trabajo.
- A la Dra. Anna Kozina, quien ha dedicado gran parte de su tiempo, paciencia y conocimiento en mi formación.
- Al Dr. Roberto Martínez y la Dra. Rosa María Chavez por proporcionar los reactivos necesarios y dar apoyo a este proyecto.
- Al Dr. Rolando Castillo por el acceso al equipo de Microscopia Electrónica de Barrido.
- Al Dr. Samuel Tehuacanero y al Dr. Carlos Magaña del Laboratorio Central de Microscopia del IFUNAM por la adquisición de imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido.
- A Catalina y a mi abuela Herlinda, por todo su apoyo a lo largo de mis estudios, por impulsarme a cumplir mis metas y acompañarme siempre con todo su cariño.
- A mis padres Miguel y Margarita, por formarme a lo largo de mi vida y cuya sabiduría y amor siempre me han acompañado. A mis hermanos Miguel y Rogelio, por su invaluable compañía en mi vida, dándome un poco de luz y motivación para seguir cumpliendo mis metas.

- A todos mis amigos que me acompañaron en mi travesía por la facultad y con quienes compartí grandes momentos: Pedro, Angie, Paty Islas, Héctor, Oscar, Bere. A mi amiga Paty con quien he compartido gran parte de mi vida y me ha impulsado a crecer como una mejor persona.
- A mis compañeros de laboratorio, que siempre me ofrecieron su ayuda y gran conocimiento en la vida académica: Samuel y Paty García.
- A la familia Meza y otros familiares que siempre han mostrado buena voluntad para ayudarme en todo momento, les estoy muy agradecida.

Lista de símbolos

AG	ácido glicólico
AL	ácido láctico
ATB	antituberculosis
DCM	diclorometano
DE	dosis encapsulada
EE	eficiencia de encapsulación
Mw	peso molecular promedio en peso
PLA	poli(ácido láctico)
PLG	poli(ácido glicólico)
PLGA	poli(D,L ácido láctico-co-glicólico)
P-PLGA	partículas fabricadas con PLGA
PVA	poli(vinil alcohol)
RIF	rifampicina
SB38	7-metoxi-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-tione
SEM	microscopía electrónica de barrido
Tg	temperatura de transición vítrea
UV	ultravioleta
Vo	volumen de la fase dispersa
Vw	volumen de la fase continua

Índice general

1. Marco Teórico	14
1.1. Nanociencia y nanotecnología	14
1.2. Tuberculosis	15
1.3. Optimización de tratamientos ATB	17
1.4. Encapsulación en partículas poliméricas	18
1.5. Partículas poliméricas con PLGA	22
1.6. Método de emulsión por extracción de disolvente	30
1.6.1. Efecto de los reactivos de la emulsión	32
1.6.2. Efectos de los parámetros de la emulsificación	38
1.7. Encapsulación de fármacos ATB	42
1.8. Posibles compuestos ATB	46
1.9. Caracterización de P-PLGA	48
1.9.1. Microscopía electrónica de barrido	50
1.9.2. Espectrofotometría de UV-visible	50
2. Objetivos	52
2.1. Objetivos generales	52
2.2. Objetivos particulares	52
3. Metodología	53
3.1. Fabricación de partículas poliméricas cargadas	54
3.2. Parámetros de fabricación estudiados	56

3.2.1. Temperatura de extracción del disolvente	56
3.2.2. Relación fármaco-polímero en la fase dispersa	57
3.2.3. Lavados de la muestra	58
3.2.4. Volumen de fase dispersa en la emulsión	59
3.2.5. Tamaño de partícula	59
3.2.6. Uso de otros compuestos activos contra la Tuberculosis	61
3.3. Caracterización de partículas obtenidas	62
3.3.1. Tamaño de partícula y morfología	63
3.3.2. Determinación de DE y EE	64
3.4. Estudios de liberación	66
4. Resultados y discusión	67
4.1. Curvas de calibración de espectrofotometría UV-visible	68
4.2. Partículas cargadas con Rifampicina	73
4.2.1. Efecto de la temperatura de extracción	73
4.2.2. Efecto del número de lavados	74
4.2.3. Efecto de la variación del factor Ω	75
4.2.4. Efecto del volumen de la fase dispersa	79
4.2.5. Efecto del tamaño de partícula	81
4.3. Perfil de liberación	84
4.3.1. Partículas cargadas con rifampicina	84
4.4. Partículas cargadas con compuesto SB38	88
4.4.1. Efecto del factor Ω	88
4.4.2. Análisis por microscopía	90
4.5. Resumen y análisis de la variación de parámetros en la elaboración de partículas de PLGA	92
5. Conclusiones y perspectivas	94
Referencias	104

Índice de figuras

1.1. Esquema de partículas esfera y cápsula fabricadas con material polimérico.	19
1.2. Estructura de los isómeros del PLA.	24
1.3. Estructura del copolímero PLGA, y mecanismo de degradación (x=unidades de PLA, y=unidades de PLG)	25
1.4. Tipos de emulsiones.	28
1.5. Etapas del proceso de emulsión por extracción y evaporación de disolvente.	31
1.6. Diagrama de la extracción y evaporación del disolvente [21].	34
1.7. Diferentes arquitecturas de partículas de PLGA [41].	34
1.8. Estructura del poli(vinil alcohol), PVA.	36
1.9. Equipos para aplicación de sonicación en emulsiones.	40
1.10. Diagrama de la distribución de partículas en el sistema respiratorio.	41
1.11. Estructura química de la rifampicina.	47
1.12. Actividad biológica reportada para la benzoazepintionas sustituida como se indica.	49
1.13. Compuesto 37 con actividad anti tuberculosis.	49
3.1. Fabricación de partículas cargadas con compuestos ATB mediante emulsión por extracción de disolvente.	55
3.2. Molde del microchip para fabricación de gotas de fase oleosa por microfluídica.	60
3.3. Esquema del montaje para fabricación de partículas mediante microchip.	61
3.4. Estructura química del compuesto SB38.	62

3.5. (a) Medición del radio de partícula en Digimizer, (b) Distribución de tamaños de partículas cargadas.	64
3.6. Metodología para los estudios de liberación mediante membrana.	66
4.1. Partículas secas de PLGA obtenidas: (a) vacías, cargadas con (b) rifampicina, (c) SB38.	67
4.2. Imágenes SEM de partículas de PLGA obtenidas, (a) partículas vacías, (b) cargadas con rifampicina, (c) cargadas con SB38.	68
4.3. (a) Espectros de absorbancia de rifampicina en DMSO a diferentes concentraciones. (b) Curva de calibración de rifampicina en DMSO a 482 nm, la ecuación lineal es mostrada en el gráfico.	70
4.4. (a) Espectro de absorbancia de SB38 a diferentes concentraciones como indica la leyenda, (b) Curva de calibración de SB38 en DCM a 311 nm. La ecuación de la regresión lineal es mostrada en el gráfico.	71
4.5. Comparación entre espectro UV de disoluciones contienen polímero y compuesto (negro) y solo compuesto (rojo), donde (a) Rifampicina (b) SB38.	72
4.6. Variación en la dosis encapsulada de rifampicina respecto al cambio de temperatura de extracción del disolvente.	73
4.7. Efecto del factor Ω en la dosis encapsulada de rifampicina.	76
4.8. Efecto del factor Ω en la eficiencia de encapsulación de rifampicina.	77
4.9. Dosis encapsulada de RIF en función de Φ .	80
4.10. Eficiencia de encapsulación de RIF en función de Φ .	81
4.11. Imágenes SEM de las muestras: (a) CR27, (b) CR29	82
4.12. Imágenes SEM de la muestra MC2.	83
4.13. Perfil de liberación obtenido para las muestras CR27, CR29 y MC2.	85
4.14. Tiempo de liberación 1 - 350 min del perfil de liberación de las muestras CR27, CR29, MC2.	87
4.15. Dosis encapsulada del compuesto SB38 (verde) con rifampicina (rojo).	88

4.16. Eficiencia de encapsulación del compuesto SB38 (verde) con rifampicina (rojo).	89
4.17. Imagen SEM de la muestra CT2, partícula cargada con SB38.	91
4.18. Micrografía óptica en fluorescencia de partículas cargadas con SB38 iluminadas con luz azul (color falso de la imagen).	91
5.1. (a) Espectros de absorbancia de rifampicina en PBS a diferentes concentraciones. (b) Curva de calibración de rifampicina en PBS a 334 nm, la ecuación lineal es mostrada en el gráfico.	100

Índice de tablas

1.1. Fármacos ATB de primera línea: propiedades fisicoquímicas y efectos secundarios.	16
1.2. Técnicas de fabricación de partículas poliméricas cargadas con fármacos ATB.	22
1.3. Composición y propiedades fisicoquímicas de los copolímeros.	25
1.4. Tiempo de degradación de algunos copolímeros PLGA [22].	26
1.5. Propiedades de distintos disolventes utilizados.	33
1.6. Reservorios propuestos y evaluados para la entrega de fármacos ATB utilizando PLGA.	43
1.7. Propiedades fisicoquímicas de la rifampicina.	46
1.8. Solubilidad de la rifampicina en distintos disolventes orgánicos.	47
3.1. Comparación de condiciones utilizadas para el estudio.	56
3.2. Variación de la temperatura de evaporación del disolvente.	57
3.3. Condiciones para el estudio del efecto del valor de Ω .	58
3.4. Variación en el número de lavados de muestra.	58
3.5. Efecto de la variación del volumen de fase dispersa V_o y fase continua V_w .	59
3.6. Condiciones de homogenización para el estudio del efecto de tamaño de partícula.	60
3.7. Valores obtenidos de actividad inhibitoria del compuesto SB38 y rifampicina.	62
3.8. Tabla de condiciones variables para el estudio del efecto del uso de otros compuestos en la encapsulación.	63

4.1. Resultados de la variación del número de lavados en muestras obtenidas.	75
4.2. Condiciones de preparación para el análisis del efecto de tamaño de partícula.	82
4.3. Efecto de tamaño de partícula en DE y EE.	84
5.1. Condiciones de preparación para todas las muestras realizadas que contienen rifampicina encapsulada.	97
5.2. Condiciones de preparación para todas las muestras realizadas que contienen compuesto SB38 encapsulado.	98
5.3. Concentración inicial definida para el análisis del perfil de liberación de rifampicina.	101
5.4. Resultados obtenidos para muestra MC2 del análisis del perfil de liberación de rifampicina.	102
5.5. Resultados obtenidos para muestra CR27 del análisis del perfil de liberación de rifampicina.	102
5.6. Resultados obtenidos para muestra CR29 del análisis del perfil de liberación de rifampicina.	103

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia se define como la actividad dedicada al estudio de los fenómenos fisicoquímicos de estructuras con escala nanométrica, es decir que el tamaño del material estudiado se encuentre entre 1 y 100 nm. Un nanómetro (nm) es equivalente a una billonésima parte de un metro (10^{-9}m). [9]

Materia como gases, líquidos y sólidos presentan propiedades fisicoquímicas inusuales dentro de esta escala, como puede ser el aumento de reactividad química o resistencia física. Aprovechando este cambio en las propiedades, la nanotecnología se enfoca en la aplicación del conocimiento comprendido dentro de la nanociencia para el desarrollo de materiales y técnicas experimentales que logren revolucionar otros campos de la ciencia.

En los últimos años, aproximadamente a inicios del siglo XXI, la nanomedicina se ha enfocado en el desarrollo de materiales nanoestructurados para innovar la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Más específicamente en el aspecto farmacéutico se han utilizado estas propiedades de los sistemas a nano y micro escala para la modificación, entrega, monitoreo y liberación controlada de fármacos, mejorando su efecto terapéutico. [42]

1.2. Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que afecta generalmente a los pulmones. Esta enfermedad sigue siendo un asunto de salud pública muy importante debido a que es una de las diez enfermedades curables con mayor tasa de mortalidad en el mundo, por lo que su erradicación se ha convertido en una de las metas definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y la Estrategia Fin de la Tuberculosis concerniente a salud para cumplir en 2030 (OMS, 2019).

Para el tratamiento de esta enfermedad existen distintos antibióticos, los cuales son clasificados en primer, segunda, tercera y cuarta línea, dependiendo del mecanismo de acción del fármaco dentro del organismo y su gradual erradicación de los síntomas que acompañan a la tuberculosis. La administración progresiva de estos antibióticos ha mostrado gran efectividad, sin embargo, este tratamiento tiene una duración entre 6 y 8 meses, y puede extenderse hasta 12 meses según lo recomendado [17].

La fármaco terapia con mayor éxito ha sido la combinación de distintos fármacos de primera línea, correspondiendo a la isoniazida, pirazinamida y rifampicina. Los primeros dos meses de tratamiento involucran estos 3 agentes combinados con etambutol y posteriormente, en los siguientes meses solo es administrada la rifampicina e isoniazida. Sin embargo, en 2018 se estimó que de 10 millones de personas enfermas de tuberculosis, medio millón de nuevos casos de tuberculosis son resistentes a la rifampicina e isoniazida (OMS, 2018).

Las causas de esto son variadas, a pesar de ser una enfermedad curable, las condiciones sociales y de salud limitadas en países en desarrollo y la presencia de otras enfermedades que comprometen el sistema inmunológico reducen la disponibilidad de medicamentos y dificultan la cobertura total del tratamiento contra la tuberculosis, provocando que la frecuencia de las dosis y la inconsistencia en la administración de los medicamentos aumenten, resultando en la resistencia antibacteriana reportada.

Se estima que un tercio de las 36 millones de personas en el mundo que son po-

sitivos para VIH / SIDA están co-infectados con *M. Tuberculosis*. A este co-infección también se le conoce como «el dúo mortal », por no solo ser una enfermedad mortal sino que el tratamiento para ambas enfermedades causan un impacto socio económico que muchas familias no logran superar [36].

Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas y la fármaco-cinética (e.g. permeabilidad, solubilidad y absorción en el organismo) han dificultado la biodisponibilidad de estos fármacos para su administración en su forma pura, ya que conforme se avanza en la línea de medicamentos, estas propiedades cobran mayor relevancia. Además, su costo y su adquisición se dificultan, considerando que las dosis administradas suelen ser altas para mantener la concentración terapéutica dentro del organismo durante toda la duración del tratamiento [5].

La mayoría de estos fármacos son administrados de manera directa vía oral y parenteral; y a largo plazo los pacientes comienzan a manifestar severos efectos secundarios en el organismo. En el caso de la rifampicina cuando es administrada vía oral causa náuseas, síntomas de gripe, complicaciones renales y hepatotoxicidad [45], lo que resulta en la discontinuación del tratamiento para evitar consecuencias aún mayores (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Fármacos ATB de primera línea: propiedades fisicoquímicas y efectos secundarios.

Fármaco	Coeficiente de partición (log P)	Solubilidad en agua [mg/mL]	Peso molecular [g/mol]	Efectos secundarios
Isoniazida (INH)	-0.639	140	137.14	Hepatotoxicidad, neuropatías
Rifampicina (RIF)	3.719	1.4	822.94	Hepatotoxicidad
Etambutol (EMB)	-0.14	10	204.31	Hepatotoxicidad, toxicidad ocular
Estreptomina (STR)	-6.400	-	581.57	Ototoxicidad, nefrotoxicidad
Pirazinamida (PZA)	-1.884	15	123.11	Hepatotoxicidad

Como se muestra en la tabla 1.1, todos los fármacos anti-tuberculosis (a excepción de la rifampicina) presentan una naturaleza hidrofílica tomando en cuenta su coeficiente

partición y solubilidad en agua, por lo que algún sistema que mejore la permeabilidad de estos compuestos (aumentando el coeficiente de partición), resultaría en una eficiencia mayor y, por lo tanto, las dosis serían menores y los efectos secundarios disminuirían a largo plazo.

1.3. Optimización de tratamientos ATB

Ante las problemáticas que se presentan en el tratamiento de enfermedades, la nanotecnología ha abierto la posibilidad de reducir los efectos secundarios que los fármacos tienen en el organismo cuando se administran de manera pura, así como mejorar su desempeño. Esto ha llevado a la creación de sistemas particulados que fungen como reservorios mejorando la fármaco-cinética, la toxicidad, estabilidad y la interacción del fármaco con el organismo; además de brindar un mayor control en la liberación con una entrega más inmediata en el sitio deseado, reduciendo las dosis requeridas en el tratamiento y los efectos adversos que puedan ocasionar a largo plazo.

Algunos de los sistemas que han resultado efectivos como reservorios para la entrega de fármacos son: partículas poliméricas, emulsiones a micro- y nanoescala, partículas sólido - lípidas, niosomas, micelas, suspensiones, nanocristales, entre otros [17]

En el caso de la tuberculosis, los reservorios con antibióticos encapsulados son capaces de modificar la fármaco-cinética del fármaco administrado pues son reconocidas más fácilmente por las células fagocíticas, donde se suele encontrar la bacteria, por lo tanto, la concentración del antibiótico es mayor en esa zona y el tratamiento es más efectivo [43]. Además de que disminuyen las dosis necesarias, evitando el desarrollo de resistencia a los antibióticos y la interrupción del tratamiento.

Sin embargo, para tener el máximo efecto terapéutico, esta formulación de encapsulación debe ser desarrollada con mucho cuidado, ya que el reservorio puede cambiar las propiedades de las sustancias encapsuladas. Para llevarla a cabo deben tomarse en cuenta factores como solubilidad, lipofilia, permeabilidad y estabilidad del fármaco

a encapsular para posteriormente aplicar la técnica de encapsulación más adecuada y eficiente. También es necesario de tomar en cuenta que el material del reservorio debe ser no tóxico pero suficientemente resistente contra factores de degradación en el organismo y mantener el control en la liberación del fármaco. Este control en la liberación en el caso de los antibióticos, ayuda a mantener la concentración efectiva del antibiótico al extender el tiempo de circulación de las partículas dentro del organismo, evitando la agregación del fármaco hidrofóbico cuando es administrado vía intravenosa lo cual causa toxicidad local, y reduce la biodisponibilidad de estos fármacos en específico [43].

Dentro de los sistemas mencionados anteriormente, las partículas poliméricas tienen la ventaja de ser excelentes candidatos para la encapsulación de fármacos ya que poseen alta estabilidad, simplicidad y variedad en las rutas de administración, abriendo la posibilidad de encapsular fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos dependiendo solo de la ruta de fabricación. Además es posible funcionalizar su superficie para disminuir los efectos indeseables. Esta modificación abre posibilidades de aplicación de estas partículas, no solo como reservorios, sino también como biosensores en ingeniería de tejidos y defensa química.

1.4. Encapsulación en partículas poliméricas

Históricamente, la primeras partículas propuestas como reservorios para aplicaciones terapéuticas fueron fabricadas con gelatina y albúmina. Sin embargo, debido a su naturaleza peptídica, se presentaba una respuesta inmune por parte del organismo [34]. Posteriormente, los polímeros sintéticos comenzaron a utilizarse, principalmente aquellos que presentan propiedades biodegradables, debido a su compatibilidad con el organismo, baja toxicidad y reabsorción por el cuerpo. Estos polímeros sintéticos biodegradables tienen la ventaja de ser fabricados a gran escala, con alto grado de pureza y uniformidad en cada batch producido [29].

Desde una perspectiva química, es posible el diseño de distintos polímeros sinteti-

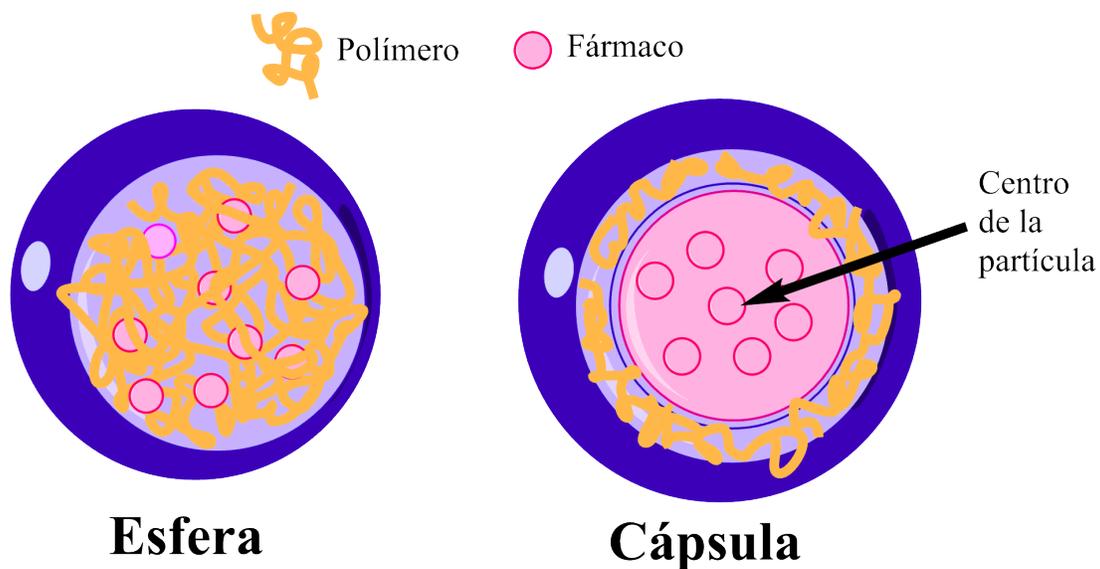


Figura 1.1. Esquema de partículas esfera y cápsula fabricadas con material polimérico.

cos con distintas propiedades fisicoquímicas al modificar la vía de síntesis, lo que lleva a la obtención de distintos mecanismo de encapsulación y liberación de fármacos.

La categoría básica de biopolímeros consiste en dos tipos: (1) los polímeros sintéticos biodegradables, principalmente hidrofóbicos como son los poli(ésteres), poli(anhídridos), poli(amidas), entre otros, y (2) los biopolímeros que abarcan los poli(sacáridos) como son: quitosan, hialurano.

De manera general, las partículas poliméricas son consideradas sistemas coloidales sólidos con tamaños entre la escala nano- y submicrométrica (aproximadamente entre 100 y 1000 nm). Son preparadas por métodos de extracción de disolvente, secado por atomización, emulsión, fluidos supercríticos, entre otros [42].

Basándose en la técnica de fabricación, estos sistemas suelen ser divididos en esferas y cápsulas, figura 1.1.

Las esferas consisten en una matriz polimérica en la cual el fármaco está disperso, mientras que las cápsulas poseen una pared que rodea un centro líquido (comúnmente oleoso) donde se encuentra disuelto el fármaco o principio activo.

La predicción de las propiedades fisicoquímicas de las partículas poliméricas así como su eficiencia de encapsulación y cinética de liberación dependerán principalmente

de las propiedades del polímero relacionadas con peso molecular, grupos funcionales terminales, carga [17]. Estas características permiten a las partículas poliméricas una mayor versatilidad en cuanto a su biodisponibilidad, el cual es uno de los puntos clave para utilizarlos al combatir la tuberculosis. Por ejemplo, se han desarrollado sistemas inhalables para evitar efectos secundarios causados por el metabolismo de los fármacos ATB en el ducto gastro intestinal, proporcionando protección del fármaco evitando su pronta degradación en el cuerpo y permitiendo un mayor control en su administración y liberación durante largos periodos de tiempo [43].

Desde un punto de vista más general, en un sistema coloidal conformado por partículas destinadas a la encapsulación de fármacos es importante considerar dos factores:

1. La incorporación del fármaco en la matriz del polímero.
2. La liberación del fármaco, es decir, el proceso inverso a la incorporación. Dentro de este paso, el fármaco es liberado desde la partícula y está disponible para su absorción o posterior efecto farmacológico en el cuerpo.

Estos dos factores descritos están relacionados entre sí por las propiedades fisico-químicas de la matriz polimérica, del fármaco y de la interacción entre ambos en el medio en el que se encuentre.

En el caso de la incorporación de fármaco al sistema reservorio, en la literatura [14] se recomienda considerar dos parámetros:

- Dosis Encapsulada (*drug loading*), DE.
- Eficiencia de encapsulación, EE.

De manera cualitativa, estos son descritos por las siguientes ecuaciones:

La dosis encapsulada (DE) se expresa:

$$DE(\text{mg/mg}) = \frac{m_{\text{enc}}}{m_p} \quad (1.1)$$

donde m_{enc} es la cantidad de compuesto encapsulado, y m_p es la cantidad de partículas utilizadas para la determinación de este valor.

$$EE \% = \frac{m_{enc}}{m_{nom}} \times 100 \quad (1.2)$$

donde, m_{enc} es la masa de fármaco dentro de las partículas definida experimentalmente y m_{nom} es la masa nominal del fármaco utilizada.

La eficiencia de encapsulación expresa la eficiencia del método de preparación utilizado para incorporar el fármaco a la partícula. Una dosis encapsulada mayor (DE) resulta deseable para mejorar la eficiencia de encapsulación debido a que la cantidad de partículas utilizadas en el tratamiento es menor y la dosis terapéutica es alcanzable más fácilmente, e idealmente la cantidad liberada es mayor. Sin embargo, si las interacciones entre el fármaco y el reservorio son fuertes, el DE y EE aumentan considerablemente pero la tasa de liberación disminuirá. Estos factores son la base del control en la liberación del fármaco dentro del organismo desde un reservorio.

