



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

Preparación y caracterización de nanopartículas de poli-vinil metil éter-anhídrido maléico cargadas con ácido glicirricínico destinadas al tratamiento de lesiones causadas por virus de papiloma humano (VPH).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

PAMELA BARBOSA LÖPEZ

ASESORA DE TESIS:

DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO (FES CUAUTITLAN), 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.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado a través del proyecto PAPIIT IN226119 (DGAPA/UNAM), así como mediante el proyecto PIAPI2021 (FESC/UNAM).

Se agradece el apoyo del **Dr. Edgar Oliver López-Villegas** y la **Dra. María del Rosario Espinoza-Mellado** de la Central de Microscopía, ENCB, del Instituto Politécnico Nacional, para la obtención de las micrografías por TEM.

Dr. Roberto D. Díaz Torres, del departamento de Ingeniería y Tecnología de la Fes Cuautitlán; a la **Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro** por las facilidades otorgadas para el uso de equipo y material.

A mi asesora de tesis la **Dra. Flora Adriana Ganem Rondero**, por la oportunidad de poder llevar a cabo este proyecto en el laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; gracias por todo su apoyo para llevar a cabo este proyecto y ser mi guía en el cierre de este ciclo en mi vida.

DEDICATORIA.

A MI MAMI Y MI HERMANA:

Las amo con todas mis fuerzas, gracias por nunca haber dejado de confiar en mí, por su infinita paciencia, mami gracias por siempre estar presente en cada paso de esta etapa tan complicada, por todo tu amor, por enseñarme a ser fuerte, por mostrarme el camino bonito que me hace creer y tener fe para nunca darme por vencida, por nuestras pláticas y nuestras caminatas, sin tu apoyo esto hubiera sido casi imposible, te amo mami; mi hermana Adri, gracias por ser mi ejemplo de fuerza y dedicación y mostrarme que todo es posible, por siempre estar presente, por compartir conmigo aventuras y diversión, infinitas gracias por traer al mundo a mi pequeña Micaela que llena mi corazón de amor siempre que la veo. Papi, aunque ya no estas con nosotras, sé que tu desde donde te encuentras siempre estas al pendiente de mí, gracias por haberme enseñado tantas cosas y haberme querido tanto, por interceder por mi para poder llegar hasta este punto, te extraño y sé que estarías muy contento de verme terminar esto; sé que lo estás.

A toda mi familia (Barbosa y López) todos y cada uno ocupan un lugar importante en mi corazón, gracias infinitas por ser parte de mi vida.

A mis amigos por llenar mi vida de alegría, por su amor y apoyo incondicional, agradezco la oportunidad de coincidir con ustedes en esta vida.

CONTENIDO

1	ANTECEDENTES.....	1
2	MARCO TEORICO	4
2.1	Nanopartículas	4
2.1.1	Definición	4
2.1.2	Métodos de obtención.....	5
2.1.2.1	Emulsificación - evaporación de disolvente.....	6
2.1.2.2	Emulsificación-difusión de disolvente.....	7
2.1.2.3	Desplazamiento de Disolvente	8
2.1.2.4	Salting- Out	10
2.1.3	Caracterización	11
2.1.3.1	Tamaño de Partícula	11
2.1.3.2	Índice de Polidispersión.....	13
2.1.3.3	Carga Superficial (Potencial Zeta).....	13
2.1.3.4	Encapsulamiento.....	14
2.1.3.5	Morfología	14
2.2	Nanopartículas Poliméricas de poli-vinil metil éter- anhídrido maléico (PVME-AM, Gantrez AN-119)	16
2.2.1	Poli-vinil metil éter-anhídrido maléico (Gantrez AN-119)	16
2.2.2	Método de preparación de nanopartículas poliméricas de polivinil metil éter-anhídrido maléico (NPs / PVME- AM).....	18
2.3	Ácido Glicirricínico	19
2.3.1	Origen	19
2.3.2	Historia.....	20
2.3.3	Naturaleza Química	20
2.3.4	Características Físicoquímicas	22
2.3.5	Acción Farmacológica.....	22
2.4	Microbiota vaginal.....	25
2.4.1	Definición	25
2.4.2	Microbiota vaginal y pH como factores primordiales en infecciones causadas por virus de papiloma humano (VPH)	25

2.5	VPH	26
2.5.1	Generalidades.....	26
2.5.2	Causas de la transmisión y factores de riesgo.....	27
2.5.3	Estructura genómica	27
2.5.4	Ciclo viral del VPH	29
2.5.5	CaCu y lesiones precursoras	30
2.5.6	Diagnóstico y Tratamiento	32
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS PARTICULARES	36
4	HIPOTESIS.....	36
5	EQUIPOS Y MATERIALES.....	37
5.1	MATERIALES.....	37
5.2	EQUIPOS	37
6	METODOLOGÍA	38
6.1	Método General para la preparación de nanopartículas.....	39
6.2	Efecto del tipo de agitación y la velocidad de inyección sobre las características de las nanopartículas poliméricas.....	40
6.3	Caracterización de nanopartículas poliméricas de poli-vinil metil éter-anhídrido maléico	41
6.3.1	Tamaño de Partícula.....	41
6.3.2	Potencial zeta	41
6.3.3	Morfología	42
6.3.4	Eficiencia de atrapamiento (EA).....	42
6.3.4.1	Sistema 1 (AG Encapsulado)	42
6.3.4.2	Sistema 2 (AG Encapsulado y Adsorbido)	44
6.3.4.3	Sistema 3 (AG Adsorbido).....	46
7	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	48
7.1	Efecto del tipo de agitación y velocidad de inyección sobre las características de las nanopartículas poliméricas.....	49
7.2	Caracterización.....	54
7.2.1	Tamaño de partícula	54
7.2.2	Carga eléctrica superficial (Potencial Zeta).....	56

7.2.3	Morfología	58
7.3	Eficiencia de incorporación.....	61
8	Conclusiones	64
9	PERSPECTIVAS.....	65
10	REFERENCIAS.....	66
11	ANEXO 1 Curva de Calibración AG	70
12	ANEXO 2: Prueba de t.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AG.- Ácido Glicirricínico

CaCu. - Cáncer cérvico uterino

CIN. - Neoplasia Intraepitelial Cervical

DS. – Desviación estándar

EI. - Eficiencia de incorporación

HTPLC. - Cromatografía de capa fina de alta resolución

IPD. - Índice de polidispersión

ITS. - Infección de transmisión sexual

LEIAG. - Lesión escamosa intraepitelial de alto grado

LEIBG. - Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

mg.- Miligramos

ml.- Mililitros

mV.- Milivolts

nm. - Nanómetros

NPs. - Nanopartículas

NPs / PVME-AM.- Nanopartículas poliméricas de poli- vinil metil éter- anhídrido maléico

NPs / PVME-AM/ AG.- Nanopartículas poliméricas de poli- vinil metil éter- anhídrido maléico cargadas con ácido glicirricínico

rpm. - Revoluciones por minuto

SEM. - Microscopia electrónica de barrido

TEM. - Microscopia electrónica de transmisión

VIH. - Virus de Inmunodeficiencia humana

VPH. - Virus del Papiloma Humano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de nanopartículas de acuerdo a su estructura.....	4
Figura 2. Esquema del método de evaporación de disolvente (6).....	7
Figura 3. Esquema del método de difusión de disolvente (7).....	8
Figura 4. Esquema del método de desplazamiento de disolvente (7)	9
Figura 5. Esquema del método Salting-out ((7)	11
Figura 6. Esquema de la posible fluctuación de la dispersión dinámica de la luz dinámica en partículas grandes (a) y partículas de menor tamaño (b)	12
Figura 7. Representación del potencial Zeta	14
Figura 8. Estructura química de la molécula de Gantrez AN-119.....	17
Figura 9. Hidrólisis de la molécula de Gantrez AN-119	17
Figura 10. Representación esquemática del proceso de preparación de NPs/PVME-AM y etapas donde puede adicionarse el fármaco (23)	19
Figura 11. Estructura química de AG.....	21
Figura 12. Representación esquemática de la estructura genómica del VPH (39).....	28
Figura 13. Esquema representativo del ciclo viral de VPH (35).....	30
Figura 14. Etapas de la infección por VPH y su posible transformación en CaCu (1,36)	31
Figura 15. A) citología normal; B) citología asociada a infección por VPH; C) citología asociada a lesión epitelial escamosa de alto grado; D) Adenocarcinoma (40)	33
Figura 16. Resumen de metodología experimental	38
Figura 17. Método para la preparación de NPs/ PVME-AM	39
Figura 18. Procedimiento para obtener AG encapsulado en NPs/ PVME-AM.....	43
Figura 19. Procedimiento para encapsular y adsorber AG en NPs/ PVME-AM.....	45

Figura 20. Procedimiento para adsorber AG en NPs/ PVME-AM	47
Figura 21. Mecanismo de formación de NPs en el método de desplazamiento de disolvente (43)	48
Figura 22. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, usando un microscopio JEOL-JEM1010 de las NPs; A) sin AG; B) con AG, preparadas por el método de desplazamiento de disolvente modificado	59
Figura 23. Disociación de AG	62
Figura 24. Esquema representativo de la incorporación de AG en las NPs / PVME-AM	63
Figura 25. Espectro de absorción Transcutol- agua y AG (24.8mcg/mL)	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferencia entre SEM y TEM (29)	15
Tabla 2. Propiedades Fisicoquímicas de Gantrez AN-119	16
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de AG (13).....	22
Tabla 4. Diseño experimental factorial.....	40
Tabla 5. Resultaos del diseño experimental multifactorial (Statgraphics centurion XVI.I, 2009)	49
Tabla 6. Prueba de ANOVA para valores de tamaño de partícula	51
Tabla 7. Prueba de ANOVA para valores de índice de polidispersión.....	52
Tabla 8. Prueba de ANOVA para valores de potencial Zeta.....	53
Tabla 9. Resultados de tamaño de partícula de NPs / PVME-AM placebo y conteniendo AG encapsulado	54
Tabla 10. Resultados de la determinación de potencial Zeta de NPs / PVME-AM y NPs / PVME- AM / AG	57
Tabla 11. Distribución del tamaño de partícula y micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, con microscopio JEOL-JEM1010, para NPS / PVME-AM y NPs / PVME-AM / AG.....	60
Tabla 12. Cantidad de AG incorporado en NPs/ PVME-AM	61
Tabla 13. Curva de calibración de AG	70
Tabla 14. Resultados de la curva de calibración de AG	71
Tabla 15. Precisión del sistema.....	74
Tabla 16. Resumen de resultados sobre parámetros de validación	76
Tabla 17. Prueba de F para varianzas de dos muestras para valores de tamaño de partícula	77

Tabla 18. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para valores de tamaño de partícula.....	77
Tabla 19. Prueba de F para varianzas de dos muestras para valores de índice de polidispersión	78
Tabla 20. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales para valores de índice de polidispersión	78
Tabla 21. Prueba de F para varianzas de dos muestras para valores de potencial Zeta	79
Tabla 22. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales para valores de potencial Zeta	79

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto de la velocidad de inyección y tipo de agitación en el tamaño de partícula .	50
Gráfica 2. Efecto de la velocidad de inyección y el tipo de agitación sobre el índice de polidispersión.....	51
Gráfica 3. Efecto de la velocidad de inyección y el tipo de agitación sobre potencial Zeta	52
Gráfica 4. Comparativo de valores de índice de polidispersión y tamaño de partícula entre NPs/PVME-AM y NPs/ PVME-AM/ AG.....	55
Gráfica 5. Resultados de valores de potencial Zeta en relación al tamaño de partícula para NPs/PVME-AM y NPs/ PVME-AM/ AG.....	58
Gráfica 6. Curva de calibración de AG	72
Gráfica 7. Residuales para valores de la curva de calibración de AG	72

1 ANTECEDENTES

El Virus del papiloma Humano (VPH) y su relación con el cáncer cérvico uterino (CaCu) fue estudiado por primera vez por el doctor Harald Zur Hausen, quien comprobó que la infección por VPH es parteaguas para propiciar el desarrollo de cáncer cérvico uterino (CaCu) que hoy en día sigue siendo investigado con gran interés. En estudios realizados se demuestra que el 99.8% de los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de este virus DNA tumoral transmitido por vía sexual (1). Esto ha desencadenado un sin número de estudios referentes al Virus del Papiloma Humano (VPH) (1–4), cuyas investigaciones aportaron importante información acerca de su origen, clasificación, epidemiología, diagnóstico, prevención y tratamiento. Una gran variedad de estudios ha demostrado las propiedades que posee el ácido glicirricínico (AG) como antiinflamatorio, antiviral, antitumoral, analgésico, antipirético y antioxidante, atributos que lo hacen excelente candidato en el tratamiento de diversos padecimientos (6-10). Debido a estas propiedades se han realizado estudios para el tratamiento de lesiones causadas por el VPH con ácido glicirricínico, buscando tener mayor eficacia en la mejora y el control de este padecimiento. La necesidad de mejorar e innovar las formulaciones existentes para el tratamiento de gran número de padecimientos ha dado origen al estudio de nanoacarreadores. En diversos estudios (5) se resalta la importancia de formular fármacos de escala nanométrica ya que presentan una serie de ventajas.

Principalmente, se centran en dirigir y localizar la liberación del principio activo en el sitio donde se desea que realicen su acción, lo que permite tener ventajas sobre barreras biológicas, permitiendo mayor acceso de éste al interior de las células (5,6); centran su investigación en el uso de la nanotecnología, con la formulación de nanoesferas o nanocápsulas, como base de formas farmacéuticas para vectorizar los fármacos y encontrar un sistema de transporte que libere el principio activo específicamente en las células afectadas (drug targeting). Se han realizado estudios con sistemas nanométricos, en especial nanopartículas, enfocándose en el estudio de sus métodos de preparación, tipos de sistemas de acuerdo a su composición, usos, ventajas, desventajas y caracterización (7–12). Varios son los autores que han propuesto y estudiado a las nanopartículas como vehículos ideales para el tratamiento de diversos padecimientos. El presente estudio es la continuación del proyecto titulado “Nanopartículas bioadhesivas poliméricas de poli-vinil metil éter-anhídrido maléico como sistema de liberación controlado de ácido glicirricínico en el tratamiento de cáncer cérvico uterino” desarrollado por Aguilar-Rosas (13) en el cual se establecieron las condiciones para la elaboración y caracterización de nanopartículas de poli-vinil metil éter- anhídrido maléico (GANTREZ AN-119) por el método de desplazamiento de disolvente incluyendo AG, se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de capa fina de alta resolución (HTPLC) para la cuantificación del AG, se realizaron estudios de bioadhesión con las nanopartículas a través de su interacción in vitro con mucosa gástrica de cerdo, se evaluó el efecto del AG incluido en las nanopartículas sobre cultivos de células HeLa, proponiendo un mecanismo de acción del efecto citotóxico de las nanopartículas cargadas con AG sobre estos cultivos.

De este modo, el propósito del presente trabajo fue optimizar las condiciones del método de preparación propuesto en el estudio antes mencionado con el fin de incrementar el % de

atrapamiento de AG en las nanopartículas formadas. El polímero elegido para este estudio fue el mismo, poli-vinil metil éter-anhidrido maléico (PVME-AM, GANTREZ AN-119), el cual tiene importantes propiedades: es altamente higroscópico, inodoro, insoluble en agua, pero de fácil dispersión, tiene buena capacidad bioadhesiva, también se conoce su uso como espesante y agente complejante. Una de sus mayores ventajas radica en su baja toxicidad (13,14). Estas propiedades lo hacen ideal para la formación de nanosistemas que sean capaces de contener y liberar el fármaco de forma específica.

2 MARCO TEORICO

2.1 Nanopartículas

2.1.1 Definición

Las nanopartículas son sistemas coloidales sólidos formados por materiales macromoleculares donde el principio activo se puede encontrar unido a la superficie, estar encapsulado en su interior, o bien, constituyendo parte de la matriz (10). Poseen un tamaño de entre 10 y 1000 nm (10,15). Considerando su estructura física, pueden clasificarse en nanoesferas y nanocápsulas (Figura1).

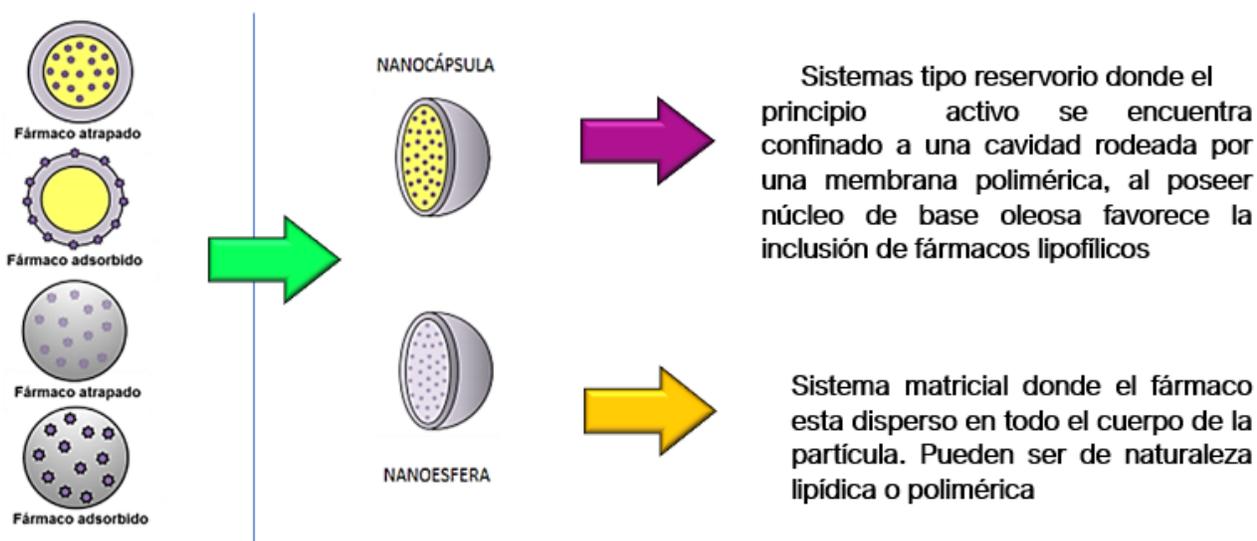


Figura 1. Clasificación de nanopartículas de acuerdo a su estructura

Las nanopartículas ofrecen diversas ventajas como las que se mencionan a continuación: Protegen la molécula encapsulada de la degradación desde el momento de su formulación, durante la administración y hasta que alcanza su lugar de acción o absorción. Confieren capacidad para atravesar las barreras biológicas, la piel, las mucosas gastrointestinal o respiratoria o bien, la barrera hematoencefálica. Facilitan alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción. Permiten llegar a compartimentos intracelulares. Controlan la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción (16).

2.1.2 Métodos de obtención

Las nanopartículas poliméricas pueden obtenerse por diversos métodos dependiendo de los requerimientos de su aplicación y las características fisicoquímicas del fármaco. Por lo general, los métodos se clasifican en dos grandes categorías: Una consiste en una reacción de polimerización de monómeros y obtención de macromoléculas y otra haciendo uso de polímeros preformados directamente (13). El uso de métodos de polimerización de monómeros para la síntesis de nanopartículas ha mostrado ciertas limitantes, ya que los monómeros son poco biodegradables o no biodegradables, también se pueden generar subproductos no biocompatibles. Estos residuos generados son difíciles de desechar por lo que requieren de un extenso trabajo de purificación para lograr obtener un producto farmacéutico adecuado y con características aceptables. Teniendo en cuenta estas limitaciones, los polímeros preformados presentan mayores ventajas para la obtención de nanopartículas al no presentar estos inconvenientes (7).

Los métodos más comunes en la preparación de nanopartículas utilizando polímeros preformados son:

- 1) Evaporación de disolvente
- 2) Difusión de disolvente
- 3) Desplazamiento de disolvente
- 4) Salting-out

2.1.2.1 Evaporación de disolvente

La evaporación de disolvente fue el primer método desarrollado para la síntesis de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros preformados. Se basa en disolver el polímero en un disolvente volátil (Figura 2). En los inicios se utilizaba diclorometano y cloroformo, pero debido a su alta toxicidad fueron reemplazados por acetato de etilo (7).

