

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**FORMULACIÓN DE CASIOPEÍNA III I a® POR MEDIO DE
NANOPARTÍCULAS COMO UN SISTEMA DE LIBERACIÓN
MODIFICADA**

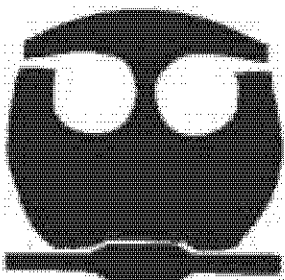
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

EDITH ANGÉLICA MORÁN ROLDÁN



México D. F

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Norma Trinidad González Monzón

Vocal: Liliana Aguilar Contreras

Secretario: María Josefa Bernad Bernad

1er Suplente: Joaquín González Robledo

2do Suplente: María Guadalupe Díaz Nanclares

Este trabajo se realizó en el Anexo del Laboratorio 1 F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Sustentante

Edith Angélica Morán Roldán

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por darme fuerza para vivir cada día.

A mis padres Santos y Rosy, a mi hermano Oscar por su amor y su apoyo y por dejarme volar y realizar mi sueño.

A mis tíos Guille y Carlos y a mi primo Carlos, por recibirme en su casa con los brazos abiertos, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis amigas de toda la vida Pao, Pris y Karla, por brindarme su amistad sincera durante todos estos años.

A Rebe, Moni y Luz por compartir conmigo mis tristezas y alegrías. Su amistad es muy valiosa para mí. Las quiero mucho.

A Armando porque contigo viví momentos inolvidables y porque no tengo palabras para expresar lo que significas para mí.

A Mariana, Betty, Carlitos, Ruben, Aldo, Gabriel, Noé por ser mis compañeros de clase, pero sobre todo por ser mis amigos. Me divertí mucho con ustedes.

A Poncho por estuviste conmigo cuando más lo necesitaba.

A mi asesora Fina, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas y por su amistad.

A los finitos, Leo, Tony, Lupita, Abraham y Jorge, por brindarme su ayuda y su amistad.

A La Dra. Lena Ruíz, a la M. en C. Isabel Gracia Mora y a la QFB Ma. Elena Bravo, por facilitarme material e información para el desarrollo de este proyecto.

A la USAI por facilitarme el uso de sus equipos.

A la UNAM porque es un honor y un orgullo ser PUMA.

A todos y cada uno de ustedes ¡GRACIAS!

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
1. El cáncer	4
1.1. Biología celular y el cáncer	5
1.2. Agentes físicos, químicos y biológicos que causan cáncer	6
1.3. Quimioprevención del cáncer	8
1.4. Fármacos anticancerígenos	9
1.5. Cisplatino	15
1.6. Casiopeínas	18
2. Sistemas de liberación controlada	21
2.1. Sistemas coloidales	24
2.1.1 Liposomas	24
2.1.2 Niosomas	25
2.1.3 Micropartículas	26
2.1.4 Nanopartículas	27
2.2 Otros acarreadores	36
IV. OBJETIVOS	40
V. MATERIALES Y EQUIPO	41
VI. METODOLOGÍA	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1 Preformulación de emulsiones	47
6.2 Doble emulsión w/o/w	48
6.3 Índice de refracción	52
6.4 Tamaño de partícula	53
6.5 Potencial Z	58
6.6 Microscopía electrónica de barrido	60
6.7 Liberación <i>in vitro</i>	67
6.8 Calorimetría diferencial de barrido	69
VIII. CONCLUSIONES	76
IX. BIBLIOGRAFÍA	78

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer ocupa uno de los primeros lugares de causa de mortalidad en nuestro país. Las células cancerosas se caracterizan por pérdida del control de la proliferación, y metástasis. En los últimos años se ha logrado un aumento en el conocimiento básico de este padecimiento, lo cual incluye la síntesis de un número importante de nuevos agentes antineoplásicos.¹

A pesar de los avances y del número de fármacos existentes, se hace necesaria la innovación de la quimioterapia experimental ya que muchos de los fármacos citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y por ello sólo son activos contra las células que se encuentran en el proceso de división, por lo tanto, afectan el desarrollo tanto de células normales como neoplásicas, sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las normales, son más susceptibles al efecto de los fármacos.

Un problema de gran importancia dentro del tratamiento del cáncer es el desarrollo de resistencia a los fármacos usados. En un principio éstos son eficaces, después de un tiempo las células tumorales desarrollan mecanismos que los vuelven ineficaces. De ahí que sea necesario el desarrollo y síntesis de nuevos compuestos con actividad antineoplásica.

Dentro de las moléculas con actividad citostática y antineoplásica se encuentra la familia de las Casiopeínas[®],²⁻⁵ que son compuestos de coordinación con un centro metálico de cobre. Estos son compuestos de coordinación análogos al cisplatino, que se diseñaron considerando diferentes parámetros y propiedades químicas, como son el metal y su estado de oxidación, número de coordinación del metal, propiedades de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad.

Por otro lado, en los últimos años la investigación farmacéutica ha desarrollado los llamados sistemas de liberación modificada, los cuales tienen por objetivo obtener formas farmacéuticas que garanticen un efecto terapéutico eficaz y seguro, con la ventaja adicional de disminuir o incluso eliminar efectos adversos locales y sistémicos, conseguir la menor potenciación o la reducción de la actividad del principio activo con el uso crónico, reducir la dosis misma y prolongar los tiempos de administración.

Dentro de los sistemas de liberación modificada de fármacos se encuentran los sistemas coloidales o transportadores particulados que incluyen, entre otros a las nanopartículas.

Las nanopartículas son sistemas que contienen un fármaco disperso con un polímero o un lípido y pueden ser producidas por diferentes técnicas. El tamaño de las nanopartículas permite que sean administradas por inyección intravenosa, y además que no sean rechazadas por el sistema inmunológico^{6, 7}, permitiendo que se encuentren en circulación sistémica, al mismo tiempo que liberan el fármaco de una forma modificada en comparación con una forma farmacéutica intravenosa convencional.

Con lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo es fabricar nanopartículas que contengan a la Casiopeína III I a[®] como principio activo y de esta manera tener un sistema de liberación prolongada para el tratamiento del cáncer.

III. ANTECEDENTES.

1. El cáncer.

La diferencia principal entre los tejidos normales y los tumores no radica en la replicación celular sino en la velocidad de proliferación, la cual en la mayor parte de los tejidos normales equivale a la velocidad de muerte celular, mientras que en las neoplasias la supera. En los tejidos normales la proliferación celular responde a señales complejas que indican la necesidad de proliferación con fines de reparación, regeneración o crecimiento y desarrollo tisulares. En apariencia en el tejido neoplásico esta autorregulación de la proliferación se ha perdido y la velocidad de replicación celular dependería principalmente de un mecanismo intrínseco regulado por la irrigación vascular.^{1, 8}

Dos son los aspectos característicos que definen al cáncer: el crecimiento celular no regulado por señales externas (es decir, autónomo) y la capacidad de invadir tejidos, metastatizar y colonizar lugares a distancia. El primero de estos aspectos, el crecimiento incontrolado de células anormales, es una propiedad de todas las neoplasias o nuevos crecimientos. Una neoplasia puede ser benigna o maligna. Si existe invasión, el segundo aspecto cardinal del cáncer, la neoplasia es maligna. Cáncer es sinónimo de neoplasia maligna. Los cánceres de los tejidos epiteliales se denominan carcinomas, y los de los tejidos no epiteliales, sarcomas.^{1, 8}

El cáncer se origina debido a alteraciones en el ADN que provocan una proliferación celular incontrolada. La mayoría de estas alteraciones implica cambios en la secuencia real de ADN (es decir, mutación), que pueden originarse como consecuencia de errores aleatorios de repetición, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación del ADN.

El cáncer es más frecuente en los tejidos de recambio rápido, sobre todo en los expuestos a carcinógenos ambientales y en aquellos cuya proliferación está regulada por hormonas. Las alteraciones genéticas más frecuentes consisten en la activación de protooncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales.

Aunque casi todos los cánceres son genéticos, la mayoría no son hereditarios.¹ Ciertos individuos con cáncer han heredado una mutación de una línea germinal que les predispone el desarrollo de cáncer, pero incluso en esa situación se requieren otras mutaciones somáticas añadidas para que se desarrolle un tumor.^{1,}

8

1.1 Biología celular y cáncer.

Para que aparezca un cáncer deben producirse mutaciones que afecten a diversas vías. Con frecuencia está afectado el punto de control de G1 del ciclo celular. La apoptosis (muerte celular programada) se evita por mutaciones en la vía p 53⁹(gen supresor de tumores) o por otros mecanismos. La expresión de telomerasa es una característica frecuente de los cánceres. A menudo se detecta una sobreexpresión de los factores de crecimiento y sus receptores. En general, cuando se produce una mutación en un componente de una vía de señalización, las demás mutaciones se observan en otras vías en lugar de en otro componente de dicha vía. El alto grado de mutabilidad de las células cancerosas facilita la adaptación al medio, incluido el desarrollo de resistencia a fármacos contra el cáncer. A medida que los tumores progresan, adquieren la capacidad para segregar proteasas que les ayudan a superar las barreras locales, de modo que puedan metastatizar. En determinadas etapas de la progresión del tumor tiene lugar la producción por las células tumorales de factores que permiten la neovascularización para suministrar nutrientes al tumor en crecimiento. Otras mutaciones permiten al tumor escapar de mecanismos de vigilancia inmunitarios.^{1, 8, 9}

1.2. Agentes químicos, físicos y biológicos que causan cáncer.

Los agentes que causan cáncer se clasifican en tres amplios grupos:

- **Energía radiante:** Los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma son mutágenos y carcinógenos. Estas radiaciones lesionan al DNA de varias maneras. La radiación ultravioleta puede causar la formación de dímeros de pirimidina; pueden crearse sitios apurínicos o apirimídicos por eliminación de las bases correspondientes; pueden producirse roturas en las tiras sencillas o dobles, o entrecruzamiento de ellas. Se supone que la lesión del DNA es el mecanismo básico de carcinogénesis de la energía radiante. Aparte de los efectos directos sobre el DNA, los rayos X y γ provocan la formación de radicales libres en los tejidos. Los radicales hidroxilos resultantes, superóxido y otros, pueden interactuar con el DNA y algunas macromoléculas y conducir a alteraciones moleculares, por lo tanto, es probable que contribuyan a los efectos carcinogénicos de la energía radiante. ^{1, 8, 10, 11}
- **Compuestos químicos:** Un extenso número de compuestos químicos son carcinógenos (Tabla I). Muchas de estas sustancias se relacionan con el desarrollo de cáncer en el ser humano. Se calcula que hasta 80% de los cánceres humanos se producen por factores ambientales, principalmente por compuestos químicos. La exposición a esas sustancias puede deberse a la ocupación de la persona (por ejemplo, benceno y asbesto); la alimentación (por ejemplo, aflatoxina B₁, producida por el moho *Aspergillus flavus* y que en ocasiones se encuentra como contaminante de los cacahuates y otros alimentos); el estilo de vida (consumo de cigarros) o a otros factores (por ejemplo, ciertos agentes farmacológicos pueden ser carcinógenos). ^{1, 8, 10, 11}

Tabla I. Algunos carcinógenos químicos.

CLASE	COMPUESTO
Hidrocarburos aromáticos poli cíclicos	Benzo(α)pireno, dimetilbenzantraceno
Aminas aromáticas	2-Acetilaminofluoreno, N-metil-4- aminoazobenceno(MAB)
Nitrosaminas	Dimetilnitrosamina, Dietilnitrosamina
Medicamentos diversos	Alquilantes, dietilestilbestrol
Compuestos naturales	Dactinomicina, aflatoxina B ₁
Compuestos inorgánicos	Arsénico, asbesto, berilio, cadmio, cromo

Virus: Los poliomavirus y los virus SV40 desempeñan un papel importante en el desarrollo de las ideas actuales sobre la oncogénesis viral. Los dos son pequeños y sus genomas circulares codifican sólo 5 o 6 proteínas; bajo ciertas circunstancias, la infección con estos virus en células apropiadas puede causar transformación maligna. En el caso del SV40 estas proteínas se conocen como **T** y **t** y en el caso del poliomavirus, se designan **T**, **Tmedia** y **t**. Se sabe que los antígenos T se unen fuertemente al DNA y alteran la expresión genética. Estas proteínas muestran efectos cooperativos los cuales sugieren, que es necesario modificar más de una reacción o un proceso para la transformación. Hay interés considerable en el virus de Epstein-Barr, dado que en el ser humano se relaciona con el linfoma de Burkitt (linfoma que se origina a partir de los linfocitos B y tiende a invadir áreas externas al sistema linfático, como la médula ósea, la sangre, el sistema nervioso central y el líquido de la médula espinal) y con el carcinoma nasofaríngeo. El virus de la hepatitis B puede estar relacionado con algunos casos de cáncer hepático en el hombre.^{1,}

8, 10-12

1.3. Quimioprevención del cáncer

La quimioprevención del cáncer es un concepto relativamente nuevo que implica la utilización de determinados agentes químicos, naturales o sintéticos para corregir, suprimir o impedir la carcinogénesis antes del desarrollo de una neoplasia maligna invasora.