Por otra parte, es importante considerar la capacidad máxima del reservorio, ya que si se llega a superar ese valor máximo, la EE comenzará a descender [14].

En general, el método utilizado para la encapsulación así como los cambios en las condiciones principales de fabricación influirán en el DE y la EE. El fármaco puede ser incorporado al sistema por interacciones débiles (van de Waals), fuertes (iónicas, covalentes) o por métodos físicos (mezclaje simple o precipitación).

A continuación se mencionan algunas técnicas de elaboración de partículas poliméricas utilizadas para la encapsulación de fármacos ATB [29]:

Específicamente en los tratamientos que involucran antibióticos ATB las partículas poliméricas han mostrado ventajas al resolver problemáticas relacionadas con: [17]:

- Poca absorción de los fármacos hidrofóbicos en el organismo.
- Agregación del fármaco administrado vía venosa. Esto provoca intoxicación y reduce la biodisponibilidad del tratamiento.
- Poca biodisponibilidad. Al cambiar el tamaño de partícula, es posible variar la vía de administración (e.g. parénteral, inhalable, entre otros).

Tabla 1.2. Técnicas de fabricación de partículas poliméricas cargadas con fármacos ATB.

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Emulsión	Un disolvente organico es usado para disolver el polímero y el fármaco, posteriormente es dispersado en una solución acuosa que contiene un emulsificante. Después de la emulsificación, el solvente es retirado por extracción o evaporación.	Las propiedades fisicoquímicas del polímero se preservan. Bajo costo.	Toxicidad por el uso de disolventes orgánicos. Consiste en 2 etapas, es más lento.
Spray drying	Las partículas sólidas son creadas a partir de la esparción de gotas en un medio caliente	Consiste en un solo paso, rápido y continuo. Sencillo de escalar.	Mayor polidispersidad. Equipo y condiciones costosas.
Anti -disolvente supercríticos	El fármaco y polímero son disueltos en un disolvente orgánico, y mediante un fluido supercrítico se promueve la precipitación de las gotas formadas.	Consiste en un solo paso.	Uso de disolventes orgánicos. Material costoso.
Gelación	Adición de un agente entrecruzador (e.g. CaCl ₂) en una disolución de polímero para la formación de las partículas. Posteriormente, las partículas son secadas por atomización.	Evita el uso de agentes tóxicos.	Dificultades para escalar.

En el caso del tratamiento contra la tuberculosis las micropartículas elaboradas con copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico han recibido atención como reservorios para entrega de fármacos en los pulmones. Lawlor [20] estudió micro-esferas cargadas con rifampicina, observando una liberación del fármaco constante durante aproximadamente 20 días a un pH 7.4, y con resultados efectivos, pues se encontró una concentración de rifampicina 19 veces mayor en los macrófagos alveolares utilizando las partículas que administrando la solución del fármaco puro. Esto ha abierto al estudio de diversas técnicas para la obtención de partículas poliméricas elaboradas con este polímero biodegradable.

1.5. Partículas poliméricas con PLGA

Las partículas poliméricas elaboradas a partir de polímeros biodegradables se popularizaron a finales del siglo XX, al ser introducidas como material quirúrgico, debido a la compatibilidad mostrada en su vía de degradación *in vivo*, formando cadenas más

pequeñas que son fácilmente metabolizadas por el organismo [40].

Los poli(ésteres) son la familia de polímeros más estudiada en el campo de la nanomedicina, en especial el poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y sus copolímeros, a causa de su debut en el año 1970 al ser introducidos en el mercado como material biodegradable para suturas [6].

El copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico), PLGA (figura 1.3) es uno de los polímeros biodegradables aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (US FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) de la Unión Europea, es un copolímero conformado por los monómeros ácido láctico y ácido glicólico. Mediante hidrólisis este polímero se degrada generando los monómeros que lo conforman, los cuales son metabolizados fácilmente por el cuerpo en dióxido de carbono (CO_2) y agua, vía ciclo de Krebs [38].

Este tipo de copolímeros son sintetizados principalmente vía copolimerización por apertura de anillo utilizando como monómeros las lactonas correspondientes, mediante policondensación del ácido láctico y el ácido glicólico.

Debido al carbono asimétrico α del poli(ácido láctico), este puede ser descrito dependiendo del isómero óptico utilizado, como se muestra en la figura 1.2 donde existen tres tipos de estructuras enantioméricas: «D», «L» y «DL». Estas letras describen la quiralidad absoluta (déxtrogiro «D», levógiro «L»), y el mayor efecto que tienen en el polímero es la tacticidad que le proporcionan al copolímero PLGA y por consecuencia el cambio en la temperatura de transición vítrea a causa del cambio en la estructura, ya sea cristalina o amorfa. Por ejemplo, el poli(D-ácido láctico) (P(D)LA) es amorfo y el poli(L-ácido láctico) P(L)LA, se organiza de forma más cristalina, provocando un cambio en la rapidez de degradación del polímero [23].

En términos de diseño y mecanismo, el PLGA es el mejor candidato como biomaterial para la entrega de principios activos dentro del organismo. Pueden obtenerse diversas formas con distintas propiedades fisicoquímicas del PLGA variando factores como: peso molecular, relación entre las unidades de AL y AG que lo conforman, y en el caso de las partículas poliméricas, su perfil de liberación es afectado por el tamaño

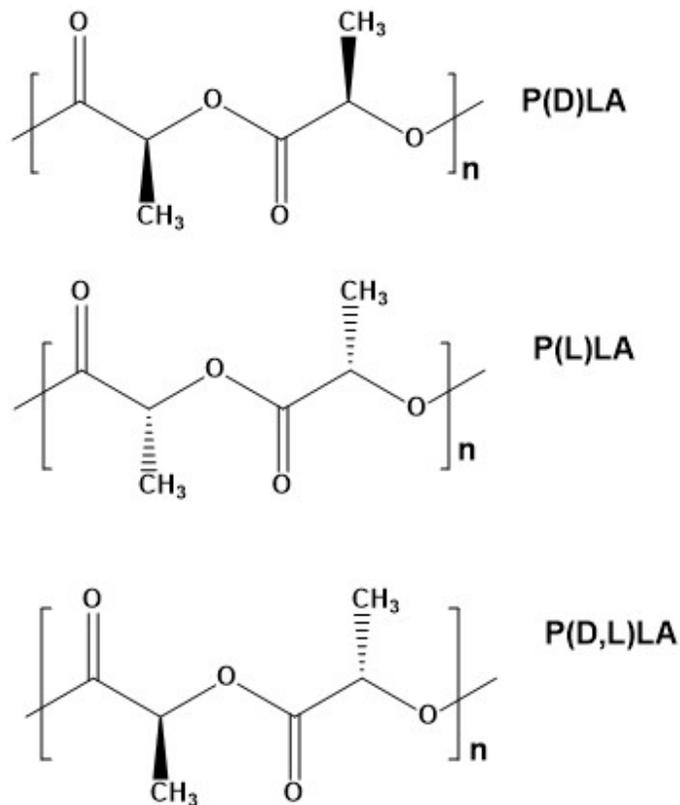


Figura 1.2. Estructura de los isómeros del PLA.

de partícula, condiciones de almacenaje y la exposición al agua.

Debido a que el mecanismo de degradación de este copolímero es mediante hidrólisis, los copolímeros PLGA con bajos pesos moleculares y alto contenido de ácido glicólico son más hidrofílicos y amorfos, ocasionando que el tiempo de deterioración disminuya por su tendencia a absorber agua. Por otra parte, un alto contenido en ácido láctico aumenta la tendencia a ser más hidrofóbicos, absorben menos agua y se degradan de manera más gradual. Esto se refleja en que partículas de PLGA con alto contenido de AG se degradarán más rápido al ser aplicadas. La excepción a esta tendencia es la relación 50:50 (AL:AG) el cual muestra una degradación más rápida [23]. A pesar de ello, el cambio en estas propiedades resulta útil para la modificación del polímero y tener un mejor control en el mecanismo de liberación del principio activo.

Algunos ejemplos de la variación del tiempo de degradación con respecto a la composición de AL y AG en el copolímero, en medio acuoso pH 7.4 a una temperatura de

Tabla 1.3. Composición y propiedades fisicoquímicas de los copolímeros.

Copolímero	Composición de los monómeros AL/AG	Peso molecular (g/mol)	Tg (°C)	Referencia
PDLA	0/100	100000	59.8	[44]
PLLA	100/0	100000	62.2	[44]
PLGA	75/25	10000	40.6	[39]
PLLGA	75/25	10000	47.7	[39]
PLGA	91/9	11134	43.6	[39]
PLLGA	90/10	9071	51.0	[39]

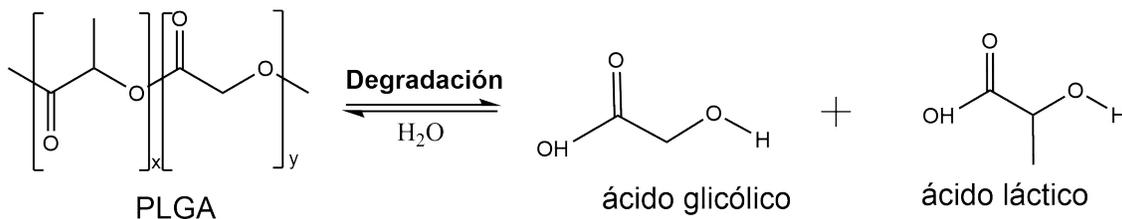


Figura 1.3. Estructura del copolímero PLGA, y mecanismo de degradación (x=unidades de PLA, y=unidades de PLG)

37°C se muestra en la tabla [1.4](#).

Makadia [\[23\]](#) describe el mecanismo de liberación del fármaco a través de las partículas de PLGA (P-PLGA), en tres etapas:

1. «*Initial burst*». Este fenómeno consiste en una liberación más rápida en las primeras horas de la liberación. Es causado por la presencia de fármaco en la superficie de las partículas, sin embargo, en esta fase no se presenta monómero disuelto. Usualmente este efecto incrementa con la dosis encapsulada.
2. Hidrólisis química. El agua penetra en la matriz polimérica, hinchándolo e hidrolizando principalmente los enlaces ésteres, debilitando el entrecruzamiento del polímero y los enlaces secundarios, disminuyendo el peso molecular del polímero

Tabla 1.4. Tiempo de degradación de algunos copolímeros PLGA [22].

Polímero	Composición de monómeros AL/AG	Tiempo vida media (semanas)
PLA	100/0	110
PLGA	85/15	20
PLGA	75/25	10

y formando oligómeros solubles y monómeros de AG y AL.

3. Liberación por difusión a través de la matriz polimérica y erosión de la superficie.

Sin embargo, en la liberación desde partículas PLGA predomina la degradación química en vez de la erosión superficial de la partícula, es decir, el PLGA absorbe el agua y la hidrólisis predomina en el proceso, lo que usualmente resulta en una degradación mayor al interior del matriz polimérica [22]. Es por esta razón que la degradación de las partículas poliméricas de PLGA dependen fuertemente de la relación AL:AG, el peso molecular del polímero, el grado de cristalinidad y la temperatura de transición vítrea.

Además de estos factores, la liberación del fármaco es un parámetro importante para su aplicación in vivo, por lo que deben tomarse en cuenta:

- Interacciones PLGA - fármaco encapsulado. Usualmente, si estas interacciones son muy fuertes la liberación del fármaco se ve limitada, provocando una liberación lenta a través de las partículas.
- Tamaño y forma de la matriz polimérica. Un área superficial mayor deriva en una degradación más rápida por el incremento en el área de contacto con el medio acuoso.
- pH. Estudios de liberación *in vitro* con P-PLGA muestran que medios alcalinos y muy ácidos aceleran el proceso de degradación. Mientras que en medios lige-

ramente ácidos y neutros, esta diferencia es menos notoria por la autocatálisis de los grupos carboxílicos derivados del rompimiento de los enlaces ésteres del polímero [46].

Por la naturaleza hidrofóbica del copolímero PLGA, la mayoría de las técnicas de preparación de micro- y nanopartículas involucran disolventes orgánicos. De manera breve, se describen algunas metodologías para la elaboración de partículas poliméricas a partir de PLGA que han sido aplicadas para la encapsulación de fármacos.

Emulsiones En general, el método de emulsión seguida de la extracción del disolvente consiste en la dispersión de un disolvente orgánico que contenga al fármaco y al polímero, en una disolución acuosa con un emulsificante. Posterior a la emulsificación, el disolvente es retirado (por evaporación o por extracción) y las gotas formadas se solidifican formando las partículas deseadas.

La ventaja de este método es su simplicidad y la versatilidad de preparar emulsiones simples y múltiples, figura pues permite la encapsulación de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Para la elaboración de partículas poliméricas con PLGA las emulsiones comúnmente utilizadas son o/w, w/o/w; debido a que este polímero es hidrofóbico.

Separación de fase «coacervación» Este método consiste en la aplicación de técnicas de separación líquido - líquido de dos disoluciones, una de las cuales se encuentra saturada con el polímero (fase coacervada) y otra con una proporción mas baja de polímero. La disolución en la cual se encuentra el fármaco es recubierta con el coacervado. Después, estas fases son sumergidas en un medio donde el polímero no es soluble para formar las partículas.

Las desventajas de este método reside principalmente en la determinación de la relación de volúmenes entre ambas disoluciones, además de estar limitada para cierto tipo de polímeros.

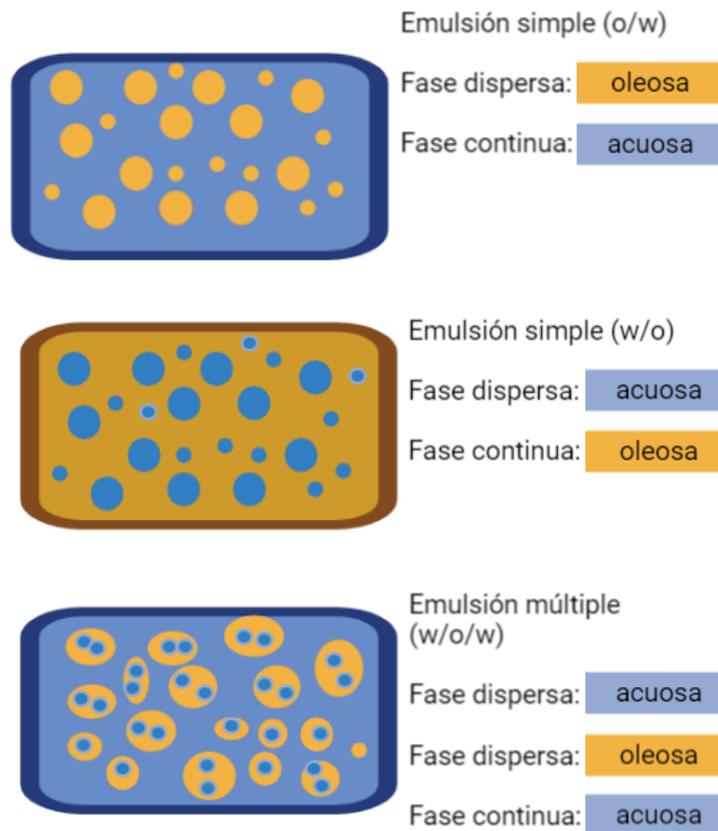


Figura 1.4. Tipos de emulsiones.

Microfluídica La microfluídica consiste en el uso de dispositivos (también llamados *chips*) compuestos por canales de tamaños micrométricos y nanométricos para la manipulación de fluidos. Estos dispositivos se han utilizado para la formación de emulsiones con tamaños de gota más controlados y monodispersos, mediante la modificación del flujo de entrada y salida de los disolventes utilizados, a través de los micro- y nanocanales.

La ventaja del uso de estos dispositivos o «*chips*» es la variedad de materiales con los que son fabricados además del control en las propiedades de las partículas obtenidas, sin embargo, el diseño y fabricación de los chips utilizados suele ser costosa y difícil de escalar para su aplicación.

Método de extrusión Relacionado con el principio de la microfluídica, el método de extrusión reside en el uso de membranas con tamaño de poro definido que van desde 200 nm hasta 5 μm [38]. Mediante estos poros se hacen pasar la fase dispersa de la emulsión creada, para formar gotas con un tamaño definido, por lo que podría decirse que es una forma de crear emulsiones utilizando presión para la formación de las gotas.

Técnicas de «*spray drying*» A comparación de los métodos mencionados anteriormente, la técnica por *spray drying* es la más rápida de todas, y su fabricación no depende de tantos parámetros por lo que su escalamiento es más sencillo [23]. El proceso consiste en rociar una emulsión o dispersión que contiene al fármaco y al polímero, en un medio de aire caliente para formar las partículas. La naturaleza del disolvente utilizado en la emulsión o dispersión, y la temperatura del medio son los principales parámetros que definen la morfología de las partículas formadas por «*spray drying*».

1.6. Método de emulsión por extracción de disolvente

Cada técnica para la fabricación de partículas lleva consigo una serie de factores que afectan el proceso y tendrán un impacto en la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación del fármaco. De las técnicas mencionadas para la elaboración de partículas poliméricas de PLGA, la técnica por emulsión seguida por extracción de disolvente es la que presenta más ventajas en cuanto a versatilidad y sencillez. En el ámbito de la encapsulación de fármacos, esta técnica ha sido de las más estudiadas en su aplicación para obtención de partículas de PLGA por la conservación de sus propiedades fisicoquímicas. Algunos ejemplos en su aplicación ha sido para la encapsulación de fármacos psiquiátricos (e.g. diazepam, clorpromazina) agentes anti-cáncer (aclerubicina) y opiodes como el L-metadona [42].

Como se describió anteriormente, esta técnica se basa en la emulsificación de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales consiste en un disolvente orgánico que contiene al fármaco y al polímero disueltos. En general, la técnica de emulsión por extracción de disolvente puede describirse en 4 etapas [21], figura 1.5:

1. Disolución del fármaco hidrofóbico en la fase orgánica que contiene al polímero.
2. Emulsificación de la fase dispersa en la fase continua.
3. Extracción del disolvente desde la fase dispersa seguida de su evaporación, permitiendo la solidificación de las gotas en partículas poliméricas.
4. Recuperación de las partículas elaboradas.

Diversos autores [31][33] han estudiado los parámetros que afectan la fabricación de partículas de PLGA elaboradas con la técnica de emulsión por extracción de disolvente y el efecto de los parámetros que conforman a esta metodología en las propiedades de las partículas obtenidas. Ming Li [21] clasifica los efectos de la metodología en tres factores generales:

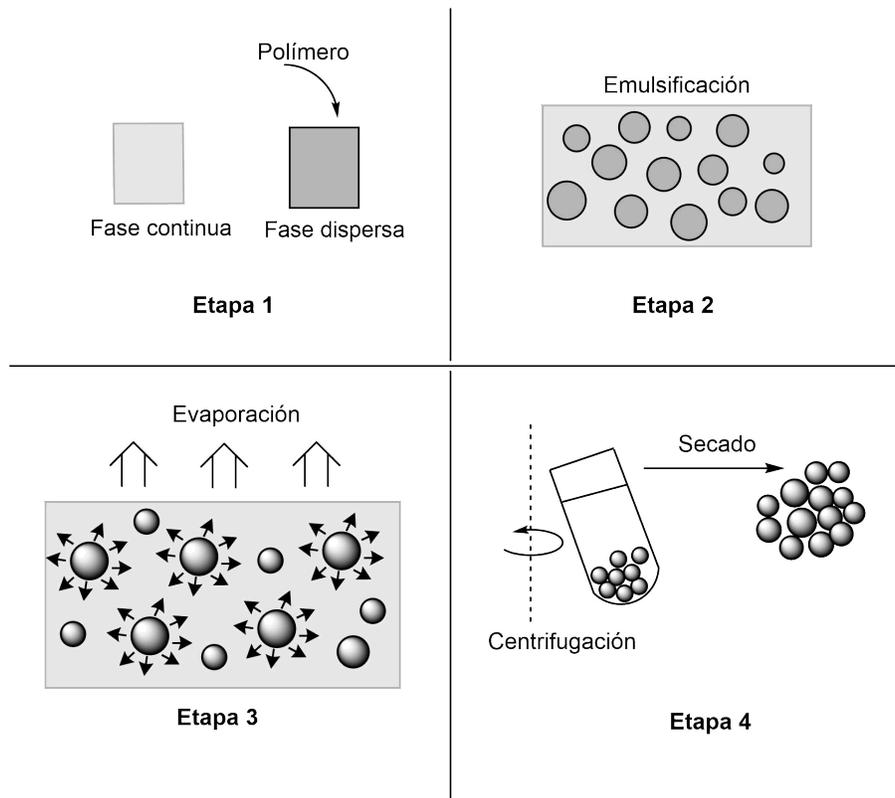


Figura 1.5. Etapas del proceso de emulsión por extracción y evaporación de disolvente.

1. Propiedades de los materiales. Comprende a los reactivos utilizados en la fase dispersa (e.g. PLGA, disolvente orgánico, fármaco y co-solvente, si aplica), y en la fase continua (emulsificante).
2. Características de la emulsión. Relacionadas con las propiedades de la fase dispersa y la fase continua (e.g. viscosidad, concentración de polímero y fármaco en la fase dispersa, fracción de volumen).
3. Condiciones de emulsificación. Factores externos relacionados con la técnica de emulsificación y la extracción del disolvente (e.g. agitación, temperatura, presión).

Estos factores afectan principalmente las propiedades de las partículas (e.g. distribución de tamaño, morfología, porosidad) y por ende, la encapsulación del fármaco (dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación) y el comportamiento del perfil de liberación del fármaco desde las partículas.

A continuación se describirán algunos de los efectos que tienen los parámetros que conforman al método de emulsión seguida de extracción y evaporación de disolvente, y han sido utilizados para la optimización de este método.

1.6.1. Efecto de los reactivos de la emulsión

Efecto del disolvente orgánico

Los disolventes orgánicos son los más utilizados en la encapsulación basada en emulsión, y particularmente en el caso de la fabricación de partículas de PLGA por su solubilidad en este disolvente. Dependiendo de la selección del disolvente estos tendrán un efecto en el tamaño, morfología, liberación del fármaco y, en caso de que hayan residuos en las partículas, influye en el efecto terapéutico de las partículas elaboradas [38].

En la encapsulación de fármacos hidrofóbicos en PLGA, el disolvente más utilizado en la técnica de emulsión por evaporación es el diclorometano (DCM), debido a su alta volatilidad, bajo punto de ebullición y alta inmiscibilidad con agua. La ventaja que

sobrepone a este disolvente sobre otros como el etilacetato o el cloroformo es su alta presión de vapor, pues provoca que el tiempo de evaporación sea menor [21], tabla 1.5. También, específicamente para el PLGA, cuando esta macromolécula tiene grupos terminales alquilo (e.g. metil, etil o éster) posee una mejor solubilidad en DCM a comparación con los polímeros con terminaciones con ácidos carboxílicos.

Tabla 1.5. Propiedades de distintos disolventes utilizados.

Disolvente	Presión de vapor (mbar) a 20°C	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L) a 20°C
Cloroformo	212	61	8
Diclorometano	453	39.7	20
Acetato de etilo	100	77	90

La velocidad de evaporación del disolvente está fuertemente relacionado con la solidificación de las partículas. La solidificación de las gotas de la emulsión depende de la difusión del disolvente orgánico a través de las gotas formadas hacia la fase continua (difusión), y de la fase continua al aire (evaporación), figura 1.6

Durante este proceso el PLGA comienza a encogerse y formar las partículas sólidas, debido a la hidrofobicidad que presenta. En general, una rápida precipitación del polímero es considerado ventajoso para obtener altas eficiencias de encapsulación. Sin embargo, si la velocidad de precipitación es muy alta, se observa la formación de cascarones huecos de polímero o deformaciones en lugar de esferas o cápsulas completas (figura 1.7), afectando la dosis encapsulada y el perfil de liberación, pues tienden a degradarse más rápidamente [4].

En el caso del uso de diclorometano en la fase dispersa, se ha reportado [25] que al utilizar volúmenes de fase continua (acuosa) menores, el DCM se distribuye a través de la fase acuosa de manera más lenta, por lo que está controlado por la velocidad de difusión, ocasionando que el fármaco sea arrastrado por este efecto hacia la interfaz de la gota formada, y al solidificarse el polímero, la superficie de la partícula estará más en-

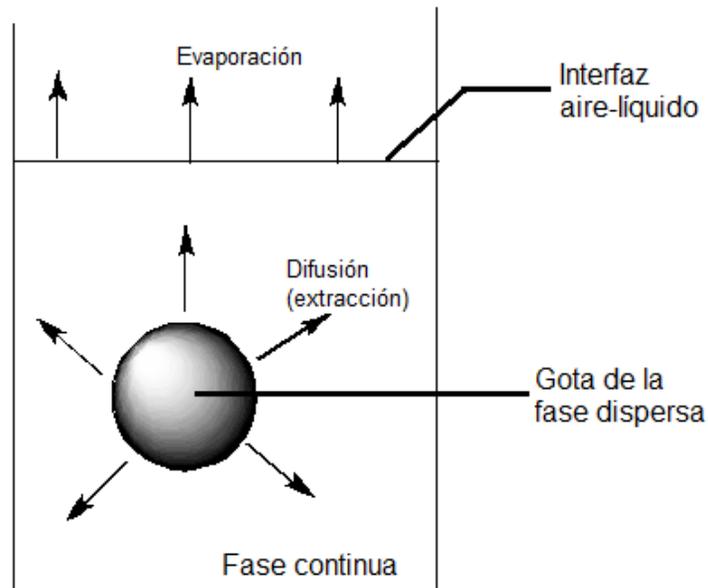


Figura 1.6. Diagrama de la extracción y evaporación del disolvente [21].

riquecida con el compuesto encapsulado lo que a su vez ocasionará un efecto «*burst*» más marcado en la liberación. También se encontró que en estos casos, la superficie de las partícula obtenida era menos porosa, lo que se relaciona con la velocidad de evaporación del disolvente.