Este método tiene dos etapas : En la primera etapa, el fármaco y el polímero tienen que ser solubilizados en un disolvente orgánico inmiscible en agua, después se lleva a cabo la emulsificación de la fase acuosa la cual contiene agentes estabilizantes, por medio de agitación a alta velocidad o ultrasonificación; para así dar paso a la segunda etapa donde el disolvente es evaporado en su totalidad provocando la precipitación del polímero, formando así las nanopartículas donde podemos encontrar el fármaco disperso en la matriz polimérica (12).

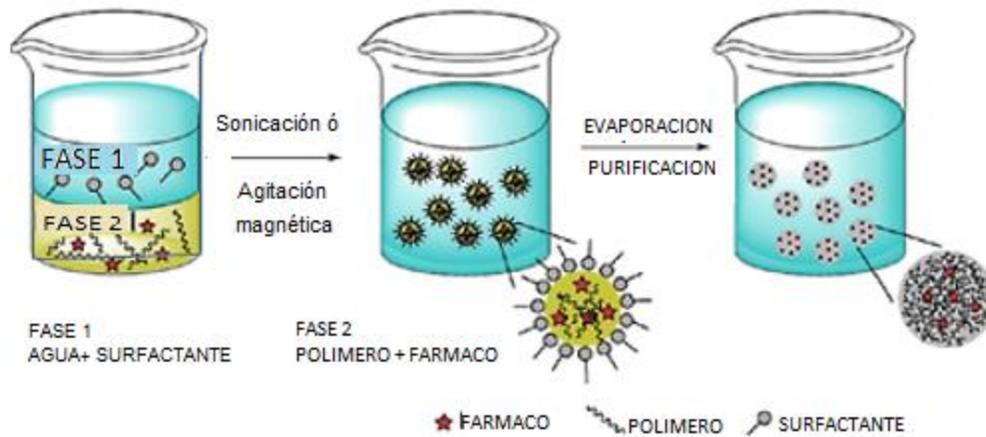


Figura 2. Esquema del método de evaporación de disolvente (6)

2.1.2.2 Difusión de disolvente

Este método se basa en la formación de una emulsión convencional aceite-agua (o/w) entre un disolvente parcialmente miscible con agua que contenga el polímero y el fármaco, y una solución acuosa que contenga un surfactante. Cabe mencionar que para una mayor eficiencia del método, el disolvente orgánico y el agua deben saturarse mutuamente a temperatura ambiente para garantizar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos al inicio del proceso (7). Posteriormente, una vez disuelto el fármaco y el polímero en la fase orgánica y el surfactante (estabilizante) en la fase acuosa, deben ser sometidas a agitación vigorosa para obtener la emulsión deseada. La adición de agua en exceso provoca la difusión del disolvente de las gotas dispersas formadas en la emulsión lo cual provoca la precipitación del polímero y da como resultado la formación de las nanopartículas con el fármaco encapsulado. Finalmente, el disolvente es eliminado por filtración o evaporación (Figura 3)(12).



Figura 3. Esquema del método de difusión de disolvente (7)

Entre las ventajas que este método presenta pueden mencionarse su eficiencia de encapsulamiento usualmente mayor al 70%, alta reproducibilidad de lote a lote, se obtienen altos rendimientos de formación, no es necesario la homogenización; pero como se presentan ventajas también hay ciertas desventajas como la gran cantidad de agua que debe eliminarse terminando la primera etapa del proceso, así como la baja eficiencia de encapsulamiento de fármacos solubles en agua debido a su fuga hacia la fase externa acuosa (12).

2.1.2.3 Desplazamiento de Disolvente

Este método también es conocido como método de nanoprecipitación. Es un método rápido y fácil para la formación de nanopartículas que implica la precipitación instantánea de un polímero a partir de una solución orgánica por difusión del disolvente a un medio acuoso (Figura 4).

Se basa en la deposición interfacial de un polímero después de desplazar el disolvente orgánico de una solución lipófila a una fase acuosa. El polímero se disuelve en un disolvente miscible en agua de polaridad intermedia y esta solución se añade a un medio acuoso con agitación constante, ya sea de un solo disparo, o con velocidad controlada gota a gota (13).

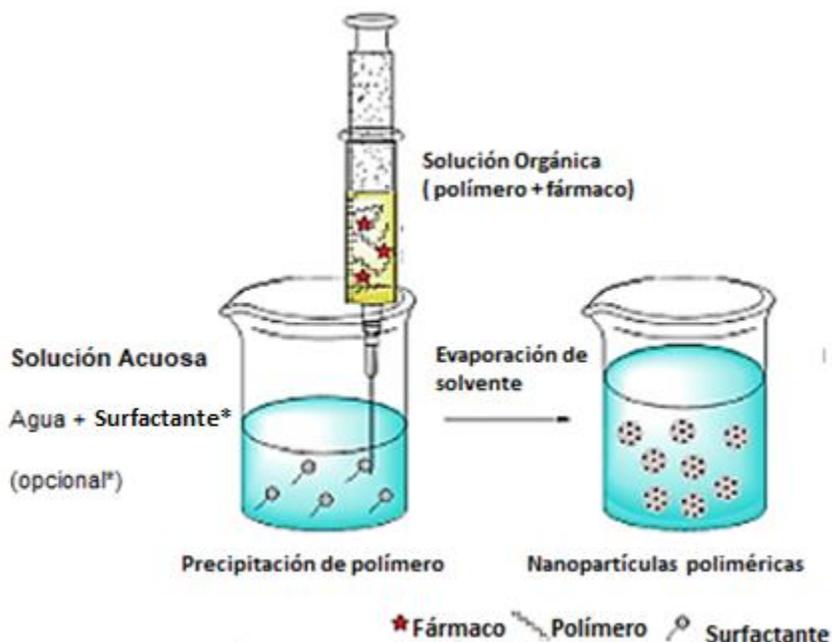


Figura 4. Esquema del método de desplazamiento de disolvente (7)

Debido a la rápida difusión de la solución que contiene al polímero, las nanopartículas se forman instantáneamente por evadir a las moléculas de agua (7). El uso de este método se limita a disolventes miscibles en agua ya que su velocidad de difusión es la adecuada para una emulsificación espontánea (etanol o acetona).

Sin embargo, este método es frecuentemente utilizado para la encapsulación de fármacos lipofílicos debido a la miscibilidad de los solventes con agua. Gracias a una modificación en el pH del medio de dispersión, es posible modificar la ionización y por tanto, la solubilidad del fármaco en el medio acuoso, lo que permite la aplicación de este método para facilitar la encapsulación de fármacos hidrofílicos (13).

2.1.2.4 Salting- Out

Este método se basa en la separación de un disolvente miscible en agua de una solución acuosa por medio del efecto de Salting-out (Figura 5). Este procedimiento puede ser considerado una modificación del método de emulsificación- difusión de disolvente. Como un primer paso, el polímero y el fármaco deben ser disueltos en un disolvente como acetona, que posteriormente será emulsionado en una solución acuosa que contiene el agente precipitante o Salting-out (puede ser cloruro de magnesio, cloruro de calcio, acetato de magnesio) y un estabilizante coloidal (hidroxietilcelulosa). Esta emulsión aceite/agua es diluida con un volumen adicional de agua para provocar la difusión del disolvente orgánico, por ejemplo, acetona en la fase acuosa, provocando la formación de las nanopartículas (12).



Figura 5. Esquema del método Salting-out ((7)

2.1.3 Caracterización

Las características más importantes de los sistemas nanoparticulados son: tamaño de partícula, carga superficial, liberación del fármaco y eficiencia de encapsulación (10).

2.1.3.1 Tamaño de Partícula

Es de las propiedades más importantes de la caracterización de nanopartículas, ya que dependiendo de ésta se puede predecir el destino biológico ya sea órganos, tejidos o células dañadas, disminuyendo la toxicidad asociada al fármaco al lograr asociar las nanopartículas al destino biológico específico. Permite que la liberación del principio activo sea poco invasiva, ya que el tamaño nanométrico permite atravesar poros y membranas celulares; Otorga control de la liberación incrementando la efectividad del fármaco.

La reducción del tamaño de partícula aumenta la velocidad de disolución, lo que permite una mejor biodisponibilidad del principio activo (11).

Uno de los métodos para determinar el tamaño de partícula es la espectroscopía de correlación fotónica que utiliza la técnica de dispersión dinámica de la luz. Dicha técnica relaciona las fluctuaciones de la intensidad de luz que dispersa una partícula en solución bajo un movimiento browniano en función del tiempo (13).

Este movimiento de las partículas provoca cambios en la intensidad de la dispersión de la luz cuando el láser choca con ellas. Entonces, cuando las partículas son pequeñas se mueven rápidamente lo que acelera la variación de la intensidad de dispersión (Figura 6). Mientras que las partículas más grandes que se mueven lentamente llevan a variaciones de dispersión más lentas (17).

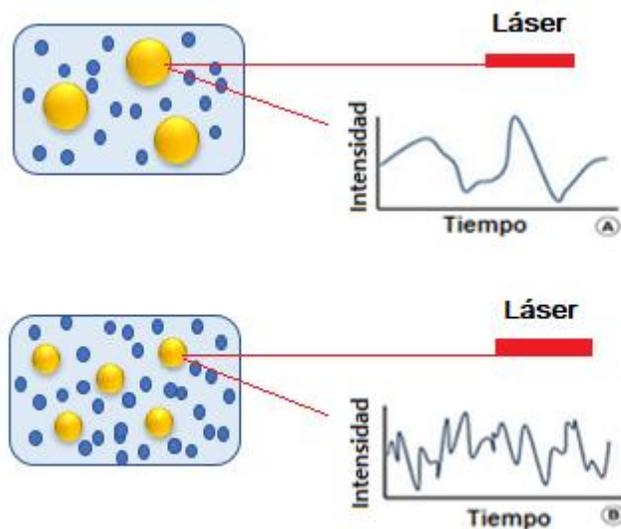


Figura 6. Esquema de la posible fluctuación de la dispersión dinámica de la luz dinámica en partículas grandes (a) y partículas de menor tamaño (b)

2.1.3.2 Índice de Polidispersión

El índice de polidispersión es un parámetro obtenido de manera simultánea al tamaño de partícula, este provee información sobre el grado de dispersión del tamaño de las partículas. Un valor que va desde 0 a 1 e indica heterogeneidad en la distribución de tamaño de nanopartícula de las muestras, los valores más cercanos a 0 indican mayor monodispersidad en las muestras, mientras que los valores cercanos a 1 indican mayor variabilidad en los tamaños(18).

2.1.3.3 Carga Superficial (Potencial Zeta)

Cuando las partículas se encuentran dispersas en un medio acuoso, su superficie adquiere una carga ya sea por la ionización de grupos de superficie o por adsorción de especies cargadas. Esta carga adquirida se expresa mediante potencial zeta, que es sin más, una carga eléctrica que existe alrededor de las partículas. Es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unida a la partícula dispersa (11).

La importancia del potencial zeta es que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales, mostrando el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión. Un alto potencial zeta indica que la solución o dispersión se resiste a la agregación por lo que existe mayor estabilidad y las partículas se mantienen en suspensión (Figura 7). Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera la repulsión y se forman flóculos, los cuales pueden sedimentar. Por consiguiente, los coloides con alto potencial zeta se estabilizan eléctricamente y los coloides con bajos potenciales tienden a coagular o flocular (19).

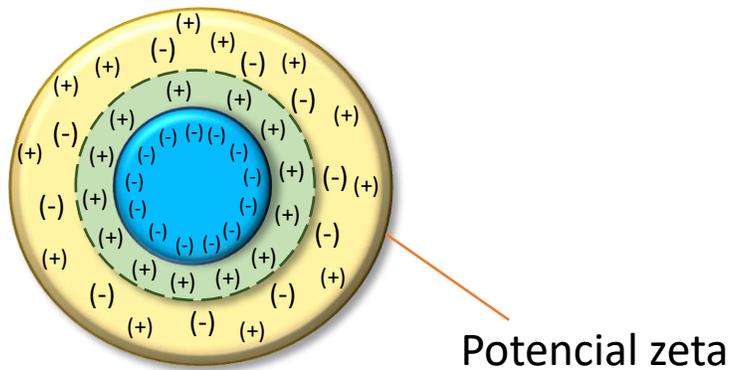


Figura 7. Representación del potencial Zeta

2.1.3.4 Encapsulamiento

El encapsulamiento es el proceso mediante el cual se introduce a la matriz una sustancia activa, con el fin de impedir que se pierda, para protegerla de interacciones con otros compuestos y promover su liberación bajo condiciones controladas, o bien para aportar características deseadas en casos específicos. Encapsular confiere ventajas como: Mejorar la estabilidad del fármaco, aumentar su solubilidad, absorción y biodisponibilidad, así como controlar su liberación (20).

2.1.3.5 Morfología

La microscopía electrónica involucra la interacción de los electrones con la materia. Para el estudio de sistemas coloidales, las microscopías electrónicas de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) son las técnicas más directas utilizadas para determinar el tamaño y la morfología de las partículas (21).

La microscopía electrónica puede capturar imágenes con una resolución muy alta; TEM y SEM son los tipos de microscopía electrónica más comunes. SEM es un tipo de microscopía que usa un haz muy fino de electrones para escanear la superficie de la muestra. La imagen que nos brinda otorga información topográfica y de la composición elemental de la muestra, captura imágenes blanco y negro 3-D. Por otro lado, TEM utiliza un amplio haz de electrones para crear una imagen de la estructura interna de la muestra, detallando su morfología, composición y estructura. Los componentes de SEM y TEM son muy similares; ambos tienen una fuente, un cañón que emite el flujo de electrones hacia la muestra, pero las diferencias de función entre los dos son muy significativas, la tabla 1 resume las diferencias existentes(22).

Tabla 1. Diferencia entre SEM y TEM (29)

	Microscopio electrónico de barrido (SEM)	Microscopio electrónico de transmisión (TEM)
Flujo de electrones	haz fino y enfocado	haz ancho
Tipo de imagen	topográfico / de superficie	estructura interna
Resolución	baja	alta
Ampliación	hasta 2 millones de veces	hasta 50 millones de veces
Dimensión	3-D	2- D
Espesor de la muestra	muestras finas y gruesas	muestras ultrafinas
Preparación de la muestra	sencilla	elaborada
Costo	menos costo	más costo
Velocidad	rápido	lento
Dificultad de operación	facil de usar	requiere mas capacitación

2.2 Nanopartículas Poliméricas de poli-vinil metil éter- anhídrido maléico (PVME-AM, Gantrez AN-119)

2.2.1 Poli-vinil metil éter-anhídrido maléico (Gantrez AN-119)

El copolímero Gantrez AN-119 posee propiedades fisicoquímicas que lo caracterizan (Tabla 2). Se utiliza en el campo farmacéutico debido a su capacidad de formar películas de recubrimiento y también debido a su propiedad bioadhesiva. También se conoce su uso como espesante y agente complejante. Una de sus mayores ventajas radica en su baja toxicidad (14).

Tabla 2. Propiedades Fisicoquímicas de Gantrez AN-119

CARACTERÍSTICAS		Polvo blanco, inodoro e higroscópico
SOLUBILIDAD		Soluble en: alcohol, fenoles, aldehídos, piridina, ésteres alifáticos y cetonas
		Se dispersa en: Agua
		Insoluble en: Hidrocarburos aromáticos y halogenados
VISCOSIDAD ESPECÍFICA (CP A 25°C)		0.1 a 0.5
Gravedad específica (25°C / conc)		1.018 al 5%

La molécula de Gantrez AN-119 (Figura 8) está constituida por una cadena lineal de monoalquil ésteres que contiene grupos metil vinil éter y anhídrido maléico (13).

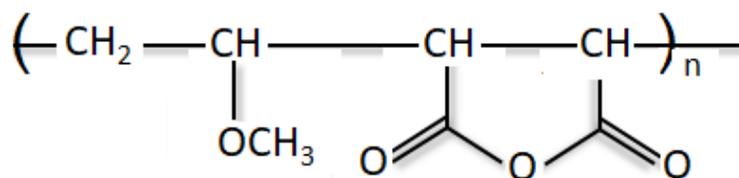


Figura 8. Estructura química de la molécula de Gantrez AN-119

A pesar de ser insoluble en agua, al tener contacto con ella, el grupo anhídrido de la molécula se hidroliza a su forma ácida paulatinamente lo que favorece su solubilización (Figura 9) (14).

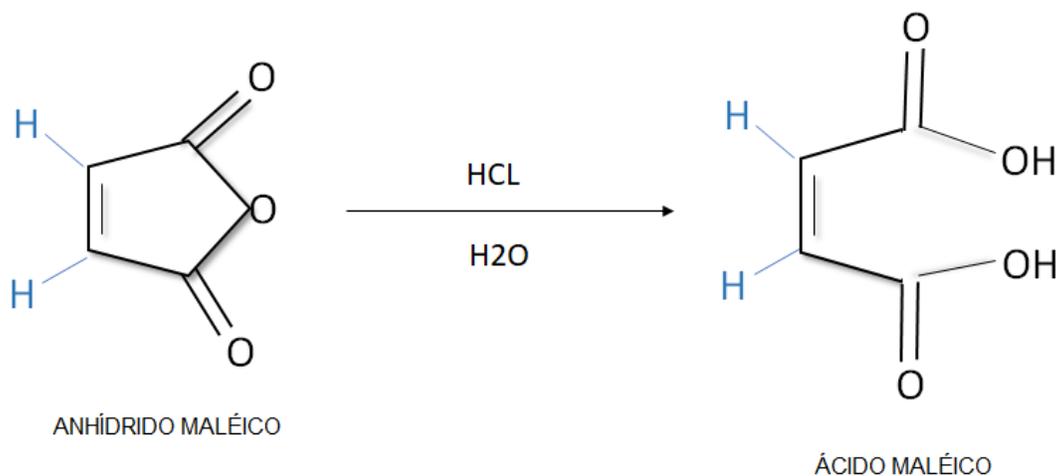


Figura 9. Hidrólisis de la molécula de Gantrez AN-119

De esta manera, conforme el polímero se hidroliza, la suspensión de apariencia lechosa se transforma en una solución transparente, inodora y ligeramente viscosa (13).

2.2.2 Método de desplazamiento de disolvente para preparación de nanopartículas poliméricas de polivinil metil éter-anhídrido maléico (NPs / PVME- AM)

El proceso de fabricación de NPs / PVME-AM mediante desplazamiento de disolvente es necesario disolver el polímero en un volumen específico de acetona y posteriormente se adiciona una solución hidroalcohólica bajo agitación magnética para llevar a cabo la desolvatación. Las partículas se forman instantáneamente en el medio manifestándose como una suspensión lechosa. A continuación, deben retirarse los disolventes orgánicos (acetona y etanol) mediante evaporación a presión reducida para obtener las partículas en una suspensión acuosa más estable, en el proceso es necesaria una etapa suplementaria de estabilización de las partículas mediante el uso de agentes reticulantes como la albúmina humana y el 1,3-diaminopropano, povidona o gelatina. Posteriormente las nanopartículas formadas pueden ser purificadas mediante ultracentrifugación y finalmente pueden liofilizarse para su conservación (Figura 10) (9,14).