El mejor conocimiento actual de la biología del cáncer determina que la quimioprevención es una posibilidad real. El cáncer se desarrolla mediante una acumulación de cambios genéticos, que son puntos potenciales de intervención para prevenirlo. Las alteraciones de este tipo pueden heredarse o adquirirse mediante la acción de carcinógenos físicos, infecciosos o químicos (Tabla II). Al igual que la mayoría de las enfermedades humanas, el cáncer proviene de una interacción entre la genética y las exposiciones ambientales.¹

Tabla II. Carcinógenos y neoplasias o cánceres asociados

Carcinógenos	Cáncer o neoplasia asociado
Agentes alquilantes	Leucemia mielocítica, cáncer de vejiga
Andrógenos	Cáncer de próstata
Aminas aromáticas (colorantes)	Cáncer de vejiga
Arsénico	Cáncer de pulmón, piel
Asbesto	Cáncer de pulmón
Benceno	Leucemia mielocítica
Cromo	Cáncer de pulmón
Dietilestilbestrol (prenatal)	Cáncer de vejiga
Estrógenos	Cáncer de endometrio, hígado
Alcohol etílico	Cáncer de hígado, esófago
<i>Helicobacter pylori</i>	Cáncer de estómago
Virus de la hepatitis B o C	Cáncer de hígado
Gas mostaza nitrogenado	Cáncer de pulmón, cabeza y cuello
Hidrocarburos poli cíclicos	Cáncer de pulmón, piel
Luz solar (ultravioleta)	Cáncer de piel
Tabaco	Cáncer de vías aerodigestivas superiores

1.4. Fármacos anticancerígenos.

La quimioterapia consiste en la utilización de compuestos químicos. Este tipo de terapia ha presentado resultados alentadores dado que los compuestos químicos pueden influir en todos los sitios de una enfermedad metastásica después de ser administrados. Esto último es simultáneamente la principal

ventaja y desventaja, ya que estos compuestos no discriminan entre células neoplásicas y células normales con alto índice reproductivo. En general, los principales efectos tóxicos que produce un agente quimioterapéutico son, en forma aguda: anorexia, vómito, diarrea, supresión funcional de la médula ósea y del sistema inmune, así como anafilaxia y cambios en el sistema urinario. De forma crónica se presentan daños principalmente en el corazón.^{1, 8, 10, 11}

Todos los fármacos neoplásicos son citotóxicos, y por lo tanto afectan el desarrollo tanto de células normales como neoplásicas. Sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las normales, son más susceptibles al efecto de los fármacos. La Tabla III recoge los agentes quimioterapéuticos que se utilizan habitualmente y los aspectos relacionados con su utilización. Se pueden agrupar los fármacos en tres categorías generales: los que afectan al ADN, los que afectan a los microtúbulos y los que actúan sobre receptores de tipo hormonal. En general, la terapéutica de dosis altas intermitentes tiene más probabilidad de lograr éxito que un tratamiento continuo con dosis bajas. Los tumores expuestos a concentraciones más altas del fármaco usando la quimioterapia combinada (combinación de 3 o 4 medicamentos) han tenido éxito en varios cánceres, ya que los compuestos actúan en forma sinérgica, el comienzo de la resistencia puede retardarse y con frecuencia su toxicidad es menor.^{1, 8}

Tabla III. Agentes quimioterapéuticos útiles en las Enfermedades neoplásicas.

CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES GENÉRICOS	ENFERMEDAD
AGENTES ALQUILANTES	Mostazas Nitrogenadas	Mecloretamina	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin
		Ciclofosfamida	Leucemia linfocítica aguda y crónica, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, ovario, pulmón, testículo
	Alquisulfonatos	Bisulfán	Leucemia granulocítica aguda
	Nitrosoureas	Carmustina (BCNU)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumores de cerebro primarios, mieloma múltiple, melanoma
		Semustina (metil- CCNU)	Tumores primarios de cerebro, estómago , colon
	Triacenos	Dacarbazina	Melanoma, Sarcomas de tejidos blandos.
ANTIMETABOLITOS	Análogos del ácido fólico	Metotrexato (ametopterina)	Leucemia linfocítica aguda, mama, cabeza y cuello, pulmón, sarcoma osteogénico
	Análogos de la pirimidina	Flourouracilo, Floxuridina.	Mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello
	Análogos de la purina e inhibidores relacionados	Mercaptopurina	Leucemias linfocíticas agudas, granulocítica aguda y granulocítica crónica
PRODUCTOS NATURALES	Alcaloides de la vinca	Vinblastina	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mama, testículo
		Vincristina	Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, pulmón.

	Antibióticos	Bleomicina	Testículo, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y tracto genitourinario; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin
		Mitomicina	Estómago, cuello de útero, colon, mama, páncreas, vesícula, cabeza y cuello.
AGENTES VARIOS	Complejos de coordinación del platino	Cisplatino	Testículo, ovario, vesícula, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cuello de útero, endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico
	Antracenediona	Mitoxantrona	Leucemia granulocítica aguda, mama
	Urea sustituida	Hidroxiurea	Leucemia granulocítica crónica, melanoma
	Derivado de la metilhidrazina	Procarbazina	Enfermedad de Hodgkin
HORMONAS Y ANTAGONISTA	Corticosteroides	Prednisona	Leucemias linfoides crónica y aguda, linfomas no Hodgkin, mama
	Estrógenos	Dietilestilbestrol	Mama, próstata
	Antiestrógenos	Tamoxifeno	Mama

❖ Agentes de interacción directa con el ADN.

Los agentes alquilantes se descomponen, ya sea de forma espontánea o tras el metabolismo celular de un órgano normal o de un tumor, y originan intermediarios reactivos que modifican de forma covalente las bases del ADN. Esto conduce al entrecruzamiento de hebras de ADN o la aparición de roturas en el ADN a consecuencia de los efectos de reparación. El ADN roto es incapaz de completar la replicación normal y la división celular, además, es un potente activador de los puntos de control del ciclo celular y de las vías de señalización que activan la apoptosis. Los agentes alquilantes comparten unas toxicidades similares, como son la mielosupresión, la alopecia, la disfunción gonadal, la mucositis y la fibrosis pulmonar.^{1, 8}

❖ **Antibióticos antineoplásicos y tóxicos de la topoisomerasa.**

Los antibióticos antitumorales son sustancias producidas por las bacterias que en la naturaleza parecen proporcionar una defensa química contra otros microorganismos hostiles. Los antibióticos antitumorales se unen al ADN directamente y experimentan frecuentes reacciones de transferencia electrónica para generar radicales libres muy cerca del ADN, lo que provoca lesiones del mismo en forma de roturas de una sola cadena o entrecruzamientos. Los tóxicos de la topoisomerasa son productos naturales o especies semisintéticas derivadas del último término de plantas, y modifican las enzimas que regulan la capacidad del ADN de desenrollarse para permitir la replicación o transcripción normales.

La doxorubicina es el agente antineoplásico con mayor actividad y de uso más frecuente. Puede intercalarse en el ADN, alterando de esta forma la estructura y replicación del ADN y la función de la topoisomerasa. También puede experimentar ciclos de oxidación – reducción aceptando electrones en su sistema anillo quinona. Causa mielosupresión, alopecia, náuseas y mucositis.^{1,}

8

❖ **Efectores indirectos de la función del ADN: antimetabolitos.**

Una definición amplia de los antimetabolitos incluiría a los compuestos con similitudes estructurales con los precursores de las purinas o las pirimidinas o que interfieren en la síntesis de las purinas o de las pirimidinas. Los antimetabolitos pueden producir daños al ADN, una cronología anormal o una progresión incorrecta a través de las fases de síntesis del ADN o por una alteración de la función de las enzimas de biosíntesis de las pirimidinas y las purinas. Tienden a provocar una mayor toxicidad a las células en fase S, y el

grado de toxicidad aumenta con la duración de la exposición. Son manifestaciones tóxicas comunes las estomatitis, la diarrea y la mielosupresión.^{1, 8}

❖ **Inhibidores del huso mitótico.**

Los microtúbulos son estructuras celulares que forman el huso mitótico, y en las células en interfase son responsables del andamiaje celular a lo largo del cual transcurren diversos procesos de movimiento y secreción. Los microtúbulos se componen de multímeros covalentes repetidos de un heterodímero de subunidades α y β de la proteína de la tubulina. La vincristina se une al dímero de tubulina con el resultado de que los microtúbulos se disgregan. Esto da lugar al bloqueo de las células en crecimiento en la fase M; sin embargo, también son evidentes los efectos tóxicos en las fases G1 y S.

Los taxanos son una clase de fármacos a la que pertenecen el paclitaxel y el docetaxel. Estos agentes, difieren de los alcaloides de la vinca en el hecho de que los taxanos estabilizan los microtúbulos frente a la despolimerización. Los microtúbulos estabilizados funcionan anormalmente y no son capaces de experimentar los cambios dinámicos normales de la función de los microtúbulos necesarios para completar el ciclo celular. Los taxanos se encuentran entre los agentes antineoplásicos más activos en los tumores sólidos.^{1, 8}

❖ **Agentes hormonales.**

La familia de las moléculas relacionadas con el receptor de hormonas esteroideas se ha convertido en diana destacada para “pequeñas moléculas” de utilidad en el tratamiento del cáncer. Cuando se unen a sus ligandos conocidos, estos receptores pueden alterar la transcripción génica y, en ciertos tejidos, inducir la apoptosis. El efecto farmacológico imita o parodia los efectos

normales del agente sobre el tejido no transformado, aunque los efectos sobre los tumores están mediados por efectos indirectos en determinados casos.

Los glucocorticoides se suelen administrar en forma de ciclos de dosis elevadas en las leucemias y los linfomas, donde inducen apoptosis en las células tumorales. El tamoxifeno es un antagonista parcial de los receptores de estrógenos; tiene diez veces más actividad antineoplásica en las pacientes con cáncer de mama que expresan receptores de estrógenos que en quienes tienen niveles bajos o nulos de expresión. El cáncer de próstata se trata tradicionalmente con dietilestilbestrol, que actúa como un estrógeno en el hipotálamo para regular negativamente la producción de hormona luteinizante hipofisiaria, lo que da lugar a una disminución de la elaboración de testosterona por el testículo.^{1, 8}

1.5. Cisplatino.

En la quimioterapia del cáncer existen 44 compuestos aprobados para su uso, de estos compuestos, un compuesto descubierto de manera azarosa vino a revolucionar la quimioterapia actual, es conocido comercialmente como Cisplatino (*cis* -diamonio-dicloro-platino (II)), y resulta ser un complejo de coordinación que se sintetizó el siglo pasado y fue señalado por vez primera por Rosenberg en 1965 por mostrar actividad antibiótica. Estudios posteriores del mismo autor en 1969 establecen la actividad antitumoral; a la fecha se sabe que actúa como un agente antineoplásico interactuando con el ADN, al igual que un análogo de él que presenta la misma efectividad pero que resulta menos tóxico: Carboplatino. Con este antecedente se puede inferir que complejos de coordinación que poseen una estructura semejante en su diseño al Cisplatino (Figura 1.1) o Carboplatino podrán presentar actividad antineoplásica.^{8, 11}

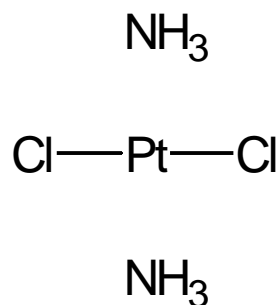


Figura 1.1 Cisplatino ((*cis* -diamonio-dicloro-platino(II))

La principal toxicidad del cisplatino que se observó primero en perros y en monos ya se ha observado en pacientes. Éste incluye toxicidad renal dosis limitante, náusea y vómito, mielosupresión, ototoxicidad, y disminución en los electrolitos séricos. El uso intensivo de hidratación intravenosa cuya consecuencia es la diuresis, ha disminuido la gravedad de la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino. El número de efectos secundarios menores continúa incrementando conforme aumenta la experimentación clínica del fármaco. Estos incluyen ahora la tinitus, sordera, neuropatía periférica e hipomagnesemia.⁸

El cisplatino es el primer miembro de una nueva clase de fármacos anticancerígenos potentes (los complejos metálicos de coordinación) en adquirir uso general en la quimioterapia del cáncer. Se ha demostrado ser efectivo solo o en combinación para el tratamiento de una amplia variedad de tipos de cáncer sólidos en el hombre. La evidencia sugiere que puede ser curativo para el cáncer testicular y de los ovarios. También es paliativo en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, de la vesícula, próstata, pulmón y algunos cánceres pediátricos.^{1, 8, 11}

Los compuestos de Pt (II) tales como el cisplatino reaccionan con nucleófilos para producir productos de adición. El cisplatino es bifuncional en el sentido de que cada molécula tiene dos sitios de reacción de nucleófilos. En este aspecto,

el cisplatino y sus derivados se asemejan a los agentes alquilantes bifuncionales como las mostazas nitrogenadas. Como éstas, el cisplatino puede reaccionar con una variedad de sitios moleculares en la célula, pero la reacción más significativa desde un punto de vista biológico es probablemente con el ADN. Los ejemplos de posibles de aductos del cisplatino involucrando al ADN se ilustran en la Figura 1.2.