Figura 1.7. Diferentes arquitecturas de partículas de PLGA [41].

Efecto del emulsificante

Debido a que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, se utiliza un tercer agente llamado emulsificante o tensoactivo, el cual presenta propiedades anfífilas para estabilizar la emulsión. Este compuesto reduce la tensión interfacial entre dos líquidos inmiscibles, evitando fenómenos como la coalescencia y aglomeración de las gotas de disolvente orgánico formadas. En la metodología de emulsión por extracción de disolvente el uso de un emulsificante durante y después de la formación de la emulsión es crucial, tanto para mantener la estabilidad del sistema líquido - líquido, como para también estabilizar el coloide sólido - líquido formado cuando las gotas de polímero solidifican, y evitar su agregación.

La elección del emulsificante repercute en las características de las partículas formadas: el tamaño y distribución del tamaño de las gotas formadas, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación y también puede tener efectos en la estabilidad física de las partículas, los emulsificantes más utilizados en la elaboración de partículas poliméricas para aplicaciones biomédicas son los polisorbatos, el poli(acetato de vinilo) PVAc, poli(vinil alcohol) PVA y los poloxámeros [8], los cuales se caracterizan por tener un carácter no iónico.

El PVA, figura 1.8, es el emulsificante más utilizado en la fabricación de partículas poliméricas por sus propiedades biocompatibles, biodegradables y no tóxicas, además de ofrecer un control en sus propiedades al modificar su peso molecular y grado de hidrólisis: bajos pesos moleculares de PVA resultan en una baja viscosidad, menor carácter hidrofílico y mayor flexibilidad, mientras que un bajo grado de hidrólisis resulta en un mayor carácter hidrofílico, flexibilidad y adhesión a superficies hidrofóbicas [8].

El poli(vinil alcohol), PVA ha sido ampliamente utilizado en la preparación de partículas utilizando PLGA como polímero y diclorometano como el disolvente orgánico, debido a su interacciones intermoleculares con el PLGA, y la obtención de partículas más pequeñas [21]. De manera general, el incremento en la concentración de emulsificante en la fase continua tiene una relación inversamente proporcional con el tamaño de partícula, por la disminución en la tensión superficial [13].

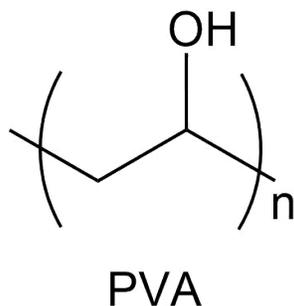


Figura 1.8. Estructura del poli(vinil alcohol), PVA.

Efecto de las propiedades del fármaco

Una de las propiedades más importantes para la aplicación del método de emulsión por extracción de disolvente es la solubilidad del fármaco a encapsular.

(1) Antes de la encapsulación es necesario tomar en cuenta la solubilidad del fármaco tanto en la fase dispersa como en la fase continua de la emulsión. En el caso de la elaboración de partículas PLGA por emulsión, la compatibilidad del fármaco con el disolvente orgánico es importante para mejorar la eficiencia de encapsulación. Por otra parte, si el fármaco utilizado es parcialmente soluble en la fase continua (acuosa) es necesario tomar en consideración su pérdida en este medio, pues habrá una disminución en la dosis encapsulada. Uno de los parámetros para describir la naturaleza lipofílica o hidrofílica de un compuesto químico, y para hacer predicciones del comportamiento en cada fase es el coeficiente de partición K_p , el cual se expresa como el cociente entre la solubilidad del compuesto determinado en cada una de los líquidos inmiscibles que conforman la emulsión.

En el caso de compuestos farmacéuticos, el coeficiente de partición es determinado en medios de *n*-etanol / agua, por la importancia de estas moléculas en los procesos biológicos. El coeficiente de partición nos dan información sobre el comportamiento de la molécula en cuanto a permeabilidad a través de membranas biológicas. En estudios sobre la farmaco-cinética, el coeficiente de partición expresa el comportamiento de propiedades como absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco en el organismo. Es útil para estimar la distribución del fármaco dentro del cuerpo, por ejem-

plo, en el caso de fármacos hidrofóbicos con altos coeficientes de partición tendrán una tendencia a ubicarse en los compartimientos hidrofóbicos de la célula como las bicapas lipídica, mientras que fármacos hidrofílicos (coeficientes de partición menores) se encuentran más tiempo en el suero sanguíneo [3].

Fármacos con coeficientes de partición $\log P$, menores a 1.72 están clasificados con baja permeabilidad, mientras que valores arriba o iguales a este valor son considerados como altamente permeables [16]. Este antecedente nos permite discernir entre el uso de emulsiones simples o complejas para encapsular fármacos hidrofóbicos o hidrofílicos, según sea el caso y el método en que desee ser administrado.

(2) Una vez preparada la emulsión, las propiedades del estado sólido del fármaco (e.g. grado de cristalinidad, estabilidad de la estructura, temperatura de fusión) determinarán su estabilidad dentro de las partículas durante la formación (solidificación de gotas) y la liberación desde las mismas. Durante la encapsulación, el fármaco es disuelto en la fase dispersa y una vez encapsulado este puede estar presente en las partículas como una disolución sólida, una dispersión o formar regiones amorfas y cristalinas en la matriz polimérica.

Otra característica a tomar en cuenta son las interacciones del fármaco con el polímero. Para el PLGA, la presencia de grupos amino en los fármacos, especialmente en el caso de aminas primarias en los péptidos, se ven afectadas por reacciones de acilación como consecuencia de la degradación del polímero [30].

Por otra parte, en la liberación, la interacción fármaco-PLGA toma relevancia si afecta el mecanismo de degradación del polímero. Los fármacos cuyos grupos principales son las aminas se caracterizan por catalizar la degradación del poliéster, incrementando la velocidad de degradación [27]. Además en el caso de interacciones fuertes de fármaco con los grupos carboxilo del PLGA, la cantidad de fármaco encapsulada llega a aumentar, sin embargo, por la fuerza de este tipo de interacciones, la liberación será más lenta [42].

1.6.2. Efectos de los parámetros de la emulsificación

Características de la fase dispersa y continua

Usualmente, el estudio de estos efectos se enfoca en el análisis de la fracción de volumen utilizada para cada fase y su viscosidad.

Una mayor viscosidad de la fase dispersa es alcanzada incrementando la concentración o el peso molecular del PLGA. Al incrementar la viscosidad, el tamaño de las partículas incrementa exponencialmente y la eficiencia de encapsulación mejora. De la misma manera, una concentración de polímero mayor resulta en una solidificación más rápida del polímero [4].

Por otra parte, el efecto de la viscosidad en la fase dispersa no suele ser estudiado debido a que este parámetro dificultaría la recuperación de las partículas en el último paso de la metodología. Al aumentar la concentración de emulsificante, se vuelve más complicado retirar el sobrenadante de la fase continua y recuperar las partículas fabricadas.

Sin embargo, en el caso de la encapsulación por emulsión, es necesario considerar los siguientes factores:

1. Concentración de saturación del fármaco en el disolvente orgánico.
2. La tendencia del polímero a expulsar el fármaco: durante la etapa de solidificación de las partículas, el PLGA se encoge de manera que la cantidad de fármaco por volumen aumenta, y el límite de saturación del polímero se alcanza más rápidamente.
3. Una alta dosis encapsulada tiende a producir partículas con irregularidades en su superficie, esto provoca que el fármaco se filtre a través de estas imperfecciones de la partícula y provoque bajas eficiencias de encapsulación.

Emulsificación

En una emulsión comúnmente se aplican fuerzas de corte para la formación de gotas, por lo tanto el incremento de estas fuerzas (e.g. aumentando la velocidad de agitación, potencia de un homogeneizador) resulta en tamaños de gota más pequeños, sin embargo, por efectos como la cavitación y el poco control en el uso de equipos homogeneizadores (e.g. sonicación), la polidispersidad (diferencia en tamaño de las gotas) tiende a aumentar.

El método de emulsificación más utilizado es el de sonicación, el cual consiste en la propagación de ondas de ultrasonido a través de un líquido con el fin de comprimir y expandir el espacio entre las moléculas del líquido que conforman en este caso, a la emulsión. Cuando la distancia mínima entre moléculas para mantener el líquido intacto es superada, ocurre el fenómeno de cavitación, donde se alcanzan altas temperaturas y presión en el sistema a esa escala provocando la formación y colapso periódico de burbujas. Este fenómeno incrementa con la presión hidrostática, pureza del líquido donde se aplique, la tensión superficial y la frecuencia aplicada. [7]. Los equipos más utilizados para la aplicación de sonicación son los baños de ultrasonido y sonicadores de punta, figura 1.9.

En baños de ultrasonido, el efecto de cavitación tiene una menor fuerza y las ondas ultrasónicas no se propagan de la misma manera debido a que no está en contacto directo con el líquido. Por otra parte, la sonicación aplicada con puntas está en contacto directo con el líquido provocando que la cavitación ocurra en una zona más específica, donde es más intensa [12], provocando que el tamaño de las gotas formadas disminuya. El tamaño de gota fina obtenido por estos métodos dependerá de las características del equipo utilizado (e.g. la diferencia de potencial, diámetro de la punta utilizada) y las características del proceso de emulsificación (e.g. tiempo de sonicación, cantidad de fase dispersa, tipo y concentración de emulsificante utilizado). En general, se modifica el tiempo de sonicación para el control de tamaño de gota en la formación de emulsiones, donde un mayor tiempo de sonicación resulta en un tamaño menor de gota [2].

El control en el tamaño de gota de una emulsión está directamente relacionado con



(a) Equipo para baño de ultrasonido.



(b) Procesador ultrasónico con punta.

Figura 1.9. Equipos para aplicación de sonicación en emulsiones.

la biodisponibilidad de las partículas finales obtenidas. En el caso de las partículas de PLGA administradas vía parénteral es necesario que el rango de tamaño se encuentre entre 20 - 100 μm , por otra parte tamaños de partícula menores a 5 μm son utilizadas cuando las partículas desean ser administradas en el sistema respiratorio o directamente en las células fagocíticas, figura [1.10](#) [\[31\]](#).

Además la viscosidad de la fase dispersa debe ser considerada debido a que la formación de las gotas es controlada por fuerzas de inercia, las cuales a su vez dependen de la viscosidad del líquido. Una mayor viscosidad requerirá de mayor intensidad en las fuerza aplicadas para obtener determinado tamaño de partícula. Una mayor viscosidad de la fase dispersa se obtiene aumentando la concentración de polímero o su peso molecular, y este a su vez, incrementara el tamaño de partícula [\[25\]](#).

Por otra parte, el efecto del tamaño de partícula también influirá en el perfil de liberación del compuesto. Fuminori [\[11\]](#), estudió este efecto con la fabricación de partículas monodispersas de PLGA, con diámetros de 1.3, 2.2, 5.2 y 9 μm . Para las partículas con

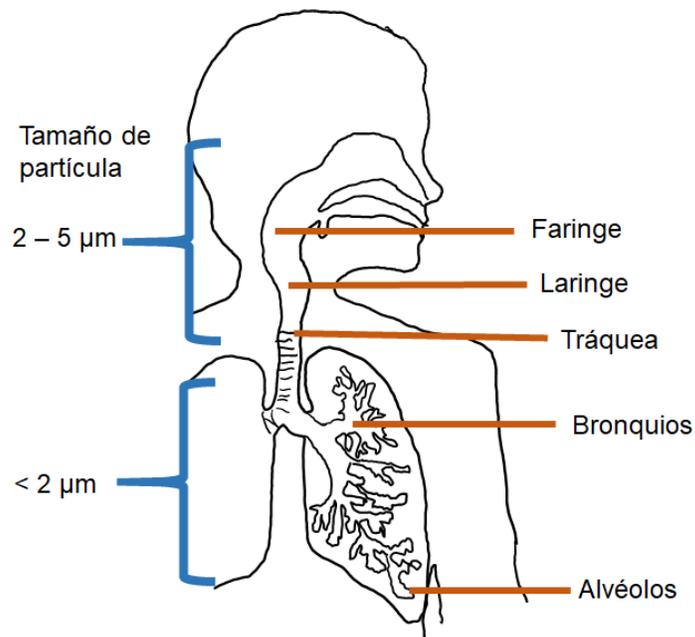


Figura 1.10. Diagrama de la distribución de partículas en el sistema respiratorio.

tamaños menores (1.3 y 2.2 μm) se liberó hasta el 90% de la DE en los primeros 20 días, mientras que para partículas más grandes (5.2 y 9.2 μm) solo se liberó el 75% en el mismo período de tiempo.

Efecto de la temperatura y presión

En la sección [1.6.1](#) se hizo referencia a la velocidad de evaporación del disolvente y sus efectos. Otra forma de acelerar ese proceso es mediante el incremento de la temperatura, sin embargo, el manejo de temperaturas elevadas en la extracción del disolvente resulta en un incremento de la porosidad de la partícula y por lo tanto en menores dosis encapsuladas debido a que el flujo del disolvente a través de la interfase es más rápida y provoca irregularidades en la solidificación de la partícula, causando fracturas [\[42\]](#) (ver figura [1.7](#)).

Asimismo, para seleccionar la temperatura de extracción del disolvente es necesario tomar en cuenta la posible desnaturalización del fármaco encapsulado, la temperatura de ebullición del disolvente y en el caso del PLGA, la temperatura de transición vítrea,

pues el mal manejo de estos parámetros ocasionaran una baja eficiencia de encapsulación.

En el caso de la presión, en recientes estudios [28] para la encapsulación de macromoléculas en P-PLGA solo se ha analizado el uso de presión reducida para disminuir el tiempo de evaporación del disolvente, sin embargo, la eficiencia de encapsulación disminuía en ese caso.

1.7. Encapsulación de fármacos ATB

Históricamente, la encapsulación de fármacos ATB comenzó a finales del siglo XX como una respuesta para resolver el abandono del tratamiento por parte del paciente debido a su larga duración. Este tratamiento mejorado consistió principalmente en la búsqueda de nuevas rutas de administración, lo que disminuye las dosis requeridas, la toxicidad de los fármacos administrados y sobre todo, aumenta la concentración de los antibióticos en el sitio de interés [38].

Las principales rutas de interés para la fabricación de partículas en la mejora del tratamiento de la tuberculosis son la administración vía oral, parénteral y pulmonar (partículas inhalables). Este último de mayor interés debido a que el 80% de los casos de tuberculosis afectan principalmente a los pulmones, por lo tanto, los reservorios de los antibióticos son destinados principalmente a ser entregados en las células macrofagocíticas de los alveólos pulmonares, donde reside la bacteria *M. tuberculosis*.

Diferentes tipos de partículas inhalables han sido creadas a partir del polímero PLGA, ya que no muestra efectos tóxicos ni inflamación en los pulmones después de ser aplicado ya sea a micro escala o nano escala [37], además del control y duración en la liberación del fármaco encapsulado después de ser administradas, pues en varios estudios se concluye que la concentración del fármaco en el plasma sanguíneo perdura durante largos períodos de tiempo. La mayor parte de estos estudios mencionados en la tabla 1.6 se enfoca en la fabricación de partículas como polvos secos que puedan ser dispersados como aerosoles para posteriormente ser administrados por las vías

Tabla 1.6. Reservorios propuestos y evaluados para la entrega de fármacos ATB utilizando PLGA.

Reservorio	Polímero	Fármacos encapsulados	Ventajas	Referencias
Partículas poliméricas	PLGA	Rifampicina, isoniazida, pirazinamida.	Muestra una eliminación efectiva de la bacteria TB , altas concentraciones en el plasma por tiempo prolongado, buena dispersabilidad.	[33], [24], [15], [37], [32]
	Lectina/PLGA	Rifampicina.	Aumento en la biodisponibilidad del tratamiento.	[10]

respiratorias.

Como puede verse en la tabla [1.6](#) la mayor parte de los reservorios fabricados con PLGA están destinados a la encapsulación de la rifampicina, principalmente por las problemáticas de permeabilidad y toxicidad anteriormente mencionadas. La mayor parte de los tratamientos que involucran este fármaco son administrados vía oral, sin embargo, la bacteria suele estar protegida por tejidos fibrosos en los pulmones, dificultando la absorción del fármaco en esa zona y disminuyendo el efecto bactericida.

Encapsulación de rifampicina en P-Poliméricas

En el caso de los fármacos de primera línea, como se muestra en la tabla [1.1](#), la rifampicina ha causado un mayor interés por las problemáticas relacionadas con la solubilidad, absorción en el cuerpo y biodisponibilidad, y en los últimos años se han enfocado en el estudio de las técnicas de encapsulación de este fármaco para mejorar su farmaco-cinética y optimizar el tratamiento terapéutico.

La rifampicina es un antibiótico semi sintético de amplio espectro, utilizado para el tratamiento de la tuberculosis. Fue desarrollado por el laboratorio Dow-Lepetit (Milan, Italia) en 1965, y fue introducido para su uso terapéutico en 1968. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se describen en la tabla [1.7](#).

En disolución, la rifampicina se comporta como un compuesto zwitterion, es decir,

es una molécula eléctricamente neutra pero con cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. Su comportamiento ácido ($pK_a = 1.7$) está asociado a sus grupos hidroxilo, mientras que su función básica ($pK_a = 7.9$) está relacionada con el grupo piperazina-nitrógeno, figura [1.11](#).

La rifampicina se considera un compuesto hidrofóbico, por lo que suelen utilizarse métodos que involucren emulsiones con disolventes orgánicos para su encapsulación ya que presenta una mayor solubilidad y estabilidad en estos, tabla [1.8](#). Sin embargo, la rifampicina es ligeramente soluble en agua y esta solubilidad es dependiente del pH y la temperatura. Su solubilidad en agua a 25°C es aproximadamente de 0.1 g/mL a un pH 2.0, 0.004 g/mL a un pH de 5.3, y aproximadamente 0.0028 g/mL a un pH 7.5 [\[18\]](#). No obstante, en disoluciones acuosas la rifampicina es altamente inestable. A pH bajos (2 - 3) la rifampicina es hidrolizada en 3-formyl-rifamycin SV y 1-amino-4-metil-piperazina; y en medios alcalinos la rifampicina tiende a oxidarse en rifampin-quinona. Estas propiedades tienen efecto en la fármaco-cinética y dificultan la biodisponibilidad del fármaco. Además la rifampicina suele ser incómoda para los pacientes por la coloración roja que causa en la orina, esputo y lágrimas. Otros efectos comunes son complicaciones gastro intestinales, fallas hepáticas y algunos efectos en el sistema nervioso como mareos, visión borrosa y náuseas. Para disminuir estos efectos, suele administrarse acompañada de otros fármacos como la isoniazida. La encapsulación de rifampicina en partículas poliméricas inhalables han mostrado diversas ventajas [\[19\]](#) como:

- Administración no invasiva
- Penetración de los tejidos fibrosos de los pulmones
- Evita que sea metabolizada vía hepática
- Efectivo contra la bacteria que se encuentre en la periferie del sistema respiratorio.
- Altas concentraciones de rifampicina en el revestimiento epitelial y la mucosa bronquial.

Estas nuevas capacidades permiten aminorar efectos secundarios y hacer más cómodo el tratamiento contra la tuberculosis, evitando que el paciente abandone el tratamiento y por ende, la resistencia a la rifampicina disminuya.

Un estudio llevado a cabo por O' Hara y Hickey [31] comparó la producción de micro-partículas cargadas con rifampicina inhalables utilizando el polímero PLGA mediante el método de emulsión por extracción, y por otro lado utilizando el método *spray drying*; con el fin de definir parámetros para predecir el perfil de liberación y la eficiencia de encapsulación. Los parámetros estudiados fueron: concentración de surfactante, volumen de la fase dispersa, cantidad de fármaco en la fase dispersa, volumen de la fase continua y temperatura de evaporación. Donde concluyeron principalmente los siguientes efectos de manera general para ambos métodos:

- La disminución del volumen del disolvente de la fase dispersa por debajo de 3 mL y el incremento del fármaco más allá de 100 mg resuelta en una mayor dosis encapsulada y menor tamaño de partícula.
- Conforme menor sea el tamaño de las moléculas del fármaco a encapsular, se observa una mayor concentración en la superficie de las partículas.
- La porosidad de la partícula es un determinante mayor en el área total de la superficie que el tamaño de partícula.
- Un tamaño de partícula menor provoca una liberación más rápida.
- La porosidad interna en la partícula aumenta utilizando una menor cantidad de polímero en la fase dispersa.

Finalmente, reportan tamaños irregulares para el método de *spray drying* y tamaños más definidos con el método de emulsión por extracción de disolvente. Concluyeron que la diferencia en la morfología de la partícula es un factor que contribuye en el *initial burst* durante la liberación (el cual fue mayor en el caso del método *spray drying*).

Años más tarde, Pandey y Khuller en 2003 [33] investigaron la encapsulación de los antibióticos ATB de primera línea en nanopartículas preparadas por el método de

Tabla 1.7. Propiedades fisicoquímicas de la rifampicina.

Nombre compuesto	Rifampicina
Fórmula	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂
Masa molecular	822.94 g/mol
Solubilidad	Altamente soluble en DMSO, medianamente soluble en etil acetato, metanol, tetrahidrofurano, diclorometano. Ligeramente soluble en acetona y agua.
Dependencia con pH	pKa's: 1.7 para 4-hidroxi y 7.9 para el 3-piperazin nitrogeno, figura 1.11

emulsión por extracción de disolvente utilizando al poli(D,L-ácido láctico co glicólico), y comprobaron su potencial terapéutico probando en modelo conejillos de India. Tuvieron una eficiencia de encapsulación del 56.9, 66.3 y 68.0 % para rifampicina, isoniazida y pirazinamida, respectivamente, para partículas con tamaños entre 186 y 290 nm.

Pese a los diversos estudios con rifampicina, pocos autores mencionan de manera sistemática el estudio de la encapsulación de este fármaco, pues solo se encuentra información de casos particulares donde se concentran más en el estudio biológico de la fabricación de partículas.

El presente proyecto tiene como objetivo la optimización más sistemática de la encapsulación de fármacos hidrofóbicos como la rifampicina siguiendo la metodología de Pandey, la cual mostró un mayor rendimiento para la rifampicina, para su encapsulación en PLGA, y posteriormente, aplicar la metodología mejorada en la encapsulación de otros compuestos activos contra la tuberculosis.

1.8. Posibles compuestos ATB

A partir del año 2000, se ha enfocado el estudio de posibles compuestos con propiedades antibióticas. Se ha utilizado la química informática para la identificación de compuestos activos, la selección de estos y la optimización de su síntesis. Katsuno y su equipo han publicado un resumen de los criterios a considerar para el desarrollo de nuevos compuestos activos contra la tuberculosis, entre los que podemos destacar:

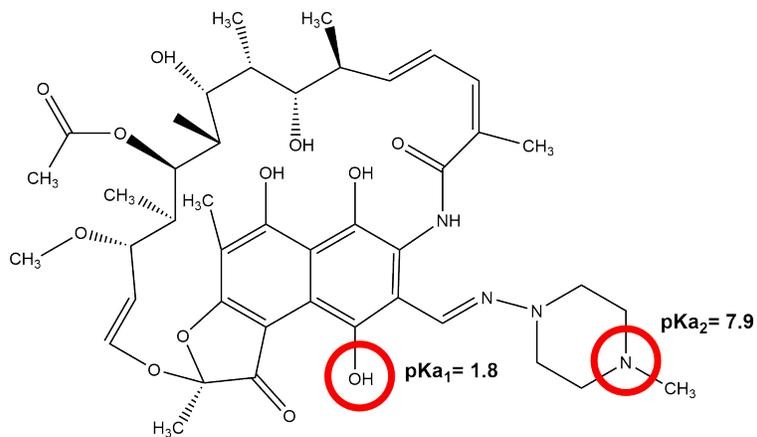


Figura 1.11. Estructura química de la rifampicina.

Tabla 1.8. Solubilidad de la rifampicina en distintos disolventes orgánicos.