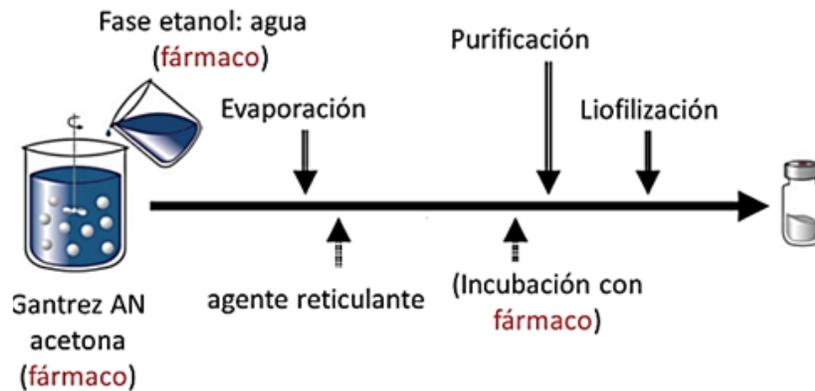


Figura 10. Representación esquemática del proceso de preparación de NPs/PVME-AM y etapas donde puede adicionarse el fármaco (23)

2.3 Ácido Glicirricínico

2.3.1 Origen

El ácido Glicirricínico (AG) es uno de los componentes de la raíz *Glycyrrhiza glabra*, también conocida como regaliz, planta nativa del centro y suroeste de Asia, cultivada en regiones templadas y subtropicales del mundo incluyendo Europa y Asia (24). Crece especialmente en zonas arenosas, cerca de ríos o zonas con corriente de agua en general. Las flores son de color azul o púrpura que crecen en racimos alargados. La raíz es flexible y de sabor dulce (25).

2.3.2 Historia

El regaliz es una de las plantas medicinales más utilizada en el mundo, encontrada en formulaciones tradicionales desde la antigüedad. El uso de esta planta se remonta a las antiguas culturas asiática, egipcia, china e india, al igual que fue muy apreciada por los romanos y los griegos. Las fuentes indican que era utilizada para tratar síntomas atribuidos a infecciones del tracto respiratorio y en síntomas de hepatitis.

Aparte de ser apreciada por sus usos terapéuticos también es conocida por su uso como edulcorante, gracias a su sabor dulce. De hecho su nombre viene del griego *glukus* que significa dulce y *rhiza* que quiere decir raíz (25).

2.3.3 Naturaleza Química

El ácido glicirricínico (AG) es una molécula de naturaleza ácida (Figura 11), donde se pueden localizar tres grupos carboxilo y cinco grupos hidroxilo los cuales tienen la capacidad de interactuar con otros grupos funcionales formando puentes de hidrógeno (15).

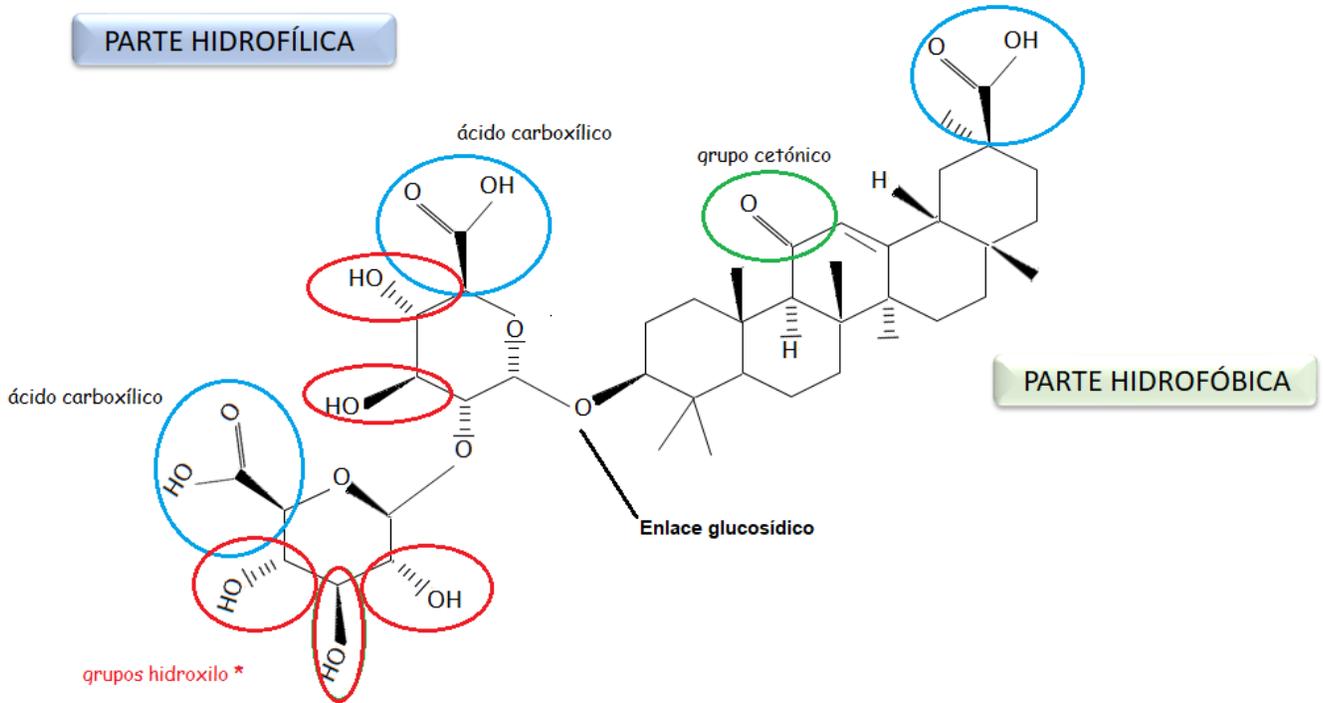


Figura 11. Estructura química de AG

El AG posee propiedades de superficie muy propias de su tipo, como gran actividad interfacial, la capacidad de formar micelas capaces de asociarse y orientarse. Puede formar geles rígidos a pH ácidos y concentraciones bajas, y presenta una gran capacidad como agente emulsificante debido al grupo carboxilo del extremo hidrofóbico de la molécula que se disocia fácilmente (Tabla 3) (5,20) .

2.3.4 Características Fisicoquímicas

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de AG (13)

Fórmula molecular	C₄₂H₆₂O₁₆
Peso molecular	822.94 g/mol
Punto de Fusión	209 °C
Coeficiente de partición	Log K o/w = 2.80
Solubilidad	Muy soluble en agua caliente, etanol Prácticamente insoluble en éter
pka 's	pka1= 2.76; pka2= 2.81; pka 3= 4.71
Concentración micelar crítica	2 a 3 x 10 ⁻⁴ mol/L
Apariencia física	Polvo blanco a amarillo claro
Naturaleza química	Saponina triterpenoide de origen natural
Uso terapéutico	Antiviral, antiinflamatorio, antioxidante, antiulceroso, antialérgico.

2.3.5 Acción Farmacológica

El AG ha demostrado tener muchas propiedades farmacológicas entre las que se encuentran su poder antiinflamatorio, antiulceroso, antialérgico, modulador del sistema inmune y antiviral, lo que ha impulsado la investigación en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de diversos padecimientos (26). El efecto antiinflamatorio y antiulceroso del AG se produce por la inhibición de la producción de prostaglandinas y por su gran capacidad antioxidante.

Se ha visto que incrementa en la síntesis de interferón, provocando la activación de los macrófagos aumentando las propiedades fagocíticas y bactericidas, produciendo entonces una doble acción: antiviral y antiproliferativa (27). Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales el AG logra su efecto antiinflamatorio; el primero es inhibiendo el metabolismo de glucocorticoides. El segundo es inhibiendo los procesos generados por neutrófilos que son los mediadores de la inflamación. El potencial terapéutico del AG es limitado debido a su escasa solubilidad en agua, así como en fluidos biológicos que resultan en una baja biodisponibilidad. Para superar este problema, en los últimos años se han estudiado varias preparaciones incluyendo AG. Estos incluyen: liposomas, nanopartículas y complejos de inclusión con ciclodextrinas (26).

El AG ha sido propuesto como antiviral, actuando sobre diversos virus *in vitro* e *in vivo*, impidiendo la replicación tanto de los virus ADN y ARN, virus varicela zoster (VZV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano, influenza A y B, Herpes Simple (HSV) 1 y 2, Hepatitis B y C, sin toxicidad de las líneas celulares usadas en diversos ensayos. El AG disminuye la replicación de los virus en un estado temprano, además impide la salida del virión de su cápside y con esto evita su penetración a las células.(24)

Se ha demostrado su acción antioxidante mediante la inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata y la protección de la función mitocondrial ante el estrés oxidativo. La actividad hepatoprotectora se ha estudiado *in vitro*, demostrándose que previene cambios en la permeabilidad de la membrana celular (27).

Estudios realizados indican que el metabolito ácido 18- β glicirricínico tiene actividad antitumoral debido a que induce la apoptosis de células tumorales.

Los nuevos hallazgos sugieren que la mayoría de los mecanismos de regulación del crecimiento celular se dañan en el proceso de inicio del cáncer y el crecimiento celular se sale de control. La apoptosis o muerte celular programada es uno de los mecanismos fundamentales que regulan el crecimiento y la muerte celular. Básicamente, la apoptosis se activa mediante un receptor de superficie celular llamado Fas que se une a un ligando en la célula activadora que a menudo es un linfocito llamado ligando Fas (FasL). La interacción de Fas y FasL conduce a la muerte celular. Estudios recientes han demostrado que muchos cánceres se han vuelto resistentes a la apoptosis (28). Efectos Gastrointestinales: El AG tiene propiedades antiulcerosas, parece elevar la concentración de prostaglandinas que promueven la secreción de mucosa y la proliferación de células en el estómago. Efectos antioxidantes: se ha mostrado que algunos derivados de la glicirricina protegen la piel de radicales libres. Acción Hepatoprotectora: En el mundo, especialmente en Asia, el AG es usado en tratamientos intravenosos de hepatitis B, se ha observado que hace decrecer los niveles de aminotransferasa en pacientes con hepatitis crónica. Esto sugiere que el AG tiene un efecto que previene el desarrollo de células hepáticas cancerígenas (27).

Actualmente existen diversos medicamentos que contienen AG en su formulación y son utilizados en el tratamiento de algunos padecimientos; entre estos medicamentos se encuentran: **EPIGEN®** Solución spray, utilizado como antiherpético en el tratamiento de herpes simple (VSV 1 y HSV2); **VIUSID®**, jarabe, usado como antiviral contra hepatitis B (VHB) y C (VHC) y el virus de la malaria; **GLIZIGEN®**, en spray y barra labial, utilizado como antiviral en infecciones de origen sexual (29).

2.4 Microbiota vaginal

2.4.1 Definición

Se le denomina microbiota al conjunto de comunidades microbianas específicas y complejas, los cuales son diferentes dependiendo del sitio del cuerpo en el que se encuentren. Las bacterias que habitan en la vagina humana son la primera línea de defensa contra agentes patógenos, tanto por exterminio directo como por exclusión competitiva de éstos. Actualmente se ha dado un enorme crecimiento en el entendimiento de la función de la flora vaginal, la interacción entre las comunidades bacterianas y el ambiente externo, que tienen gran influencia en la salud sexual y las enfermedades de transmisión sexual (30).

Se han identificado diferentes tipos de microbiota vaginal, predominando cuatro especies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii* cuyos niveles poblacionales están directamente relacionados con la salud de la vagina (31).

2.4.2 Microbiota vaginal y pH como factores primordiales en infecciones causadas por virus de papiloma humano (VPH)

Se ha planteado la hipótesis de que la microbiota vaginal interactúa con los agentes patógenos de transmisión sexual de dos maneras: Una es que la microbiota vaginal contribuye de manera directa en los procesos patológicos de las infecciones genitales y sus secuelas a largo plazo, y otra es que los agentes patógenos de infecciones de transmisión sexual (ITS) podrían influir en la composición de la microbiota vaginal (31). También debe relacionarse el pH con la salud de la microbiota vaginal.

El pH normal de las secreciones vaginales se encuentra dentro de un rango de 3.6 hasta 5.0 (4). Después de la menopausia el pH aumenta de 7.0 a 7.4 debido a la disminución en la producción de glucógeno en las células (32). Un pH dentro de los límites es indicativo de una microbiota vaginal sana, la cual es capaz de proteger al organismo de agentes patógenos externos, no obstante un pH por arriba de 5 se ha asociado a una prevalencia del VPH y a neoplasia cervical (33).

2.5 VPH

2.5.1 Generalidades

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Son un grupo de virus de ADN de doble cadena, no poseen envoltura y tienen un diámetro aproximado de entre 52-55 nm. La importancia de saber más acerca de la naturaleza de este virus recae en que es un agente comúnmente ligado a diferentes tipos de cánceres, entre ellos del cuello uterino (34). Hoy en día se conocen más de 100 tipos virales que se relacionan con la capacidad oncogénica, se clasifican en tipos de bajo y alto riesgo. Los que pertenecen a la categoría de bajo riesgo tienen poca o nula capacidad de causar CaCu, pero son causantes de la formación de verrugas genitales, estos VPH de bajo riesgo son : 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81. Por su parte los VPH de alto riesgo más frecuentes son: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 68 y 66. De los cuales el tipo 16 y 18 están relacionados con el 70% de los casos de CaCu (35).

2.5.2 Causas de la transmisión y factores de riesgo

El VPH es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes en el mundo, misma que puede ser asintomática por mucho tiempo (36). Usualmente las infecciones por VPH son transitorias, pero existen factores que pueden incrementar su persistencia, entre ellos puede haber factores genéticos o adquiridos por la edad, la inmunodepresión, el tabaquismo y factores virales (genotipo, carga viral, integración). Entre los posibles factores de riesgo de contagio se encuentran: Tener más de una pareja sexual, pareja sexual masculina sin circuncidar, uso a largo plazo de anticonceptivos hormonales, infección por VIH (3).

Además de las causas ya mencionadas, se han identificado otros factores de riesgo que parecen asociarse con el comportamiento del VPH entre los que se encuentran los factores nutricionales (la deficiencia de antioxidantes como folatos, vitaminas A, C y E) (37).

2.5.3 Estructura genómica

El virus del VPH es de estructura icosaédrica con una doble cadena de ADN circular de 7500 a 8000 pares de bases. La cápside del virión consta de dos proteínas, la L1 y L2 conocidas como promotores tardíos que constituyen la cápside (Figura 12). El VPH codifica de 8 a 10 genes y los factores necesarios para la producción, transcripción, traducción del virus y replicación de ADN los otorga la célula hospedera (36). El genoma viral codifica dos proteínas que se conocen con el nombre de proteínas tardías y seis proteínas más denominadas proteínas tempranas. De acuerdo con su función están organizadas de la siguiente manera:

- Proteínas tempranas no estructurales: E1-E7 Codifican proteínas que funcionan como genes replicadores y reguladores que se transcriben al inicio del ciclo vital del virus.
- Proteínas tardías estructurales: L1 y L2 Codifican las proteínas de la cápside que se expresan al final del ciclo vital de virus.
- Proteínas reguladoras (LCR): Esta es la región larga de control que contiene elementos de control de la transcripción y regulación, es una zona no codificante (38,39) .

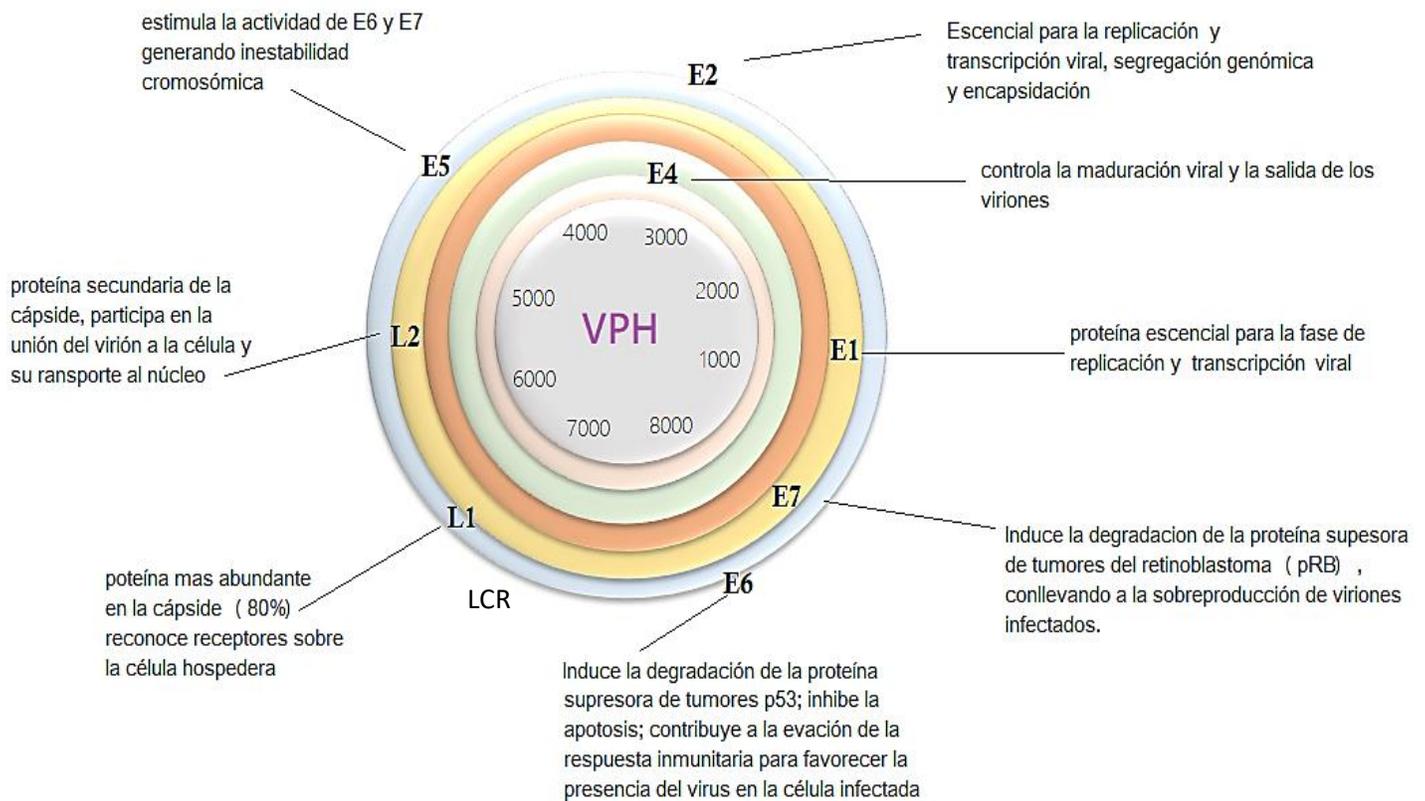


Figura 12. Representación esquemática de la estructura genómica del VPH (39)

2.5.4 Ciclo viral del VPH

El ciclo y crecimiento del virus del VPH está directamente relacionado con el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El virus inicia su ciclo infectando a las células de las capas basales del epitelio, aquí inicia la transcripción de sus genes. La manera en que el virus del VPH llega hasta este punto es por medio de lesiones, abrasiones o microheridas que se producen en el tejido (Figura 13). El virus se une a la célula por medio de receptores de membrana específicos ($\alpha 6$ -Integrina).

Una vez ocurrido esto, el virus se establece en el núcleo de la célula infectada; en este punto del ciclo, el ADN viral permanece en estado episomal (circular) y fuera de los cromosomas de la célula anfitriona, replicándose a niveles bajos (entre 50 y 100 copias por célula), en coordinación con los mecanismos de división propios de la célula infectada. Cuando estas células se diferencian y migran de la capa basal al estrato escamoso del epitelio, la replicación viral se estimula (al menos 1000 copias por célula), produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. El último paso en el ciclo es el ensamble del virión y su maduración, que ocurre en las capas superiores del epitelio donde es liberado para poder infectar a otras células cercanas (34–36).