Recientemente se aisló un aducto de ADN-cisplatino y se obtuvo la estructura cristalina, lo que vino a corroborar la propuesta hecha varios lustros antes.^{8, 11, 13-17}

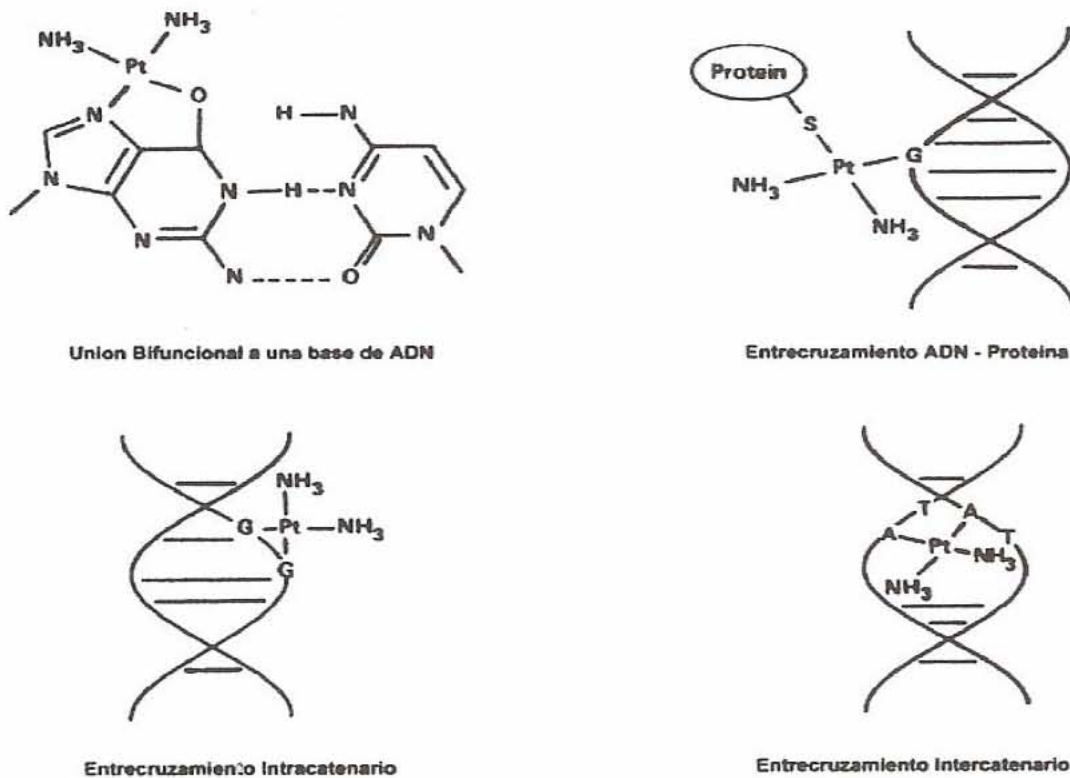


Figura 1. 2. Mecanismos de reacción del Cisplatino.

Desafortunadamente, muchos tumores son totalmente refractarios al cisplatino, Este hecho ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de muchos nuevos agentes en la búsqueda de compuestos con toxicidad reducida y diferentes propiedades biológicas. De manera ideal, la búsqueda pretende encontrar fármacos con las siguientes características:

- a) Ausencia de resistencia-cruzada al cisplatino.
- b) Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos.
- c) Disminución de efectos eméticos y renales (tóxicos directos en general)
- d) Sinergismo en terapias combinadas.
- e) Bajo potencial oncogénico.^{8, 11}

1.6. Casiopeínas.

En México, el elevado índice de mortandad por cáncer, la resistencia de ciertos tumores a los tratamientos convencionales y su costo elevado, estimulan la búsqueda de nuevas moléculas, como una alternativa de tratamiento para esta enfermedad. Por todo lo anterior, en 1975, la Dra. Ruiz Azuara, en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, concibió la idea de diseñar compuestos de coordinación con posible actividad contra el cáncer.^{2-5, 18} El diseño de los compuestos se realizó considerando además de los puntos mencionados en el apartado anterior, varios parámetros particulares de compuestos de coordinación, como son:

- El metal y su estado de oxidación.
- El número de coordinación del mismo.

Con respecto a los ligantes, se considera la capacidad quelante y el grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad de los mismos. Estas características se reflejan en las propiedades que estos compuestos presentan, en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de los compuestos con el ADN, entre otras posibilidades de mecanismo de actividad. La familia de compuestos llamada Casiopeínas contienen cobre (II) como centro metálico que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N,N) y otro que puede ser aminoacidato (N,O) o donador (O,O)^{10-12, 18}. Estos compuestos han sido clasificados en subfamilias las cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla IV. Subfamilias y fórmulas generales.

Subfamilia	Fórmula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína III	[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)(O-O)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5R-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(bipiridina))(O-N)]NO ₃

Los compuestos de coordinación desarrollados por Ruiz Azuara fueron diseñados para mostrar una actividad biológica potencial. Dichos compuestos poseen en su esfera de coordinación metales de la primera serie de transición, de preferencia esenciales biológicamente (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn). A partir de 1980 se inician los trabajos de constatación biológica *in vitro* con base en el postulado que pueden tener actividad antineoplásica^{2-5, 18}. Esta hipótesis se

apoyó tanto en los postulados antes mencionados como en los postulados de Rosenberg, los últimos a su vez fueron derivados de los conocimientos farmacodinámicos del cisplatino en líneas tumorales y que se resumen en los siguientes puntos:

- a) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- b) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
- c) Dos ligantes *cis* monodentados (o uno bidentado) como grupos salientes son necesarios. Los isómeros *trans* son inactivos.
- d) Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- e) Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.

Hasta la fecha se han sintetizado cerca de 100 Casiopeínas, las cuales están caracterizadas químicamente y en proceso de caracterizarse con detalle fisicoquímicamente. Se encuentran patentadas. El proceso de síntesis implica la mezcla de cantidades equimolares de los ligantes y $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ para obtener una mezcla de reacción azul intenso en la mayoría de los casos a la que se evapora el disolvente a presión reducida y temperatura controlada. De esta forma se obtiene un precipitado cuya coloración varía según los ligantes del verde oscuro al azul de diferentes tonalidades. Este producto se somete repetidas veces a recristalización para purificarlo y finalmente se procede a realizar las pruebas de identificación y caracterización.^{2, 18}

La actividad biológica de algunas Casiopeínas ha sido estudiada más a fondo y han sido sometidas a múltiples pruebas de acuerdo con las normas internacionales de evaluación de fármacos con potencial anticancerígeno, y los

resultados han demostrado que estas moléculas tienen actividad citostática, citotóxica y antineoplásica, lo cual motiva a continuar con estos estudios en otras moléculas de la misma familia. Aunque todavía no está definido el mecanismo de acción de éstas moléculas, estudios recientes indican que tienen una alta capacidad para inducir apoptosis en células tumorales, así como la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).^{19, 20}

Hasta la fecha, no existe algún tipo de formulación para las Casiopeínas. Para estudios en animales, las Casiopeínas son administradas por vía intravenosa en solución glucosada para evitar su precipitación. Este trabajo es pionero en cuanto a formulación de las Casiopeínas se refiere.

2. Sistemas de liberación controlada.

Durante varias décadas el tratamiento de las enfermedades ha sido acompañado por la administración de las formas farmacéuticas tradicionales tales como las tabletas, cápsulas, cremas, ungüentos, jarabes, aerosoles, inyectables y supositorios. Sin embargo esas formas farmacéuticas, a pesar de que son las que predominan en el mercado, no garantizan una concentración constante del fármaco dentro del organismo, por lo que para lograr esto es necesario tomar este tipo de medicamentos varias veces al día provocando así, molestias al paciente tales como tiempos de dosificación cortos, además de los efectos adversos del fármaco y de que sólo una pequeña cantidad de fármaco llega al sitio donde se requiere. Lo anterior se ejemplifica en la figura 2.1.²¹

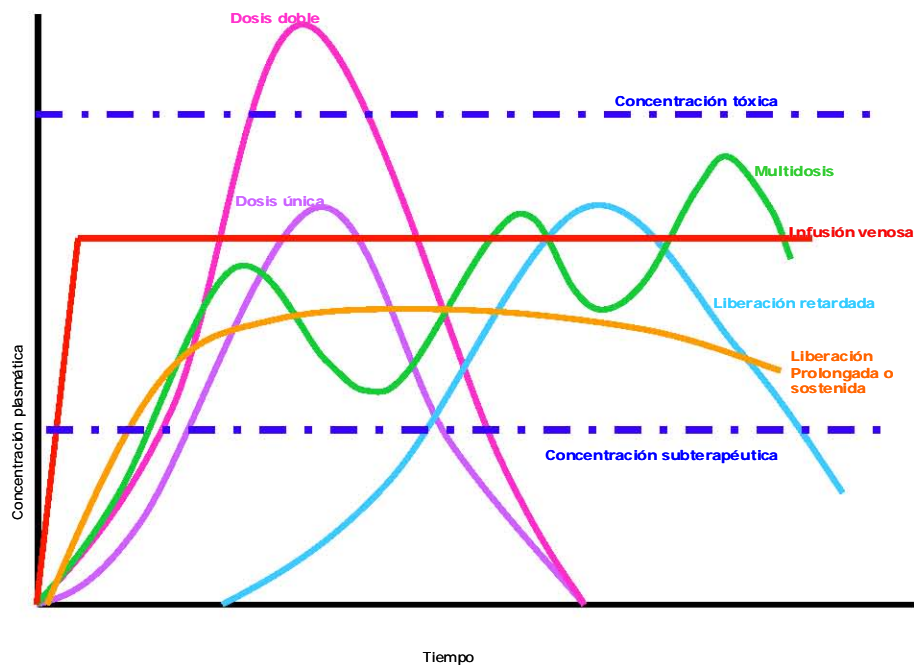


Figura 2.1 Perfiles de liberación

Por lo anterior en los últimos años se han diseñado formas farmacéuticas alternativas para solucionar este tipo de problemas surgiendo así los sistemas de liberación controlada.

La liberación controlada de fármacos al lugar específico de acción en la dosis y tiempo necesarios es un área extensa y muy activa de la tecnología farmacéutica. Los beneficios de estos sistemas de liberación son muchos, destacando la disminución de los efectos secundarios, la posibilidad de disminuir la dosis y el aumento de los tiempos de dosificación.²¹

Los sistemas de liberación controlada abarcan una amplia gama de técnicas; desde aerosoles para la terapia de inhalación hasta cápsulas de alta tecnología que liberan la carga a los sitios específicos del cuerpo. Otra forma de lograr este objetivo se refiere al uso de acarreadores que lleven al fármaco al lugar de acción en la dosis y el tiempo deseados.

Los sistemas acarreadores presentan algunas ventajas sobre el hecho de administrar los fármacos libremente. Por una parte el organismo es protegido de la posible toxicidad de los activos, mientras que éstos son protegidos de la acción del organismo y del medio ambiente, a la vez que mantienen la velocidad de liberación.

Para diseñar formas de dosificación “sofisticadas” se utilizan materiales adecuados que disminuyan las propiedades de las moléculas activas, incluyendo aquellas relacionadas con su comportamiento en el organismo. Muchos tipos diferentes de biomateriales han sido desarrollados, siempre considerando la finalidad última: lograr un sistema de liberación controlada, con el cual ni organismo, ni activo se vean afectados de manera negativa. Los materiales deben ser, principalmente biodegradables, es decir, que su degradación en el organismo sea más rápida que fuera de él y que ni ellos ni sus productos de degradación sean tóxicos. Destacan las ciclodextrinas, fosfolípidos, esteroides, diferentes tipos de tensoactivos y polímeros naturales (albúmina, gelatina, colágeno, etc.) o sintéticos (lípidos, polianhidros, poli-ε-caprolactona, poliortoésteres, etc.).^{21, 22}

Para poder conocer cómo funcionarán los distintos acarreadores utilizados es necesario tener conocimiento de algunas propiedades de los mismos: distribución y tamaño de partícula, potencial Z, hidrofobicidad de la superficie y análisis químico de la misma.

En caso de ser necesario obtener formulaciones estériles, hay que estudiar la composición de cada uno de los acarreadores, siendo los más complejos aquellos formados a partir de polímeros, ya que muchos de éstos son susceptibles de hidrolizarse a temperatura altas o mediante radiaciones esterilizantes (rayos γ) y el óxido de etileno no se recomienda, dado que es susceptible de dejar residuos. Por lo tanto, las técnicas serán elegidas en función del vehículo, considerando la posibilidad de filtración, si es que el

tamaño de partícula lo permite o directamente trabajando en condiciones asépticas.^{7, 22-24}

En resumen, para conseguir sistemas altamente eficaces se necesita que:

- 1.- La superficie sea hidrofílica.
- 2.- La superficie sea no activante.
- 3.- La adsorción de componentes del suero sea baja.
- 4.- El tamaño de la partícula no importa si la superficie es la adecuada.
- 5.- Todos los requerimientos deben de cumplirse simultáneamente.