Disolvente orgánico	Solubilidad (mg/mL)
Alcohol metílico	39
Alcohol etílico	5
Acetona	14
Cloroformo	39
Diclorometano	216
n-Hexano	0.43
Dimetil sulfóxido	≈ 100

- Índice de selectividad $SI > 10$
- Concentración inhibitoria mínima (MIC) menor a $10 \mu\text{M}$
- Propiedades antibióticas

Otro criterios utilizado para determinar si un compuestos es considerado como un posible agente ATB, es su actividad contra *M. tuberculosis* que haya presentado resistencia a alguno de los fármacos ATB, como isoniazida o rifampicina, lo que indica un nuevo mecanismo de acción distinto a los que esos fármacos presentan. Martínez [26] definió en sus estudios que el efecto ATB de algunas moléculas depende de la aromaticidad del anillo en los heterociclos, específicamente si existe un grupo amida y si el anillo en sí posea baja aromaticidad (fenilo < tiofeno < pirrol < furano). Un grupo de compuestos, estudiados por este autor, como posibles precursores para la síntesis de nuevos compuestos ATB son las benzoazepintionas. Estas moléculas consisten en un tipo de biciclos que poseen en su estructura el anillo de benceno fusionado a una tiolactama de 7 miembros. Se ha descrito que las benzoazpintionas 1-4, figura 1.12, presentan actividad inhibitoria de transporte de poliaminas, las cuales participan en la regulación metabólica de algunas bacterias [1]. Martínez et al hacen uso de las características estructurales y las emplean como bloques de construcción modificando los grupos que la conforman, volviendolas benzoazepintionas más complejas con distintas propiedades antibióticas contra tuberculosis. Un ejemplo fue la molécula sintetizada por Becerra y Martínez [1], la 7-(2-cloroetoxi)-1,3,4,5.tetrahidro-2H-benzo[b]azepin-2-tiona (compuesto 37), figura 1.13, la cual mostró actividad contra la tuberculosis con un valor de concentración mínima inhibitoria (MIC) de $7.8 \mu\text{g/mL}$, donde la adición del grupo cloro aumenta su actividad ATB.

1.9. Caracterización de P-PLGA

La caracterización de las partículas poliméricas consiste en el análisis físico y químico para conocer las principales propiedades del material. Esta caracterización es fun-

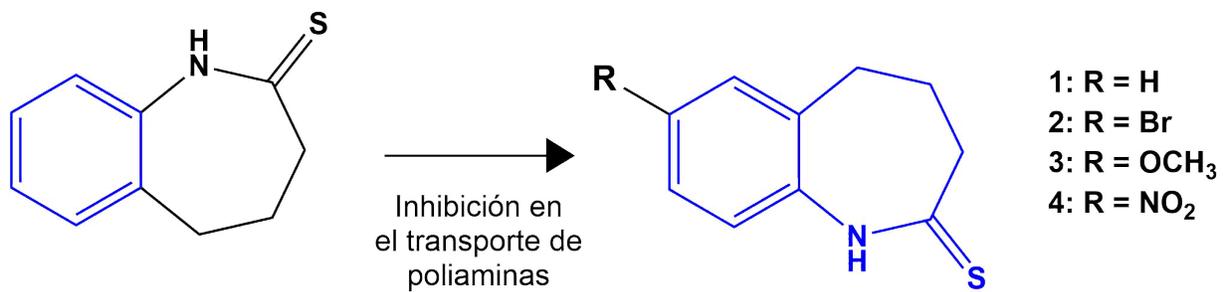


Figura 1.12. Actividad biológica reportada para la benzoazepintionas sustituida como se indica.

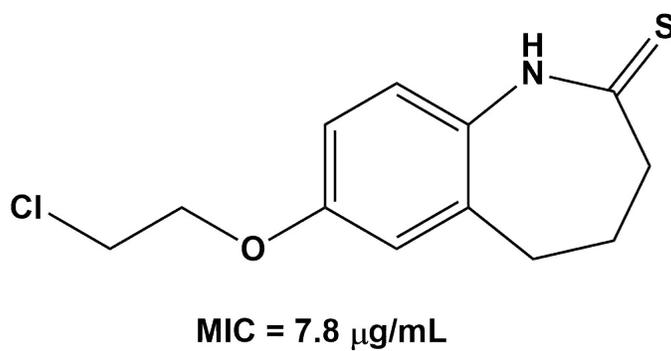


Figura 1.13. Compuesto 37 con actividad anti tuberculosis.

damental para optimizar el proceso de fabricación de partículas.

En la elaboración de partículas poliméricas de PLGA, la caracterización física consiste en determinar la morfología de las partículas obtenidas. La técnica más utilizada para llevar a cabo este tipo de análisis es la microscopía electrónica de barrido SEM, con la cual se caracterizan la forma, distribución y agregación de las partículas.

Por otro lado, los estudios para determinar la eficiencia de encapsulación y el perfil de liberación se fundamentan en el análisis espectrofotométrico de medios que contengan a las partículas.

1.9.1. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido se basa en la emisión de electrones desde un cátodo de tungsteno que pasan a través de una columna a la que se ha hecho un vacío de alrededor de 10^{-7} torr. Este haz de electrones es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas hasta ser llevado a un área de la muestra a analizar. Cuando el haz de electrones impacta la superficie de la muestra, se producen electrones secundarios los cuales amplifican la información sobre la muestra. Estos electrones secundarios son captados por un detector y procesados como fotones, los cuales dan lugar a la imagen obtenida.

En esta clase de microscopios, las muestras no conductoras (e.g. polímeros, muestras orgánicas, vidrios) son recubiertas con metales (e.g. carbono, oro) para evitar carga eléctrica y daño por radiación, lo que permite mayor precisión en la observación.

La ventaja del uso de estos equipos son la alta resolución de las imágenes (hasta 100 Å) y la sencillez en la preparación de las muestras.

1.9.2. Espectrofotometría de UV-visible

La espectrofotometría está basada en la absorción de luz por una sustancia, lo que genera información sobre las transiciones electrónicas del material analizado. Cada material se caracteriza por la presencia de transiciones electrónicas, las cuales ocurren

por efecto de la luz absorbida a distintas longitudes de onda. Cada molécula tiene las transiciones electrónicas características lo que da información sobre la identidad de la muestra y resulta útil en la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos que absorban luz en determinadas regiones del espectro.

La región UV- visible comprende el rango de longitudes de onda de 195 a 780 nm del espectro. Dentro de este rango se encuentran compuestos que presentan color visible por el ojo humano o absorben en el rango UV.

La relación entre el haz de fotones incidente y el transmitido por la muestra, es la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \log_{10} I_0/I_t = \epsilon dC. \quad (1.3)$$

Donde A representa la absorbancia (energía absorbida por la muestra), ϵ es el coeficiente de extinción con valores específicos para cada compuesto, I_0 la intensidad de luz que incide perpendicularmente sobre un compuesto químico a analizar. El valor I_t es la intensidad de la luz transmitida (no absorbida por la muestra) detectada por el espectrofotómetro. Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales, la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a determinada longitud de onda, y el valor de la absorbancia es $\log(1)=0$.

La ecuación [1.3](#) expresa que la absorción de energía por parte de una sustancia a una longitud de onda determinada es proporcional a su concentración, esta ecuación se cumple para disoluciones diluidas. Para concentraciones más altas se deben considerar efectos de dispersión de luz, agregación, cambios en el medio, entre otros, los cuales cambian el valor de ϵ .

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivos generales

Obtención de una metodología optimizada para la fabricación de partículas con base en el poli(D,L ácido láctico-co-glicólico) PLGA, cargadas con sustancias hidrofóbicas activas contra la tuberculosis, que posean una liberación prolongada a través de las partículas.

2.2. Objetivos particulares

- Estudio de la metodología de obtención de P-PLGA cargadas con fármacos hidrofóbicos con actividad antituberculosis para determinar los principales parámetros que afecten en el proceso.
- Caracterización cuantitativa de la eficiencia de encapsulación y dosis encapsulada del método para determinar el efecto que tienen los parámetros del proceso.
- Aplicación de la metodología optimizada en la encapsulación de nuevos compuestos activos contra la tuberculosis sintetizados por el departamento de Química Orgánica del Instituto de Química, UNAM.

Capítulo 3

Metodología

La metodología puede ser resumida en las siguientes etapas:

- Etapa 1 Elaboración de partículas mediante la técnica de extracción de disolvente para la encapsulación de rifampicina y el compuesto 7-metoxi-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-tiona (SB38).
- Etapa 2 Caracterización de partículas. Mediante el uso de técnicas de Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica se obtiene información sobre tamaño y morfología de partícula. Utilizando técnicas de espectrofotometría, la concentración del compuesto encapsulado es calculada para determinar la eficiencia de encapsulación y a partir de este parámetro seleccionar las variables con mayor impacto.
- Etapa 3 Variación de los parámetros principales definidos. Esta etapa tiene como objetivo el estudio del efecto de las condiciones de fabricación en la eficiencia de encapsulación.
- Etapa 4 Estudios de liberación del compuesto encapsulado a través de las partículas obtenidas.

Estas etapas están relacionadas entre sí con el objetivo de determinar un intervalo de condiciones óptimas para la aplicación del método de emulsión por extracción de di-

solvente en el encapsulamiento de otros compuestos hidrofóbicos con actividad contra la tuberculosis, tomando como base el fármaco rifampicina.

3.1. Fabricación de partículas poliméricas cargadas

Las partículas fueron preparadas mediante emulsión por extracción de disolvente. Esta técnica consiste en la preparación de una emulsión simple de disolvente orgánico en agua (o/w) compuesta de la siguiente manera:

Fase dispersa.

Para la preparación de la fase dispersa (o), los reactivos utilizados fueron: polímero poli(DL ácido láctico - co - glicólico), PLGA con una composición de ácido láctico : ácido glicólico de 50:50 Resomer RG Mw 54,000 - 69,000 (Sigma Aldrich), el disolvente orgánico volátil diclorometano anhídrido $\geq 99.8\%$ (Sigma Aldrich) el cual tiene una temperatura de ebullición entre 39.8 y 40.0 °C.

Debido a las propiedades hidrofóbicas de los compuesto utilizados, estos son incorporados en la fase dispersa. El fármaco base utilizado fue rifampicina en polvo $\geq 97\%$ grado HPLC (Sigma Aldrich).

Para simplificar la información de las muestras realizadas, se determinó el coeficiente Omega Ω que expresa la relación entre la masa del compuesto encapsulado (m_f) y la masa polímero PLGA (m_p)

$$\Omega = \frac{m_f}{m_p} \quad (3.1)$$

Un valor menor de $\Omega < 1$ indica que se utilizó una menor cantidad de compuesto que de polímero, así como un valor mayor a uno indica mayor cantidad de polímero utilizado. Un valor de $\Omega = 1$ indica una relación 1:1 en masa entre el fármaco y el polímero disueltos en la fase dispersa (o).

Fase continua. En este caso, se utilizó una disolución fija de poli(vinil alcohol) (PVA) Mw 13,000-23,000 86-89% hidrolizado (Sigma Aldrich) al 1% masa/volumen en agua grado Milli - Q.

El proceso de elaboración de las partículas consiste en la emulsificación de la fase continua y dispersa utilizando un homogeneizador ultrasónico.

Posteriormente, el disolvente diclorometano es evaporado y debido a la naturaleza hidrofóbica del polímero utilizado, las gotas formadas en la emulsión se solidifican formando partículas.

Después de la extracción del disolvente las partículas son recuperadas mediante centrifugación a 9000 rpm, utilizando agua milli Q fría (10 °C) entre cada lavado. Finalmente, las partículas recuperadas son dispersadas en un volumen de 2 mL de agua MQ y congeladas a -20 °C para posteriormente ser secadas mediante liofilización, figura 3.1.

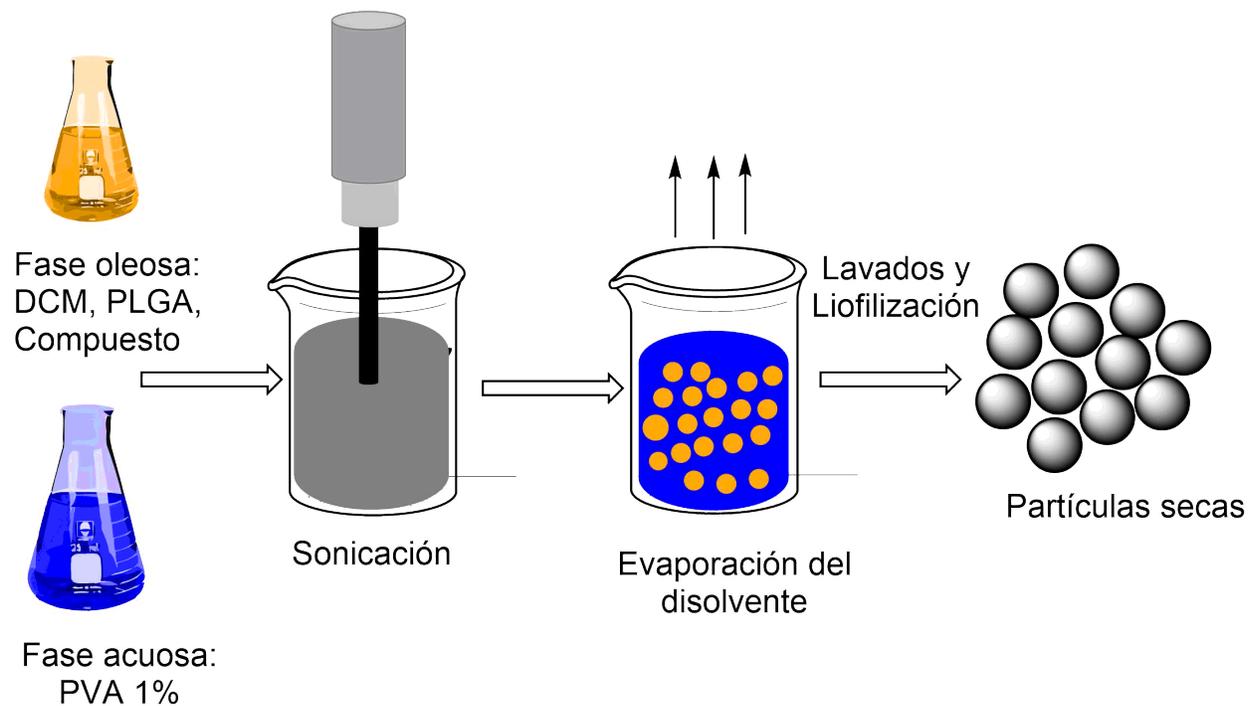


Figura 3.1. Fabricación de partículas cargadas con compuestos ATB mediante emulsión por extracción de disolvente.

3.2. Parámetros de fabricación estudiados

Los parámetros iniciales se basaron en la metodología descrita por Pandey [33] como muestra la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Comparación de condiciones utilizadas para el estudio.

Parámetros utilizados por Pandey,[33]	Parámetros iniciales seleccionados
8 mL fase continua Vw	9 mL fase continua Vw
10 mL fase dispersa Vo (relación polímero- fármaco 1:1 en masa)	1 mL fase dispersa Vo (relación polímero-fármaco 1:1 en masa)
3min de ultrasonificación	3 min de ultrasonificación,
Partículas recuperadas por centrifugación	Partículas recuperadas por centrifugación
a 8 000 - 10 000rpm, 15min.	a 9000 rpm, 40 min.
Lavados 3 veces con agua destilada y secadas a vacío.	Lavados 3 veces con agua destilada y secadas por liofilización.

La relación 1:1 en masa descrita en la tabla 3.1 es el equivalente a un valor de $\Omega = 1$.

A continuación, se describen los parámetros estudiados para la optimización de la dosis encapsulada y la eficiencia de encapsulación utilizando rifampicina como compuesto a encapsular.

3.2.1. Temperatura de extracción del disolvente

Mediante la variación de este parámetro se determinará una temperatura de trabajo óptima para la extracción del disolvente diclorometano, tomando en cuenta la energía requerida para el proceso, la temperatura de transición vítrea del polímero utilizado y la temperatura de ebullición del disolvente. Una vez realizado esto, el parámetro de temperatura se mantuvo constante en el análisis de los parámetros posteriores.

Las condiciones que se mantuvieron constantes para el estudio de la temperatura de extracción son las descritas en la tabla 3.1 y el intervalo de temperatura de extracción

analizadas se describen en la tabla [3.2](#).

Tabla 3.2. Variación de la temperatura de evaporación del disolvente.

Muestra	Temperatura de evaporación del disolvente
CR18	25°C
CR21	25°C ¹
CR19	32°C
CR20	50°C

En el caso de las muestras CR19 Y CR20, se utilizó un baño maría para mantener la temperatura de extracción deseada, mientras que para las muestras CR18 y CR21, la temperatura indicada en la tabla [3.2](#) es aquella medida en condiciones normales de cuarto de trabajo, también referida como temperatura ambiente.

3.2.2. Relación fármaco-polímero en la fase dispersa

El objetivo del estudio de la relación de cantidad de fármaco y polímero utilizado fue determinar un intervalo en el cual la eficiencia de encapsulación y la dosis encapsulada incrementa. Se utilizó principalmente el valor del factor Ω (ecuación [3.1](#)) para una mejor visualización de esta tendencia.

Las condiciones que se mantuvieron constantes en este caso fue el volumen de fase oleosa y fase acuosa utilizado, el tiempo de sonicación, el número de lavados, la temperatura de extracción del diclorometano, así como las condiciones de lavado y secado por liofilización.

El rango de valores utilizados para el análisis de Ω fue de 0.2 a 2.0, tabla [3.3](#)

¹Condiciones de vacío

Tabla 3.3. Condiciones para el estudio del efecto del valor de Ω .

Muestra	Ω (mg/mg)
PR1	0.2
PR3	0.6
PR5	1.0
PR32	1.5
PR33	2.0

3.2.3. Lavados de la muestra

Debido a la posible presencia de fármaco en la superficie de las partículas, se incluyó el número de lavados de muestra como un parámetro variable. Las condiciones fijas fueron las siguientes: $V_o = 1$ mL, $V_w = 1$ mL, tiempo de sonicación = 3 min, y una temperatura de evaporación de disolvente de 50°C. El número de lavados estudiados en esta sección se muestran en la tabla 3.4. Cada lavado tuvo una duración de 40 min, a una velocidad de 9000 revoluciones por minuto (rpm), se utilizó agua Milli-Q a 10 °C. El volumen de agua utilizado entre cada lavado fue de 20 mL, la muestra fue dispersada en una bañera de ultrasonido entre cada lavado.

Finalmente, las muestras fueron dispersadas en un volumen de 2 mL, y fueron secadas mediante liofilización.

Tabla 3.4. Variación en el número de lavados de muestra.

Muestra	mg PLGA	Ω	Lavados
CR3	60.3	0.5	8
CR8	61	0.5	4
PR38	30.4	1	4
CR27	29.0	1	2

3.2.4. Volumen de fase dispersa en la emulsión

Las condiciones fijas para el estudio de la relación de volumen entre la fase dispersa y continua fueron: $\Omega = 1$, tiempo de sonicación (tabla 3.1), condiciones de lavados (tabla 3.1) y secado por liofilización. Los volúmenes utilizados para el estudio de este parámetro se describen en la tabla 3.5, manteniendo constante un volumen total (V_o+V_w) igual a 10 mL para poder comparar los resultados con las muestras anteriormente sintetizadas.

Tabla 3.5. Efecto de la variación del volumen de fase dispersa V_o y fase continua V_w .

Muestra	V_o	V_w
PR5	1 mL	9 mL
PR41	2 mL	8 mL
PR42	3 mL	7 mL
PR43	4 mL	6 mL
PR45	6 mL	4 mL

3.2.5. Tamaño de partícula

La emulsificación mediante procesador ultrasónico permite controlar el tamaño de las gotas formadas dependiendo de la amplitud, tiempo y potencia del equipo utilizado. Para este proyecto, se utilizó el equipo dejando fijas las condiciones de potencia y porcentaje de amplitud, 100 W y 20 % respectivamente, de acuerdo a las indicaciones del equipo con respecto al volumen a homogeneizar y el tipo de punta utilizada. El parámetro estudiado para variar el tamaño de partícula obtenido fue el tiempo de sonicación, ya que se espera que al modificar el tamaño de las gotas al formar la emulsión, el tamaño de las partículas sólidas cambie.

Por otro lado, para la obtención de gotas más grandes en la emulsión se utilizó la técnica de microfluídica, la cual consiste en la elaboración de canales a escala micrométrica con los cuales se obtienen gotas con determinado tamaño y homogeneidad,

en este trabajo se empleó un chip pre - fabricado cuyas características se muestra en la imagen [3.2](#), donde la velocidad de entrada de la fase dispersa a los canales es de 20 mL/h utilizando una bomba de inyección, figura [3.3](#).

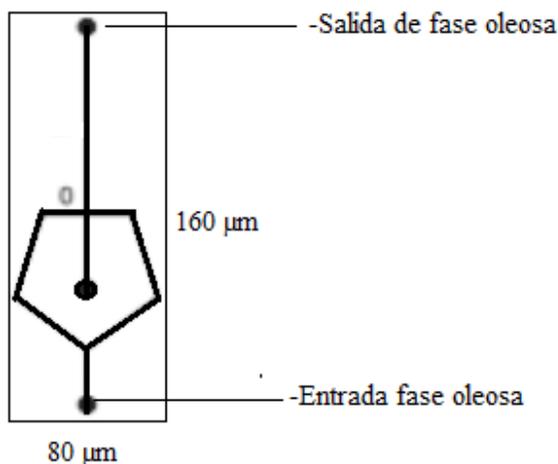


Figura 3.2. Molde del microchip para fabricación de gotas de fase oleosa por micro-fluídica.

Las condiciones fijas para el estudio del efecto del tamaño de partícula fueron las siguientes: $\Omega = 1$, volumen en la fase oleosa y acuosa (1 mL DCM, 9 mL PVA 1 %), número de lavados y condiciones de secado como se indican en la tabla [3.1](#).

Tabla 3.6. Condiciones de homogenización para el estudio del efecto de tamaño de partícula.

Muestra	Condiciones de homogenización
CR29	1 min sonicación ultrasónica
CR27	3 min sonicación ultrasónica
MC2	Microchip 20 mL/h

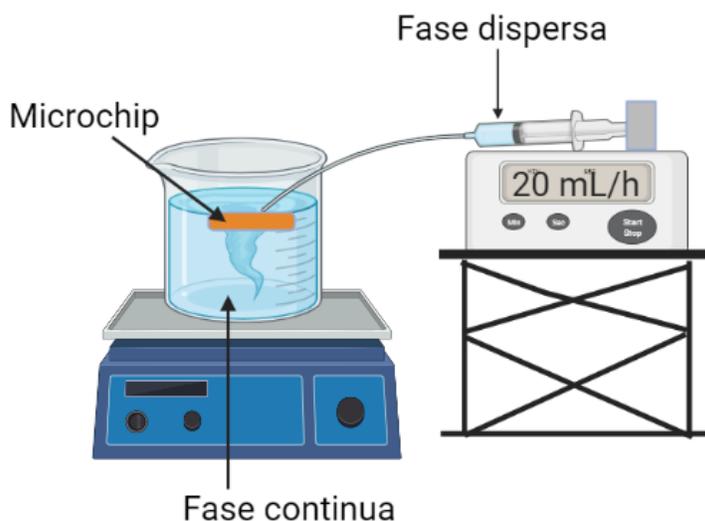


Figura 3.3. Esquema del montaje para fabricación de partículas mediante microchip.

3.2.6. Uso de otros compuestos activos contra la Tuberculosis

Una vez determinados los parámetros que presenten una mejor eficiencia de encapsulación, se procede a la fabricación de partículas cargadas con otro tipo de compuestos que tengan propiedades hidrofóbicas y sean activos contra la tuberculosis. En este caso se utilizó el compuesto 7-metoxi-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-tiona (Compuesto SB38, figura 3.4) el cual también es soluble en diclorometano. Este compuesto fue enviado al Instituto de Investigaciones Biomédicas para la identificación de su actividad inhibitoria contra la *M. tuberculosis* y establecer la concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento bacteriano (IC_{50}) y la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre la cepa *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 aplicando el método de reducción por resazurina [35]. Los resultados se muestran en la tabla 3.7.

Como se ve en la tabla anterior, el compuesto SB38 es deficiente en la inhibición de la cepa de *M. tuberculosis*, sin embargo, como se menciona en el marco teórico, esta molécula es útil como precursor para nuevos compuestos ATB por lo que se concluye que es conveniente utilizarlo para analizar su comportamiento desde un punto de vista fisicoquímico dentro de las partículas de PLGA como compuesto hidrofóbico.

Tabla 3.7. Valores obtenidos de actividad inhibitoria del compuesto SB38 y rifampicina.

Compuesto	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Rifampicina	>1000	0.06
SB38	221	250

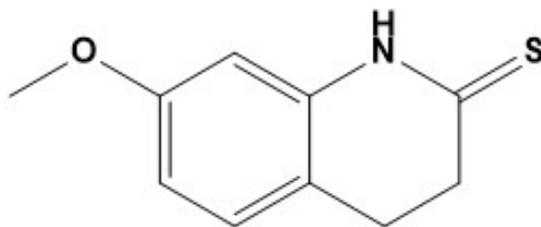


Figura 3.4. Estructura química del compuesto SB38.