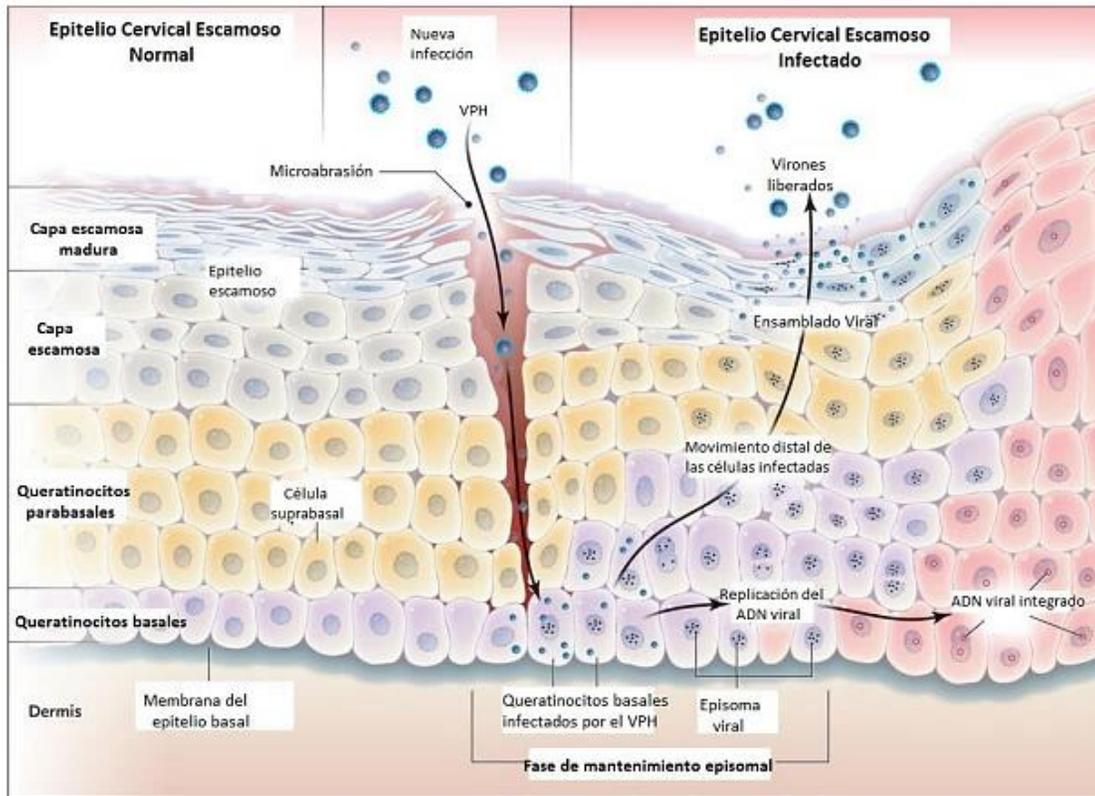


Figura 13. Esquema representativo del ciclo viral de VPH (35)

2.5.5 CaCu y lesiones precursoras

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es una enfermedad que se desarrolla en la zona de transformación de la unión escamo-columnar del cuello uterino, a partir de lesiones recurrentes después de una infección por VPH, se ha demostrado que casi todos los casos de cáncer cervical y de neoplasia intraepitelial cervical severa son positivos al ADN viral de VPH. Se conocen diversos tipos de CaCu entre los que predominan el escamoso (90 - 95%) y el adenocarcinoma cervical (<5%).

Las lesiones precursoras son crecimientos anormales de las células escamosas del cuello uterino y éstas se clasifican en lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) o neoplasia intraepitelial cervical 1 (CIN 1) o lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) o neoplasia intraepitelial cervical 2 (CIN 2)- neoplasia intraepitelial cervical 3 (CIN 3). La mayoría de las CIN 1 regresan con poca frecuencia, no obstante, pueden pasar de ser de bajo a alto riesgo, ya que a medida en que es recurrente se lleva a cabo la integración del ADN viral que puede llevarlo al punto de ser de alto riesgo (2,36). El cáncer cérvico uterino se distingue por ciertas fases. La clasificación morfológica de la carcinogénesis va desde : Epitelio normal, NIC en sus tres grados NIC 1, NIC 2 y NIC 3 y por último carcinoma invasor desde grado I hasta grado IV (Figura 14) (36).

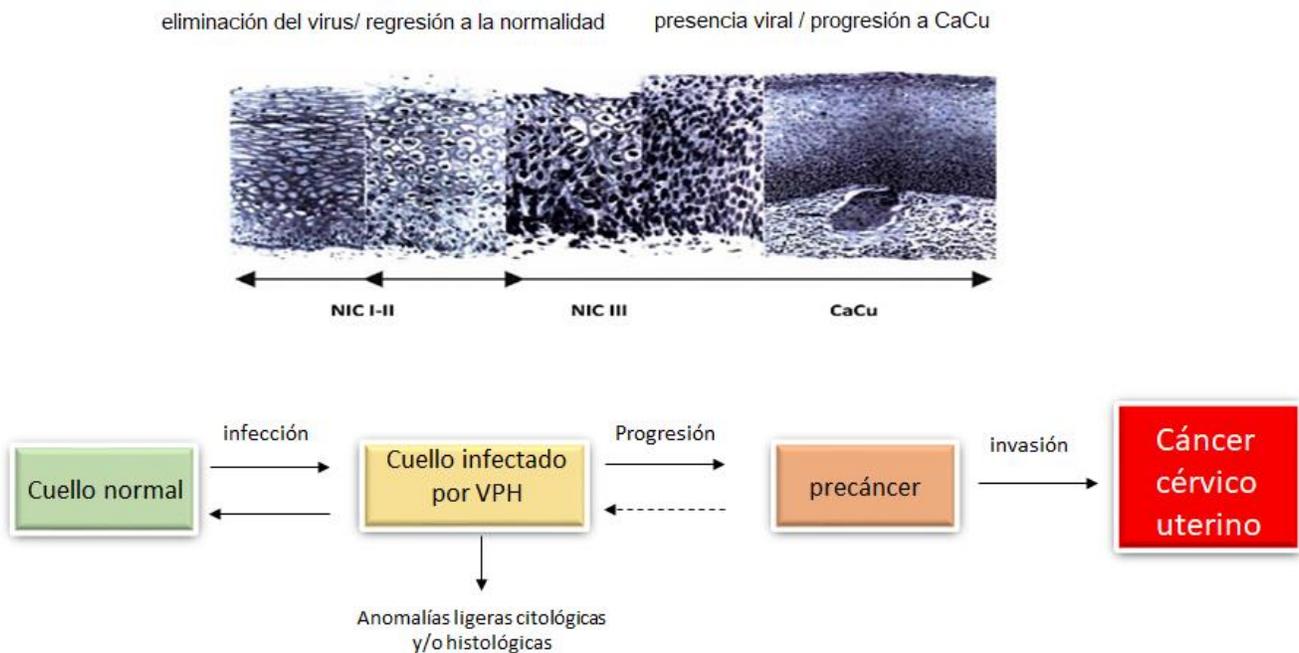


Figura 14. Etapas de la infección por VPH y su posible transformación en CaCu (1,36)

2.5.6 Diagnóstico y Tratamiento

La mortalidad por el cáncer cervical ha disminuido aproximadamente en un 70% debido a los programas de detección temprana de los cambios celulares en el cérvix. Se ha establecido que la edad para detener el seguimiento es a los 65 años de edad si durante la última década los resultados de la prueba de Papanicolaou han sido normales (37).

El diagnóstico citológico se basa en la técnica de Papanicolaou y Traut (1941), que tiene en cuenta las propiedades de las células del epitelio del cuello uterino y las características nucleares y citoplasmáticas (Figura 15). Permite diagnosticar las lesiones específicas infecciosas por Trichomonas, Chlamydias, virus del Herpes, VPH y otras (3).

En una citología asociada a lesiones moderadas causadas por VPH las células tienen un tamaño general grande, el núcleo es el triple de tamaño del área de una célula normal, las células sufren hiperchromasia nuclear y hay presencia de coilocitos. En lesiones intraepiteliales de alto grado se ven afectadas las células menos maduras, su tamaño es variable y la membrana nuclear es muy irregular. En un adenocarcinoma las células están dispuestas en lámina, grupos o rosetas con núcleos aglomerados superpuestos que a veces sobresalen de la periferia, los núcleos están agrandados, elongados y estratificados; hay presencia de hiperchromasia nuclear, es frecuente observar mitosis y cuerpos apoptóticos (40).

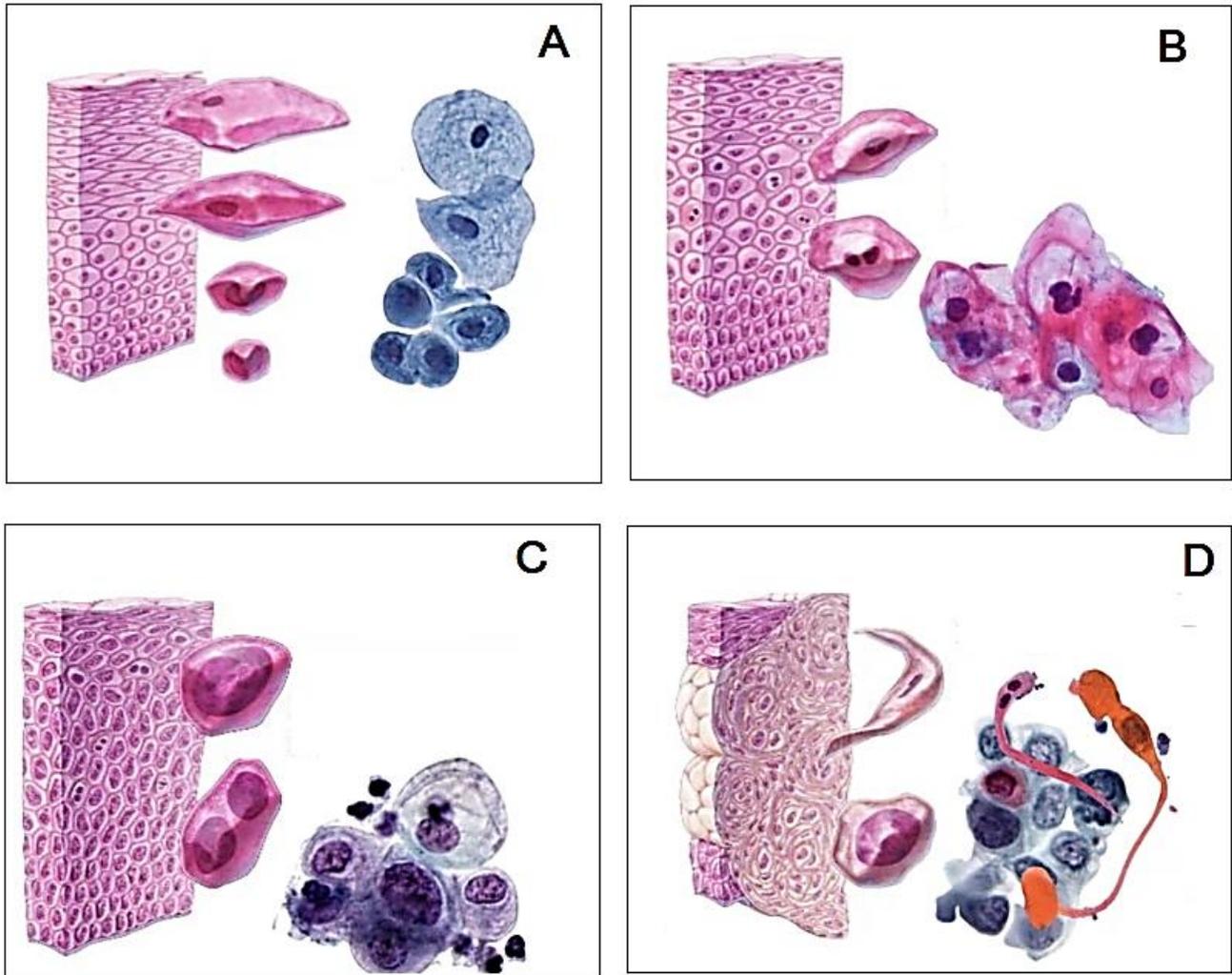


Figura 15. A) citología normal; B) citología asociada a infección por VPH; C) citología asociada a lesión epitelial escamosa de alto grado; D) Adenocarcinoma (40)

La colposcopia se realiza con la utilización de ácido acético al 5% y visión bajo colposcopio, permite detectar lesiones que se han categorizado en positivas o negativas. Entre los resultados anormales o positivos se citan la lesión aceto blanca que puede variar en intensidad y tiempo de tinción en dependencia de la cantidad de proteínas acumuladas en el epitelio, el punteado, el mosaico y la presencia de vasos atípicos (3).

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una de las técnicas moleculares que con mayor frecuencia es utilizada para detectar el ADN viral del VPH en células cervicovaginales permitiendo conocer de esta manera la prevalencia de la infección en mujeres citológicamente normales y en aquellas con enfermedades (displasia ó cáncer). A través de estos métodos se ha hecho evidente que el ADN del VPH constituye el factor de riesgo más significativo para el desarrollo de estas enfermedades. La finalidad de la PCR es identificar el genoma del VPH en células cérvico-vaginales, estimar la prevalencia de la infección, determinar la prevalencia y la variabilidad de genotipos circulantes en nuestra población y relacionar el genotipo de VPH con el tipo de lesiones genitales (41).

El tratamiento de las lesiones causadas por el VPH tiene diferentes modalidades terapéuticas. Por un lado, los métodos químicos que involucran citotoxicidad inducida químicamente: a) *Podofilina*: está indicada solo en el tratamiento de los condilomas acuminados producidos por virus del papiloma humano en la vulva, región perineal y perianal. No se aplica en lesiones del cuello uterino por su potencial de poder oncogénico. Previene la unión de la polimerización de la tubulina requerida para el ensamble de los microtúbulos de los núcleos celulares, b) *Ácido Tricloroacético*: Es un agente cáustico muy utilizado en el tratamiento de lesiones de bajo grado y acuminadas, c) *Interferón*: Posee un efecto antiviral, antiproliferativo e inmunomodulador. Su administración no está exenta de efectos no deseados como: fiebre, escalofríos, náuseas, vómito y alteración de la función hepática; su aplicación se realiza por vía sistémica, intramuscular o inyección intraperitoneal, d) *Ácido Glicirricínico*: En estudios realizados, el ácido glicirricínico ha demostrado remitir lesiones intraepiteliales de bajo grado en pacientes tratados a la cuarta semana de iniciado un tratamiento con dos vías de administración: oral cada 12 horas y de forma tópica (aerosol) cada 8 horas.

Los métodos físicos o ablativos que destruyen el tejido lesionado entre los que se encuentran:

a) Criocirugía: Consiste en la destrucción mediante congelamiento del tejido a tratar. Para ello se utilizan gases refrigerantes que se aplican sobre el tejido. Los gases utilizados son: nitrógeno líquido, óxido nitroso o dióxido de carbono, *b) Láser:* El empleo de láser de dióxido de carbono es aceptado hoy en día como un tratamiento eficaz para lesiones escamosas intraepiteliales. Así mismo el proceso de cicatrización depende de la recuperación de los tejidos adyacentes a la zona tratada (42).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Preparar y caracterizar nanopartículas de poli-vinil metil éter- anhídrido maléico (NPs / PVME-AM), obtenidas mediante el método de desplazamiento de disolvente, destinadas a la administración de ácido glicirricínico (AG) para el tratamiento de lesiones precancerígenas detectadas en el cuello del útero, provocadas por VPH.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar NPs / PVME-AM mediante el método de desplazamiento de disolvente, evaluando el efecto del tipo de agitación y la velocidad de inyección, con el fin de obtener partículas monodispersas de tamaño nanométrico.
- Caracterizar las nanopartículas obtenidas por su tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta y morfología.
- Incrementar la tasa de incorporación de AG en las nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento de disolvente, adicionando al proceso una etapa para la adsorción del fármaco.

4 HIPOTESIS

Si se modifican las condiciones para la preparación de NPs/PVME-AM por el método de desplazamiento de disolvente, será posible la obtención de nanopartículas con características tecnológicas adecuadas en cuanto a tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta y capacidad de incorporación de AG, que puedan ser evaluadas como una alternativa potencial para el tratamiento de lesiones cervicouterinas provocadas por VPH.

5 EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 MATERIALES

- Poli-vinil metil éter-anhídrido maléico de nombre comercial Gantrez AN119® donado por *Ashland Specialty Ingredients, Ciudad de México, México*
- Acetona (*Tecsiquim SA de CV, México*)
- Ácido Glicirricínico (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*)
- Etanol absoluto (*Tecsiquim SA. de CV, México*)
- Agua desionizada GA (*Milli-Q®, Millipore, EUA*)
- Cloruro de sodio (*Fermont, Productos Químicos Monterrey, México*)
- Hidróxido de potasio (*Fermont, Productos Químicos Monterrey, México*)
- Ácido Clorhídrico (*Tecsiquim SA. de CV, México*)

5.2 EQUIPOS

- Balanza analítica (*Shimadzu ATX 224*)
- Potenciómetro (*Oakton, Thermo Scientific, Singapur*)
- Parrilla con agitación magnética (*Cimarec®, Thermoline, EUA*)
- Rotavapor® R-3 (*Büchi Labortechnik, AG*)
- Nanosizer Nano-ZS90 (*Malvern, USA*)
- Ultraturrax (*IKA® T18, Alemania*)
- Bomba de inyección (*Cole-Parmer® 100, Instrument Company, USA*)
- Ultracentrífuga (*Beckman Coulter XL-100K, EUA*)
- Espectrofotómetro UV-Vis (*Hitachi® U-5100, Chiyoda, Tokio, Japón*)
- Vórtex (*Mixer, modelo M167715, EUA*)
- Microscopio Electrónico de Transmisión (*JEOL- JEM 1010*)

6 METODOLOGÍA

La metodología general que se siguió para el desarrollo de este trabajo se resume a continuación (Figura 16):

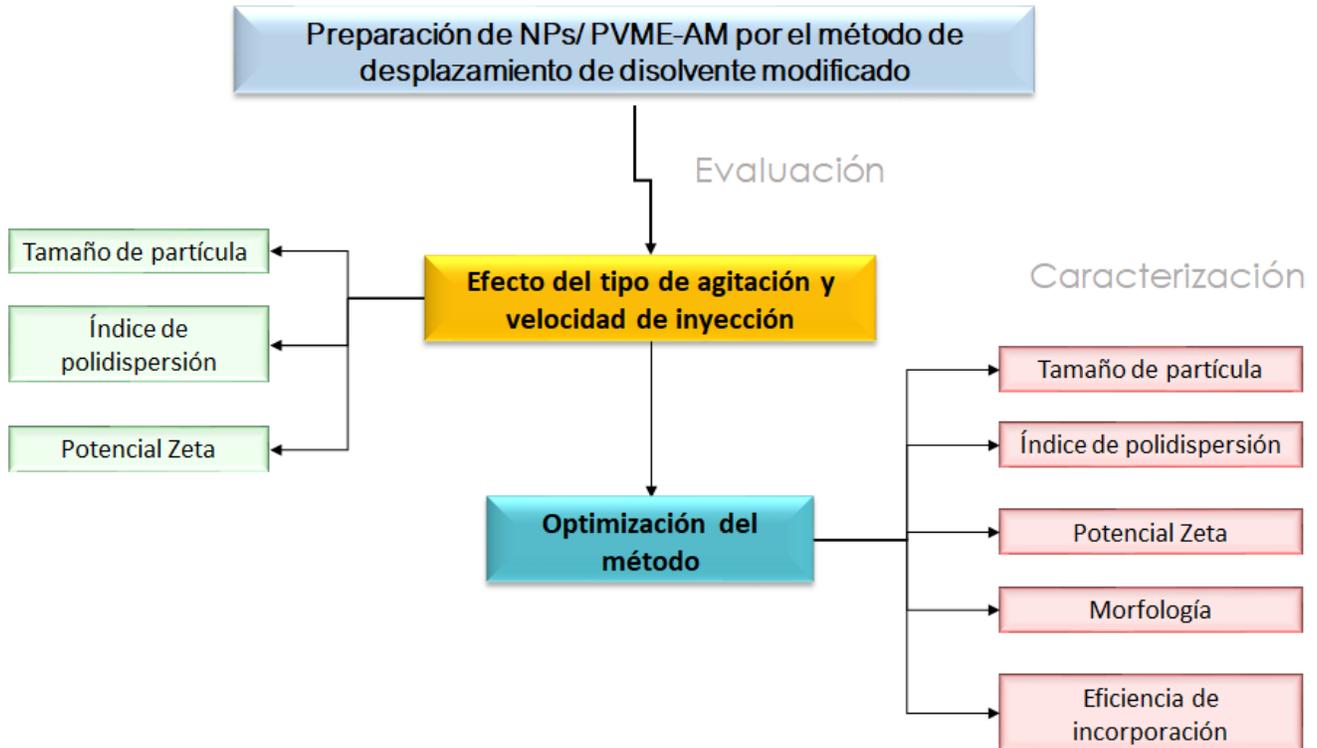


Figura 16. Resumen de metodología experimental

El método desarrollado para este estudio se fundamenta en el desplazamiento de disolvente para la formación de nanopartículas de poli vinil metil éter-anhídrido maléico (NPs/PVME-AM) el cual fue adaptado para los fines de este proyecto. El método propuesto es el que se presenta a continuación.