Su éxito en terapéutica depende de su capacidad para mantenerse en la circulación y su capacidad de alcanzar las células o tejidos “meta”.

Los acarreadores más utilizados se pueden clasificar en tres grupos:

- Coloidales: liposomas, niosomas, micropartículas y nanopartículas.
- Moleculares: ciclodextrinas, anticuerpos y dendrímeros.
- Celulares: eritrocitos resellados.

2.1 Sistemas coloidales

Son todos aquellos constituidos por partículas menores a 1 μm . Entre los más mencionados en la liberación controlada se encuentran: liposomas, niosomas, nanopartículas y micropartículas.^{7, 22, 24, 25}

2.1.1 Liposomas

Se definen como vesículas de diferentes tamaños, formadas por una o más capas concéntricas de fosfolípidos y que presentan en su interior una cavidad hidrofílica. Figura 2.2.^{22, 26-28}

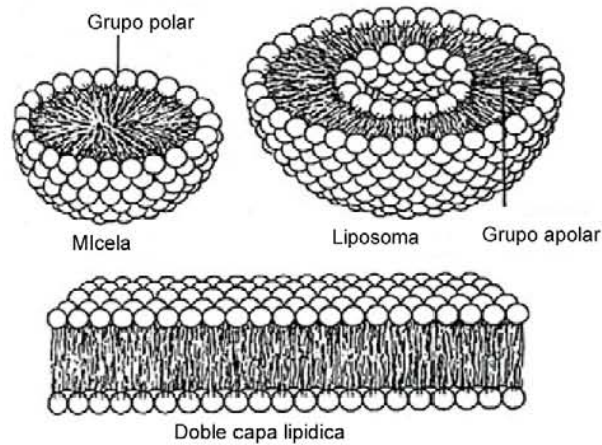


Figura 2.2 Estructura de Liposomas

Fueron descubiertos en 1960 y desde entonces han sido utilizados para diversos fines, entre los que destacan su uso como modelos de membranas celulares y como sistemas de liberación de activos, a nivel farmacéutico y cosmético. Los liposomas varían según el tipo de lípidos utilizados, la técnica y las condiciones de preparación lo cual influye sobre los procesos de opsonización, perfil de liberación de los activos y la vida media del liposoma^{22, 26-28}. Entre sus aplicaciones terapéuticas se encuentran la aplicación de doxorubicina y citromicina en administración parenteral y el AZT por vía intravenosa. Entre sus aplicaciones cosméticas se encuentra en el mercado Capture[®] de Christian Dior.

2.1.2 Niosomas

Son vesículas formadas principalmente por tensoactivos no iónicos y presentan una mayor estabilidad que los liposomas. Entre los tensoactivos utilizados para su fabricación se encuentran: poliglicerol alquiléteres y glucosil alquil-éteres, entre otros. Para conferirles una mayor estabilidad se incluyen en su estructura otros tensoactivos cargados y un porcentaje de colesterol.

Su eficacia de carga depende del método de preparación (inyección de disolvente orgánico lleva a mayor eficacia que por agitación manual), composición de la bicapa (a más colesterol, mayor longitud de cadena y mayor carga, mayor atrapamiento).

Entre sus aplicaciones terapéuticas se pueden mencionar la administración intravenosa de doxorubicina, la administración oral de metotrexato y la administración transdérmica de estradiol.^{22, 26, 29}

2.1.3 Micropartículas

Son partículas pequeñas, del orden de micras. Pueden ser preparadas a partir de diferentes materiales y sus características físicas dependerán del uso al que estén destinadas. La elección del material considera el principio activo que se desea utilizar, el sitio donde se requiere, la duración del efecto y la toxicidad del mismo. Existen dos tipos de micropartículas: las microesferas en las que el fármaco se encuentra disuelto o disperso en una matriz polimérica sólida y las microcápsulas cuando el fármaco se encuentra en una fase líquida interior y rodeada por una membrana polimérica.

El uso de micropartículas ha sido generalizado en los últimos años. Se pueden encontrar sistemas de liberación dirigidos prácticamente a cualquier vía de administración que involucren estas partículas microestructuradas. Sin embargo, debido a su tamaño existe el riesgo de activación del sistema inmunitario y la posibilidad de producir toxicidad.

Se han utilizado con antineoplásicos, broncodilatadores, antiinflamatorios, etc., suponiendo un gran auge en el ámbito farmacéutico.²²

2.1.4 Nanopartículas

Son partículas coloidales las cuales tienen un tamaño de entre los 10 y 1000 nm. Están hechas a base de materiales macromoleculares en el cual el fármaco está disuelto, atrapado o encapsulado. Este material debe ser preferentemente biodegradable.^{7, 22-24, 27, 30}

La elección del polímero, tamaño y método de preparación dependerá de la bioaceptabilidad del mismo, las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del polímero y de la meta terapéutica.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Se pueden dividir en aquellos en los que se parte del polímero previamente sintetizado o los que se parte de los monómeros.

Polímeros previamente sintetizados:

Emulsificación-evaporación^{21, 22, 31-33}

-El polímero y el fármaco se disuelven en un medio orgánico inmisible con el agua y se adiciona a una disolución acuosa mediante agitación u otro mecanismo que lleve a disminuir el tamaño del glóbulo de la preemulsión formada.

- Se elimina el disolvente orgánico mediante vacío, calor o ambos.

El resultado es la formación de una dispersión de nanoesferas.

Emulsificación-difusión^{21, 22, 34-36}

Se puede considerar una modificación del método anterior.

- Se disuelve el polímero en un disolvente parcialmente miscible con agua, el cual ha sido previamente saturado en agua.

-
-
- Se adiciona la fase anterior a una disolución acuosa que contiene un estabilizante.
 - Se adiciona más agua, lo que hace que haya un proceso de difusión y se formen las nanopartículas.
 - Se elimina el disolvente mediante vacío.

Desplazamiento del disolvente^{21, 22, 37}

- Se disuelve el polímero, el fármaco, y en ocasiones, un estabilizador en un medio semipolar, miscible con el agua.
- Se adiciona la mezcla a una disolución acuosa con un estabilizante (alcohol polivinílico) manteniendo agitación.

Las nanopartículas se forman inmediatamente debido a una rápida difusión del disolvente no acuoso, el cual es eliminado mediante vacío.

Salting-out^{21, 22, 38-40}

Se basa en la separación de un disolvente miscible con agua de una disolución acuosa mediante efecto de salting-out.

- El polímero y el fármaco son disueltos en acetona (ya que se conoce muy bien su comportamiento).
- Mediante agitación es emulsificada en un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante coloidal.
- Se adiciona la suficiente cantidad de agua para que aumente la difusión de acetona a la fase acuosa y se formen las nanoesferas.
- Se elimina el disolvente.

A partir de monómeros:

Polimerización en emulsión²²

- Se disuelve el monómero en un no-disolvente con la ayuda de un tensoactivo.

-
-
- Se inicia la reacción de polimerización
 - Precipitación de las nanopartículas

Polimerización en fase acuosa continua²²

- Se disuelve el monómero en una disolución acuosa, con o sin estabilizantes, en la que también está disuelto el fármaco.
- Se inicia la polimerización mediante radiación o iniciación química.
- Debido a que el polímero es insoluble en el medio utilizado hay una precipitación y formación de las nanopartículas.

Polimerización interfacial²²

- Se disuelven fármaco y monómero en la fase en que son solubles.
- Se adicionan a la fase orgánica o acuosa, según sea el caso, con agitación. (En caso de ser necesario, la fase externa deberá tener un iniciador de la polimerización.
- Si el proceso de polimerización es muy rápido, se forma una capa impermeable del polímero, dando como resultado microcápsulas.

Si el proceso es lento, la polimerización se dará en el total de la masa y se formarán nanopartículas sólidas.

Observando lo anterior, se puede decir que la metodología en la cual se parte de polímeros preformados es más sencilla e involucra menos riesgos que aquella en la cual se parte de monómeros.

APLICACIONES

Al igual que las micropartículas han supuesto un gran auge como sistemas de liberación de fármacos, suponiendo una mejora a las anteriores, dado que al ser su tamaño más pequeño supone un menor problema inmunológico. Además de que su facilidad para alcanzar ciertos lugares se ve incrementada.

Se han utilizado con citostáticos, antiinfecciosos, péptidos, antiinflamatorios, etc.

Además de las nanopartículas formadas a partir de polímeros naturales o sintéticos, destacan actualmente las formadas a partir de lípidos sólidos, conocidas como SLN (nanopartículas sólidas lipídicas). Éstas surgieron en 1991 y reúnen las ventajas de los sistemas tradicionales, por una parte se pueden utilizar macromoléculas no tóxicas para el organismo, como en el caso de los liposomas pero con mayor estabilidad, y por otra parte se consiguen tamaños nanométricos.

Las técnicas usadas para preparar SLN han sido: homogeneización por alta presión, microemulsión o evaporación de disolvente y doble emulsión (w/o/w).

En el primer caso se disuelve el fármaco en el lípido de elección fundido entre 5 y 10 °C por arriba de su punto de fusión y se dispersa la mezcla con agitación en una disolución caliente (a igual temperatura que la fase lipídica) de tensoactivo. Esta preemulsión se homogeniza con alta presión. La emulsión se enfría y la recristalización del lípido lleva a la formación de las estructuras nanométricas. También es posible encapsular fármacos sensibles a la temperatura mediante mezclado en frío o moléculas hidrofílicas, de este modo se evita, en parte, la migración del fármaco a la fase acuosa durante el proceso inicial de formación de la preemulsión.^{7, 21-23, 25, 27}

En el segundo caso se forma una microemulsión, siendo la fase interna el lípido fundido con el fármaco incorporado, esto es adicionado con agitación a una fase acuosa con tensoactivos y cotensoactivos a la misma temperatura. La microemulsión formada se adiciona a una disolución acuosa fría y la precipitación de las SLN es instantánea. Este último método tiene la desventaja de que la cantidad de fase lipídica con respecto a la acuosa puede ser muy

pequeña y por lo tanto para obtener una cantidad significativa de SLN es necesario eliminar una cantidad excesiva de agua.

En el tercer caso, se disuelve el lípido en un medio orgánico y se dispersa en agua formando una emulsión o/w. Posteriormente se evapora el disolvente, dejando el lípido en contacto con el agua, al ser no soluble precipitará dando lugar a las SLN. Sin embargo este método tiene el problema, como en el caso de nanopartículas convencionales, de tener que hacer uso de disolventes orgánicos.

En el último caso, el fármaco se disuelve en una fase interna acuosa que es emulsificada a alta velocidad (Ej. Ultraturax) con un lípido previamente fundido o disuelto en un disolvente orgánico. Esta primera emulsión W/O es posteriormente dispersada en una fase acuosa que contiene estabilizantes, dando lugar a una doble emulsión W/O/W que se mantiene en agitación. Después las nanopartículas son aisladas por filtración. Esta técnica es útil para fármacos que presentan una alta solubilidad en agua.

Para que el sistema de liberación sea efectivo es necesario que sea capaz de encapsular el fármaco de manera eficiente. Esto dependerá de:

-Solubilidad del fármaco en el lípido: si es poco soluble migrará hacia la fase acuosa durante el proceso de preparación.^{21, 22, 24, 30}

-Naturaleza química y estructura cristalina: los lípidos pueden formar partículas muy cristalinas, lo cual hace que se forma una red perfecta y las moléculas extrañas, el fármaco, sea eliminado. Para evitar esto, se utilizan mezclas de lípidos.^{21, 22, 24, 30}

-Polimorfismo del lípido: si hay posibilidad de diferentes modos de cristalización, nos podemos encontrar con que el lípido cristaliza diferente en el

seno de la disolución que en el proceso de manufactura de nanopartículas y por ello, durante la producción de SLN el fármaco puede ser expulsado del seno lipídico para éste formar una red cristalina más perfecta.²⁴

Una vez formado el sistema de liberación, éste debe ser capaz de liberar el fármaco de manera controlada. La liberación va a depender del tamaño de partícula, la matriz lipídica, concentración de tensoactivo y los parámetros de proceso.

LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

Las nanopartículas presentan sus efectos de liberación del fármaco en la mayoría de los casos por la interacción que tienen directamente con su medio ambiente. La liberación del fármaco puede ocurrir por:

- ❖ Desorción de la superficie.
- ❖ Difusión a través de una matriz.
- ❖ Difusión a través de la pared del polímero o lípido.
- ❖ Erosión de la matriz.
- ❖ Combinación del proceso difusión-erosión.