Se compararon las eficiencias de encapsulación obtenidas con el compuesto SB38 y aquellas obtenidas con el fármaco base rifampicina, las condiciones estudiadas en el caso del compuesto SB38 se describen en la tabla [3.8](#). Las condiciones fijas para su fabricación fue el volumen de fase dispersa y fase continua ($V_o = 1\text{mL}$, $V_w = 9\text{mL}$), tiempo de sonicación de 3 min, temperatura de evaporación a condiciones ambiente (25°C , presión atmosférica). La recuperación de las partículas fue mediante centrifugación mediante 3 lavados de muestra con una duración de 40 min cada uno a 9000 rpm.

3.3. Caracterización de partículas obtenidas

A continuación se describen los estudios realizados de caracterización física y química de las partículas obtenidas.

Tabla 3.8. Tabla de condiciones variables para el estudio del efecto del uso de otros compuestos en la encapsulación.

Muestra	Ω	Compuesto encapsulado	Comparada con: (muestras con Rifampicina cargada)
CT2	0.2	SB38	PR1
CT5	0.5	SB38	CR9
CT6	1.0	SB38	CR3 y CR8

3.3.1. Tamaño de partícula y morfología

Las partículas obtenidas fueron visualizadas por la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) en un equipo de Ultra-Alta Resolución JSM-7800F Jeol, Japón. Con una espátula se tomó una muestra de partículas secas con una masa menor a 1 mg, y fue colocada sobre una cinta de carbono colocada sobre un portamuestra cilíndrico de aluminio. Este cilindro se introdujo en el portamuestra del microscopio. Para la captura de imágenes se utilizó una diferencia de potencial 5 kV y magnificaciones entre $5\,000\times$ y $20\,000\times$.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas en Digimizer. En este software se introduce la escala de la imagen y mediante la función «circle», se mide el radio de 91 partículas. Posteriormente, mediante el software OriginLab se aplica el análisis estadístico de los datos de tamaño promedio, lo que resulta en una curva diferencial en forma de histograma de las frecuencias para cada tamaño obtenido. Se ajusta una curva Gaussiana a este gráfico, la cual es descrita con la ecuación [3.2](#):

$$y = y_0 + Ae^{-\frac{(R - R_p)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.2)$$

donde y representa la frecuencia de cierto radio de partícula R_p en el conjunto de datos, y_0 es un valor de ajuste inicial, A es la amplitud de la curva y σ es la desviación estándar que representa la proximidad con los valores de R respecto a R_p .

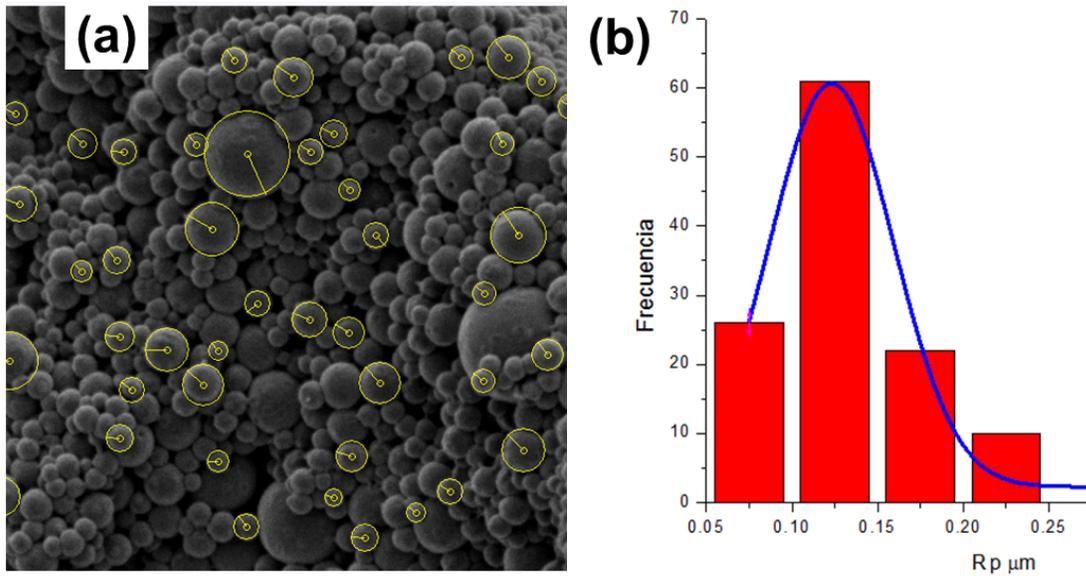


Figura 3.5. (a) Medición del radio de partícula en Digimizer, (b) Distribución de tamaños de partículas cargadas.

El índice de polidispersidad (PDI) nos indica la distribución de tamaños de partícula obtenido. Este parámetros es calculado mediante la ecuación:

$$PDI(\%) = \left(\frac{\sigma}{R_p} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

Un bajo valor de PDI indica que una muestra tiene una distribución más homogénea en el tamaño de partícula, mientras que altos valores de PDI indica una distribución de tamaños más amplia, o heterogénea.

3.3.2. Determinación de DE y EE

Correspondiente a la tercera etapa, se determinó la metodología analítica más adecuada para la cuantificación del fármaco base (rifampicina) y los compuestos estudiados, para obtener datos correspondientes a la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación de cada muestra.

Se seleccionó la espectrofotometría en el rango ultravioleta a visible ($\lambda = 200 - 1000$ nm) como método de cuantificación, debido al intervalo de absorción del fármaco base.

En el caso de las partículas que contienen rifampicina se toma una muestra de 2 mg de partículas secas y es disuelta en 5 mL de dimetil sulfóxido (Sigma Aldrich pureza $\geq 99.5\%$), para asegurar las condiciones en las que todo el fármaco (rifampicina) es liberado, pues en este disolvente tanto la rifampicina como el polímero seleccionado son altamente solubles y estables, **1.8**. Posteriormente, la disolución es analizada por espectrofotometría en el rango UV - visible.

Mediante una curva de calibración, con la absorbancia en la banda a 483 nm a distintas concentraciones en el rango de 0.025 mg/mL a 4.5×10^{-4} mg/mL, se obtiene el valor de concentración de rifampicina (mg) por volumen de disolvente DMSO (mL). Para el cálculo de la dosis encapsulada, el valor de concentración es multiplicado por el volumen de disolvente utilizado en el análisis y dividido por la cantidad de partículas utilizadas en la determinación. La eficiencia de encapsulación es calculada mediante la ecuación dividiendo el valor de dosis encapsulada entre la masa nominal del compuesto utilizado para la fabricación de la muestra.

La dosis encapsulada ($\mu g_c/mg_p$) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación fueron utilizados como indicadores para seleccionar los parámetros de fabricación que influyen más en la metodología seleccionada. Un alto valor de dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación es preferible cada serie de experimentos llevados a cabo.

3.4. Estudios de liberación

Se seleccionaron muestras específicas para determinar el impacto de los parámetros estudiados en el perfil de liberación del fármaco base a través de las partículas obtenidas.

El método utilizado para la evaluación del perfil de liberación fue la técnica de diálisis. Esta estrategia consiste en adicionar 3 mg de partículas secas en una bolsa de membrana de diálisis (SnakeSkin Dialysis Tubing 10 000 MWCO), y sujetarla con hilo nylon dentro de un vial que contiene al medio de liberación, 10 mL de buffer de fosfatos a pH 7.2, a una temperatura aproximada de $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con una agitación constante de 250 rpm.

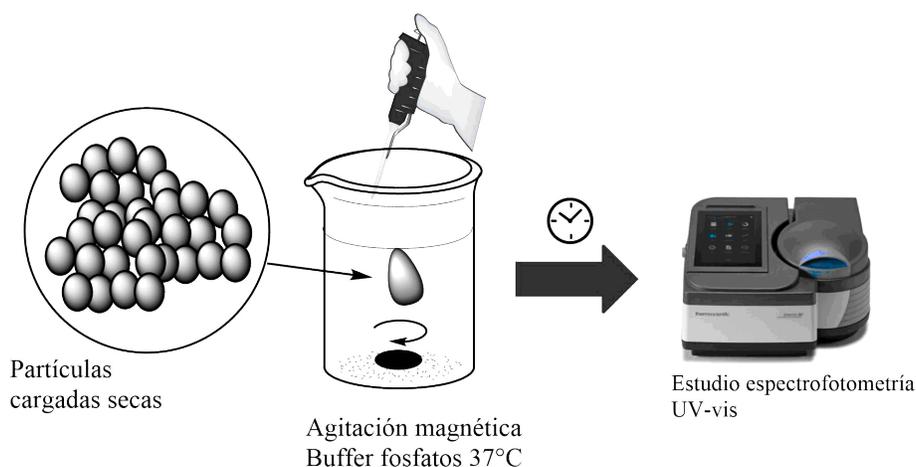


Figura 3.6. Metodología para los estudios de liberación mediante membrana.

Muestras de 2 mL del sobrenadante son tomadas cada media hora durante un total de aproximadamente 30 h (1800 min) para ser analizadas mediante espectrofotometría UV-visible para determinar la concentración de compuesto liberado mediante una curva de calibración que relaciona la concentración del fármaco en la disolución buffer con la banda típica presentada en el espectro en el rango UV-visible. El análisis se llevó a cabo sin reposición del medio, manteniendo una concentración en el medio menor a la concentración de saturación ($2.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ para un $\text{pH} = 7$), por lo que se espera mantener condiciones «sink» y obtener una cinética de orden cero u orden uno en la liberación.

Capítulo 4

Resultados y discusión

Se obtuvieron exitosamente partículas mediante la metodología descrita en la tabla [3.1](#). Se sintetizaron partículas libres de compuesto, partículas cargadas con rifampicina y partículas con compuesto SB38. Dichas partículas tienen un aspecto físico de polvo, y aquellas cargadas con rifampicina presentaron un color rojizo-naranja característico. Por otro lado cuando estaban cargadas con el compuesto SB38 o vacías eran incoloras, como se muestra en la figura [4.1](#). Mediante microscopía electrónica de barrido se observa que la mayoría de las partículas obtenidas tienen un tamaño entre 100 y 400 nm, con forma esférica y superficie lisa, figura [4.2](#).

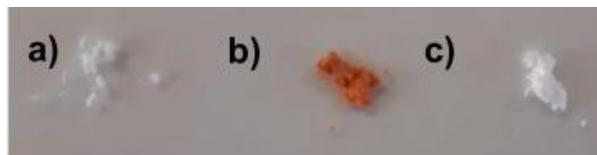


Figura 4.1. Partículas secas de PLGA obtenidas: (a) vacías, cargadas con (b) rifampicina, (c) SB38.

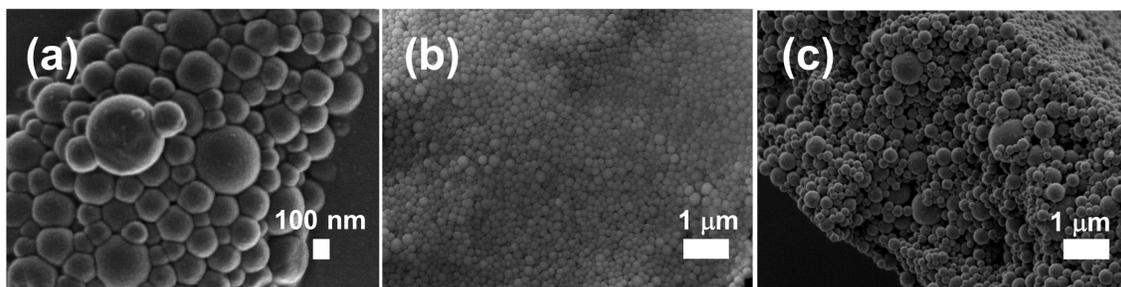


Figura 4.2. Imágenes SEM de partículas de PLGA obtenidas, (a) partículas vacías, (b) cargadas con rifampicina, (c) cargadas con SB38.

4.1. Curvas de calibración de espectrofotometría UV-visible

El espectro de absorbancia de la rifampicina en DMSO presenta una banda particular a una longitud de onda de 482 nm, figura 4.3. La absorbancia en esta longitud de onda aumenta con respecto a la concentración. La curva de calibración se llevó a cabo relacionando los valores de absorbancia con diferentes disoluciones de concentración definida entre 0.025 a 4.5×10^{-4} mg/mL en esa longitud de onda, figura 4.3a. La ecuación 4.1 es el resultado de una regresión lineal para la dependencia de la absorbancia a 482 nm con la concentración de rifampicina en DMSO (mg/mL), figura 4.3b.

Mediante estos datos se definió la ecuación:

$$Abs_{RIF} = -1.54 \times 10^{-3} + 18.92C_{RIF}, \quad (4.1)$$

donde Abs_{RIF} es la absorbancia a 482 nm y C_{RIF} es la concentración de rifampicina en DMSO expresada en mg/mL. El valor C_{RIF} es utilizado para el cálculo de la dosis encapsulada y la eficiencia de encapsulación de rifampicina en las partículas obtenidas.

En el caso del compuesto SB38, la curva de calibración se hizo con disoluciones de concentraciones en el rango de 5×10^{-4} - 3.55×10^{-3} mg/mL utilizando como disolvente el diclorometano, a una longitud de onda de 311 nm, figura 4.4a. La curva de calibración obtenida para el compuesto SB38 se muestra en la ecuación 4.2:

$$Ab_{SB38} = 8.95 \times 10^{-3} + 169.75C_{SB38}, \quad (4.2)$$

donde Ab_{SB38} es la absorbancia a $\lambda = 311$ nm, y C_{SB38} la concentración del compuesto SB38 en diclorometano, expresada en mg/mL.

Para visualizar la diferencia entre las partículas sintetizadas y las disoluciones del compuesto puro, se compararon los espectros obtenidos de las disoluciones para la curva de calibración de los compuestos a encapsular con los espectros obtenidos al disolver las partículas cargadas en el disolvente correspondiente, los resultados se muestran en la figura 4.5. En estos resultados no hay diferencia considerable en la posición de la banda de absorbancia definida para el cálculo de la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación, lo que implica que no es necesario incluir correcciones con respecto al contenido de polímero en las muestras analizadas mediante este método.

Para el cálculo de la dosis encapsulada, DE se utilizó la siguiente ecuación:

$$DE = \frac{C_f \cdot V_d}{m_p} \quad (4.3)$$

Donde C_f es la concentración del compuesto encapsulado calculada mediante la curva de calibración en mg/mL, V_d es el volumen de disolvente utilizado para la disolución de las partículas analizadas y m_p es la masa de partículas analizadas.

Para el cálculo de la eficiencia de encapsulación de la muestra obtenida, se aplicó la ecuación:

$$EE(\%) = DE(1 - DE) \cdot \frac{m_{PLGA-nom}}{m_{RIF-nom}} \times 100 \quad (4.4)$$

Donde $m_{RIF-nom}$ es la masa nominal utilizada en la fase dispersa, $m_{PLGA-nom}$ es la masa de polímero nominal usada en la fase dispersa y DE es la dosis encapsulada calculada en (mg/mg).

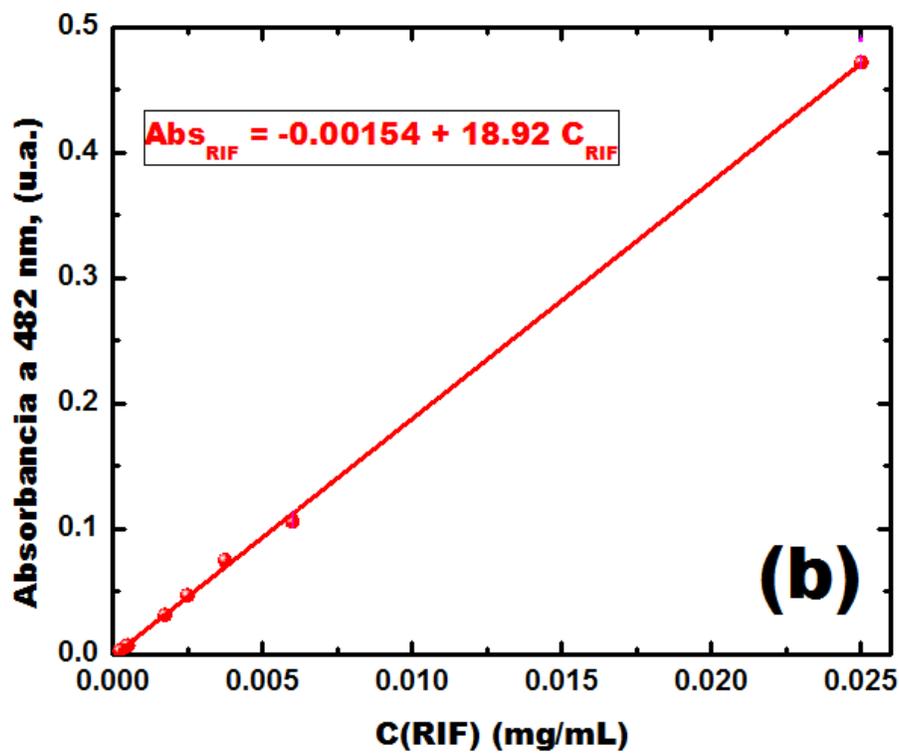
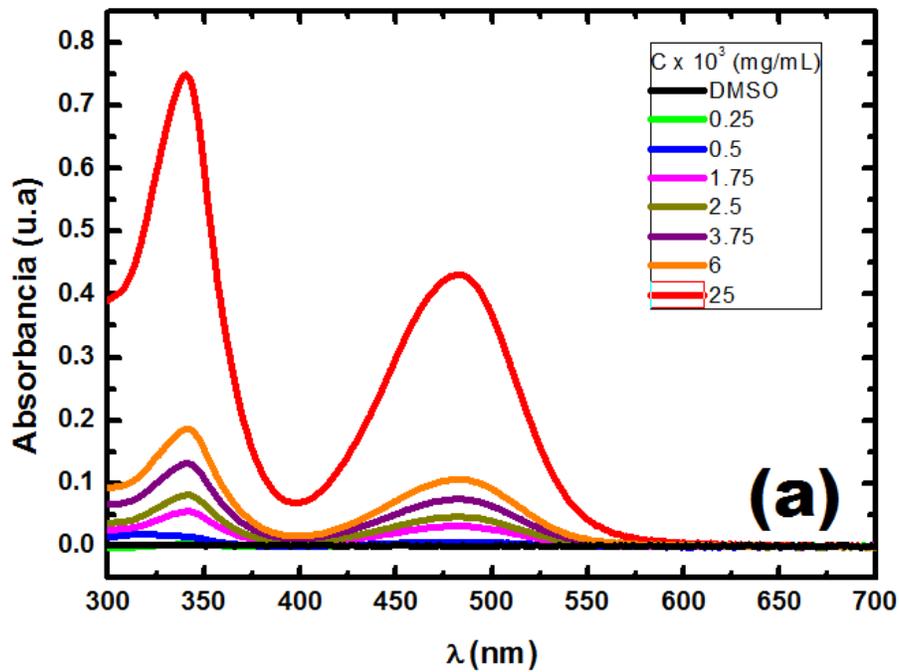


Figura 4.3. (a) Espectros de absorbancia de rifampicina en DMSO a diferentes concentraciones. (b) Curva de calibración de rifampicina en DMSO a 482 nm, la ecuación lineal es mostrada en el gráfico.

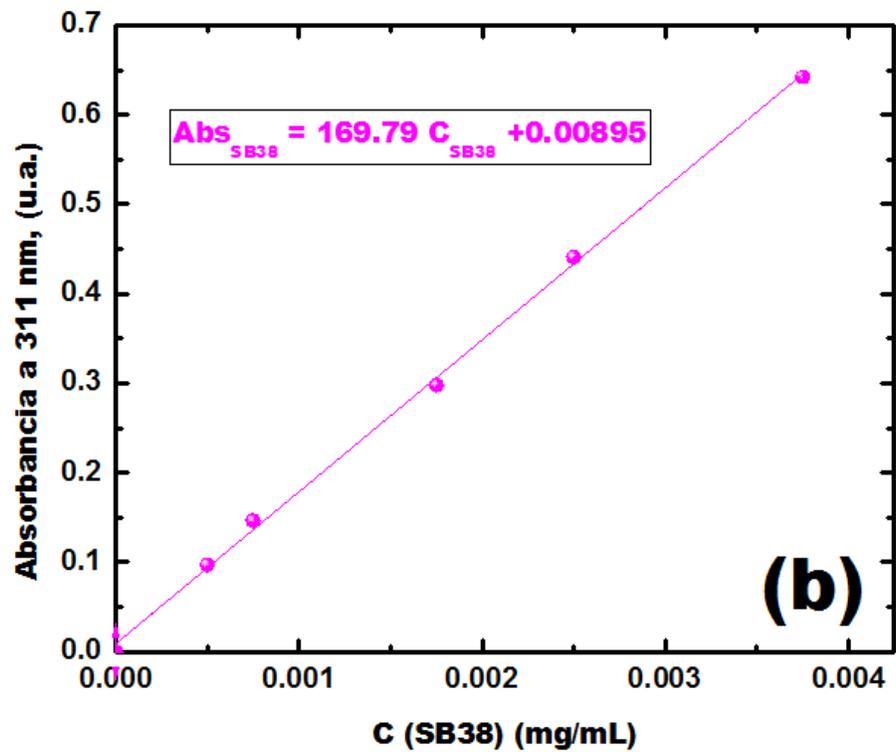
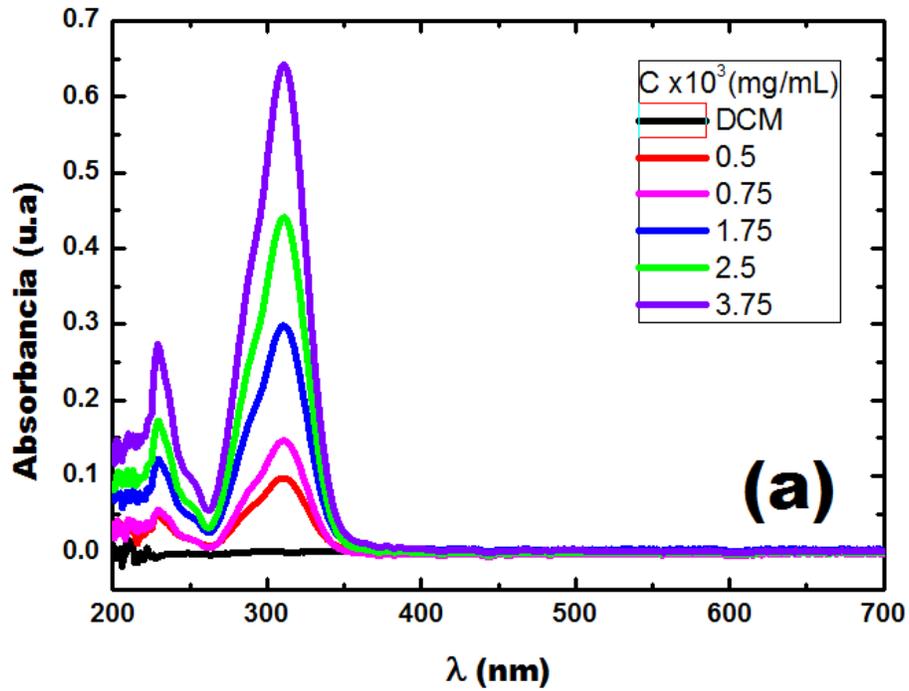


Figura 4.4. (a) Espectro de absorbancia de SB38 a diferentes concentraciones como indica la leyenda, (b) Curva de calibración de SB38 en DCM a 311 nm. La ecuación de la regresión lineal es mostrada en el gráfico.

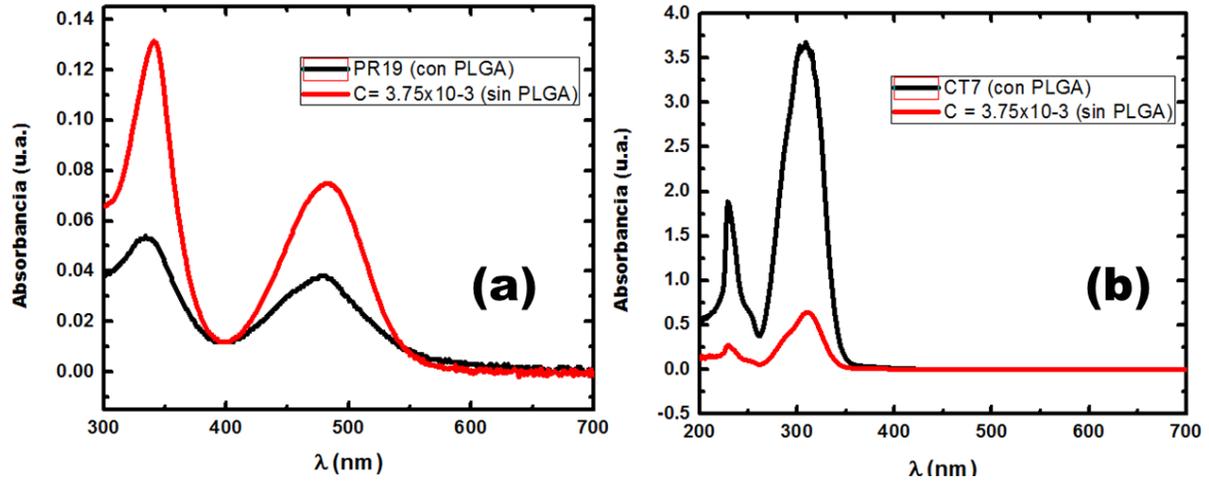


Figura 4.5. Comparación entre espectro UV de disoluciones contienen polímero y compuesto (negro) y solo compuesto (rojo), donde (a) Rifampicina (b) SB38.