6.1 Método General para la preparación de nanopartículas

Preparar una fase acuosa que consiste en una solución hidroalcohólica a partir de una mezcla etanol: agua en proporción 1:1, acidificada con ácido clorhídrico diluido hasta un pH de 2.9. Pesar 100 mg de AG y disolver en 50 mL de solución hidroalcohólica pH 2.9. Para la fase orgánica pesar 220 mg de PVME-AM (Gantrez AN-119) y diluir en 10 mL de acetona. Con ayuda de una bomba de inyección incorporar la fase orgánica por goteo constante a una velocidad de 1.6 mL/min sobre la fase acuosa bajo agitación de alta cizalla a 5,000 rpm. Una vez terminada la inyección del volumen total de la fase orgánica, dejar en agitación durante 5 minutos más para permitir la incorporación de las fases; Posteriormente eliminar los disolventes orgánicos a presión reducida a 40 °C durante 10 min, y recuperar la suspensión resultante (Figura 17).

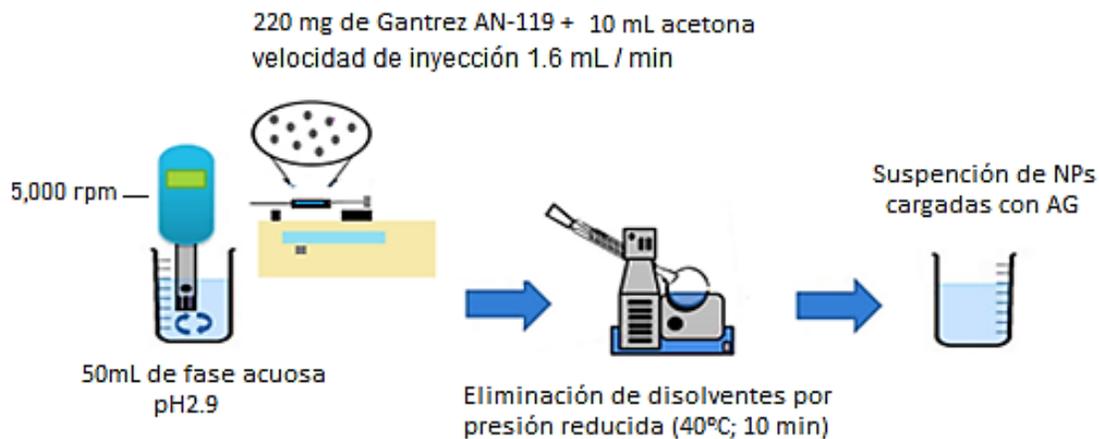


Figura 17. Método para la preparación de NPs/ PVME-AM

6.2 Efecto del tipo de agitación y la velocidad de inyección sobre las características de las nanopartículas poliméricas

Para estudiar la influencia de algunas variables en el método de formación de NPs y cómo estas pueden afectar características como tamaño de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersión se estableció un diseño experimental factorial 2^2 (Tabla 4) con ayuda del programa “Statgraphics centurion XVI.I” (2009), que se compone de dos factores experimentales (Tipo de agitación y velocidad de inyección), con dos niveles y tres respuestas: Tamaño de partícula (nm), Potencial Zeta (mV) e índice de polidispersión.

Tabla 4. Diseño experimental factorial

TIPO DE AGITACIÓN	VELOCIDAD DE INYECCIÓN
ULTRATURRAX	1.6 mL / min
AGITACION MAGNÉTICA	1.6 mL / min
ULTRATURRAX	1.0 mL / min
AGITACION MAGNÉTICA	1.0 mL / min
ULTRATURRAX	1.6 mL / min
AGITACION MAGNÉTICA	1.6 mL / min
ULTRATURRAX	1.0 mL / min
AGITACION MAGNÉTICA	1.0 mL / min
ULTRATURRAX	1.6 mL / min
AGITACION MAGNÉTICA	1.6 mL / min
ULTRATURRAX	1.0 mL / min
AGITACION MAGNÉTICA	1.0 mL / min

6.3 Caracterización de nanopartículas poliméricas de poli-vinil metil éter-anhídrido maléico

Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron físicamente determinando el tamaño de partícula, potencial zeta, morfología, eficiencia de atrapamiento.

6.3.1 Tamaño de Partícula

Esta característica se determina mediante espectroscopía de correlación fotónica que utiliza la técnica de dispersión dinámica de la luz. Es importante realizar una dilución de la suspensión de nanopartículas en un rango aceptado por el equipo que en este caso fue de 200 μ L de muestra en 2 mL de agua desionizada. Se determinó el tamaño de partícula a un sistema placebo y a un sistema cargado con AG por triplicado.

6.3.2 Potencial zeta

Para obtener la carga eléctrica superficial o potencial zeta de las NPs se toma una muestra de las NPs en suspensión con las que se mide el tamaño de partícula y se colocan en una celda con sistema micro electroforético y se pasa por una corriente eléctrica de 125 mV a 25°C para conocer la movilidad electroforética midiendo la velocidad con la que migran las partículas de un electrodo a otro. Se determinó el potencial zeta de un sistema placebo y uno cargado con AG por triplicado.

6.3.3 Morfología

La morfología de las partículas se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (JEOL- Mod. JEM1010). El trabajo lo realizó el Dr. Edgar Oliver López-Villegas y la Dra. María del Rosario Espinoza-Mellado de la Central de Microscopía, ENCB, del Instituto Politécnico Nacional. Se determinó la morfología de nanopartículas placebo y nanopartículas conteniendo AG. Se tomaron micrografías en al menos tres campos de visualización. El tamaño de nanopartícula obtenido por medio de esta técnica se utilizó como punto comparativo con los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz.

6.3.4 Eficiencia de incorporación (EI)

Con el fin de determinar la eficiencia de incorporación de AG en las nanopartículas formadas, se prepararon tres sistemas, cuyo procedimiento se describe a continuación:

6.3.4.1 Sistema 1 (AG Encapsulado)

Pesar 50 mg de AG y disolver en 50 mL de solución hidroalcohólica pH 2.9 (fase acuosa). Para la fase orgánica pesar 220 mg de Gantrez AN-119 y disolver en 10 mL de acetona. A continuación, incorporar la fase orgánica por goteo constante con ayuda de una bomba de inyección a una velocidad de 1.6 ml/min sobre la fase acuosa bajo agitación de alta cizalla a 5,000 rpm. Una vez terminada la inyección del volumen total de la fase orgánica, mantener en agitación durante 5 minutos más para permitir la incorporación de las fases; eliminar los disolventes orgánicos por presión reducida a 40 °C durante 10 minutos empleando un rotavapor y recuperar la suspensión de nanopartículas cargadas con AG.

Posteriormente centrifugar durante 40 min a 50,000 rpm para separar el AG no encapsulado que se encuentra en el sobrenadante del AG atrapado en las NPs sedimentadas. Resuspender las nanopartículas sedimentadas en 25 ml de agua destilada y permitir la hidrólisis del polímero durante 24 h, leer la muestra mediante espectrofotometría UV-VIS a 255nm y cuantificar AG empleando la curva de calibración preparada para este efecto (ver anexo 1) (Figura 18).

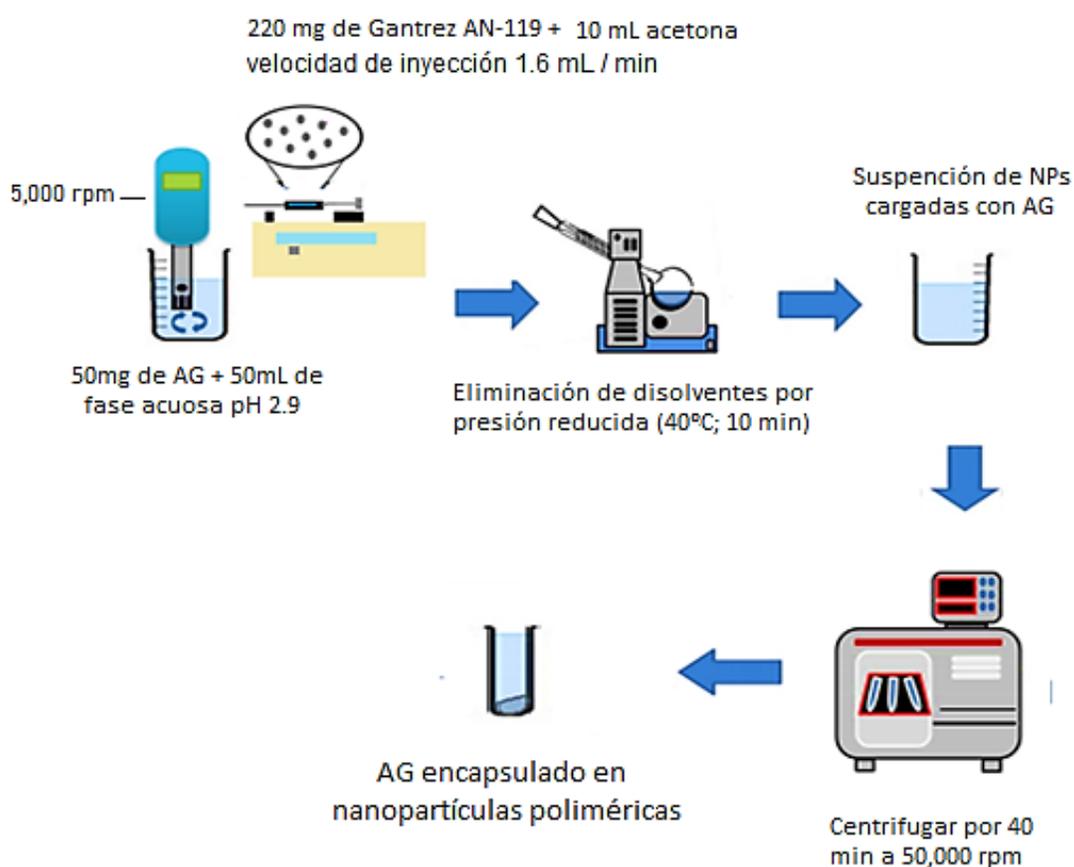


Figura 18. Procedimiento para obtener AG encapsulado en NPs/ PVME-AM

6.3.4.2 Sistema 2 (AG Encapsulado y Adsorbido)

Pesar 50 mg de AG y disolver en 50 mL de solución hidroalcohólica pH 2.9 (fase acuosa). Para la fase orgánica pesar 220 mg de Gantrez AN-119 y disolver en 10 mL de acetona. A continuación, incorporar la fase orgánica por goteo constante con ayuda de una bomba de inyección a una velocidad de 1.6 mL/min sobre la fase acuosa bajo agitación de alta cizalla a 5,000 rpm. Una vez terminada la inyección del volumen total de la fase orgánica, mantener en agitación durante 5 minutos más para permitir la incorporación de las fases; eliminar los disolventes orgánicos por presión reducida a 40 °C durante 10 minutos empleando un rotavapor y recuperar la suspensión de nanopartículas cargadas con AG. Posteriormente centrifugar durante 40 min a 50,000 rpm para separar el AG no encapsulado que se encuentra en el sobrenadante del AG atrapado en las NPs sedimentadas. Este sistema representa el AG encapsulado en las nanopartículas poliméricas. Después de la fase de encapsulación, las nanopartículas sedimentadas se resuspenden durante 1 hora, bajo agitación magnética constante, en una solución de AG, para lo cual se pesan 200 mg de AG y se disuelven en 200 ml de agua destilada. Transcurrido este tiempo, la dispersión se centrifuga de nueva cuenta, a las condiciones antes mencionadas (40 min; 50,000 rpm). Resuspender las nanopartículas sedimentadas en 25 ml de agua destilada y permitir la hidrólisis del polímero durante 24 h, leer la muestra mediante espectrofotometría UV-VIS a 255nm y cuantificar AG empleando la curva de calibración preparada para este efecto (ver anexo 1) (Figura 19).

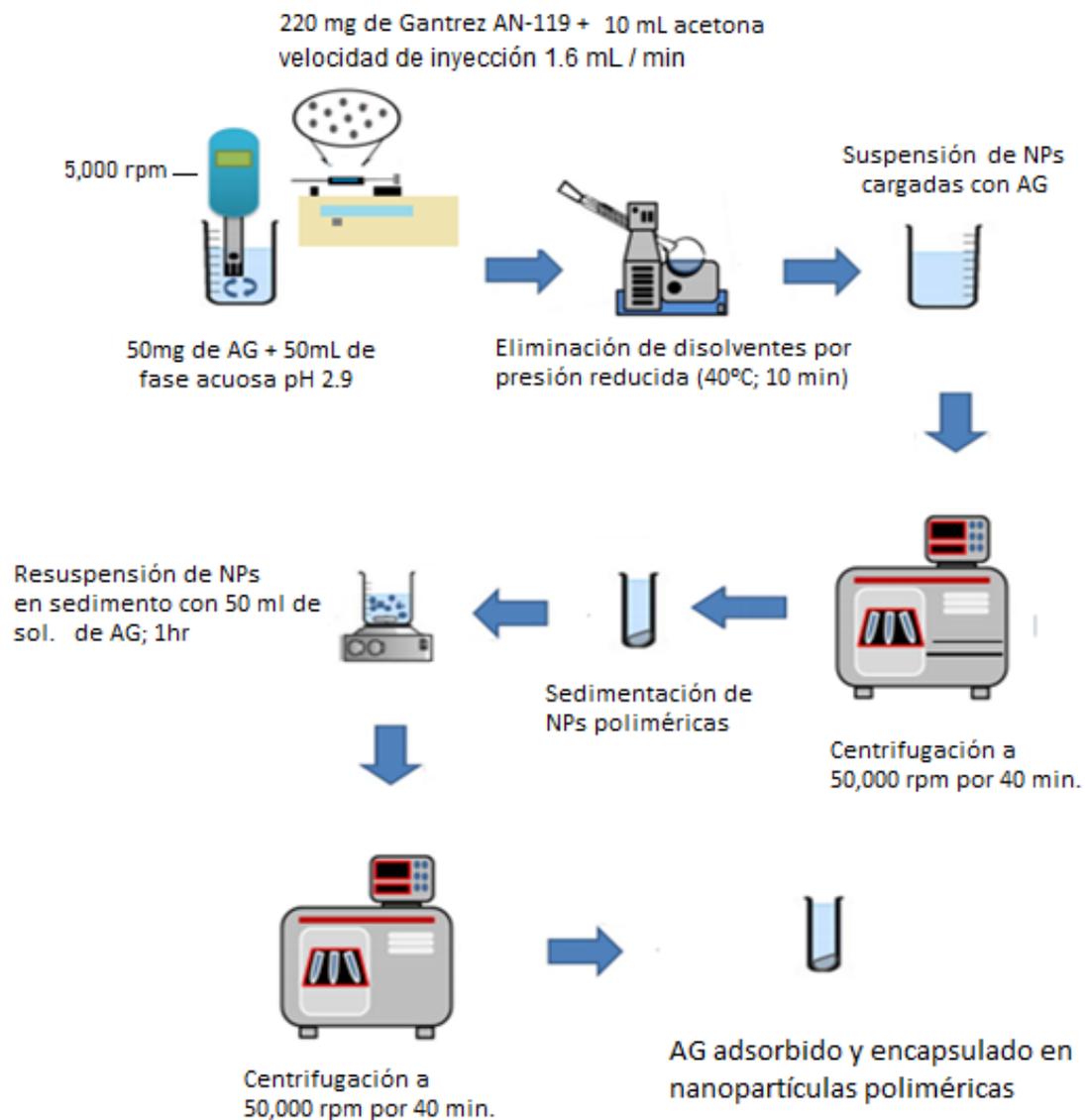


Figura 19. Procedimiento para encapsular y adsorber AG en NPs/ PVME-AM

6.3.4.3 Sistema 3 (AG Adsorbido)

Pesar 220 mg de Gantrez AN-119, disolver en 10 mL de acetona (fase orgánica). A continuación, se adiciona por goteo constante en 50 ml de solución hidroalcohólica pH 2.9 (fase acuosa) por goteo constante con ayuda de una bomba de inyección a una velocidad de 1.6 ml/min; una vez terminada la inyección del volumen total de la fase orgánica, la dispersión se mantuvo en agitación durante 5 minutos más para permitir la incorporación de las fases. Posteriormente, se eliminaron los disolventes orgánicos por evaporación a presión reducida a 40°C durante 10 min, empleando un rotavapor. Recuperar la suspensión resultante obtenida de nanopartículas placebo y se centrifugar durante 40 min a 50,000 rpm, para separar las NPs formadas (en el sedimento) las cuales se deben resuspender con agitación magnética constante durante 1 hora, en una solución de AG, para lo cual se pesan 200 mg de AG y se disuelven en 200 ml de agua destilada. Esta dispersión se centrifuga de nueva cuenta a las condiciones ya mencionadas (40 min; 50,000 rpm). Resuspender las nanopartículas sedimentadas en 25 ml de agua destilada y permitir la hidrólisis del polímero durante 24 h, leer la muestra mediante espectrofotometría UV-VIS a 255nm y cuantificar AG empleando la curva de calibración preparada para este efecto (ver anexo 1) (Figura 20).