En el mecanismo de liberación del fármaco, el coeficiente de difusión y su biodegradación son los principales factores a considerar dentro del mismo. La liberación del fármaco desde las nanopartículas esta fuertemente influenciada por el ambiente biológico en que se encuentran. El efecto del medio ambiente es mayor cuando se trata de dosificaciones muy largas, ya que puede haber un mayor grado de unión a proteínas plasmáticas y con ello el retraso en la liberación del activo.^{7, 23, 24, 30, 41}

- **Eliminación**

Los sistemas coloidales presentan problemas como rápido aclaramiento de las partículas coloidales por los macrófagos del sistema reticuloendotelial. Se conoce que éste puede ser evitado, o al menos, disminuido, de los siguientes modos: modificando el tamaño de partícula, modificando la carga de la superficie, modificando la hidrofobicidad de la superficie o modificando algunos grupos expuestos en la superficie. Se ha observado que a más lipofílica sea la superficie menor es la interacción con muchos de los componentes del organismo y por ello menor respuesta inmune. Para lograr esto se puede realizar una modificación química de la superficie mediante una reacción en la cual se introducen grupos hidrofílicos en la molécula del acarreador o por adsorción de polímeros con características estructurales y eléctricas adecuadas a nuestras necesidades (poloxámero, poloxamina, fosfolípidos, compuestos etoxilados, etc. Con respecto a los grupos de superficie se conoce que para evitar el rápido aclaramiento de las partículas es necesario: no tener expresión de antígenos en la superficie y así no habrá reconocimiento por anticuerpos, no poseer lugares de unión para el C3b (sistema del complemento) y poseer características de superficie adecuadas para la unión con el componente H (sistema del complemento que disminuye la actividad del mismo. Ejem: Alto contenido de grupos carboximetilo disminuye la activación del sistema del complemento ^{24, 38, 42, 43} .

CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Tamaño de partícula (ϕ)

Se realiza mediante PCS (Espectroscopia de correlación de fotones) y LD (Difracción láser). La primera técnica mide la fluctuación de la intensidad de la dispersión de la luz causada por el movimiento de las partículas. La segunda se basa en el ángulo de difracción de la luz producido por las partículas, a

menor tamaño se observan ángulos más grandes. Los equipos miden el tamaño de partícula de acuerdo a la intensidad, volumen y número. El estudio del tamaño de partícula es necesario porque de éste dependerá: su distribución en el organismo, su toxicidad (si es mayor a $6\mu\text{m}$ es mayor que el diámetro de los capilares, así (LD50 ratas=154000/g para $13.5\mu\text{m}$ y 705/G para $90.7\mu\text{m}$) y evidentemente el aclaramiento por el sistema reticuloendotelial (mayor tamaño mayor aclaración). También es necesario para ver el comportamiento de las nanopartículas durante la liberación del fármaco. ^{22, 24, 30, 35, 41, 42, 44, 45}

Potencial Z (ζ)

La medición de este parámetro ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales. La medición se basa en la movilidad electroforética de las partículas, para lo cual existen varios métodos para medir este parámetro. La agregación disminuye a valores altos de potencial Z (mayores de +30mV y menores de -30mV) debido a la repulsión de las partículas cargadas. El conocimiento del potencial zeta es determinante para estimar la unión a macrófagos y la agregación entre partículas. Prácticamente todos los coloides acuosos son negativos, -14mV a -30 mV. A más negativo la estabilidad aumenta, esto se consigue por la adición de electrolitos aniónicos. Si el potencial es -30 mV o menos, la repulsión es suficiente para conferir una gran estabilidad y entre -45 y -70, la estabilidad está asegurada.

Para conseguir aglomeración es necesario que el potencial zeta sea cercano a cero, lo cual se consigue adicionando electrolitos catiónicos. ^{7, 21, 22, 24, 30, 32, 35, 42, 46, 47}

Liberación *in vitro*

Los diferentes sistemas para determinar el paso de un fármaco a través de una membrana constan de dos compartimientos, un donador y un receptor

separados por una membrana (Figura.2.3). El perfil de liberación se obtiene mediante la cuantificación de fármaco en muestras obtenidas de la cámara receptora de donde se extrae un volumen conocido de medio y se renueva con medio nuevo con el fin de mantener el contacto entre la membrana y el medio receptor y condiciones sink. El análisis se realiza con HPLC o espectrofotometría. Uno de los sistemas más utilizados con esta finalidad son las celdas de difusión de Franz.^{21, 48-51}

$$\% \text{ Liberado} = (\text{masa acumulada en receptor} / \text{masa total}) (100)$$

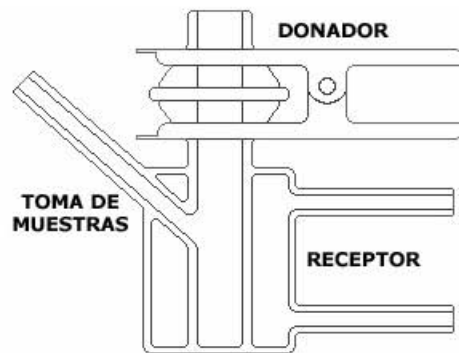


Figura 2.3 Celda de difusión de Franz

Microscopía Electrónica

La evaluación morfológica de las partículas se realiza mediante técnicas de microscopía electrónica como la de transmisión (TEM) y la de barrido (MEB), con ellas es posible contar con una evidencia del tamaño y aspecto de las nanopartículas obtenidas^{7, 21, 30, 41, 42, 51, 52}. La microscopía electrónica de barrido funciona a través de un baño de electrones que incide sobre la muestra, la energía producida por este choque, provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El análisis térmico diferencial es una técnica mediante la cual se puede conocer las propiedades de cristalinidad de las partículas obtenidas, así como la interacción fármaco-lípido y la modificación que se presenta con respecto al lípido y el fármaco después de someterse a una técnica para formación de nanopartículas. También puede ser un indicador de la estabilidad de las nanopartículas formadas a través del tiempo. Se pueden presentar la desaparición, disminución y corrimiento de picos de fusión. Este equipo mide la energía (mW) liberada o absorbida en función de la temperatura.^{21, 41, 45, 52, 53}

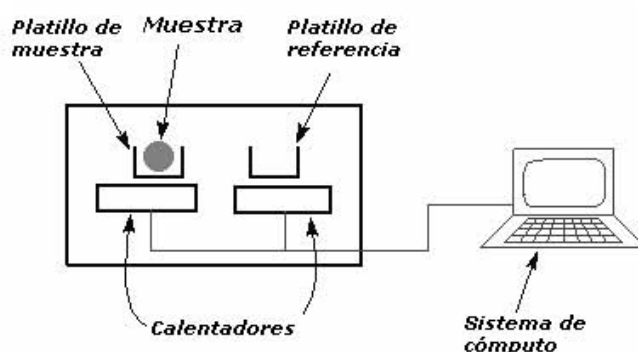


Figura 2.4 Calorímetro diferencial de barrido

2.2 Otros acarreadores:

1.- Ciclodextrinas

Son sistemas potenciales de liberación de fármacos, ya que tienen la capacidad de alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas de la molécula huésped por medio de la formación de complejos de inclusión. Se sabe que las ciclodextrinas están constituidas por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces α 1 \rightarrow 4 glucosídicos, las más comunes, α -, β - y γ -

ciclodextrinas, están constituidas por 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente y tienen una cavidad hidrofóbica con los bordes exteriores hidrofílicos, presentan forma de cono truncado y sus estructuras son las mostradas en la Figura 2.5.^{22, 54-58} Las ciclodextrinas se utilizan en la industria farmacéutica para aumentar la solubilidad de algunos fármacos en agua. Las moléculas del principio activo se incluyen en la cavidad y pueden ser transportadas por la ciclodextrina hasta el lugar de su actuación. Además las protegen del oxígeno y de la irradiación UV y las liberan uniformemente sobre un tiempo prolongado.

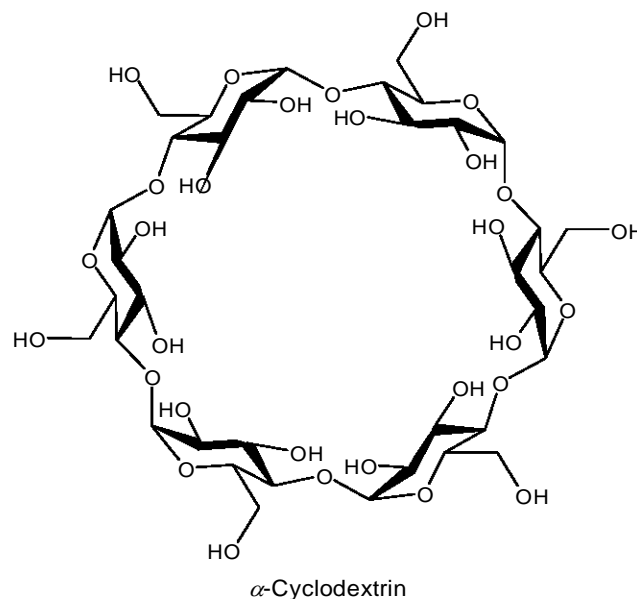


Figura 2.5 Ciclodextrinas

2.- Eritrocitos resellados

Se pueden utilizar como acarreadores debido a su capacidad para ser abiertos y resellados y poderse introducir moléculas en su interior sin sufrir variaciones en su estructura, presentando un comportamiento en circulación idéntico al del glóbulo rojo (GR) sin modificar.

Como cabe esperar son específicas para células eritrofagocitarias, como por ejemplo la enfermedad de Gaucher (glucocerebrósidos).^{22, 27}

3.- Dendrímeros

Son una clase relativamente nueva de macromoléculas. Son moléculas sintéticas tridimensionales ampliamente ramificadas, polímeros tipo árbol, que poseen un tamaño y forma precisos, así como grupos superficiales, que son sintetizadas mediante polimerización por pasos a partir de monómeros ramificados cuya naturaleza y funcionalidad puede ser fácilmente controlada y variada (Figura 2.6).^{22, 59, 60}

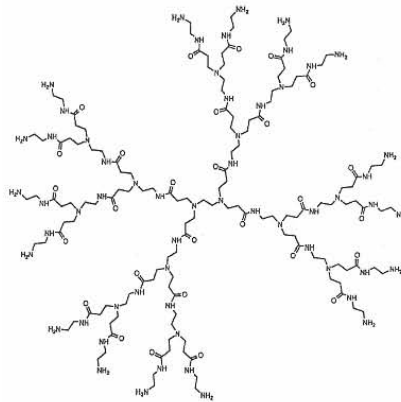


Figura 2.6. Dendrímero PAMAM (poliamidodiamido) de tercera generación

Ventajas de las formas farmacéuticas de liberación modificada

Existe una gran variedad de aplicación para los sistemas de liberación modificada de fármacos ya que pueden ser administrados en diferentes formas farmacéuticas y vías de administración como son:

Oral: tabletas y cápsulas con recubrimiento entérico.

Parenterales: Inyectables.

Implantes subcutáneos.

Dispositivos transdérmicos.

Dispositivos intrauterinos.

Todas estas formas de dosificación presentan ventajas sobre las formas farmacéuticas convencionales. Los medicamentos formulados a través de la liberación modificada tienen como objetivo principal mejorar el tratamiento farmacológico a través de ventajas tales como:

- ❖ Reducción del número de administraciones.
- ❖ Reducción de la dosis, y por lo tanto la reducción de los efectos colaterales, así como evitar la acumulación del fármaco.
- ❖ Incrementar la biodisponibilidad de algunos fármacos que son susceptibles a la inactivación enzimática o bacteriana, así como protegerlos de su metabolismo.
- ❖ Mejorar la eficiencia del tratamiento.



IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Elaborar nanopartículas de Casiopeína III I a[®] que liberen el fármaco de manera prolongada.

Objetivos particulares:

- a. Conseguir una emulsión del tipo w/o/w estable.
- b. Caracterizar las nanopartículas obtenidas mediante estudios de tamaño de partícula (ϕ), potencial Z (ζ), microscopía electrónica de barrido (MEB) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- c. Conocer el comportamiento de liberación *in vitro* de las nanopartículas.

V. MATERIALES Y EQUIPO

Equipo utilizado:

- Autoclave, sin marca, fabricación nacional.
- Espectrofotómetro UV-Visible, Ocean optics S-2000.
- Celdas horizontales de difusión de Franz con membrana de celofán (12000-14000 D).
- Parrilla de agitación magnética, Fisher Scientific.
- Campana de flujo laminar, Esco.
- Rotaevaporador Heindolph.
- Equipo Ultraturrax, Poliscience.
- Zetasizer Malvern Instrument Modelo ZS3600.
- Microscopio óptico, Lider.
- Baño ultrasónico, Cole Parmer.
- Videocámara, Cole Parmer.
- Balanza analítica, Explorer Ohaus.
- Refractómetro, Bausch & Lomb.
- Calorímetro Diferencial de Barrido, Shimadzu.
- Microscopio Electrónico, GEOS.

Materiales utilizados:

Fosfato de sodio monobásico, monohidratado, Reactivo Analítico Baker®.

Cloruro de metileno (CH_2Cl_2), Reactivo Analítico Baker®.

Poloxámero, Pluronic F-127, donado amablemente por Polioles.

Lecitina 60% TLC, Sigma.