4.2. Partículas cargadas con Rifampicina

4.2.1. Efecto de la temperatura de extracción

La temperatura en la etapa de extracción del disolvente tiene un efecto principalmente en la dosis encapsulada y la eficiencia de encapsulación de las partículas obtenidas. Como se mencionó en el marco teórico, se espera que un aumento en la temperatura de extracción del disolvente disminuya la dosis encapsulada. Para ilustrar esta hipótesis con la encapsulación de la rifampicina, se llevó a cabo la fabricación de las muestras CR18, CR20, CR19 y CR21. En la muestra CR21 el disolvente se extrajo bajo condiciones de vacío a temperatura ambiente, la cual fue definida en 25°C.

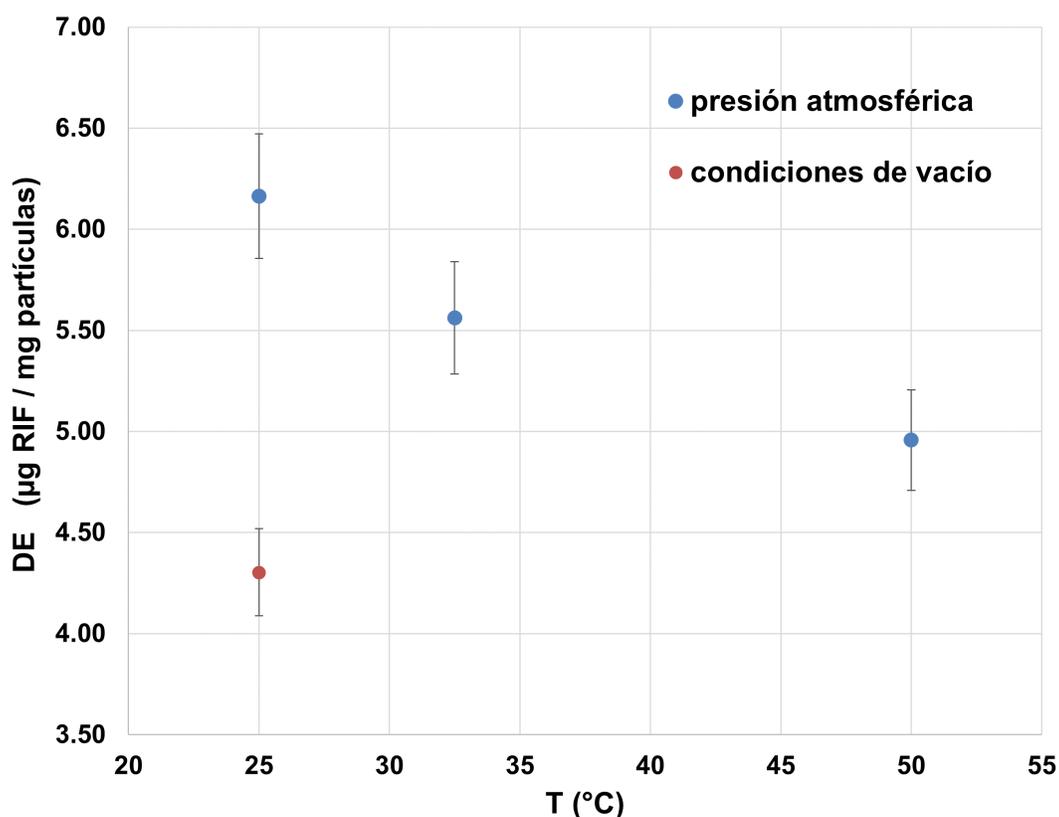


Figura 4.6. Variación en la dosis encapsulada de rifampicina respecto al cambio de temperatura de extracción del disolvente.

Los resultados obtenidos son representados en la figura 4.6, donde la dosis encapsulada

sulada muestra una disminución conforme aumenta la temperatura de extracción del diclorometano. Por otra parte, al utilizar una temperatura de evaporación ambiente en condiciones de presión reducida (condiciones de vacío), la dosis encapsulada disminuye notablemente con respecto a las muestras evaporadas a presión atmosférica.

Esta tendencia puede ser explicada por la velocidad de solidificación de las gotas de la emulsión. Al aumentar la temperatura, la extracción de diclorometano se acelera provocando que las partículas solidifiquen de manera más rápida. Sin embargo, debido a que este proceso se lleva a cabo mediante el «encongimient» de las cadenas de polímero, estas no solidifican de manera homogénea ocasionando la formación de «huecos» en la partícula sólida por los cuales el compuesto encapsulado escapa hacia la fase continua y debido a que la rifampicina es ligeramente soluble en agua, es probable que el pH de la fase continua promueva su disolución, provocando la pérdida de rifampicina dentro de las gotas formadas.

En el caso de la muestra CR21, el efecto de la presión reducida parece acelerar el proceso de evaporación lo que ocasiona el mismo efecto observado en las partículas realizadas a 50°C donde este aumento en la rapidez de solidificación afecta negativamente la DE.

Con los resultados obtenidos en esta sección, se decide continuar con los experimentos posteriores manteniendo una temperatura de evaporación de disolvente cercana a 25°C a presión atmosférica.

4.2.2. Efecto del número de lavados

En el marco teórico se menciona que este tipo de partículas poliméricas presentan un efecto «initial burst» en los análisis de liberación debido a la presencia de fármaco en la superficie de las partículas cargadas. A su vez, el «initial burst» está relacionado con la DE, por lo que las muestras de esta sección fueron analizadas comparando la DE y EE con respecto al número de lavados de muestra.

Basados en las condiciones de preparación de la tabla [3.4](#), los resultados obtenidos se muestran en la tabla [4.1](#). La tendencia general, manteniendo fijo el valor del factor

Omega Ω , muestra un incremento en la dosis encapsulada y la eficiencia de encapsulación conforme disminuye el número de lavados. Comparando las muestras PR38 y CR27, al disminuir el número de lavados de 4 a 2, la dosis encapsulada aumenta aproximadamente 10 veces para $\Omega = 1$.

Para $\Omega = 0.5$, el número de lavados se disminuyó de 8 a 4, y el valor de la dosis encapsulada aumento de 2.67 a 5.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Lo que nos indica que la tendencia se mantiene incluso al variar Ω .

Estos resultados confirman la posible presencia de agregados de compuesto en la superficie de las partículas (no encapsulado). Por la ligera solubilidad de rifampicina en agua, como se mencionó en el marco teórico, disminuye tanto la dosis encapsulada como la eficiencia de encapsulación al incrementar el número de lavados, ya que estos agregados en las partículas son removidos.

Para las muestras fabricadas posteriormente, se mantuvo el número de lavados en 3 durante la recuperación de las partículas para evitar la pérdida de fármaco pegado en la superficie, ya que se considera un factor importante en el comportamiento de la liberación de las muestras fabricadas.

Tabla 4.1. Resultados de la variación del número de lavados en muestras obtenidas.

Muestra	Ω	Número de lavados	DE ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EE (%)
CR3	0.5	8	2.67	0.53
CR8	0.5	4	5.75	1.10
CR27	1	4	18.50	1.93
PR38	1	2	104.15	11.51

4.2.3. Efecto de la variación del factor Ω

Como se mencionó en la metodología, el factor Ω se analizó dejando constante la cantidad de polímero utilizada. Para representar el efecto de la cantidad de polímero en

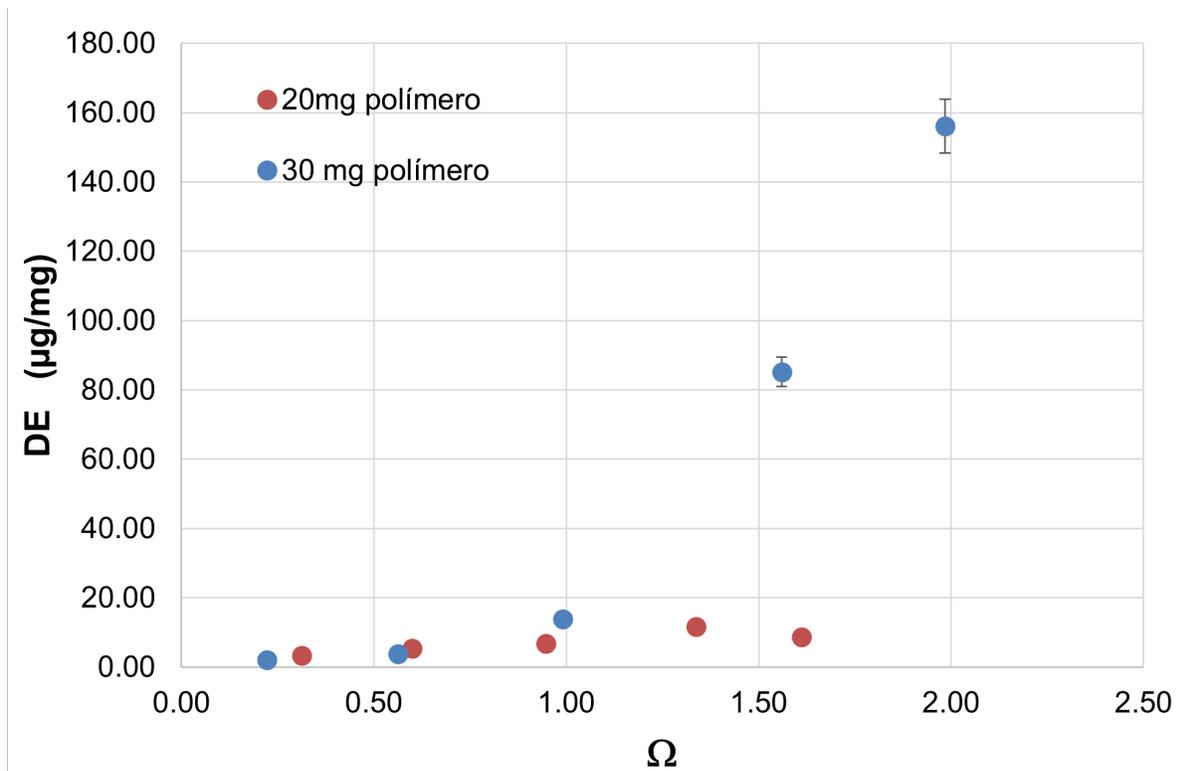


Figura 4.7. Efecto del factor Ω en la dosis encapsulada de rifampicina.

la fase dispersa se manejaron dos cantidades constantes de polímero: 20 mg y 30 mg para cada serie de experimentos con el fin de evaluar simultáneamente el efecto de la concentración de polímero en la fase dispersa.

Los resultados del efecto de Ω en la dosis encapsulada se muestra en el gráfico de la figura 4.7. Para las dos series de experimentos, se muestra un aumento de la dosis encapsulada conforme aumenta el valor del factor omega Ω es decir, con el aumento de la cantidad de rifampicina en la fase dispersa.

Para la serie de experimentos con una cantidad de 20 mg de polímero (círculos color rojo), no se observa un aumento pronunciado en la dosis encapsulada, y el máximo no supera los 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Para la serie de experimentos con 30 mg de polímero (círculos color azul), se observa una tendencia de crecimiento pronunciado pues hay un aumento de 20 a 80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la D.E. con valores para $\Omega > 1$, alcanzando un máximo de 160 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para $\Omega = 2$.

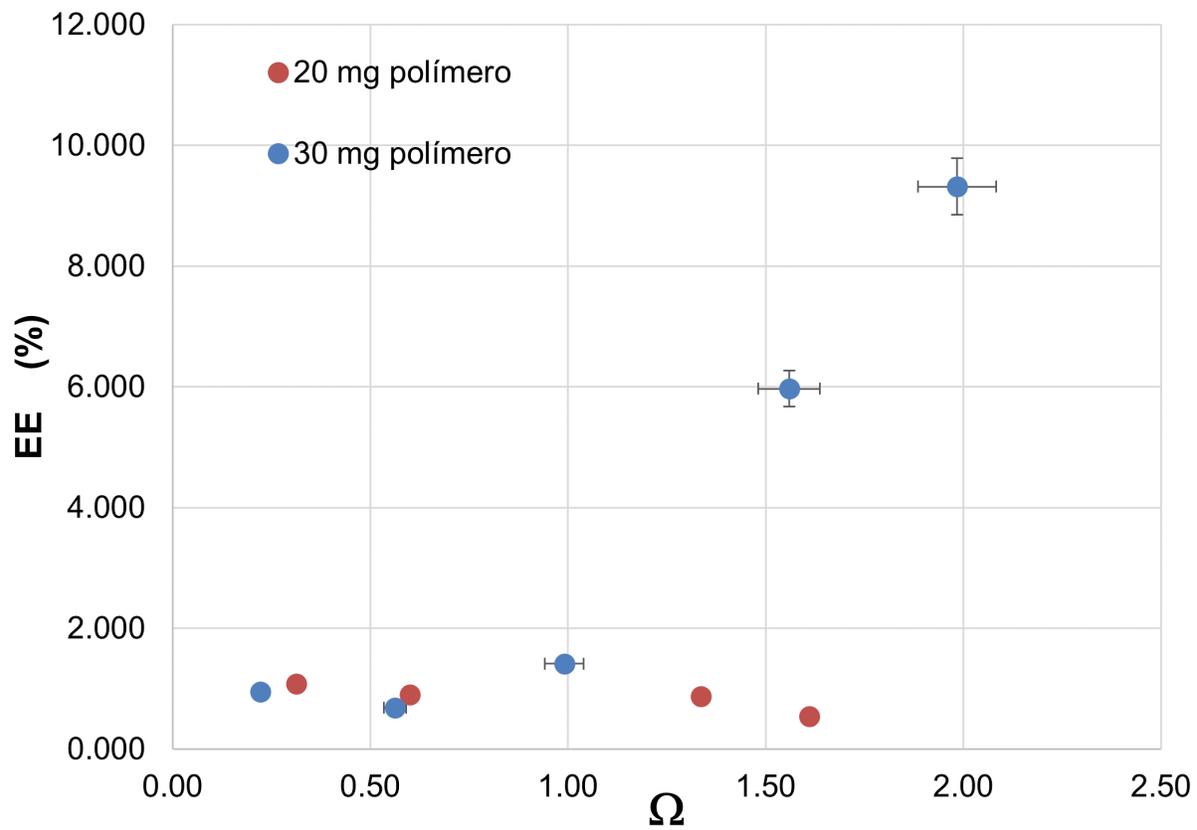


Figura 4.8. Efecto del factor Ω en la eficiencia de encapsulación de rifampicina.

Por otro lado, el gráfico de la figura 4.8 expresa el efecto del factor omega Ω en la eficiencia de encapsulación. Los resultados de EE para la serie de experimentos con 20 mg de polímero no muestran una tendencia a aumentar, y se mantienen cercanos a 1 %. Por otro lado, en la serie de experimentos con 30 mg de polímero, la eficiencia de encapsulación muestra un aumento en mayor proporción con respecto a las partículas con 20 mg de polímero, alcanzando un máximo en $\Omega = 2$ con 9.2 %.

El aumento de la DE en valores de Ω mayores puede ser explicado por la concentración de rifampicina en la fase dispersa, al estar más saturada con RIF la gota de emulsión la pérdida hacia la fase continua disminuye porque la cantidad de fármaco es mayor. También debido a que el volumen de la gota disminuye conforme se evapora el disolvente y la cantidad de RIF se mantiene constante, es probable que existan una mayor cantidad de RIF en las periferias de la gota.

La diferencia entre los resultados de DE y EE entre la serie de experimentos con 20 mg y 30 mg de PLGA podría estar relacionada con la viscosidad de la gota formada. Es posible que si la gota formada es muy viscosa, la difusión del diclorometano a través de la fase dispersa sea más lenta permitiendo una solidificación más lenta y homogénea. Además, la viscosidad de la gota podría ayudar a que el fármaco no escape hacia la fase continua al disminuir la velocidad de difusión por el aumento de la viscosidad. Al contrario, cuando se ocupa una menor cantidad de polímero, la difusión del diclorometano a través de la gota no se ve tan limitada por la viscosidad y el diclorometano provoca un arrastre de la rifampicina hacia la fase continua, provocando la pérdida de fármaco por la solubilidad de la rifampicina en agua.

Pese a las tendencias obtenidas exitosamente, la cantidad de rifampicina encapsulada es muy baja en comparación con los resultados obtenidos por Pandey [33], donde reporta máximos de 56.9 % de EE y dosis encapsulada de hasta 570 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Esta diferencia podría explicarse con la metodología de preparación, como puede apreciarse en la tabla 3.1. Además el tipo de polímero ocupado en los estudios de Pandey posee un peso molecular distinto, el autor utiliza PLGA Resomer RG 506 con una composición 50:50 (AL:AG) y un peso molecular $M_w = 2,500$, mientras que el polímero utilizado en

este proyecto es Resomer RG 505 con una composición 50:50 y un peso molecular entre 54,000 y 69,000. Makino [24] estudió el efecto del peso molecular y composición LA:GA del PLGA, donde se observa un aumento en la eficiencia de encapsulación conforme disminuye el peso molecular del polímero encontrando un máximo en EE = 86.7% ocupando un peso molecular $M_w = 2,500$. El autor explica que este aumento se debe a las interacciones de los grupos carboxilo terminales de la cadena de PLGA con los grupos amino de la molécula de rifampicina. Sin embargo, esta tendencia solo se apreciaría en estudios donde se encapsule rifampicina en PLGA.

4.2.4. Efecto del volumen de la fase dispersa

Para el análisis del efecto del volumen de fase dispersa, se llevó a cabo una serie de experimentos manteniendo constante el volumen total de la emulsión en 10 mL, con aumentos de 2 mL entre cada experimento. Para visualizar mejor el efecto en la DE y EE, se determinó el factor Φ con la siguiente ecuación:

$$\Phi = \frac{V_o}{(V_o + V_w)} \quad (4.5)$$

donde V_o es el volumen de la fase dispersa y V_w el volumen de la fase continua. La suma $(V_o + V_w)$ representa el volumen total, el cual se mantuvo fijo. Conforme aumenta el valor de Φ , aumenta la cantidad de diclorometano utilizado para la emulsión.

Los resultados del efecto del volumen de la fase dispersa en la dosis encapsulada se muestran en la figura [4.9]. En este gráfico se observa una disminución en la dosis encapsulada para el valor Φ 0.1 a 0.2, para luego aumentar alcanzando un máximo en $\Phi = 0.6$ con una dosis encapsulada de $47.63 \mu\text{g}/\text{mg}$ (valor encerrado en rojo en la figura [4.9]).

El mismo comportamiento se observa en el gráfico de la figura [4.10], donde para valor de Φ entre 0.2 y 0.4 la eficiencia de encapsulación no muestra un cambio considerable en el porcentaje manteniéndose por debajo del 2%, excepto para 6 mL de fase dispersa, donde el porcentaje de EE sube a 5%.

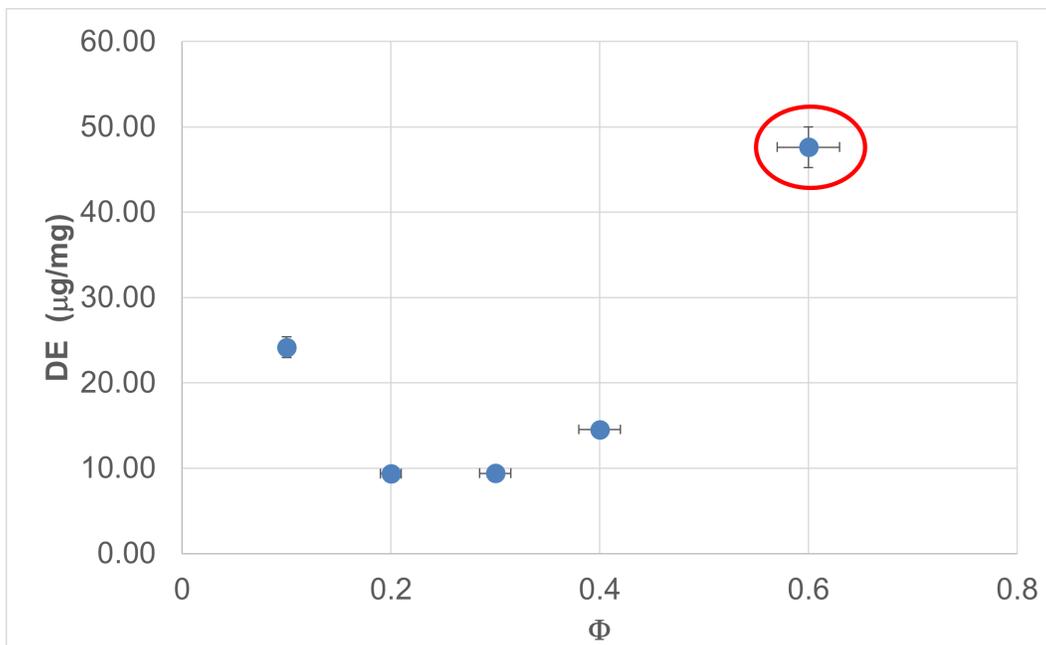


Figura 4.9. Dosis encapsulada de RIF en función de Φ .

Esta tendencia podría indicarnos que existe un mínimo de DE y EE cuando se ocupan volúmenes entre 2 y 4 mL de diclorometano, pues cuando el valor de $\Phi = 0.1$, la dosis encapsulada es de 24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ con una EE de 2.6%. La explicación de este fenómeno se relaciona con el efecto de difusión y evaporación del diclorometano: conforme aumenta el volumen de la fase dispersa el arrastre de rifampicina, por la difusión del diclorometano hacia la fase continua, disminuye por el posible aumento en el tamaño de la gota ya que al ocupar un mayor volumen de fase dispersa y no cambiar la potencia del sonicador, es probable que el tamaño de gota aumente debido a que las gotas formadas no se rompen con la misma frecuencia, lo que ocasiona una coalescencia y formación de gotas más grandes. Los resultados encontrados en esta sección también explicarían la diferencia con los resultados de dosis encapsulada reportados por Pandey, [33] donde ocupan un volumen de 8 mL de diclorometano en un volumen total de 18 mL, lo que corresponde a un valor de $\Phi = 0.44$, sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios del efecto que tiene utilizar volúmenes totales de emulsión distintos, pues esto impactaría en la difusión y evaporación del diclorometano, así como en el tamaño de las gotas formadas.

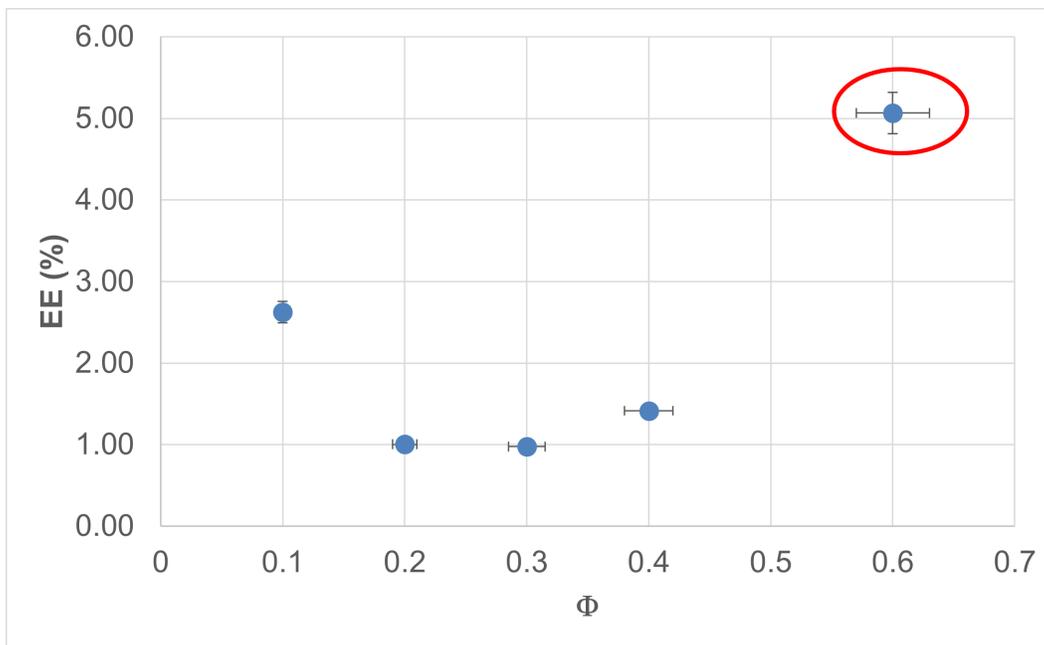


Figura 4.10. Eficiencia de encapsulación de RIF en función de Φ .