La eficiencia de incorporación fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EI = \frac{\text{Cantidad de AG (mg)}}{\text{Peso total de PVME-AM (mg)}}$$

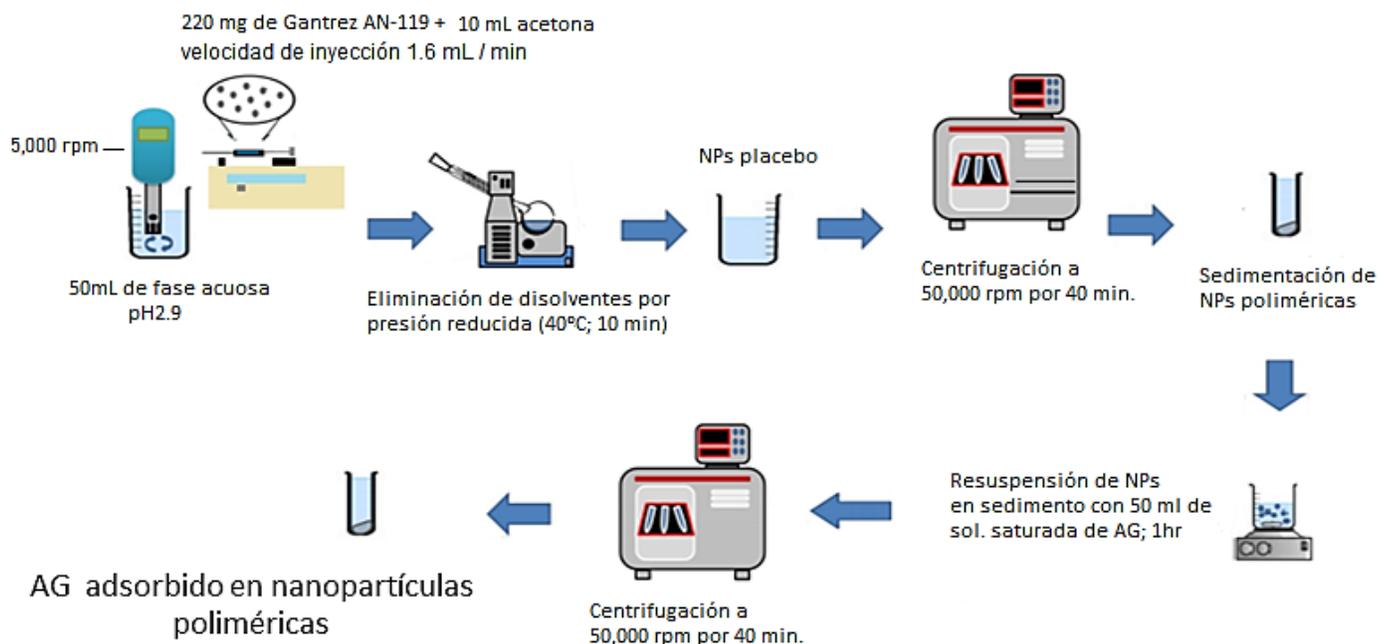


Figura 20. Procedimiento para adsorber AG en NPs/ PVME-AM

7 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

El método de desplazamiento de disolvente describe la formación de NPs/PVME-AM por medio de la desolvatación del polímero bajo agitación; los disolventes orgánicos se eliminan por evaporación a presión reducida y las partículas se obtienen con una apariencia de suspensión lechosa (9,14). El mecanismo de formación de las NPs se debe a la turbulencia interfacial entre dos fases líquidas generada durante la difusión del solvente lo que ocasiona movimientos que promueven la formación de glóbulos nanométricos, seguido de la agregación del polímero (Figura 21) (43) . Este método es preferido sobre los demás métodos de obtención de NPs debido a que es sencillo, rápido, reproducible, robusto y económico haciéndolo buena opción para la formación de estos sistemas.

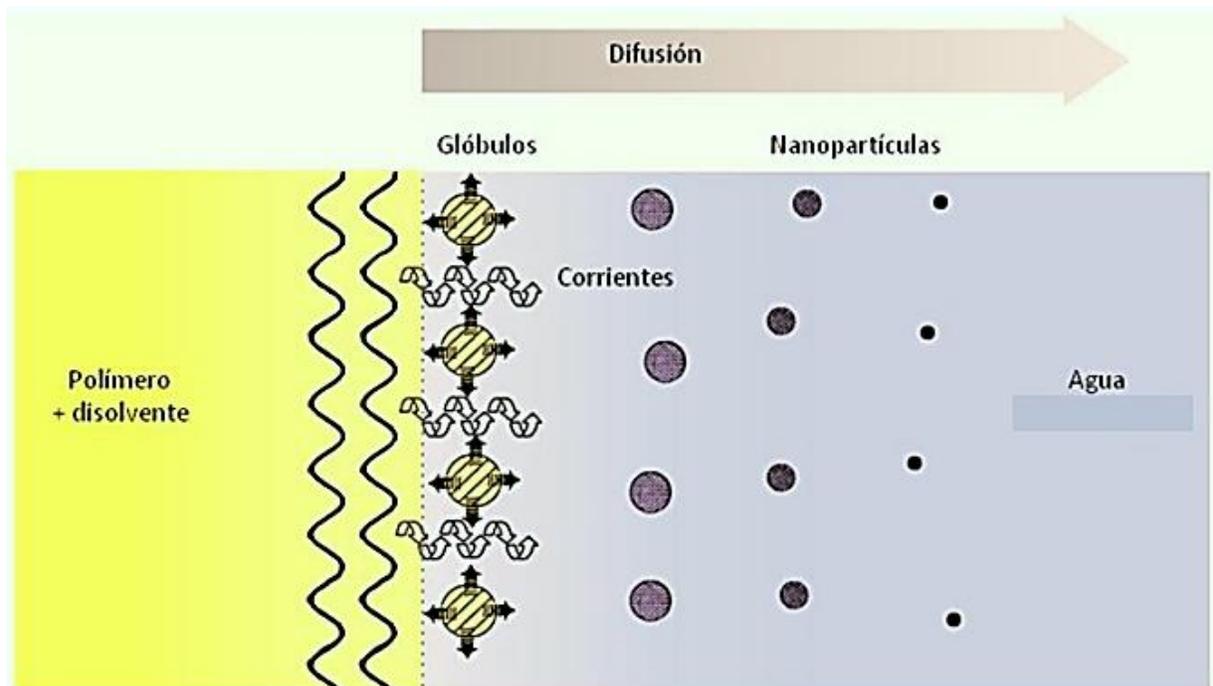


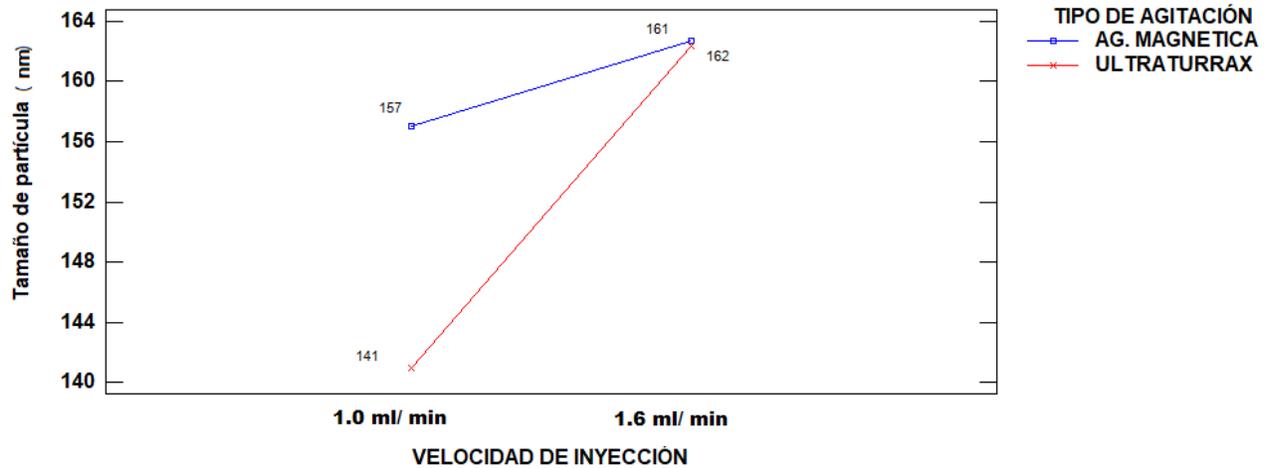
Figura 21. Mecanismo de formación de NPs en el método de desplazamiento de disolvente (43)

7.1 Efecto del tipo de agitación y velocidad de inyección sobre las características de las nanopartículas poliméricas

La finalidad de comparar distintas condiciones de agitación y velocidad de inyección fue determinante para demostrar si estos factores influyen considerablemente sobre las características de las NPs, eligiendo las condiciones que permitieran obtener sistemas de talla nanométrica con baja polidispersión, para proceder a la incorporación del AG. El análisis se llevó a cabo con NPs/PVME-AM, a partir de un diseño experimental multifactorial aleatorio, donde se evaluaron dos factores, tipo de agitación y velocidad de inyección, con dos niveles cada uno, teniendo como variables de respuesta el tamaño de partícula, potencial zeta y el índice de polidispersión. Los experimentos que se realizaron de acuerdo a este diseño y los resultados obtenidos para cada uno se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del diseño experimental multifactorial (Statgraphics centurion XVI.I, 2009)

FACTORES		VARIABLES		
Tipo de agitación	Velocidad de inyección (ml/min)	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersión
Ultraturrax	1.6	152	-27	0.379
Agitación magnética	1.6	170	-25	0.307
Ultraturrax	1.0	122	-28	0.507
Agitación magnética	1.0	150	-24	0.290
Ultraturrax	1.6	173	-22	0.274
Agitación magnética	1.6	156	-23	0.268
Ultraturrax	1.0	141	-21	0.523
Agitación magnética	1.0	161	-26	0.256
Ultraturrax	1.6	162	-26	0.232
Agitación magnética	1.6	156	-24	0.269
Ultraturrax	1.0	160	-22	0.256
Agitación magnética	1.0	160	-22	0.266



Gráfica 1. Efecto de la velocidad de inyección y tipo de agitación en el tamaño de partícula

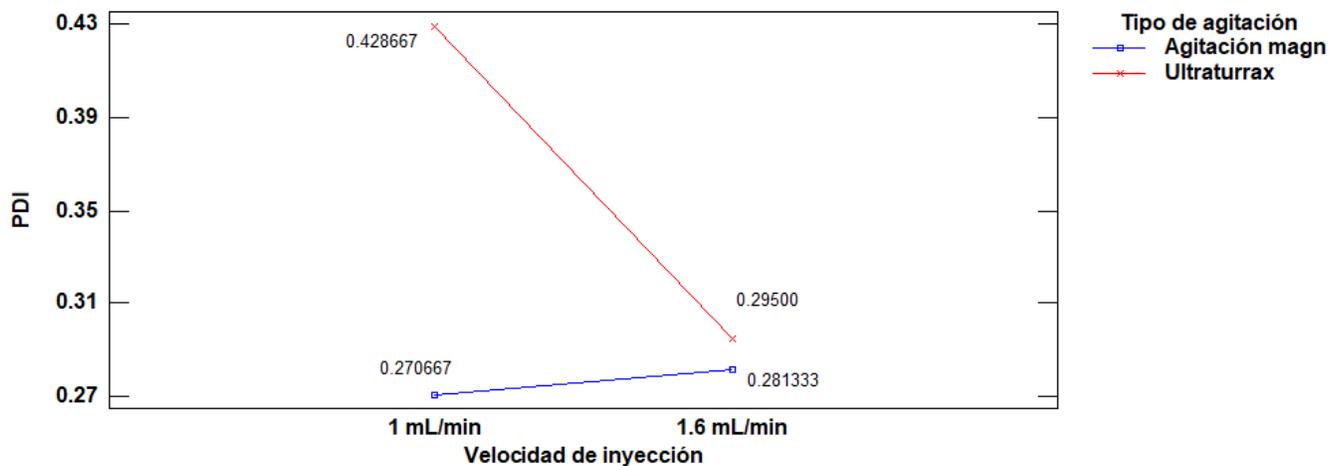
En general, como se observa en la Gráfica 1, se encontró que un aumento en la velocidad de inyección del polímero da como resultado NPs de mayor tamaño, tanto para la agitación magnética como la agitación con Ultraturrax, aunque parece que el efecto es más pronunciado con el Ultraturrax. Se sabe que la formación de NPs por este método se lleva a cabo por un mecanismo de difusión el cual ocurre durante una emulsificación espontánea; a medida que la acetona difunde hacia el agua, el polímero queda expuesto formando las nanopartículas (44) por lo tanto, al aumentar la velocidad de inyección la difusión del solvente es más rápida y debido al flujo turbulento provocado por la agitación se forman NPs de mayor tamaño. No obstante, a pesar de esta diferencia, una prueba de ANOVA nos indica que ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) sobre esta variable (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de ANOVA para valores de tamaño de partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: TIPO DE AGITACIÓN	200.083	1	200.083	1.44	0.2652
B: VELOCIDAD DE INYECCIÓN	546.75	1	546.75	3.92	0.0830
INTERACCIONES					
AB	184.083	1	184.083	1.32	0.2837
RESIDUOS	1115.33	8	139.417		
TOTAL (CORREGIDO)	2046.25	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El índice de polidispersión nos brinda información sobre la distribución en los tamaños de partícula presentes en la muestra, en todos los casos nos habla de poblaciones con bajo rango de tamaños.



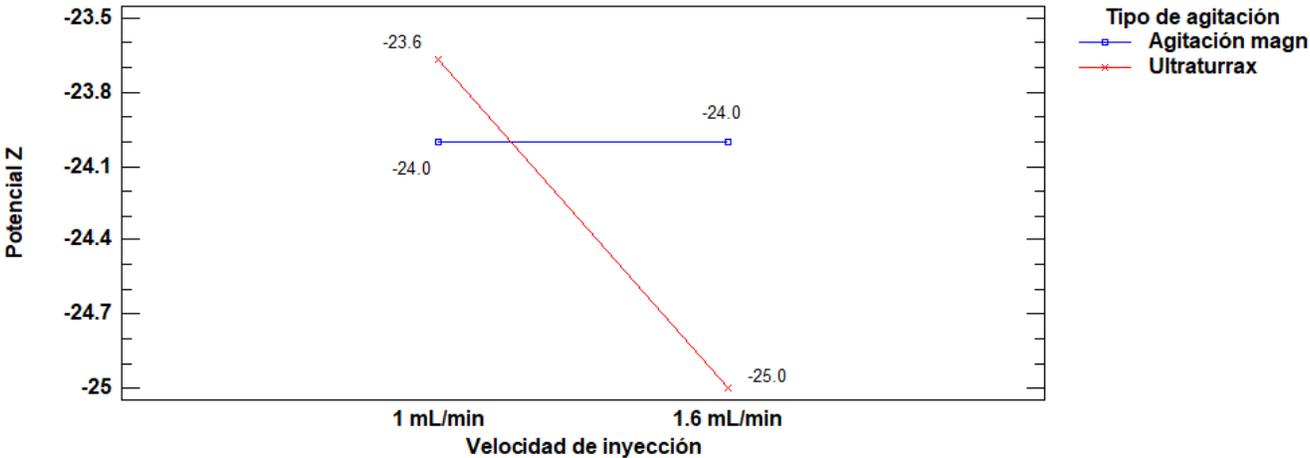
Gráfica 2. Efecto de la velocidad de inyección y el tipo de agitación sobre el índice de polidispersión

Como se observa en la Gráfica 2, el efecto más importante se presenta con la agitación de alta cizalla con Ultraturrax, sin embargo, la prueba de ANOVA indica de igual manera que el índice de polidispersión no se ve afectado estadísticamente por ninguno de los factores estudiados (Tabla 7).

Tabla 7. Prueba de ANOVA para valores de índice de polidispersión

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: TIPO DE AGITACIÓN	0.0221021	1	0.0221021	3.05	0.1187
B: VELOCIDAD DE INYECCIÓN	0.0113467	1	0.0113467	1.57	0.2459
INTERACCIONES					
AB	0.0156241	1	0.0156241	2.16	0.1800
RESIDUOS	0.057914	8	0.00723925		
TOTAL (CORREGIDO)	0.106987	11			

En cuanto al efecto sobre el potencial Zeta de las partículas (Gráfica3), solo en el caso de agitación de alta cizalla (ultraturrax), existe un incremento con el aumento de la velocidad de inyección que va de -23.6 a -25 mV, el incremento en el valor absoluto del potencial Zeta indica menor tendencia de las partículas a sufrir agregación (45; 19).



Gráfica 3. Efecto de la velocidad de inyección y el tipo de agitación sobre potencial Zeta

Los valores obtenidos para el potencial Z permiten prever si las partículas pueden tender a agregarse, teniendo un grado de estabilidad aceptable. La prueba de ANOVA que se obtiene indica que esta variable tampoco tiene una diferencia estadística significativa frente al tipo de agitación y la velocidad de inyección (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de ANOVA para valores de potencial Zeta

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: TIPO DE AGITACIÓN	0.333333	1	0.33333	0.05	0.8276
B: VELOCIDAD DE INYECCIÓN	1.3333	1	1.3333	0.20	0.6646
INTERACCIONES					
AB	1.3333	1	1.33333	0.20	0.6646
RESIDUOS	52.6667	8	6.58333		
TOTAL (CORREGIDO)	52.6667	11			

El análisis estadístico permite aseverar que se obtienen NPS/PVME-AM con características adecuadas en cuanto a tamaño, índices de polidispersión bajos y potencial zeta entre -24 y -25, independientemente del tipo de agitación empleado y de la velocidad de inyección.

Dado esto, se prepararon las NPs para incorporar AG empleando agitación por alta cizalla utilizando un Ultraturrax (*IKA® T18, Alemania*) a 5000 rpm y una velocidad de inyección de 1.6 ml/min, para reducir el tiempo de obtención.

7.2 Caracterización

7.2.1 Tamaño de partícula

La determinación de tamaño de partícula se realizó mediante dispersión dinámica de luz en un equipo Nanosizer Nano-ZS90 (Malvern, USA). Los resultados de los sistemas placebo y conteniendo AG, obtenidos por el método de desplazamiento de disolvente, aplicando una velocidad de inyección de 1.6 ml/min y agitación de 5000 rpm se exponen en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de tamaño de partícula de NPs / PVME-AM placebo y conteniendo AG encapsulado

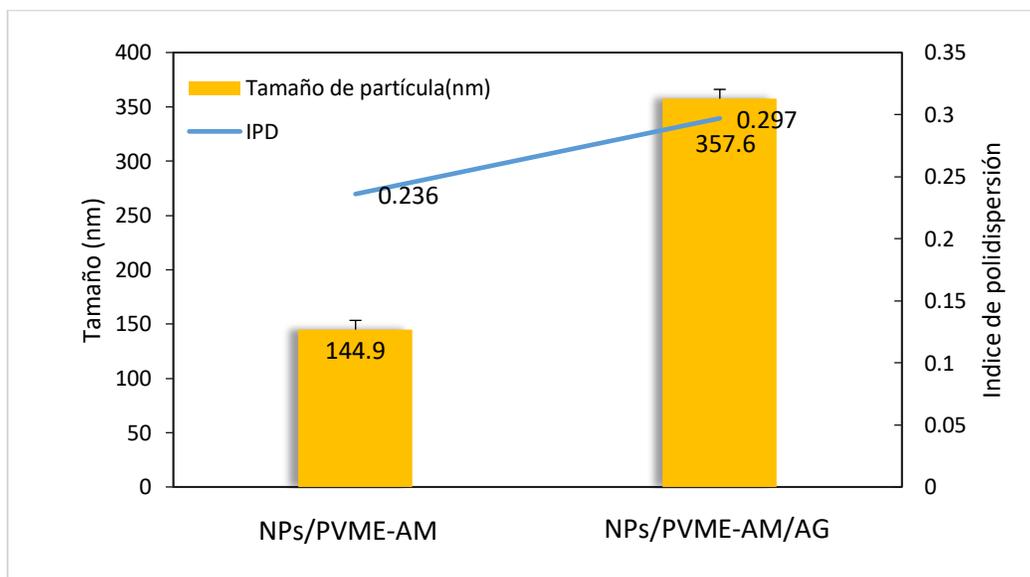
LOTE	NPs/PVME-AM (placebo)		NPs/PVME-AM/AG (encapsulado)	
	Tamaño de partícula (nm)	Índice de Polidispersión	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión
A	141.8	0.227	359.0	0.243
B	138.4	0.234	353.3	0.320
C	154.5	0.246	360.6	0.328
Promedio	144.9	0.236	357.6	0.297
Desv. Est (DS)	8.5	0.010	3.8	0.047

*Los valores presentados representan el promedio y la DS de una $n = 3$

Como se observa, fue posible obtener partículas placebo con talla de 144.9 ± 8.5 nm e índice de polidispersión de 0.236, mientras que la incorporación de AG al sistema provocó un incremento en el tamaño de partícula obteniendo sistemas de 357.6 ± 3.8 nm;

en comparación con el método de Aguilar Rosas presentado en el 2015, donde el tamaño de partícula de NPs/PVME-AM/AG fue de 155.7 ± 5.8 nm. Tal diferencia se atribuye al tipo de agitación y al orden de adición de las fases en el método. En este trabajo el orden de inyección fue de fase orgánica a la fase acuosa.

El índice de polidispersión obtenido nos brinda un panorama de la variación de los tamaños de las nanopartículas, y dado que los valores tanto para los lotes placebo como para los que incluyen AG son inferiores a 0.3, esto nos indica que se trata de una muestra monodispersa, con baja dispersión en el tamaño (Gráfica 4).