Ácido Esteárico, Sigma.

Casiopéina III I a[®] sintetizada en el laboratorio 210 de la Facultad de Química de la UNAM.

VI. METODOLOGÍA

- Preformulación de emulsiones

En este primer paso lo que se pretende lograr es elaborar una emulsión doble estable para a partir de ésta obtener un sistema nanoparticulado.

Para lo anterior se probaron diferentes proporciones de lecitina y poloxámero como agentes tensoactivos disueltos en diclorometano y agua respectivamente ³⁵.

Para definir las proporciones de los tensoactivos de la doble emulsión, se realizaron varios ensayos. El primero consistió en probar diferentes porcentajes de lecitina para estabilizar la primera emulsión. Los porcentajes de lecitina fueron 0.25%, 0.5% y 1%, los cuales a su vez se disolvieron en 20 mL de diclorometano y se mezclaron con 2 mL de agua para tener dos fases inmiscibles. Esta mezcla se homogeneizó con el ultraturrax y se forma una emulsión del tipo w/o. Las emulsiones formadas se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min para probar su estabilidad.

Posteriormente se probaron diferentes porcentajes de poloxámero 188 para formar la doble emulsión. Para ello se combinaron los porcentajes de lecitina con los porcentajes de poloxámero 188 siguientes: 2%, 3% y 4%. Este tensoactivo se disolvió previamente en 55 mL de agua y esta disolución se agregó a la emulsión w/o y se agitó con ultraturrax durante 15 min. Las emulsiones se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min y se tomaron imágenes de las emulsiones con microscopio óptico para asegurar que se obtiene lo deseado.

-Elaboración de emulsión múltiple (w/o/w)

Considerando los estudios de estabilidad de cada ensayo, la proporción elegida para elaborar la doble emulsión fue 0.5% de lecitina en 20 mL de diclorometano y

3% de poloxámero en 55 mL de agua. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

La lecitina previamente pesada se disuelve en 20 mL de diclorometano hasta formar una disolución. La solución anterior se mezcla con 2 mL de agua y se agita con el Ultraturax durante 5 min. Con lo anterior se forma una emulsión w/o. Por otro lado se disuelve el poloxamero en 55 mL de agua lo cual consiste la fase externa de la emulsión una vez disuelto se mezcla con la emulsión w/o obtenida en el punto anterior y se agita el conjunto con el Ultraturax durante 20 min.

Es importante señalar que durante todo el procedimiento se trabajó en condiciones estériles, ya que previamente se esterilizó el material en la autoclave a 120° C, 14 psi durante 15 minutos y toda la metodología se llevó a cabo en la campana de flujo laminar con filtro HEPA y lámpara UV, previamente desinfectada con etanol al 70%.

-Elaboración de SLN de ácido esteárico.

Método emulsificación evaporación

En este punto se siguió el mismo procedimiento para la emulsión triple con la variante de que en este punto se agregó ácido esteárico para formar las nanopartículas. En este caso el ácido esteárico se disolvió en el diclorometano junto con la lecitina y posteriormente se realizó el resto del proceso para obtener una emulsión triple. Una vez formada la emulsión múltiple, esta se somete a rotaevaporación a una temperatura de 30°C y 120 rpm hasta que el diclorometano se haya evaporado completamente. Posteriormente el concentrado resultante se sonica durante 30 min. Esta preparación constituye la formulación blanco y se trabajó en condiciones estériles al igual que en la preparación de la doble emulsión.

-Preparación de nanopartículas con Casiopeína® III I a.

Se sigue el método antes mencionado solo que en este caso se disuelve el fármaco (25 mg) en 3 mL de agua (1.87×10^{-2} M). Lo anterior se mezcla con la solución de lecitina, ácido esteárico y diclorometano y se agita con el ultraturrax. Una vez obtenida la primera emulsión se agrega la solución de poloxámero y se agita nuevamente con el ultraturrax. Nuevamente se trabajó en condiciones estériles.

Para lo anterior se manejaron diferentes cantidades de ácido esteárico con respecto a la concentración de fármaco la cual permaneció en todos los casos constante. Así se obtuvieron cuatro formulaciones diferentes con el fin de elegir la más adecuada de acuerdo a su comportamiento en cuanto tamaño de partícula (ϕ), potencial Z (ζ) y velocidad de liberación *in vitro*. Por lo tanto las formulaciones realizadas fueron las siguientes:

1. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 0.01)
2. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 0.1)
3. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 1)
4. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 10)

- Caracterización de nanopartículas.

Tamaño de partícula (ϕ) y potencial Z (ζ)

Para medir el tamaño de partícula y el potencial Z, es necesario conocer el índice de refracción de las materias primas que se están utilizando, con el fin de disminuir el error en la medición, debido a las propiedades de cada material. Para ello se mide con un refractómetro el índice de refracción del agua, el cual es conocido y sirve como medio de calibración y posteriormente se mide el índice de refracción de las materias primas.

Para medir el tamaño de partícula se toman 2 mL de la muestra obtenida en una celda de vidrio y se mide el tamaño de partícula y con una celda de plástico con electrodos se mide el potencial Z (ζ). En ambos casos se calcula el promedio de las mediciones realizadas (20 mediciones por muestra). Las mediciones tanto de tamaño de partícula como potencial Z (ζ) se llevan a cabo en el equipo Zetasizer Malvern Instrument.

-Liberación *in vitro*

El estudio de liberación del fármaco a partir de las muestras obtenidas se realiza mediante celdas horizontales de difusión de Franz utilizando como medio en el donador y receptor disolución reguladora pH 7.5 (para tener condiciones parecidas a las fisiológicas) separados por una membrana de celofán, la cual es inerte a los componentes de la fórmula, es semipermeable a aniones y cationes y tiene un tamaño de poro de aproximadamente. Se coloca una cantidad de la muestra de acuerdo a la capacidad de la celda que funciona como donador manteniendo el sistema en un baño de 37°C y en agitación constante. Se toman muestras a diferentes tiempos durante 8 horas, recuperando el volumen de la alícuota analizada. Se cuantifica la cantidad de casiopeína[®] liberada a cada tiempo utilizando espectrofotometría UV-Visible, considerando la longitud de onda a la cual absorbe el fármaco (244.86nm) y comparando cada absorbancia contra una curva patrón previamente realizada. La curva patrón se realizó a partir de una solución madre de concentración 1.8629⁻² M y a partir de ella se hicieron las diluciones pertinentes para tener suficientes puntos y un coeficiente de correlación aceptable.

-Microscopía Electrónica

Por medio de esta técnica es posible evaluar la morfología y el tamaño de las partículas para así obtener evidencia de tanto la presencia de las mismas como

de su forma y tamaño. Para ello se coloca la muestra en un metalizador de carbono el cual consiste en dos electrodos conectados a una fuente de corriente alterna de bajo voltaje y alta intensidad entre los que se intercala una barra de carbono terminada en una punta afilada. Al pasar la corriente, la punta de la barra se va evaporando, de forma que rocía la muestra con una fina capa de carbono. La punta va acoplada a un muelle que la mantiene en todo momento en contacto con el otro electrodo. Todo el conjunto está encerrado en vacío con el fin de facilitar la deposición de la película de carbono sobre la muestra.

-Calorimetría diferencial de barrido.

El análisis térmico diferencial es una técnica que permite conocer las propiedades de cristalinidad de las partículas obtenidas que muestran la interacción del fármaco con los excipientes después de la formación de las nanopartículas. Para ello se pesa una pequeña cantidad de la muestra que se desea estudiar (aprox. de 2 a 6 mg) y se coloca en una cápsula de aluminio y se sella herméticamente. Posteriormente, se coloca la cápsula dentro del equipo y se procede al análisis ajustando las condiciones del estudio (10° C por minuto hasta 350° con atmósfera de N₂). Es importante señalar que la muestra es comparada contra un blanco, el cual consiste en aire.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Preformulación de emulsiones

La emulsión formada con cada porcentaje de lecitina presenta una consistencia cremosa en los tres casos. Esto se debe a Las emulsiones anteriores se dejaron reposar y posteriormente se centrifugaron para ver su estabilidad. Para ello se tomaron 5 mL de cada emulsión y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min. El resultado de lo anterior fue la separación de fases en los tres casos. Las emulsiones w/o se volvieron a agitar con el ultraturrax y recuperaron su apariencia original a pesar de que se centrifugaron. Esto indica que hubo un proceso de agregación, más no de coalescencia y que aunque el sistema no es estable durante mucho tiempo, el periodo durante el cual es estable permite llegar a la elaboración de las nanopartículas.

La adición del poloxámero 188 permite estabilizar la segunda emulsión w/o/w ya que posee una cadena de polioxietileno la cual es hidrofílica mientras que su parte polioxipropileno es hidrofóbica y por lo tanto ésta parte estará unida a la lecitina, formando una emulsión estable. Para comprobar su estabilidad, se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones (4500 rpm, 10 min), lo que derivó en la separación de fases de todas las combinaciones de porcentajes de poloxámero-lecitina probadas. Las emulsiones se volvieron a agitar con ultraturrax siendo éstas reemulsionables. Al igual que en la emulsión w/o, hubo un fenómeno de agregación y no de coalescencia. Para elegir la proporción que se iba a utilizar se tomaron imágenes de las preparaciones con el microscopio óptico, lo cual derivó en que la proporción elegida fuera 0.5% de lecitina, 3% de poloxámero ya que en esta combinación se encontró la doble emulsión.

6.2 Doble emulsión (w/o/w)

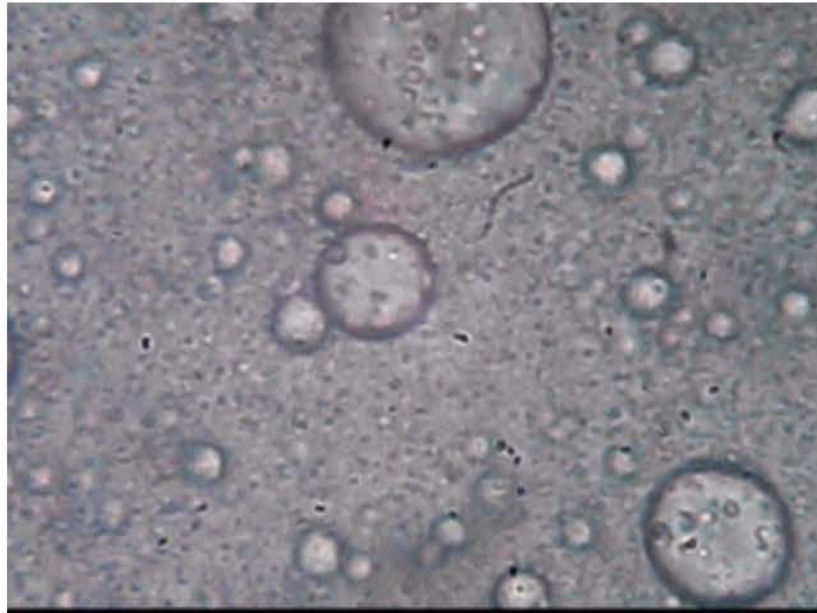
Para conocer cual es la emulsión múltiple más estable, se realizaron diferentes ensayos, variando las proporciones de los tensoactivos, y se tomaron imágenes de las mismas, las cuales se presentan a continuación:



**Figura 6.1. Microscopía óptica de la emulsión w/o/w
0.25% lecitina, 3% poloxamero**

La emulsión múltiple con las proporciones de 0.25% lecitina y 3% poloxamero muestra que efectivamente hay formación de la emulsión múltiple ya que hay tres fases, lo cual se muestra en la figura anterior. Sin embargo, esta emulsión no es estable ya que el tamaño de gota es muy variado y hay fusión de gotas debido a que probablemente la cantidad de tensoactivo no es suficiente para estabilizar las fases, por lo que esta emulsión quedó descartada para ser utilizada en la formación de nanopartículas debido a que no es estable el tiempo suficiente para realizar el procedimiento completo de formación de SLN.

La figura siguiente muestra el resultado de la combinación de lecitina al 1% y poloxamero al 3%.



**Figura 6.2. Microscopía óptica de la emulsión w/o/w
1.0% lecitina, 3% poloxamero**

Esta emulsión presenta las tres fases pero en poca proporción, además de que se presentan varios tamaños de gota y en la figura se muestra la fusión de gotas. Lo anterior indica inestabilidad de la formulación, por lo que por las razones anteriormente mencionadas, no se puede considerar una formulación ideal para el proceso de formación de nanopartículas.

Finalmente la emulsión seleccionada fue 0.5% de lecitina y 3% de poloxamero. La emulsión obtenida tiene un aspecto blanco lechoso uniforme, lo cual nos indica que en principio la emulsión es estable y presenta una consistencia cremosa. Se hicieron observaciones con el microscopio óptico y se tomaron imágenes de la emulsión obtenida que se presentan a continuación.