4.2.5. Efecto del tamaño de partícula

Para estas muestras se comparó el tamaño de las muestras CR27, CR29 y MC2 las cuales se realizaron bajo las condiciones de emulsificación descritas en la tabla 4.2, el tamaño de partícula es analizado variando el tiempo de sonicación utilizando 3 min y 1 min para la muestra CR27 y CR29, respectivamente. En el caso de la muestra MC2, fabricada mediante microfluídica, la velocidad de entrada al chip (v_{ent}) fue de 20 mL/h utilizando una bomba de inyección.

La figura 4.11 muestra las imágenes SEM obtenidas mediante análisis por microscopía electrónica de barrido de las muestras CR27 y CR29, donde se aprecia que tienen forma esférica y una superficie lisa. Y en la figura 4.12 se muestra la imagen obtenida por SEM de la muestra MC2, estas partículas también tienen forma de esfera ligeramente deformada con una superficie porosa como puede verse en la figura 4.11. El radio promedio de partícula para estas muestras se muestra en la tabla 4.3, en esta tabla también se incluyen los resultados obtenidos para una muestra de partículas vacías (CA6) como referencia.

Tabla 4.2. Condiciones de preparación para el análisis del efecto de tamaño de partícula.

Muestra	Ω	Condiciones de emulsificación
CA6	0	Sonicación durante 3 min
CR27	1	Sonicación durante 3 min
CR29	1	Sonicación durante 1 min
MC2	1	Microchip, $v_{ent} = 20$ mL/h

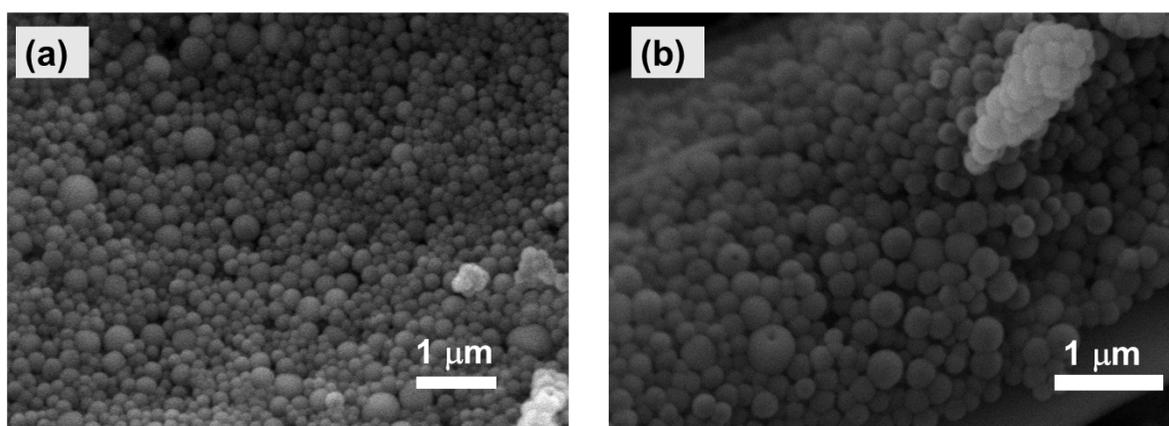


Figura 4.11. Imágenes SEM de las muestras: (a) CR27, (b) CR29

Los resultados obtenidos de radio promedio de partícula para la muestra CR27 en comparación con la muestra de partículas vacías CA6, no muestran un aumento considerable en el radio de partícula cuando se incorpora la rifampicina a la fase dispersa.

Comparando la muestra CR27 y CR29, se varió el tiempo de sonicación de 3 min a 1 min respectivamente. Sin embargo, el radio promedio de partícula es muy similar indicando que la diferencia indicada en el tiempo de sonicación no afecta considerablemente en el tamaño de partícula promedio. En cambio, el valor de polidispersidad aumenta casi el doble. La dosis encapsulada de la muestra CR27 tiene un valor de $18.50 \mu\text{g}/\text{mg}$ para un tiempo de sonicación de 3 min, y la muestra CR29 muestra un valor de $35.08 \mu\text{g}/\text{mg}$ para un tiempo de sonicación de 1 min. Es decir, la muestra

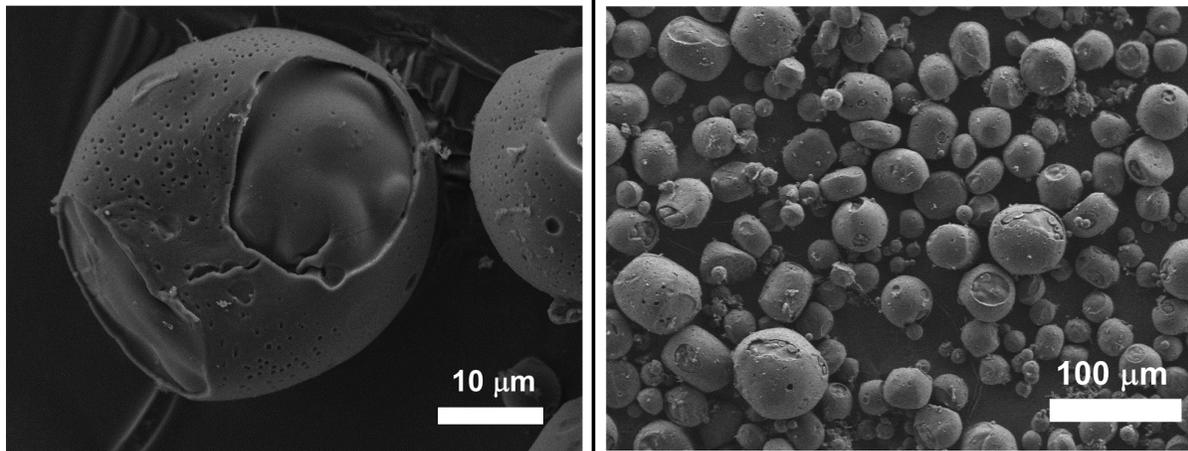


Figura 4.12. Imágenes SEM de la muestra MC2.

CR29 tiene un aumento en el índice de polidispersidad, dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación a pesar de tener un radio promedio de partícula parecido al de la muestra CR27, lo que nos indica que el PDI influye fuertemente en estos factores. En el caso de la muestra fabricada mediante microfluídica, el radio de partícula promedio obtenido es de $17.64 \mu\text{m}$, un valor aproximadamente 100 veces mayor que para las muestras elaboradas mediante sonicación. El efecto de la obtención de partículas más grandes mostró un aumento en la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación de esta muestra, alcanzando un valor de $170.48 \mu\text{g}/\text{mg}$ y 23.86% , respectivamente. Estos valores han sido los más altos obtenidos para las muestras realizadas.

Este resultado nos indica que la DE y EE se ven afectadas por el tamaño de la partícula y el índice de polidispersidad de la muestra. En el caso de la muestra CR29, al ocupar un tiempo de sonicación menor, los tamaños de partícula son más variados y es probable que se haya formado gotas más grandes las cuales contenían una mayor cantidad de polímero y compuesto encapsulado, lo que explicaría el aumento considerable en la DE y EE como se vio con la muestra MC2. Al contrario, en la muestra CR27 al tener una mayor cantidad de partículas pequeñas con una distribución más homogénea, la D.E. disminuye.

Pandey [33] reporta un rango de tamaños entre 186 y 290 nm para más del 80 % de las partículas obtenidas, con un índice de polidispersidad de 38 % para un tiempo

Tabla 4.3. Efecto de tamaño de partícula en DE y EE.

Muestra	Radio promedio de partícula (μm)	PDI %	DE ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EE (%)
CA6	0.114	28.37	-	-
CR27	0.133	16.32	18.5	1.93
CR29	0.139	33.86	35.08	3.66
MC2	17.64	34.32	170.48	23.86

de sonicación de 3 min. Los resultados obtenidos en este proyecto con las mismas condiciones de sonicación tienen radios de partícula que entran en el rango de tamaños que reporta el autor, el alto PDI que obtiene Pandey podría explicar la diferencia entre la DE obtenidas en comparación con este proyecto.

4.3. Perfil de liberación

4.3.1. Partículas cargadas con rifampicina

Las muestras analizadas para el perfil de liberación fueron: CR27, CR29 y MC2 con el fin de mostrar el efecto del tamaño de partícula en el perfil de liberación, debido a que como se mencionó en el marco teórico, la degradación de las partículas está fuertemente influenciado por la morfología y tamaño de las partículas cuando se utiliza un mismo tipo de polímero.

Los resultados de tamaño de partícula, dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación se describen en la tabla 4.3. El perfil de liberación obtenido para cada una de las muestras es representado en el gráfico de la figura 4.13. Se observa que en las primeras horas del estudio, hay una liberación más rápida del compuesto encapsulado. Este resultado corresponde con el fenómeno «initial burst» mencionado en el marco teórico.

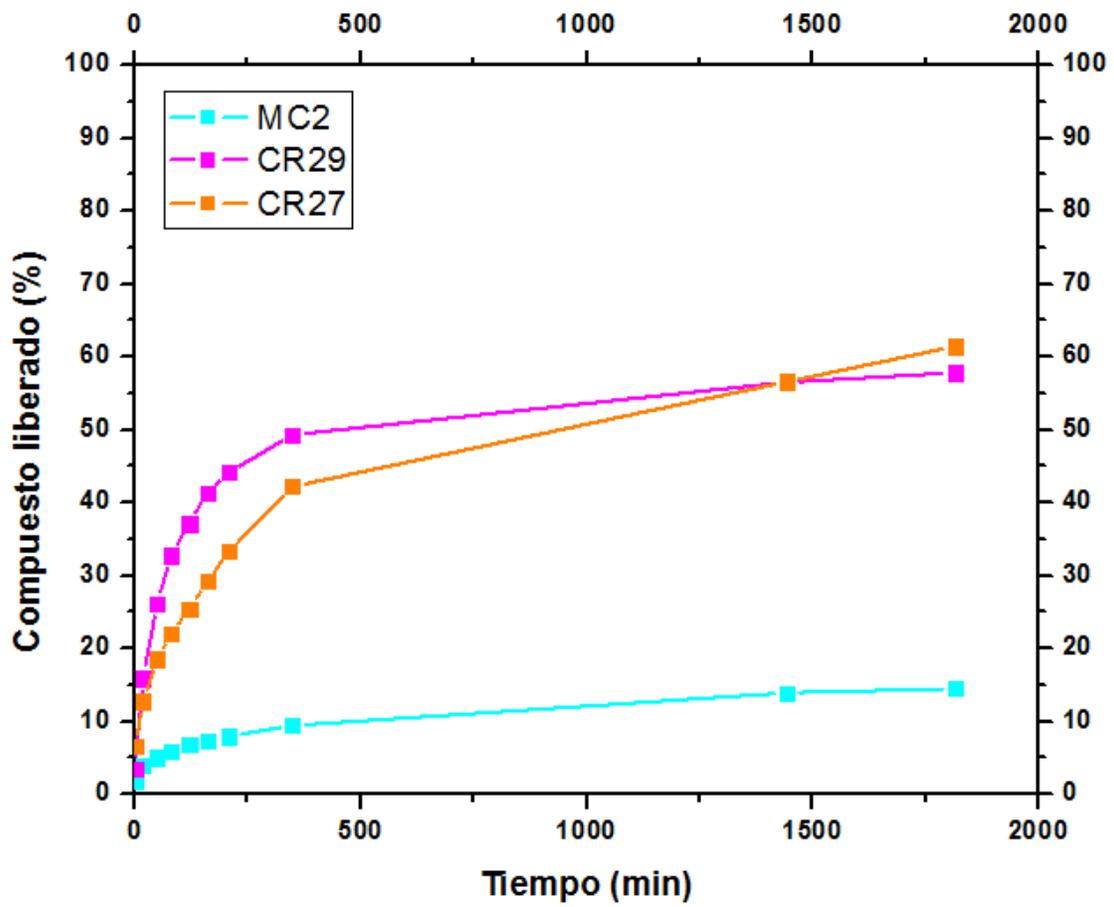


Figura 4.13. Perfil de liberación obtenido para las muestras CR27, CR29 y MC2.

En el caso del polímero PLGA Resomer 505, utilizado para la fabricación de partículas de las muestras CR29 y CR27, estas tuvieron un efecto «burst» en las primeras 3 horas del estudio, figura 4.14 correspondientes al 44 y 33 % del total encapsulado respectivamente, continuando con una liberación más lenta sin llegar al 100 % del compuesto liberado durante el análisis de 30 h.

En contraste, la muestra MC2 con un tamaño de partícula aproximadamente 100 veces mayor, liberó 8 % del compuesto encapsulado en las primeras 3 h del estudio y el compuesto liberado posteriormente se mantuvo constante durante el tiempo estudiado. Todas las muestras fueron fabricadas con el mismo tipo de polímero y analizadas en medios de liberación con las mismas condiciones, por lo tanto el perfil de liberación está influenciado principalmente por las propiedades de la partícula fabricada relacionadas con la porosidad y tamaño de partícula.

En el marco teórico se mencionó que una mayor porosidad y tamaño de partícula acelera el proceso de hidrólisis. Sin embargo, debido al alto peso molecular del polímero seleccionado, es probable que la velocidad de degradación del polímero en medio acuoso (buffer fosfatos, pH 7.0, 37°C) en este caso dependa principalmente del área superficial de la partícula, pues como se ve en el gráfico para las muestras con menor tamaño de partícula (CR27, CR29) se observó una liberación más rápida a comparación de las partículas más grandes.

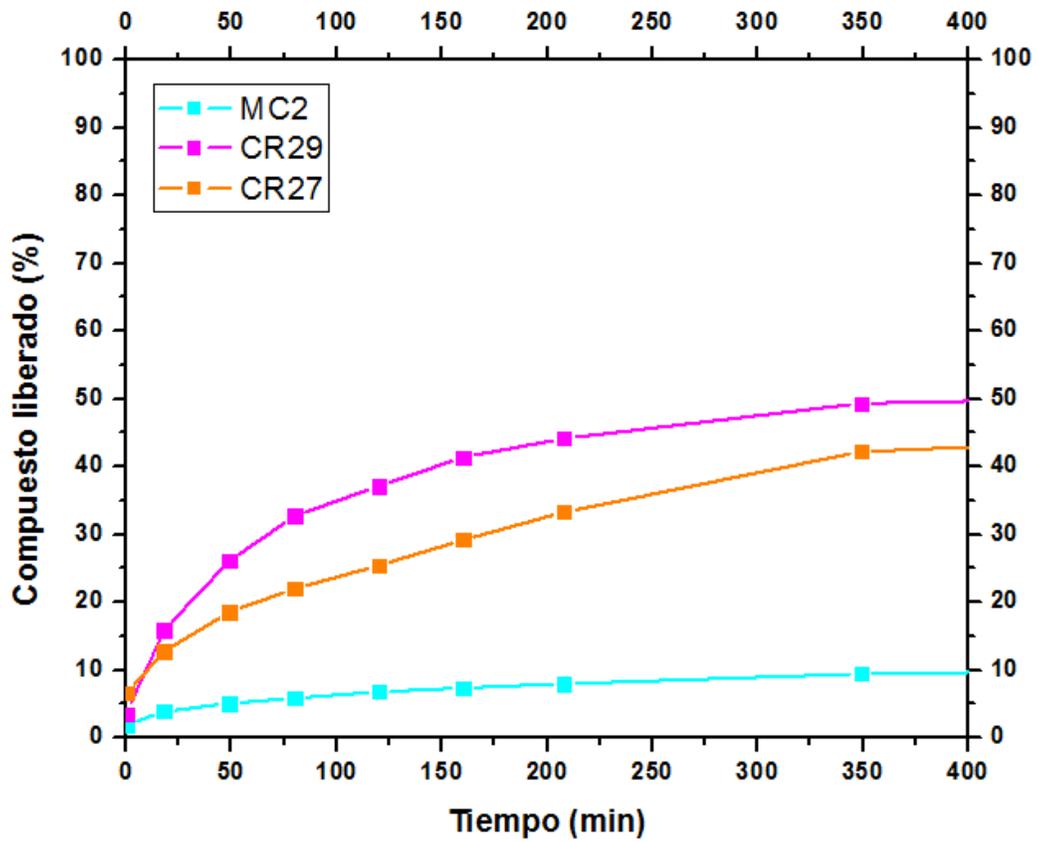


Figura 4.14. Tiempo de liberación 1 - 350 min del perfil de liberación de las muestras CR27, CR29, MC2.

4.4. Partículas cargadas con compuesto SB38

4.4.1. Efecto del factor Ω

Como se observó en los experimentos con RIF, uno de los parámetros más influyentes sobre la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación es la relación de fármaco y polímero, factor Ω , por lo que se decidió variar este parámetro para la encapsulación de SB38, y los resultados fueron comparados con una serie de muestras de partículas cargadas con rifampicina con valores de Ω similares.

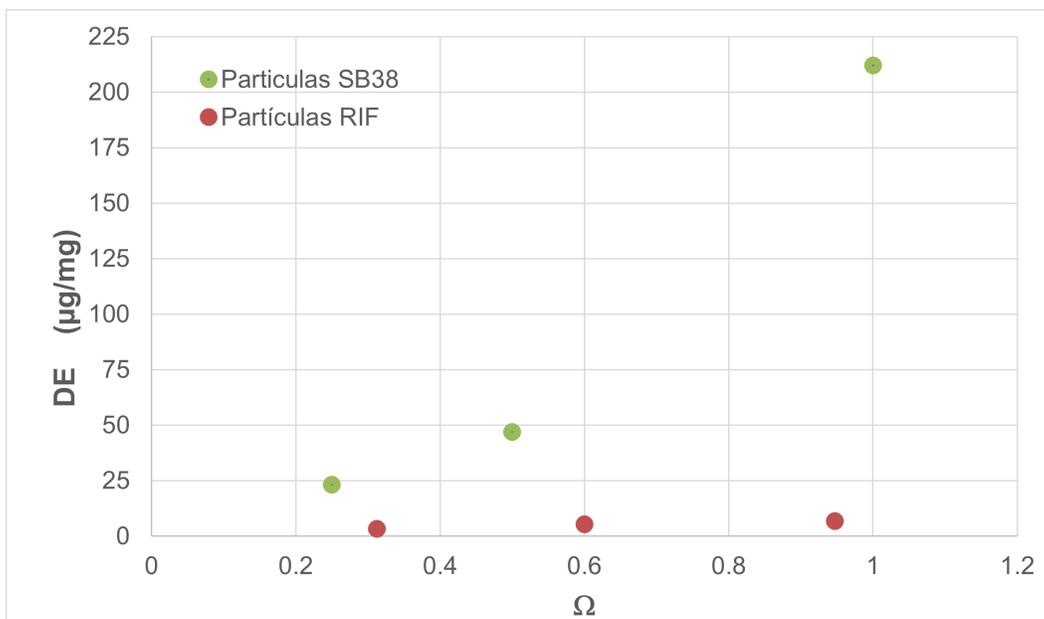


Figura 4.15. Dosis encapsulada del compuesto SB38 (verde) con rifampicina (rojo).

El gráfico de la figura [4.15](#) muestra los resultados obtenidos de dosis encapsulada para las partículas cargadas con compuesto SB38 (círculos verdes) con las partículas cargadas con rifampicina RIF (círculos rojos). Las partículas con SB38 muestran dosis encapsuladas mayores que aquellas obtenidas con RIF, pero manteniendo la tendencia de aumento con respecto al incremento de Ω . Para un valor de $\Omega=1$, la dosis encapsulada de SB38 es de $212 \mu\text{g}/\text{mg}$, un valor 30 veces mayor que la obtenida para la rifampicina. En cuanto a los valores de DE en valores de Ω menores (0.25 y 0.5) el valor de dosis encapsulada aumentaba aproximadamente 10 veces en las partículas

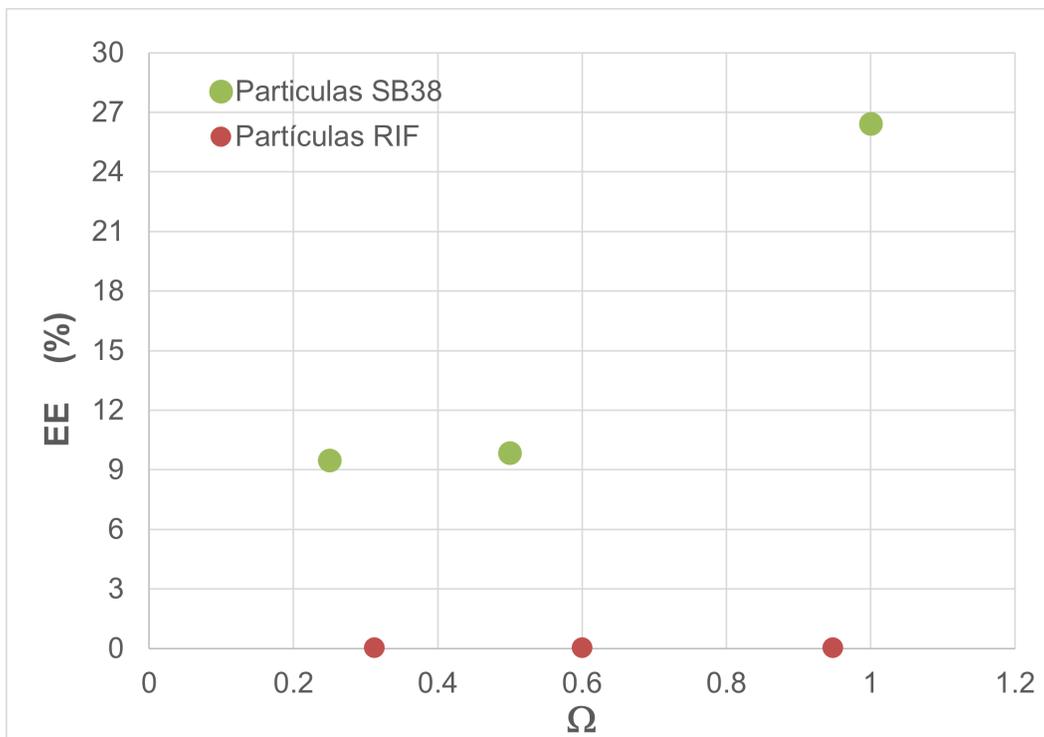


Figura 4.16. Eficiencia de encapsulación del compuesto SB38 (verde) con rifampicina (rojo).

cargadas con SB38 en comparación con la rifampicina. Por otra parte, el gráfico de la figura [4.16](#) compara los resultados de eficiencia de encapsulación de partículas con compuesto SB38 (círculos verdes) con las partículas cargadas con rifampicina (círculos rojos). En general, al igual que se vio con la dosis encapsulada, el valor de eficiencia de encapsulación aumenta hasta 10 veces más cuando se encapsula el compuesto SB38. Sin embargo, la tendencia de aumento de DE y EE con respecto a Omega se mantiene, y es más pronunciada con el compuesto SB38. La diferencia en los resultados obtenidos para SB38 con respecto a rifampicina se atribuye principalmente al tamaño y peso molecular del compuesto encapsulado. A comparación con el peso de la rifampicina, ($822.94 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), el compuesto SB38 tiene un peso molecular de $193.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que podría permitir un mejor acomodo en la matriz polimérica del PLGA. Además, por la estructura química del compuesto SB38, figura [3.4](#), se intuye que presenta una naturaleza más hidrofóbica que la rifampicina (la cual es parcialmente soluble en agua), lo

que evita la difusión de este compuesto hacia la fase continua durante la extracción del disolvente, evitando su pérdida.

4.4.2. Análisis por microscopía

Las partículas cargadas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar su morfología y tamaño. La figura 4.17 muestra una morfología circular con superficie de partícula lisa, parecida a las muestras obtenidas para la rifampicina. El tamaño de partícula de las muestras cargadas con el compuesto SB38 fabricadas bajo las condiciones mencionadas en la metodología, tuvieron un radio promedio de partícula de 123 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 59 %. Los valores obtenidos para estas partículas cargadas con SB38 entran en el rango de tamaños obtenidos para encapsulación de rifampicina en las mismas condiciones de sonicación, lo que sugiere que el tamaño del compuesto a encapsular no influye considerablemente en el tamaño de partícula.

Debido a los resultados obtenidos en el espectro UV-visible, la banda de absorción característica del compuesto SB38 es cercana a la región UV ($\lambda_{SB38} = 311 \text{ nm}$), por lo que mediante el uso de un microscopio óptico en fluorescencia una muestra fue iluminada con luz azul. La figura 4.18 muestra que las partículas presentan cierta fluorescencia después de ser iluminadas. Este resultado puede ser útil en un futuro para llevar a cabo el seguimiento de las partículas después de ser depositadas en células o tejidos.