Gráfica 4. Comparativo de valores de índice de polidispersión y tamaño de partícula entre NPs/PVME-AM y NPs/PVME-AM/AG

Se realizó una prueba de t , con el fin de evidenciar si existía diferencia significativa para los valores de tamaño de partícula e índice de polidispersión, entre las NPs placebo y las NPs cargadas con AG, encontrando que si existe diferencia significativa tanto para en el tamaño de partícula ($t = 70.76 > t_{0.05,16} = 2.11$), como para el IPD ($t = 3.91 > t_{0.05,9} = 2.26$) (ver anexo 2).

7.2.2 Carga eléctrica superficial (Potencial Zeta)

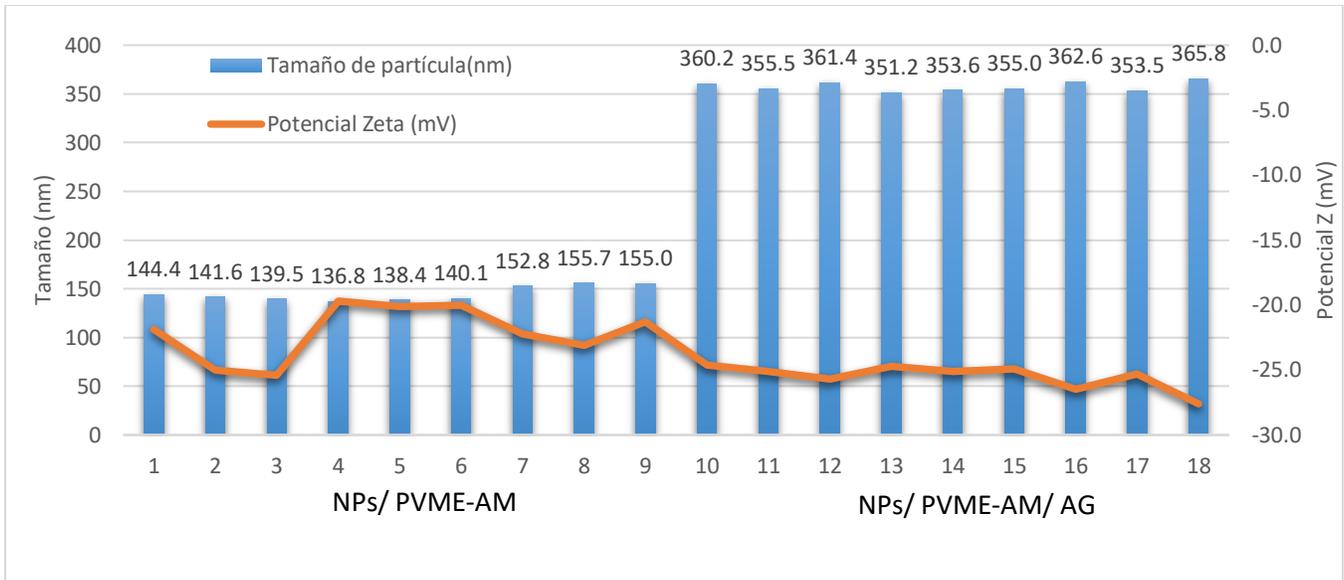
Este parámetro es un indicativo de la estabilidad de las NPs en el medio en el que se encuentran dispersas, ya que como se sabe estas adquieren una carga, la cual se expresa mediante el potencial Zeta (27). Las dispersiones con un alto potencial Zeta, sea negativo o positivo, se estabilizan eléctricamente (en general se asume que este valor debe ser mayor a 30 mV). Mientras que las dispersiones con bajo potencial Zeta tienden a coalescer (si no son estabilizadas por otro medio) lo que puede dar lugar a una estabilidad física deficiente. Cuando el potencial Zeta de una dispersión es alto, las fuerzas de repulsión son altas, lo que da lugar a un sistema relativamente estable (46). De acuerdo a los resultados que se obtuvieron (Tabla 10; Gráfica 5), se puede ver que en las nanopartículas placebo el potencial Zeta promedio es de -22.1 mV y al encapsular AG, el potencial Zeta tiene valores promedio de -25.5 mV. Este aumento en el valor neto del potencial zeta se debe a que las moléculas de AG al ser encapsuladas en las NPs incrementan la carga negativa debido a la ionización de los grupos carboxilo presentes en la molécula, lo cual sería indicativo de una mayor estabilidad y menos tendencia a la agregación. Las partículas dispersas en un líquido pueden adquirir carga debido a dos fenómenos; por la adsorción de iones en solución (electrolitos presentes en una disolución, iones hidronio o hidroxilo provenientes de la ionización del agua), o debido a la

ionización de especies químicas presentes en la superficie de la partícula (45); lo que justifica la afirmación anterior.

Tabla 10. Resultados de la determinación de potencial Zeta de NPs / PVME-AM y NPs / PVME-AM / AG

LOTE	POTENCIAL ZETA (MV)	
	NPs / PVME-AM	NPs / PVME-AM/AG
A	-21.9	-24.6
	-25.0	-25.1
	-25.4	-25.7
B	-19.7	-24.7
	-20.1	-25.1
	-20.0	-24.9
C	-22.2	-26.5
	-23.1	-25.3
	-21.3	-27.6
PROMEDIO	-22.1	-25.5
DESV. EST.	2.1	1.0

De acuerdo con la prueba de t realizada se encontró que existe una diferencia significativa entre los valores del potencial Zeta para las NPs placebo y las NPs cargadas con AG ($t = 4.43 > t_{0.05,11} = 2.20$; ver anexo 2).



Gráfica 5. Resultados de valores de potencial Zeta en relación al tamaño de partícula para NPs/PVME-AM y NPs/PVME-AM/AG

7.2.3 Morfología

De las NPs preparadas se obtuvieron las correspondientes micrografías por TEM, las cuales permitieron visualizar la morfología de las nanopartículas, así como el diámetro de estas. A continuación (Figura 22), se muestran micrografías de nanopartículas con y sin fármaco obtenidas mediante el método de evaporación de disolvente modificado.

Las NPs sin AG (Figura 22A) son aproximadamente redondas y poco delimitadas. Al incorporar AG (Figura 22B), se pueden notar NPs de forma más esférica y en el centro es visible el fármaco incorporado o encapsulado en el interior de las NPs.

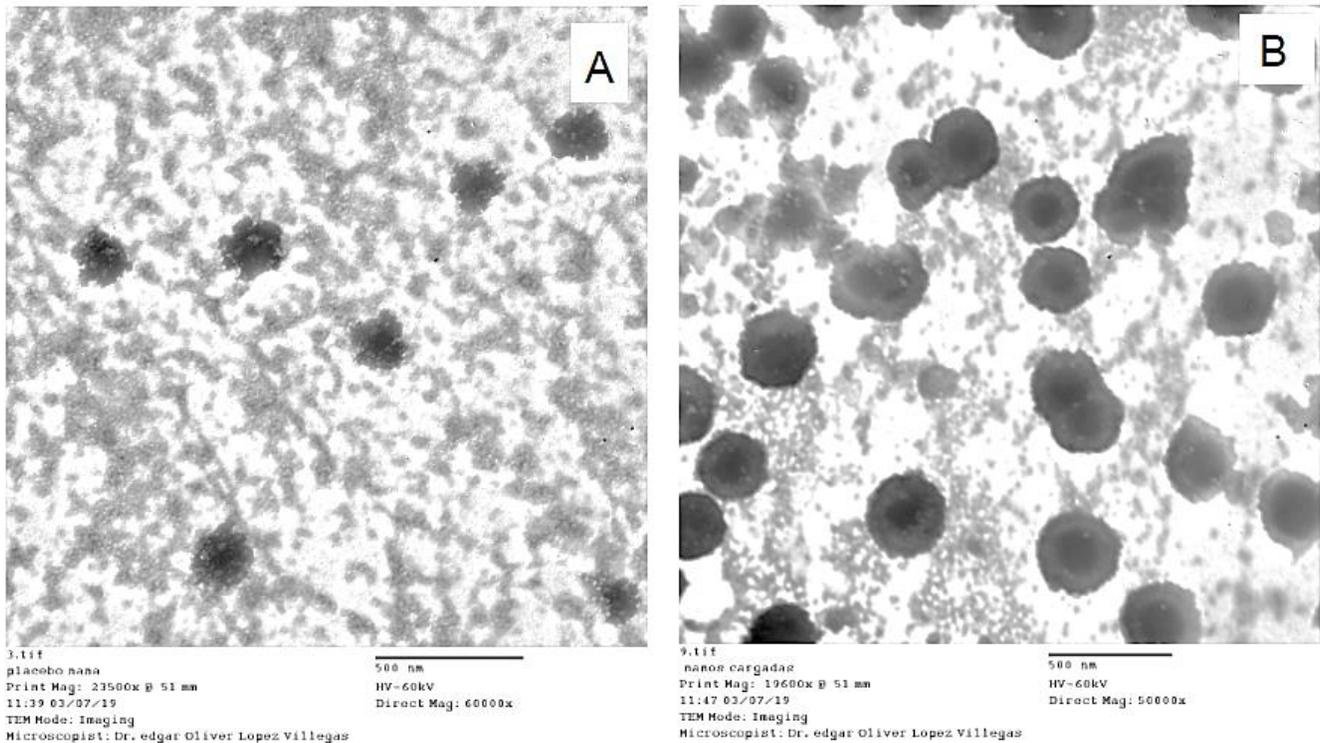


Figura 22. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, usando un microscopio JEOL-JEM1010 de las NPs; A) sin AG; B) con AG, preparadas por el método de desplazamiento de disolvente modificado

El diámetro promedio de cada tipo de partícula con y sin AG se indica en la tabla 11. Con estas micrografías se confirma que la presencia del fármaco conduce al aumento del tamaño de la partícula. Al incorporar el AG, la morfología de las partículas cambia notablemente ya que se observan más esféricas y mejor delimitadas. En ninguna de las muestras se observa aglomeración en su distribución.

7.3 Eficiencia de incorporación

Se determinó la capacidad de las NPs formadas de incorporar AG en la matriz o en la superficie de las NPs mediante la Eficiencia de incorporación (EI), la cual se expresa como los mg de AG obtenidos / mg de polímero. Con esto se pretendía conocer la cantidad de AG que es posible incorporar en los nanosistemas.

Esta prueba se realizó por triplicado a tres muestras diferentes utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 255 nm, realizando la cuantificación de AG mediante una curva de calibración (ver anexo 1). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Cantidad de AG incorporado en NPs/ PVME-AM

	AG ENCAPSULADO (mg AG / mg PVME-AM)	AG ADSORBIDO (mg AG / mg PVME-AM)	AG ADSORBIDO Y ENCAPSULADO (mg AG / mg PVME-AM)
PROMEDIO	0.8	1.6	2.8
DESV. ESTD (DS)	0.17	0.04	0.09

La cantidad de AG adsorbido es 2 veces mayor que la cantidad encapsulada y la cantidad promedio que es posible incorporar después de la adsorción es de 2.8 mg de AG / mg de polímero (AG encapsulado y adsorbido).

La encapsulación del AG por el método de desplazamiento de disolvente se lleva a cabo justo en el momento en que se agrega la fase orgánica, y comienza la interacción entre AG y el polímero (6). De acuerdo con lo mostrado en la Figura 23, se requeriría un pH inferior a 2.76 para que el AG se encontrara en su forma no ionizada y por tanto en su forma más hidrofóbica; no obstante, se ha reportado (13) que por debajo de pH 2.9 las nanopartículas no se mantienen estables, por lo que se ajustó el pH de la fase acuosa a 2.9 (agua-etanol 1:1 pH 2.9). A este pH, se tiene aproximadamente un 68 % de la molécula como H_2GA^- y un 32 % como HGA^{2-} . Esto permitió que el AG no escapara totalmente hacia la fase acuosa mientras se llevaba a cabo la desolvatación del polímero (13).

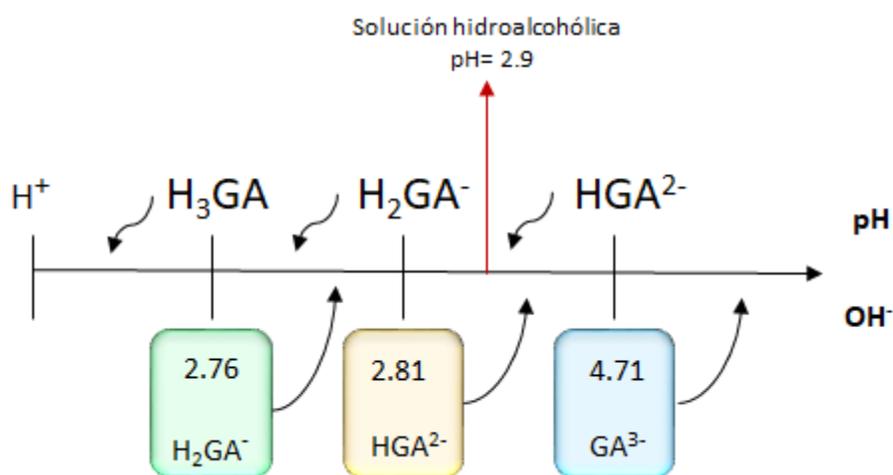


Figura 23. Disociación de AG

En este trabajo, se buscó incrementar la tasa de incorporación de AG, una vez obtenidas las nanopartículas de la etapa 1 por el método de desplazamiento de disolvente ya descrito, se llevó a cabo una segunda etapa donde las NPs se ponen en contacto con una solución de AG de concentración conocida con la intención adsorber fármaco en la superficie (Figura 24).

La manera en que el AG se adsorbe en la superficie de las NPs/PVME-AM se debe a que el pH del agua destilada donde se encuentra disuelto el AG es de entre 5 y 7, la molécula se encuentra en su forma ionizada (GA^{-3}) (48), que le permite interactuar con los grupos carboxilo del polímero que se forman en su hidrólisis por contacto con el agua (Figura 23). De esta manera al llevar a cabo los procesos de encapsulación y adsorción se consigue incorporar 3.5 veces más cantidad de AG en relación al proceso de solo encapsularlo.



Figura 24. Esquema representativo de la incorporación de AG en las NPs / PVME-AM

El incremento en la cantidad de AG capaz de incluirse en las NPs/PVME-AM cuando se realiza el proceso de encapsulación y de adsorción, se debe que además del AG ya encapsulado en la primera etapa, se lleva a cabo la adsorción por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo e hidroxilo de AG y los grupos carboxilo del polímero ya hidrolizado (23).

Por otro lado, el incremento en la cantidad de fármaco incorporado después de la encapsulación-adsorción, puede atribuirse al hecho de que las moléculas de AG interaccionen mediante puentes de hidrogeno con otras moléculas de AG, formando varias capas de fármaco adsorbido.

8 Conclusiones

Se prepararon nanopartículas poliméricas de poli vinil metil éter cargadas con ácido glicirricínico mediante la técnica modificada de desplazamiento de disolvente. Se aplicó un diseño factorial con la finalidad de evaluar la influencia de la velocidad de inyección y tipo de agitación sobre las características de las nanopartículas. No obstante, el análisis estadístico demostró que estos dos factores no tienen un efecto significativo sobre el tamaño, IPD y potencial Z de las partículas. Las condiciones de trabajo elegidas para la preparación de las nanopartículas fueron las siguientes: velocidad de inyección de 1.6 ml/ min y agitación de alta cizalla con una velocidad de 5000 rpm. Las nanopartículas conteniendo AG mostraron características tecnológicas adecuadas para el fin al que se pretende destinarlas, al tener una forma esférica con un tamaño aproximado de 357.6 ± 3.8 nm, una superficie con carga eléctrica negativa presentando un potencial Zeta de -25.5 ± 1.0 mV e índice de polidispersión menor a 0.3.

Se logró incrementar sustancialmente la cantidad de AG incorporado en las NPs, en relación a lo reportado por Aguilar-Rosas I. (2015). Por las propiedades terapéuticas del AG, así como por las características de las nanopartículas preparadas, se espera que este sistema constituya una alternativa eficaz para combatir lesiones a causa de VPH.

9 PERSPECTIVAS

- Determinar el rendimiento de formación de las NPs/PVME-AM y NPs/PVME-AM/AG por el método utilizado en este estudio.
- Caracterizar las nanopartículas con el fármaco adsorbido y encapsulado-adsorbido, mediante las pruebas empleadas en este trabajo (microscopía electrónica, tamaño, IPD, potencial Z).
- Realizar pruebas de adsorción de AG en NPs/PVME-AM, con el fin de definir el tipo de isoterma.
- Realizar ensayos de liberación de AG en un medio fisiológico (fluido vaginal simulado), a diferentes pH's y determinar el mecanismo y la cinética de liberación.

10. REFERENCIAS

1. Lizano Soberón M, López Saavedra A. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Unidad Investig Biomédica en Cáncer UNAM- INCAN*, 1. 2006;31–55.
2. Chavaro Vicuña N, Arroyo Hernández G, Felipe Alcázar L, Muruchi Garrón GW, Pérez Zúñiga I. Cáncer cervicouterino. *An Radiol México*. 2009;1:61–79.
3. Sanabria Negrín JG, Fernández Montequín Z, Cruz Hernandez I de la C, Oriolo Pérez L, Llanuch Lara M. El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras : revisión bibliográfica. *Rev Ciencias Médicas*. 2011;15(4):295–319.
4. Sánchez Hernández JA, Rebollo Ramírez MF, Paulin Badillo JA, Rivera Tapia JA. Cambios en el pH vaginal en pacientes con infección cérvico-vaginal. *Enfermedades Infecc y Microbiol*. 2013;33(2):61–5.
5. Alcalá-Alcalá S, Quintanar-Guerrero D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. *Mundo Nano Rev Interdiscip en Nanociencias y Nanotecnología*. 2014;7(12):32–48.
6. Suñe-Pou M, Suñé-Negre J. Estrategias para la vectorización de fármacos mediante nanotecnología. *El Farmacéutico Hospitales*. 2016;208:4–9.
7. Crucho C, Barros MT. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C*. 2017;80:771–84.
8. Martínez Barbosa ME, Taylor Castillo AY, Acuña Campa H, Carrasco Cota LA. Síntesis y caracterización de nuevas nanopartículas de derivados de PBLG para su uso en nanomedicina. *Epitemus*. 2014;16:5–12.
9. Irache JM. Nanomedicina: Nanopartículas con aplicaciones médicas. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31(1):7–10.
10. Llabot J. Nanopartículas poliméricas sólidas. *ResearchGate*. 2008;53:1–47.
11. Oropesa Nuñez R, Jáuregui- Haza U. Las nanopartículas como portadores de fármacos : características y perspectivas. *CENIC*. 2012;43:1–22.
12. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2006;2(1):8–21.
13. Aguilar Rosas I. Nanopartículas bioadhesivas poliméricas de polivinil metil éter- anhídrido maléico para el tratamiento de cáncer cervico uterino. UNAM; Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias químicas; 2015: 1-103

14. Arbos Vila P, Meriodo de la Quintana M, Arnedo Hernández A. Fabricación de nanopartículas a base de copolímero de metil vinil eter y anhídrido maleíco para la administración de fármacos de naturaleza hidrofílica, en particular de bases púricas pirimidínicas. WO 02/069938 A1, 2002. p. 53.
15. Jardon Xicotencatl S. Estudio del efecto biológico en líneas celulares de nanopartículas lipídicas y poliméricas como vehículo de ácido glicirricínico para el tratamiento del virus PRRS. UNAM; Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias de la producción y la salud animal 2020: p 1-87
16. Irache JM. Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. An Sist Sanit Navar 2008;31(1):7–10.
17. Cuadros-Moreno A, Casañas Pimentel R, San Martín Martínez E, Yañes Fernandez J. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. Latin-American J Phys Educ. 2014;8(4):1–14.
18. Lancheros RJ, Beleño JÁ, Guerrero CA, Godoy-Silva RD. Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). Univ Sci. 2014;19(2):161–8.
19. Batalla Mayoral J, Cuadros Moreno A, San Martín Martínez E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Latin-American J Phys Educ. 2014;8(4):4319–1; 4319–6.
20. Oficina de transferencia de resultados de la Investigación. Encapsulación de Agentes Bioactivos. Universidad de Murcia Oficina de transferencia de resultados de la investigación. p. 1. Recuperado de: https://www.um.es/web/otri/investigadores/oferta-tecnologica/ofertas-tecnologicas/-/asset_publisher/JKqdcmqJbZCh/content/id/13220083
21. Reyes Gasga J. Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México. Mundo Nano. 2020;13(25):79–100.
22. Gleichmann N. Redes Tecnológicas. SEM vs TEM. 2020 [consultado 2020 Feb 3]. Recuperado de: <http://www.news-courier.com/analysis/articles/sem-vs-tem-331262>
23. Irache JM. Bioadhesive Properties of Gantrez Nanoparticles. Molecules. 2005;126–45.
24. Fragoso RV, Loperena HH. Uso tópico del ácido glicirricínico en el herpes genital. 2000;3(4):141–4.
25. López Luengo MT. El regaliz, actividad farmacológica, indicaciones y consejos para su uso. Ambito Farm Fitoter. 2008;27(1):66–71.
26. Bernela M, Ahuja M, Thakur R. Enhancement of anti-inflammatory activity of glycyrrhizic acid by encapsulation in chitosan-katira gum nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm. 2016;105:141–7.