**Figura 6.3. Microscopía óptica de la emulsión w/o/w,
0.5% lecitina y 3% poloxámero**



**Figura 6.4. Microscopía óptica de la emulsión w/o/w,
0.5% lecitina y 3% poloxámero**

Con la imagen anterior se puede comprobar que efectivamente se tiene una emulsión múltiple en que tanto la fase interna como externa consiste en agua. El propósito de obtener una emulsión del tipo w/o/w, fue tener disuelta la caseína[®] III I a en el agua, ya que es totalmente soluble en ésta. Lo anterior implica se formen pequeñas gotas de agua con el principio activo al entrar en

contacto con la fase orgánica, la cual contiene el ácido esteárico (necesario para formar las SLN) estabilizadas por medio de un tensoactivo, que en este caso se trata de la lecitina, formando en primer lugar una emulsión w/o. Sin embargo, en este primer paso, el ácido esteárico se encuentra soluble dentro de la fase orgánica y no está formando las SLN por lo que es necesario agregar otra fase en la cual la fase orgánica sea insoluble con el fin de formar las SLN y una vez terminado el proceso de formación, tener un medio de suspensión de las mismas. Dicho lo anterior se tiene una tercera fase para finalmente formar la emulsión múltiple del tipo w/o/w. La tercera fase, como bien nos indica el tipo de emulsión antes mencionado, se trata de una fase acuosa en la que únicamente se estabilizó con otro tensoactivo (poloxámero 188), permitiendo tener una emulsión múltiple estable el suficiente tiempo para llevar a cabo el proceso de formación de SLN evaporando la fase orgánica.

Como se puede observar en las fotografías anteriores, la emulsión, después de un tiempo no es del todo estable, esto se puede comprobar por la diversidad de tamaño en las gotas de la emulsión y conforme pasa el tiempo hay fusión de gotas lo que finalmente conlleva a una separación de fases. La inestabilidad de la emulsión puede deberse a la naturaleza de las fases, ya que el proceso de formación de la emulsión no es espontáneo y por lo tanto el sistema requiere de mucha energía para que sea estable. Esto se puede solucionar cambiando las proporciones de los tensoactivos o combinando varios tensoactivos para conferirle mayor estabilidad a la emulsión.

Formación de nanopartículas

Después de la formación de la doble emulsión, ésta se rotaevapora para eliminar el disolvente orgánico. Una vez eliminado el disolvente, el ácido esteárico entra en contacto con el agua, lo que provoca que el polímero forme una esfera llevando dentro de sí el principio activo en disolución estabilizado por la lecitina. De esta manera se forman las nanopartículas^{22, 27, 35}. El resultado de lo anterior es que las nanopartículas están suspendidas en el medio de dispersión (agua y poloxámero 188). La suspensión presenta un

aspecto amarillento lechoso y translúcido. Esta suspensión se sonica para reducir el tamaño de partícula.

6.3 Índice de refracción

Antes de medir el tamaño de partícula, es necesario introducir en el equipo a utilizar el índice de refracción de lo que se desea medir. Para ello se midió el índice de refracción del agua, que sirve como blanco, el del principio activo en disolución y el del ácido esteárico. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.1. Resultados de índice de refracción

Compuesto	Índice de refracción
Agua	1.3335
Casiopeína III I a [®]	1.3335
Ácido esteárico	1.4235

El índice de refracción es la razón de la velocidad de la luz en el vacío a la velocidad de la luz de una longitud de onda determinada en una cierta sustancia ⁶¹. El índice de refracción se midió bajo una luz amarilla de longitud de onda de 589 nm. Los resultados mostrados en la tabla 6.1 indican que entre el índice de refracción del agua y el principio activo no hay diferencia y por lo tanto, en el momento de hacer una medición en el equipo Zetasizer, el índice de refracción no será un factor que afecte los resultados del tamaño de partícula y potencial Z. Sin embargo, en el caso del ácido esteárico, hay una diferencia importante con respecto al agua, ya que el índice de refracción del ácido esteárico es mayor, por lo que este dato se introdujo dentro del equipo, con el fin de que las lecturas de tamaño de partícula y potencial Z no tuvieran errores, debido a que el equipo funciona con un rayo láser el cual choca con las partículas que se encuentran en la muestra, dando una señal al equipo la cual nos da una lectura. Así, cada material dispersa la luz de manera distinta y esto da como resultado un algoritmo diferente para cada sustancia. Este algoritmo es utilizado por el equipo para hacer el cálculo de tamaño de partícula y potencial Z, por lo que si no se introduce índice de refracción de la sustancia

con la cual se está trabajando, puede llevar a errores de medición y por lo tanto los resultados no serían confiables. Por ello es de suma importancia medir el índice de refracción para que este factor no influya en los resultados y no de lecturas falsas o erróneas.

6.4 Tamaño de partícula.

El tamaño de partícula es un parámetro que depende de las variables del proceso de formación de nanopartículas. Numerosos factores intervienen en el promedio final de tamaño de partícula tales como la composición de los excipientes, la composición del principio activo, el proceso de formación, los factores que intervienen en el proceso como temperatura, presión, y el equipo de homogeneización, el medio de dispersión, entre otros. Para este caso el factor a considerar principalmente es la cantidad de ácido esteárico utilizada frente a la cantidad de principio activo constante. Las formulaciones que se trabajaron fueron las siguientes:

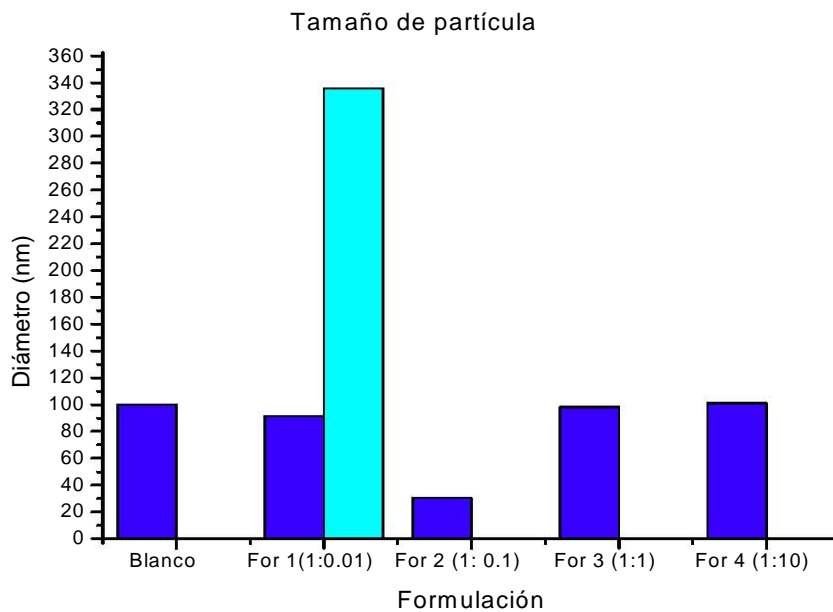
1. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 0.01)
2. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 0.1)
3. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 1)
4. Relación M casiopeína III I a –ácido esteárico (1: 10)

Es importante recordar que se trabajó con una formulación blanco la cual consiste en la misma relación molar de la formulación tres, con la única excepción que no contiene principio activo (nanopartículas vacías).

El equipo Zetasizer que se utilizó para medir el tamaño de partícula, reporta resultados en % de intensidad, % en volumen y % en número. En este caso se trabajaron los datos de % en número porque son los más representativos con respecto a la cantidad de nanopartículas presentes en las muestras y su tamaño correspondiente. En la tabla siguiente se muestran los resultados para cada una de las formulaciones realizadas:

Tabla 6.2 Resultados de tamaño de partícula

Formulación	Relación Molar (Casiopéina: Ac. Esteárico)	ϕ (nm)	% número
Blanco	0:1	100	100
1	1: 0.01	91.6	91
		336	8
2	1: 0.1	30.3	99
3	1: 1	98	100
4	1:10	101	100



Grafica 6.1 Tamaño de partícula

Como se puede observar, todas las formulaciones tienen un tamaño de partícula aceptable ya que está por debajo de los 500 nm, además de que presentan uniformidad de tamaño porque se tiene un porcentaje del 100% en número. En cambio la formulación 1 presenta dos poblaciones diferentes de tamaños de partícula, que a pesar de que entran dentro del límite requerido para considerarse como nanopartículas, el hecho de que presente más de una población, nos habla de una inestabilidad física de la formulación, y siendo así, entonces se descartaría esta formulación para una posible aplicación, ya que no es el porcentaje de principio activo encapsulado en cada partícula

posiblemente no sea el mismo debido a las diferencias de tamaño y por lo tanto la liberación y distribución del fármaco no sería la adecuada para alcanzar el efecto terapéutico deseado. En cuanto a la formulación 2, se presenta un tamaño de partícula muy pequeño en comparación con las demás formulaciones, y a pesar de que entra dentro de los límites establecidos para considerarse como un sistema coloidal, su tamaño indica que la cantidad de ácido esteárico utilizada influye notablemente en el tamaño de partícula. Esto puede traer como consecuencia, que la encapsulación y la liberación sea diferente de las otras formulaciones, lo cual se comprobaría en los estudios de liberación *in vitro*. Así el tamaño influye invariablemente en el sistema inmune, ya que por ser un tamaño de partícula tan pequeño, sea posible que el sistema inmune no lo detecte, aunque también se ve afectado por la carga de la partícula.

Cabe mencionar que tanto en la formulación 1 y 2 se utilizaron cantidades muy pequeñas de ácido esteárico frente al principio activo, y se obtuvieron resultados muy variables en cuanto a tamaño se refiere, lo cual es indicativo de que la concentración es un factor determinante para la formación de nanopartículas.

En cuanto a las formulaciones 3 y 4 los tamaños de partícula obtenidos son de 100 nm en promedio, además de que ambas formulaciones son uniformes en cuanto a % en número, lo cual nos habla de una estabilidad del sistema y por lo tanto estas formulaciones son candidatas para aplicarse por vía intravenosa.

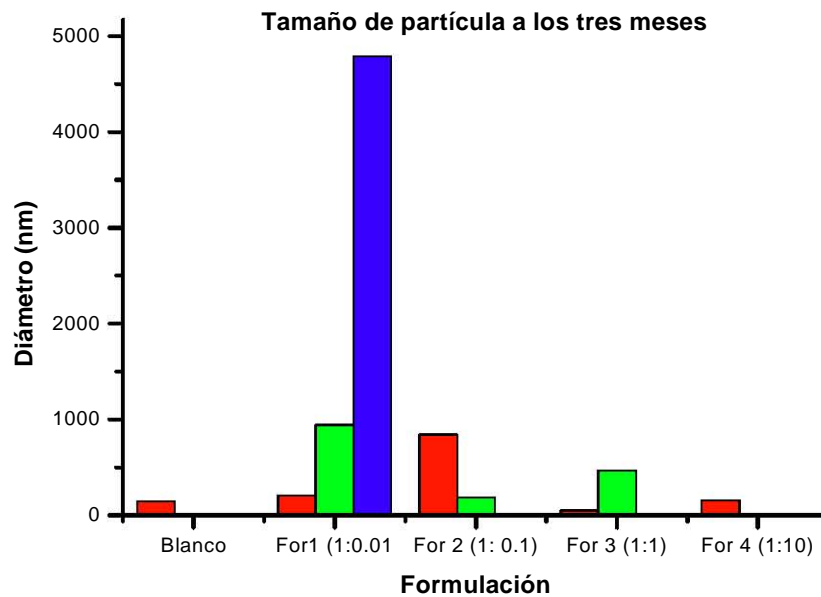
Para el objetivo de este trabajo, es importante tener tamaños de partícula menores a 500 nm porque se trata de una formulación con aplicación intravenosa. De acuerdo con diversos estudios, inyecciones intravenosas con tamaños de partícula por encima de los 500 nm pueden derivar en la muerte por una embolia^{7, 24, 30, 53}. Por otro lado el tamaño de partícula puede modular el mecanismo de captura por macrófagos y tener influencia sobre su estabilidad biológica. Se ha observado que los mecanismos de pinocitosis declinan y los de fagocitosis aumentan en función del incremento del tamaño de partícula.

Estos resultados pueden tener repercusiones en la biodistribución de las partículas.²²

Después de un cierto tiempo (aprox. 3 meses) se volvió a medir el tamaño de partícula de cada una de las formulaciones y se encontraron cambios significativos para este parámetro. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.2 Resultados de tamaño de partícula después de 3 meses

Formulación	Relación Molar (Casiopéina: Ac. Esteárico)	ϕ (nm)	% número
Blanco	0:1	147	100
1	1:0.01	204	77.6
		939	22.2
		4790	0.2
		840	11
2	1:0.1	187	89
		461	0.4
3	1:1	48.9	99.6
4	1:10	155	100



Grafica 6.2 Tamaño de partícula después de tres meses

Los resultados anteriores indican una cierta inestabilidad de las formulaciones ya que hubo cambios de tamaño de partícula con respecto a los primero resultados presentados. En la formulación blanco se muestra un aumento de tamaño de partícula de 47 nm con una población del 100%, esto quiere decir que aunque hubo un aumento en el tamaño éste no sale de los límites establecidos para considerarse como nanopartícula. En el caso de la formulación 1, anteriormente se presentaron dos poblaciones lo que ya hablaba de inestabilidad de la formulación, en estos resultados se presentan tres poblaciones diferentes y con tamaños de partícula muy variables lo cual nos habla de un sistema totalmente inestable, además de que se presenta una población con tamaño de partícula muy superior a los 1000nm, y aunque ésta tiene un porcentaje muy pequeño, esta formulación no podría ser candidata para una aplicación intravenosa y no se podría considerar como un sistema coloidal.