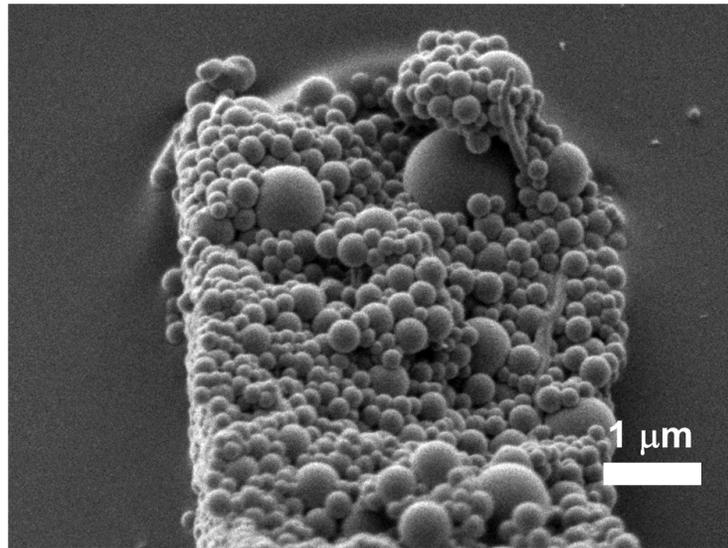


Figura 4.17. Imagen SEM de la muestra CT2, partícula cargada con SB38.

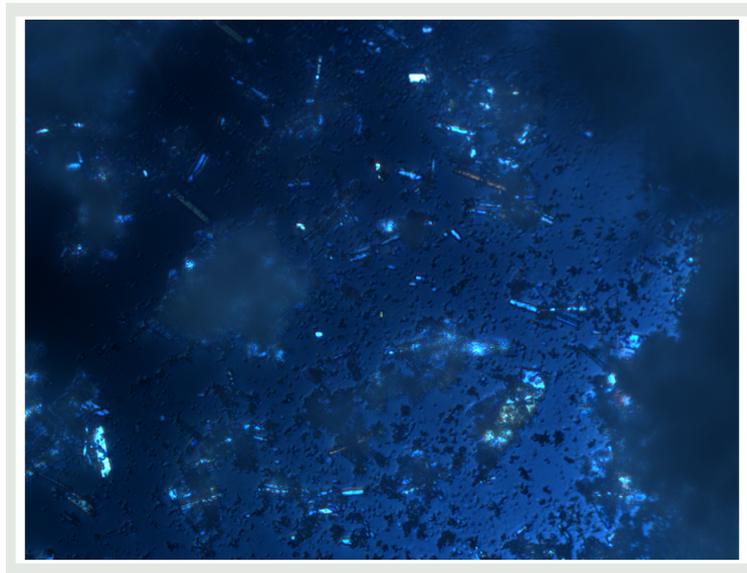


Figura 4.18. Micrografía óptica en fluorescencia de partículas cargadas con SB38 iluminadas con luz azul (color falso de la imagen).

4.5. Resumen y análisis de la variación de parámetros en la elaboración de partículas de PLGA

Se basó en la metodología de Pandey [33] para la fabricación de partículas cargadas con rifampicina aplicando el método de emulsión seguida de extracción y evaporación del disolvente. De esta metodología se varió la temperatura de extracción y los lavados de muestra con el fin de definir las condiciones que se mantendrían constantes a lo largo del proyecto de manera que se encontrara el máximo de dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación en todas las muestras fabricadas con este método. Los resultados de la variación de temperatura de extracción obtenidos a 25, 32.5 y 50 °C muestran que a temperaturas mayores de 25°C la DE y EE disminuyen, por lo tanto se optó por utilizar una temperatura de evaporación del diclorometano en condiciones ambiente para un menor gasto energético y evitar que la temperatura influya en la solubilidad del compuesto a encapsular, especialmente en el caso de la encapsulación de rifampicina. De la misma manera se analizaron los lavados de muestras, donde se definió utilizar 3 lavados debido al aumento de dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación, ocasionado por la presencia de compuesto en la superficie de la partícula.

Por otra parte, se analizó el efecto de la cantidad de rifampicina y polímero, representados por el valor Ω , en la fase dispersa. De manera general, un mayor contenido de compuesto en la fase dispersa provoca un aumento en la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación. Esta tendencia se cumplió también en la encapsulación del compuesto SB38 en partículas de PLGA con las mismas características.

El efecto de la cantidad de polímero en la fase dispersa también tuvo efecto en la DE y EE, una mayor cantidad de polímero en la fase dispersa provocó un aumento en los resultados de eficiencia de encapsulación para el mismo factor Ω . Este resultado concuerda con lo mencionado en el marco teórico donde se menciona que un aumento en la viscosidad de la fase dispersa aumenta la eficiencia de encapsulación. El fenómeno está relacionado con la velocidad de solidificación de las partículas, pues con una mayor concentración de polímero la solidificación es más rápida y homogénea, lo que

disminuye la pérdida de compuesto durante la encapsulación. Finalmente, el aumento en el volumen de fase dispersa utilizada para la creación de emulsión no tuvo un efecto significativo en la DE y EE, hasta un valor de 6 mL en la fase dispersa, después de ese valor se intuye que el aumento en la DE y EE está relacionado con el volumen total de emulsión, y posiblemente al tamaño de gota que ocasiona un cambio en la morfología y tamaño de las partículas sólidas.

Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas

La obtención de partículas entre la escala micrométrica y nanométrica fabricadas con poli (D,L ácido láctico-co-glicólico), PLGA mediante el método de emulsión por extracción y evaporación de disolvente fue exitoso.

La encapsulación de rifampicina se partió de la metodología descrita por Pandey [33], mediante la cual se obtuvieron partículas en la escala nanométrica y se definió la dosis encapsulada y eficiencia de encapsulación de estas muestras. A partir de esta metodología se variaron parámetros de fabricación relacionados con la cantidad de fármaco y polímero utilizado, el volumen de la fase dispersa, el método y tiempo de emulsificación de la emulsión, la temperatura de extracción del diclorometano y el número de lavados de muestra. Sin embargo, lograron reproducir los mismos valores de EE y DE obtenidos por Pandey [33], pues el máximo obtenido fue a través de la fabricación de partículas mediante microfluídica con una DE = 170.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y una eficiencia de encapsulación de 24 %.

Se definió que la evaporación de diclorometano a temperatura ambiente (25°C) muestra un máximo para la DE y EE de la rifampicina. Además, se analizó el número de lavados de muestra, el cual se definió el máximo para DE y EE en 3 lavados, estos están relacionados con la presencia de compuesto en la superficie de la partícula, no obstante es necesario llevar a cabo estudios más específicos para confirmar esta hipótesis.

El tamaño de partícula fabricada también estuvo fuertemente relacionado con DE y EE, donde para partículas con tamaños en la escala micrométrica se obtuvieron los valores máximos. Este parámetro también mostró efecto en el perfil de liberación de las muestras analizadas, donde las partículas más pequeñas presentaban el efecto «burst» al inicio de la liberación y en general, se degradaban de manera rápida, mientras que para las partículas más grandes, la velocidad de degradación fue menor y el efecto «burst» no fue tan marcado.

También se logró establecer una tendencia mediante la variación de las propiedades de la fase dispersa. Mediante el parámetro Ω se analizó el efecto de la concentración de rifampicina en la fase dispersa. Un máximo fue encontrado para un valor de $\Omega = 2$. Por otro lado, una mayor concentración de polímero también contribuyó al crecimiento de la DE y EE.

Se definió que esta metodología es exitosamente aplicada para la encapsulación del compuesto SB38, el cual presenta propiedades más hidrofóbicas que la rifampicina. Los valores de DE y EE obtenidos aumentaron al variar Ω , encontrando un máximo de DE = 212.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y EE = 26 % para $\Omega = 1$. Además mediante el análisis por microscopía óptica, se encontró que el compuesto SB38 presenta fluorescencia incluso encapsulado en las partículas de PLGA, lo que posteriormente puede ser utilizado para el rastreo de las partículas después de ser administradas.

En conclusión, el método de emulsión por extracción y evaporación de disolvente es efectivo para la encapsulación de compuestos utilizando PLGA, y se concluye que para su optimización utilizando el polímero PLGA Resomer 505 el aumento en el tamaño de partícula y relación fármaco - polímero en la fase dispersa, aumenta el valor obtenido de DE y EE, además de tener una fuerte influencia en el comportamiento del perfil de liberación obtenido.

Este proyecto abre nuevas posibilidades para el estudio de nuevas variables, por ejemplo, el efecto que tendrán los parámetros analizados en pruebas biológicas «in vivo» y cómo el perfil de liberación también estará relacionado con biodisponibilidad de las partículas. El uso de PLGA también abre la posibilidad del estudio de estos mismos

factores y el efecto que tendrán si se utiliza otro peso molecular o composición (AL:AG).

En cuanto a la encapsulación de nuevos compuestos, el estudio del compuesto SB38 y el conocimiento adquirido a través del estudio de la rifampicina, permitirá una mejor aproximación a el valor de las variables aplicadas para la encapsulación de otras moléculas derivadas del SB38 y otros compuestos hidrofóbicos nuevos con actividad antituberculosis a través de la metodología de emulsificación - extracción de disolvente y su posible aplicación como nuevos tratamientos ATB.

Apéndices

Características y resultados de las muestras realizadas

Tabla 5.1. Condiciones de preparación para todas las muestras realizadas que contienen rifampicina encapsulada.

Muestra	Ω	PLGA (mg)	Vo (mL)	Vw (mL)	Condiciones de sonicación	Número de lavados	DE ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Eficiencia de Encapsulación (%)	Temperatura de extracción ($^{\circ}\text{C}$)
CR18	0.92	22.4	1	9	3min ultrasonificador	3	6.16	0.67	25
CR19	1.05	20.3	1	9	3min ultrasonificador	3	5.56	0.54	32.5
CR20	1.15	20.8	1	9	3min ultrasonificador	3	4.96	0.46	50
CR21	0.96	19.8	1	9	3min ultrasonificador	3	4.3	0.43	25 (vacío)
CR3	0.50	60.3	1	9	3min ultrasonificador	8	2.67	0.53	50
CR8	0.5	61	1	9	3min ultrasonificador	4	5.75	1.1	50
PR38	1	30.4	1	9	3min ultrasonificador	4	104.15	11.5	25
CR27	0.98	29	1	9	3min ultrasonificador	4	18.5	1.93	25
CR29	1	30	1	9	1min ultrasonificador	3	35	3.66	25
MC2	0.9	21.6	1	9	Microchip	3	170.48	23.9	25
PR1	0.23	30	1	9	3min ultrasonificador	3	2.09	0.95	25
PR3	0.5	30	1	9	3min ultrasonificador	3	3.79	0.69	25
PR5	1	30	1	9	3min ultrasonificador	2	13.9	1.42	25
PR32	1.56	30	1	9	3min ultrasonificador	2	85.17	5.97	25
PR33	1.98	30	1	9	3min ultrasonificador	2	156.1	9.32	25
PR21	0.31	20.5	1	9	3min ultrasonificador	2	3.36	1.08	25
PR22	0.6	20.5	1	9	3min ultrasonificador	2	5.4	0.91	25
PR18	1	20	1	9	3min ultrasonificador	2	6.88	0.73	25
PR19	1.34	20	1	9	3min ultrasonificador	2	11.61	0.88	25
PR20	1.61	21	1	9	3min ultrasonificador	2	8.62	0.54	25
PR41	0.9	31.7	2	8	3min ultrasonificador	2	9.37	1	25
PR42	1	31.1	3	7	3min ultrasonificador	2	9.41	0.98	25
PR43	1	29.6	4	6	3min ultrasonificador	2	14.54	1.41	25
PR45	1	30.1	6	4	3min ultrasonificador	2	47.63	5.07	25

Tabla 5.2. Condiciones de preparación para todas las muestras realizadas que contienen compuesto SB38 encapsulado.

Muestra	Ω	PLGA (mg)	Vo (mL)	Vw (mL)	Condiciones de sonicación	Número de lavados	DE ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Eficiencia de Encapsulación (%)	Temperatura de extracción ($^{\circ}\text{C}$)
CT5	0.25	20	1	9	3 min ultrasonicador	3	31.8	9.5	25
CT6	0.5	20	1	9	3 min ultrasonicador	3	46.9	9.8	25
CT7	1	20.8	1	9	3 min ultrasonicador	3	212.1	26.4	25

Resultados del perfil de liberación

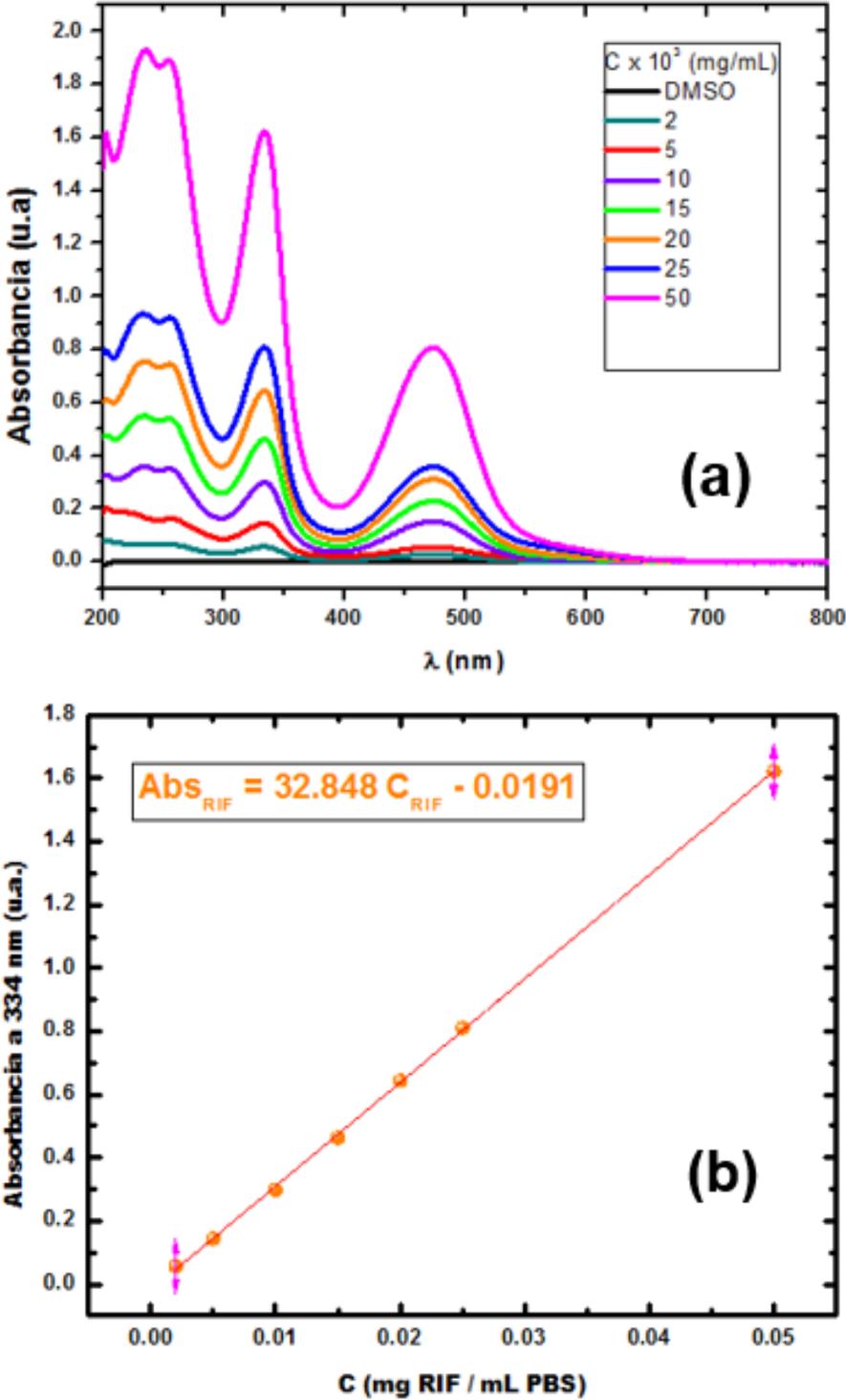


Figura 5.1. (a) Espectros de absorbancia de rifampicina en PBS a diferentes concentraciones. (b) Curva de calibración de rifampicina en PBS a 334 nm, la ecuación lineal es mostrada en el gráfico.

Tabla 5.3. Concentración inicial definida para el análisis del perfil de liberación de rifampicina.

Muestra	Concentración inicial (mg RIF/ mL PBS)
MC2	3.07E-02
CR27	8.88E-03
CR29	1.65E-02

Tabla 5.4. Resultados obtenidos para muestra MC2 del análisis del perfil de liberación de rifampicina.

Tiempo (min)	Porcentaje liberado (% mg/mg)
0	1.89
18	3.88
49	5.07
80	5.86
120	6.76
160	7.35
208	7.95
349	9.43
1443	13.90
1815	14.49

Tabla 5.5. Resultados obtenidos para muestra CR27 del análisis del perfil de liberación de rifampicina.

Tiempo (min)	Porcentaje liberado (% mg/mg)
0	6.55
11	12.72
42	18.55
73	21.97
113	25.40
153	29.17
202	33.29
343	42.20
1436	56.60
1808	61.40

Tabla 5.6. Resultados obtenidos para muestra CR29 del análisis del perfil de liberación de rifampicina.

Tiempo (min)	Porcentaje liberado (% mg/mg)
0	3.53
14	15.90
45	26.05
75	32.70
116	37.13
156	41.38
204	44.15
345	49.32
1438	56.52
1810	57.81

Referencias

1. Anaya, S. J. B. *Síntesis de bioazepintionas y la evaluación de su actividad contra Mycobacterium Tuberculosis* Tesis doct. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).
2. Asadi, A., Pourfattah, F., Szilagyi, I. M., Afrand, M. y Zya, G. Effect of sonication characteristics on stability, thermophysical properties, and heat transfer of nanofluids: A comprehensive review. *Ultrasonics sonochemistry* **58**, 104701 (2019).
3. Baluja, S., Kulshrestha, A. y Movalia, J. 1-Octanol-water partition coefficient of some cyanopyridine and chalcone compounds. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* **46**, 342-356 (2017).
4. Birnbaum, D. T., Kosmala, J. D., Henthorn, D. B. y Brannon-Peppas, L. Controlled release of β -estradiol from PLGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *Journal of Controlled Release* **65**, 375-387 (2000).
5. Blasi, P., Schoubben, A., Giovagnoli, S., Rossi, C. y Ricci, M. Fighting tuberculosis: old drugs, new formulations. *Expert Opinion on Drug Delivery* **6**, 977-993 (2009).
6. Brannon-Peppas, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International journal of pharmaceuticals* **116**, 1-9 (1995).
7. Canselier, J., Delmas, H., Wilhelm, A. y Abismail, B. Ultrasound emulsification—an overview. *Journal of dispersion science and technology* **23**, 333-349 (2002).

8. Cortes, H., Hernandez-Parra, H., Bernal-Chavez, S. A., Prado-Audelo, M. L. D. y Caballero-Floran, I. H. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials* **14**, 3197 (2021).
9. De Villiers, M. M., Aramwit, P. y Kwon, G. S. *Nanotechnology in drug delivery* (Springer Science & Business Media, 2008).
10. Gao, P., Nie, X., Zou, M., Shi, Y. y Cheng, G. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *The Journal of antibiotics* **64**, 625-634 (2011).
11. Ito, F. y Makino, K. Preparation and properties of monodispersed rifampicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **39**, 17-21 (2004).
12. Jena, S. y Das, H. Modeling of particle size distribution of sonicated coconut milk emulsion: effect of emulsifiers and sonication time. *Food Research International* **39**, 606-611 (2006).
13. Jobmann, M. y Rafler, G. Controlled release systems of biodegradable polymers: 6th communication: Control of particle size and size distribution of microparticles produced by the solvent evaporation technique. *Pharmazeutische Industrie* **60**, 979-982 (1998).
14. Judefeind, A. y de Villiers, M. M. *Drug loading into and in vitro release from nanosized drug delivery systems* (Springer Science & Business Media, NY, USA, 2008).
15. Kalluru, R., Fenaroli, F., Westmoreland, D. y Ulanova, L. Poly (lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes. *Journal of cell science* **126**, 3043-3054 (2013).
16. Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C. y Bermejo, M. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular pharmaceutics* **1**, 85-96 (2004).

17. Kaur, I. P. y Singh, H. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. *Journal of Controlled Release* **184**, 36-50 (2014).
18. Kenny, M. y Strates, B. Metabolism and pharmacokinetics of the antibiotic rifampin. *Drug metabolism reviews* **12**, 159-218 (1981).
19. Khadka, P., Dummer, J., Hill, P. C. y Das, S. C. Considerations in preparing for clinical studies of inhaled rifampicin to enhance tuberculosis treatment. *International journal of pharmaceutics* **548**, 244-254 (2018).
20. Lawlor, C., Kelly, C., O'Leary, S., O'Sullivan, M. y Gallagher, P. Cellular targeting and trafficking of drug delivery systems for the prevention and treatment of MTb. *Tuberculosis* **91**, 93-97 (2011).
21. Li, M., Rouaud, O. y Poncelet, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of pharmaceutics* **363**, 26-39 (2008).
22. Li, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials* **48**, 342-353 (1999).
23. Makadia, H. K. y Siegel, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* **3**, 1377-1397 (2011).
24. Makino, K., Nakajima, T., Shikamura, M. e Ito, F. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **36**, 35-42 (2004).
25. Mao, S., Shi, Y., Li, L. y Xu, J. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **68**, 214-223 (2008).

26. Martinez, R., Zamudio, G. J. N., Pretelin-Castillo, G. y Torres-Ochoa, R. O. Synthesis and antitubercular activity of new N-[5-(4-chlorophenyl)-1, 3, 4-oxadiazol-2-yl]-(nitroheteroaryl) carboxamides. *Heterocyclic Communications* **25**, 52-59 (2019).
27. Maulding, H., Tice, T., Cowsar, D. y Fong, J. Biodegradable microcapsules: acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medication. *Journal of Controlled Release* **3**, 103-117 (1986).
28. Meng, F., Ma, G., Liu, Y., Qiu, W. y Su, Z. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **33**, 177-183 (2004).
29. Miranda, M. S., Rodrigues, M. T. y Domingues, R. M. Exploring inhalable polymeric dry powders for anti-tuberculosis drug delivery. *Materials Science and Engineering: C* **93**, 1090-1103 (2018).
30. Na, D. H., Youn, Y. S., Lee, S. D. y Son, M.-W. Monitoring of peptide acylation inside degrading PLGA microspheres by capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of controlled release* **92**, 291-299 (2003).
31. O'hara, P. e Hickey, A. J. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization. *Pharmaceutical research* **17**, 955-961 (2000).
32. Ohashi, K., Kabasawa, T., Ozeki, T. y Okada, H. One-step preparation of rifampicin/poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis. *Journal of controlled release* **135**, 19-24 (2009).
33. Pandey, R., Sharma, A., Zahoor, A. y Sharma, S. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 981-986 (2003).
34. Rojas, V. G. L. *Obtención y caracterización de nanocápsulas de un fármaco modelo in situ a través de un sistema automicroemulsionables SMEDDS para la administración oral* Tesis doct. (FES Cuautitlán, UNAM, 2018).

35. Sanchez, L. F. L. *Sintesis y actividad tuberculosa de analogos de benzonazepinonas sustituidas en 6 y 8* Tesis doct. (Universidad Veracruzana, 2019).
36. Sharma, S., Mohan, A. y Kadiravan, T. HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management. *Indian Journal of Medical Research* **121**, 550-567 (2005).
37. Sung, J. C., Padilla, D. J., Garcia-Contreras, L., VerBerkmoes, J. L. y Durbin, D. Formulation and pharmacokinetics of self-assembled rifampicin nanoparticle systems for pulmonary delivery. *Pharmaceutical research* **26**, 1847-1855 (2009).
38. Swider, E., Koshkina, O. y Tel, J. Customizing poly (lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta biomaterialia* **73**, 38-51 (2018).
39. Takeuchi, I., Tomoda, K., Hamano, A. y Makino, K. Effects of physicochemical properties of poly (lactide-co-glycolide) on drug release behavior of hydrophobic drug-loaded nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **520**, 771-778 (2017).
40. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S. y Shakesheff, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews-Columbus* **99**, 3181-3198 (1999).
41. Ungaro, F., d'Angelo, I., Miro, A., La Rotonda, M. I. y Quaglia, F. Engineered PLGA nano-and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **64**, 1217-1235 (2012).
42. Wischke, C. y Schwendeman, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of pharmaceutics* **364**, 298-327 (2008).
43. Xiong, M.-H., Bao, Y., Yang, X.-Z., Zhu, Y.-H. y Wang, J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Advanced drug delivery reviews* **78**, 63-76 (2014).
44. Yu, B., Cao, Y., Sun, H. y Han, J. The structure and properties of biodegradable PLLA/PDLA for melt-blown nonwovens. *Journal of Polymers and the Environment* **25**, 510-517 (2017).

45. Zaleskis, R. Postgraduate Course ERS Copenhagen 2005-The side-effects of TB therapy. *Breathe* **2**, 69-73 (2005).
46. Zolnik, B. S. y Burgess, D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release* **122**, 338-344 (2007).