27. Nassiri Asl M, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Vol. 22, *Phytotherapy Research*. 2008. p. 709–24.
28. Haghshenas V, Fakhari S, Mirzaie S, Rahmani M, Farhadifar F, Pirzadeh S, et al. Glycyrrhetic acid inhibits cell growth and induces apoptosis in ovarian cancer A2780 cells. *Adv Pharm Bull*. 2014;4:437–41.
29. Vademécum. Epigen [consultado 2018 Apr 6]. recuperado de : <http://www.medicamentos.com.mx/DocHTML/23863.htm>
30. Lewis F, Bernstein K, Aral S. El microbioma vaginal y su relación con el corpontamiento, salud sexual y enfermedades de transmisión sexual. *Am Coll Obstet Gynecol*. 2017;129:643–54.
31. Tamarelle J, Thiébaud A, Delarocque-Astagneau E, DeBarbeyrac B, Bébéar C, Ravel J. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:35–47.
32. Marques M, Loebenberg R, Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technol*. 2011:15–28.
33. Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium infections: a systematic review and meta-analysis. Vol. 25, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2019. p. 35–47.
34. Sanabria Negrín JG. Virus del Papiloma Humano. *Reinf Plast*. 2017;61(2):81.
35. Santiago Lopez LM. Evaluación de la expresión de las proteínas CK17, p63 y anexina II en líneas celulares, cultivos enriquecidos de CSC y muestras de pacientes de CaCU por citometría de flujo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM; 2012. recuperado de : http://direccion.iztacala.unam.mx/PDFs/primer_informe_PDDA_2aadm.pdf
36. Martínez Carreño B. Detección de anticuerpos específicos a partículas quiméricas tipo virales contituidas por la proteína L1 y péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 en HPV-16 en sueros de pacientes con neoplasias cervicales. UNAM; 2013.
37. Hernández Valencia M, Carrillo Pacheco A, Hernández Quijano T. El Papanicolaou para detectar cambios celulares por el virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51(4):420–3.
38. Quillama Palomino S. Caracterización genotípica del virus del papiloma humano versus estudio citocolposcópico-hospital nacional dos de mayo. Universidad Nacional Federico Villareal;

39. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Gen Asp Struct Classif replication Hum papillomavirus*. 2015;53(244):S166–71.
40. García Carreño DC. Claves citomorfológicas en el diagnóstico citológico de lesiones en Pap-Test. Citorush training center 2019 Jul; recuperado de : <https://www.citorushtc.com/post/claves-citomorfológicas-en-el-diagnostico-citologico-de-lesiones-en-pap-test>
41. Cavazza ME, Correnti M. Actualidades sobre el Virus Papiloma Humano. *ResearchGate*. 2014;1–33.
42. Pacheco AC, Hernández Valencia M, Hernández Quijano T, Zárate A. Terapéutica en infección por virus del papiloma humano. *Ginecol Obstet Mex*. 2012;80(11):712–9.
43. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998;24(12):1113–28.
44. Torres pedraza LD. Formación de nanopartículas por la técnica de desplazamiento de disolvente utilizando dióxido de silicio como estabilizante. *Universidaad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco*; 2014.
45. Martínez Flores E, Berríos Vides S, Chinchot Fernandez M, Quan de Rivera A, Suncín de la Vega M. Buenas Practicas de Validación. *CIPAM*. 2006;24:1–112.
46. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. Guía De Validació De Métodos analíticos. 2002;1–55.

11. ANEXO 1 Curva de Calibración AG

Para cuantificar el AG en las nanopartículas preparadas y poder calcular la eficiencia de incorporación, se recurrió a un método espectrofotométrico. Para ello, primero se realizó un barrido de AG en agua en un rango de 220 a 330 nm, con el fin de determinar la longitud de onda de máxima absorción. Posteriormente, se construyó una curva de calibración, de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se preparó una solución stock pesando 20 mg de AG , agregando 10 ml de Transcutol®, sonicando durante 5 min para favorecer su disolución. posteriormente se llevó a un volumen de aforo de 100 mL con agua destilada. Esta solución contiene 200 µg/mL de ácido glicirricínico (Solución Stock).

De esta solución se tomaron alícuotas para obtener concentraciones de 24, 40, 80, 100 y 160 µg/mL, de acuerdo con lo presentado en la Tabla 13. Cada sistema fue preparado por triplicado y leído de manera aleatoria a 255 nm (45,46).

Tabla 13. Curva de calibración de AG

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5
Alícuota tomada de la solución Stock de AG (200 µg/ml)	3 ml	5 ml	10 ml	5ml	6 ml
Vol. de aforo con agua destilada	25 ml	25 ml	25ml	10 ml	10ml
Concentración teórica (µg/ml)	24	40	80	100	120

Los resultados de la curva de calibración se muestran en la tabla 14, en la que se determinó el coeficiente de Variación (CV%) Cada muestra se preparó por triplicado a partir de una solución stock. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV%), este último dando un valor de 1.85%, el cual cumple con el criterio de aceptación de $CV\% \leq 3.0$ (45). La gráfica 6 muestra la curva de calibración, relacionando la absorbancia en función de la concentración y de la cual se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9989$, intercepto = 0.0167 y pendiente = 0.01117.

Tabla 14. Resultados de la curva de calibración de AG

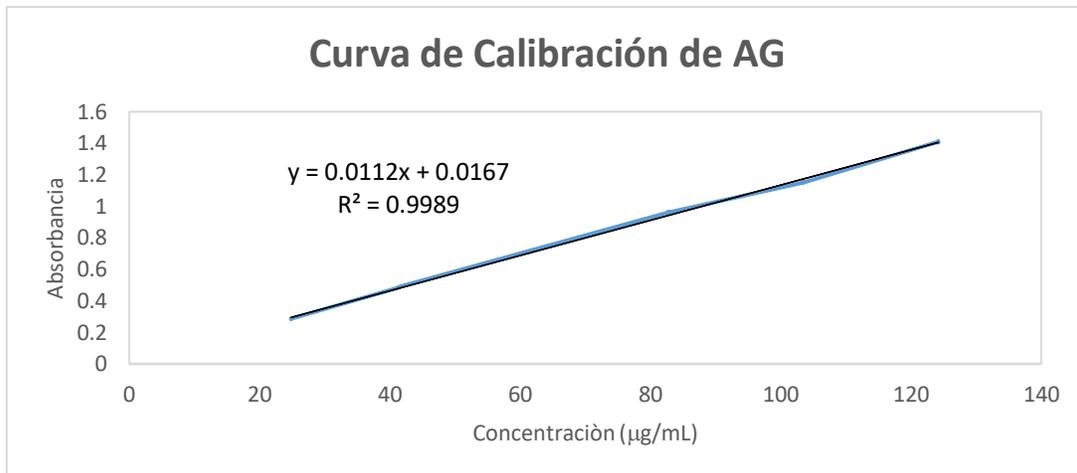
Solución	Ac. Glicirricínico (mcg /mL)	Absorbancia a 255nm	Absorbancia/Concentración
1	24.8	0.2864	0.011529791
1	24.8	0.2855	0.011493559
1	24.8	0.2863	0.011525765
2	41.4	0.4840	0.011690821
2	41.4	0.4839	0.011688406
2	41.4	0.4868	0.011758454
3	82.8	0.9604	0.011599034
3	82.8	0.9644	0.011647343
3	82.8	0.9607	0.011602657
4	103.5	1.1517	0.011127536
4	103.5	1.1558	0.011167150
4	103.5	1.1511	0.011121739
5	124.2	1.4083	0.011338969
5	124.2	1.4061	0.011321256
5	124.2	1.4130	0.011376812
Pendiente	0.011177687	Promedio	0.011465953
Intercepto	0.01674361	Desv.est	0.000212237
r^2	0.998907553	CV%	1.851020155

IC(β_1): de 0.1259459 a 0.012279001

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

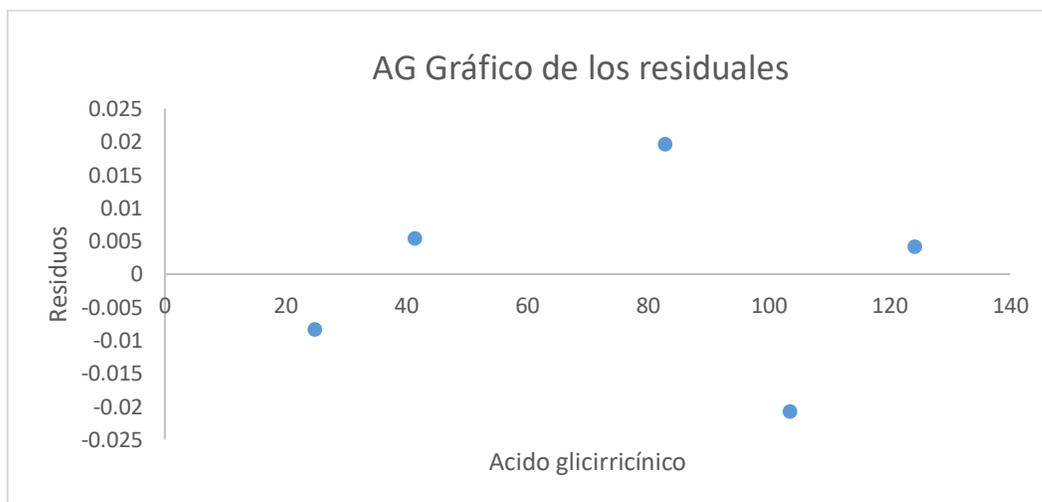
IC(β_1), no debe incluir el cero. **Aceptado**

CV $\leq 3\%$ **Aceptado**



Gráfica 6. Curva de calibración de AG

La grafica 7 de residuales para la curva elaborada nos permite ver que los datos tienen una buena distribución.



Gráfica 7. Residuales para valores de la curva de calibración de AG

Se determinó la precisión del sistema y especificidad de acuerdo a los procedimientos descritos en la guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México:

PRECISION DEL SISTEMA

1. Pesar 20 mg de ácido glicirricínico en un matraz volumétrico de 100 mL.
2. Añadir 10 ml de Transcutol y sonicar durante 5 min.
3. Llevar a volumen de aforo con agua destilada; esta solución contiene 200 mcg/mL de ácido glicirricínico.
4. De la solución stock tomar una alícuota de 10 mL en un matraz volumétrico de 25mL y llevar a volumen de aforo con agua destilada. Esta solución tiene una concentración de 80 mcg/mL de ácido glicirricínico.

$$CONC. AG = \frac{200 \text{ mcg AG}}{\text{mL FVS}} * \frac{10\text{mL}}{25 \text{ mL}} = 80 \frac{\text{mcg}}{\text{mL}} AG$$

5. Realizar por sextuplicado y leer en el espectrofotómetro UV-VIS a 255 nm
6. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta analítica.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

CV ≤ 1.5% para métodos fisicoquímico

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 15. Precisión del sistema

Solución	Ácido Glicirricínico (mcg /mL)	Absorbancia a 255 nm
1	82.8	0,9187
2	82.8	0,9171
3	82.8	0,9195
4	82.8	0,9187
5	82.8	0,9263
6	82.8	0,9274
	Promedio	0,9184
	Desviación estándar	0,0012
	%CV	0,1331

Criterio de Aceptación: $CV \leq 1.5\%$ para métodos fisicoquímicos. **Aceptado**

ESPECIFICIDAD

Se determinó el espectro de absorción UV/VIS de AG y del placebo (agua – Transcutol).

Espectro de absorción de AG

1. Pesar 20 mg de AG.
2. Incorporar el AG a un matraz volumétrico de 100 mL.
3. Agregar 10 ml de Transcutol y sonicar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente llevar a la marca de aforo con agua destilada, esta solución tiene una concentración de 200 mcg/mL.
4. Tomar una alícuota de 3 mL de la solución stock y llevar a volumen de marca de aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 25 mL, esta solución tiene una concentración de 24.8 mcg/ml

5. Determinar su espectro de absorción en un espectrofotómetro UV/VIS a longitud de onda de 220 a 330 nm.

Espectro de absorción de placebo

1. Agregar 10 ml de Transcutol en un matraz de 100 ml y sonicar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente llevar a la marca de aforo con agua destilada
2. Tomar una alícuota de 3 mL de la solución stock y llevar a volumen de marca de aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 25 mL,
3. Determinar su espectro de absorción en un espectrofotómetro UV/VIS a longitud de onda de 220 a 330 nm.

En la figura 25 se observa los espectros de absorción de las soluciones anteriormente descritas y se puede observar que se cumple con el criterio de especificidad.

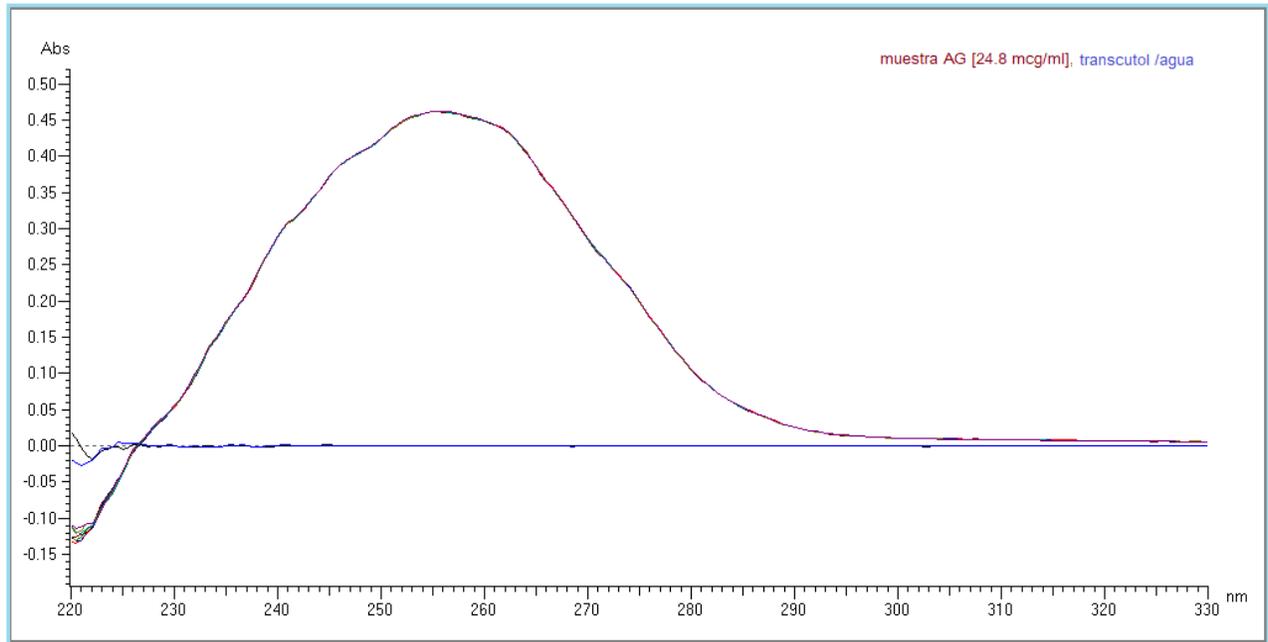


Figura 25. Espectro de absorción Transcutol- agua y AG (24.8mcg/mL)

Criterios de aceptación:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito. **Aceptado**

Tabla 16. Resumen de resultados sobre parámetros de validación

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultados
Precisión del sistema	$\%CV \leq 1.5\%$	0.1331
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	0.99891
	$\%CV \leq 3\%$	1.8510
	IC (β_1), no debe incluir el cero	0.1259459 a 0.0122790
Especificidad	La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito	Aceptado

12. ANEXO 2: Prueba de t

Se realizó una comparación de medias, mediante una prueba de t, con el fin de determinar si existía diferencia significativa entre los valores obtenidos en este estudio; para lotes placebo y lotes conteniendo AG. En todos los casos la t calculada fue mayor a la t de tablas y por consiguiente indica la existencia de diferencias significativas en los valores de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Zeta, (Tabla 17 a Tabla 22)

Tabla 17. Prueba de F para varianzas de dos muestras para valores de tamaño de partícula

	<i>PLACEBO</i>	<i>AG ENCAPSULADO</i>
MEDIA	144.922222	357.644444
VARIANZA	56.5319444	24.7952778
OBSERVACIONES	9	9
GRADOS DE LIBERTAD	8	8
F	2.27994802	
P (F <=f) UNA COLA	0.13245499	
VALOR CRÍTICO PARA F (UNA COLA)	3.438101123	

Tabla 18. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para valores de tamaño de partícula

	<i>PLACEBO</i>	<i>AG ENCAPSULADO</i>
Media	144.922222	357.644444
Varianza	56.5319444	24.79527778
Observaciones	9	9
Varianza Agrupada	40.66361111	
Diferencia Hipotética De Las Medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-70.76461472	
P (T<=t) una cola	1.04112E-21	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P (T<=t) dos colas	2.0822E-21	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Tabla 19. Prueba de F para varianzas de dos muestras para valores de índice de polidispersión

	PLACEBO	AG ENCAPSULADO
MEDIA	0.2966667	0.2355556
VARIANZA	0.0020725	0.0001168
OBSERVACIONES	9	9
GRADOS DE LIBERTAD	8	8
F	17.747383	
P (F <=f) UNA COLA	0.0002487	
VALOR CRÍTICO PARA F (UNA COLA)	3.4381012	

Tabla 20. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales para valores de índice de polidispersión

	PLACEBO	AG ENCAPSULADO
Media	0.29666667	0.2355556
Varianza	0.0020725	0.00011678
Observaciones	9	9
Diferencia Hipotética De Las Medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	3.918239698	
P (T<=t) una cola	0.001760187	
Valor crítico de t (una cola)	1.833112933	
P (T<=t) dos colas	0.003520375	
Valor crítico de t (dos colas)	2.62157163	

Tabla 21. Prueba de F para varianzas de dos muestras para valores de potencial Zeta

	<i>PLACEBO</i>	<i>AG ENCAPSULADO</i>
MEDIA	-22.0777778	-25.5
VARIANZA	4.39444444	0.9525
OBSERVACIONES	9	9
GRADOS DE LIBERTAD	8	8
F	4.61358997	
P (F <=f) UNA COLA	0.02230001	
VALOR CRÍTICO PARA F (UNA COLA)	3.43810123	

Tabla 22. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales para valores de potencial Zeta

	<i>PLACEBO</i>	<i>AG ENCAPSULADO</i>
Media	-25.5	-22.07777778
Varianza	0.9525	4.3944444444
Observaciones	9	9
Diferencia Hipotética De Las Medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-4.439935141	
P (T<=t) una cola	0.000497561	
Valor crítico de t (una cola)	1.795884819	
P (T<=t) dos colas	0.000395121	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20098516	