Para la formulación 2 se tienen dos poblaciones diferentes y una de ellas presenta un tamaño de partícula mayor a los 500 nm, lo cual descarta su posible aplicación intravenosa. En la formulación 3 se presentan dos poblaciones diferentes y con resultados muy variables entre sí respecto al

tamaño, lo cual indica inestabilidad en el sistema, es importante señalar que en este caso hubo una disminución importante en el tamaño de partícula, lo cual podría afectar la liberación del fármaco. En la formulación 4 el tamaño de partícula aumentó de manera uniforme y además está dentro de los límites requeridos, por lo que aunque no es ideal que estos cambios sucedan, podría utilizarse esta formulación para los fines establecidos en este trabajo. Los cambios en el tamaño de partícula y el hecho de que se presenten poblaciones distintas en una misma formulación puede deberse a que el sistema no es estable, ya que posiblemente las partículas no tengan la carga adecuada para repelerse y por lo tanto haya un proceso de fusión entre sí alterando los resultados. Es importante que este tipo de sistemas presente estabilidad ya que los cambios en el tamaño afectan directamente el comportamiento de liberación del fármaco de manera que no se libere adecuadamente para alcanzar el efecto terapéutico o incluso, como se trata de una aplicación intravenosa, pudiera ser que se alcanzaran tamaños de partícula mayores a los 500 nm provocando una embolia en el paciente. Para evitar este tipo de problemas, es recomendable tener un mayor control en las variables del proceso ya que éstas están directamente relacionadas con el tamaño de partícula.

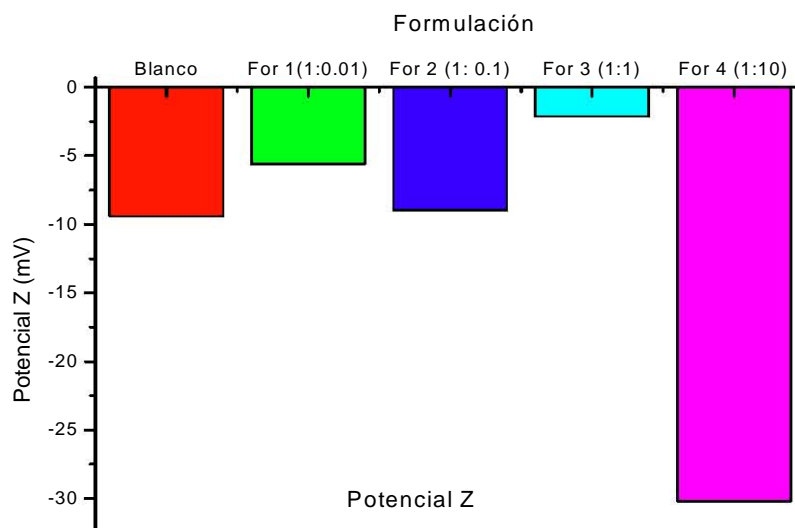
6.5 Potencial Z (ζ)

Casi todas las partículas en contacto con un líquido presentan una carga eléctrica en su superficie. El potencial eléctrico entre la carga de partícula y el líquido en el cual están suspendidas es llamado potencial Z. Dicho de otra manera, el potencial Z es un parámetro indicativo de la estabilidad de los sistemas coloidales farmacéuticos como una suspensión de las nanopartículas obtenidas, es decir, cuánto pueden atraerse las partículas para formar agregados. Es recomendable que el potencial Z tenga valores por arriba de +30 mV o por debajo de -30 mV.

En la tabla siguiente se muestran los valores de potencial Z promedio de las muestras realizadas.

Tabla 6.3 Resultados de Potencial Z

Formulación	Relación Molar (Casiopéina: Ac. Esteárico)	ζ (mV)
Blanco	0 : 1	- 9.40
1	1: 0.01	-5.59
2	1: 0.1	-8.96
3	1: 1	-2.14
4	1:10	-30.2



Gráfica 6.3. Potencial Z

Tanto en la tabla como en la grafica 6.3, se muestran los valores de potencial Z obtenidos para cada formulación. De acuerdo con los resultados obtenidos, las formulaciones no son estables ya que están dentro del intervalo de +30 mV y – 30 mV, lo que nos habla de que pueden formar agregados de partículas confiriéndole inestabilidad al sistema, lo cual se confirma con los resultados de tamaño de partícula. La formulación 4 está dentro por debajo de los –30 mV lo que indica que tendría una mayor estabilidad en comparación con las demás formulaciones, lo que en un principio podría indicar alguna relación directa entre la cantidad de ácido esteárico utilizado y el potencial Z. Sin embargo, por los resultados

obtenidos es posible que el ácido esteárico y el poloxámero que se encuentra en el medio dispersante tengan una especie de arreglo estérico que compensa en parte la repulsión electrostática obteniendo así ese valor de potencial Z. En el caso de las otras formulaciones, puede ser que la cantidad de ácido esteárico no sea suficiente o el número de partículas no sea suficiente para que el poloxámero interactúe con el ácido esteárico para evitar la agregación de partículas.

Muchas formulaciones por sí solas no son capaces de conferirle cargas adecuadas a las partículas para que sean estables, por lo que en farmacia se utiliza mucho la adición de electrolitos con el fin de modificar el potencial Z y darle estabilidad al sistema. En este caso se podría adicionar alguna sal para modificar este parámetro y obtener sistemas estables en cuanto a cargas electrostáticas se refiere.

6.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se tomaron micrografías de cada una de las formulaciones realizadas con el fin de observar la morfología de las nanopartículas. Además de esto también se tomaron micrografías de la Casiopeína III I a[®] y del ácido esteárico para observar la morfología que presentan antes y después del proceso de preparación de las nanopartículas, ya que la estructura de estas sustancias puede presentar cambios que serán evidentes al observar la morfología que exhiben las muestras obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido.

El ácido esteárico es un sólido duro, blanco, y amorfo con una morfología característica mostrada en la siguiente micrografía:

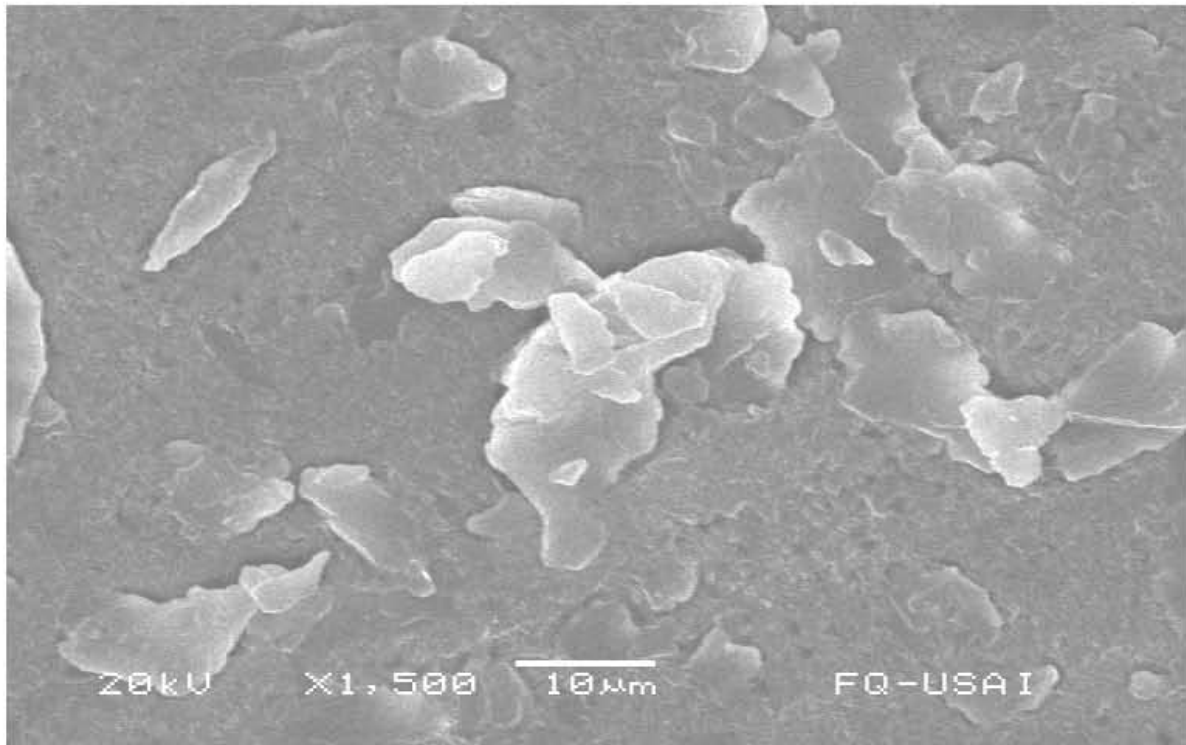


Figura 6.5. Micrografía Ácido Esteárico

En la micrografía anterior se muestra al ácido esteárico como un sólido formando pequeñas láminas de superficie lisa y de diversos tamaños y formas.

La casiopéina III I a[®] es un polvo fino de color azulado con apariencia cristalina. La morfología que presenta el principio activo se muestra a continuación:

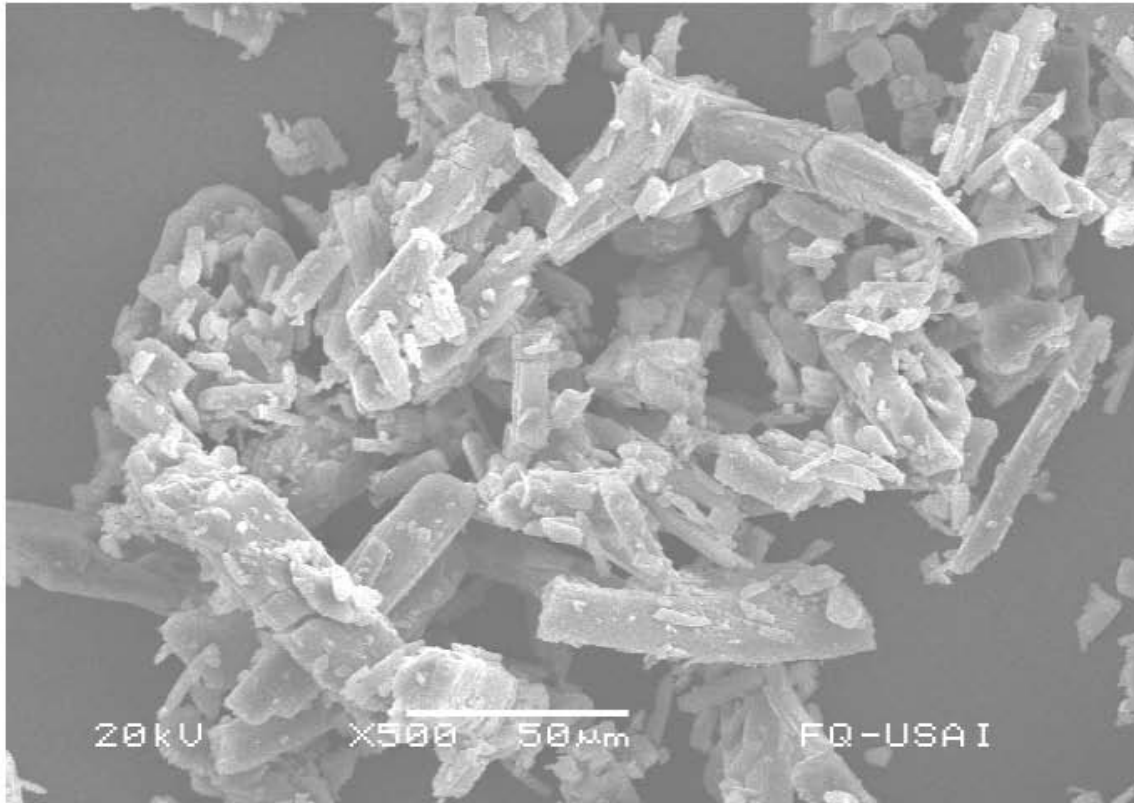


Figura 6.6. Micrografía Casiopeína III Ia[®]

Como se puede observar, la casiopeína III Ia[®] se presenta como cristales en forma de agujas de diversos tamaños, lo cual no se alcanza a distinguir a simple vista.

Con lo anterior se puede comparar tanto el principio activo como el ácido esteárico contra las nanopartículas para cada formulación con el fin de comprobar si en primer lugar la casiopeína se encapsula dentro de la nanopartícula y en segundo lugar observar los cambios en morfología del ácido esteárico al formar las nanopartículas.

Para cada formulación se tomaron varias micrografías en donde se muestra la morfología de las nanopartículas.

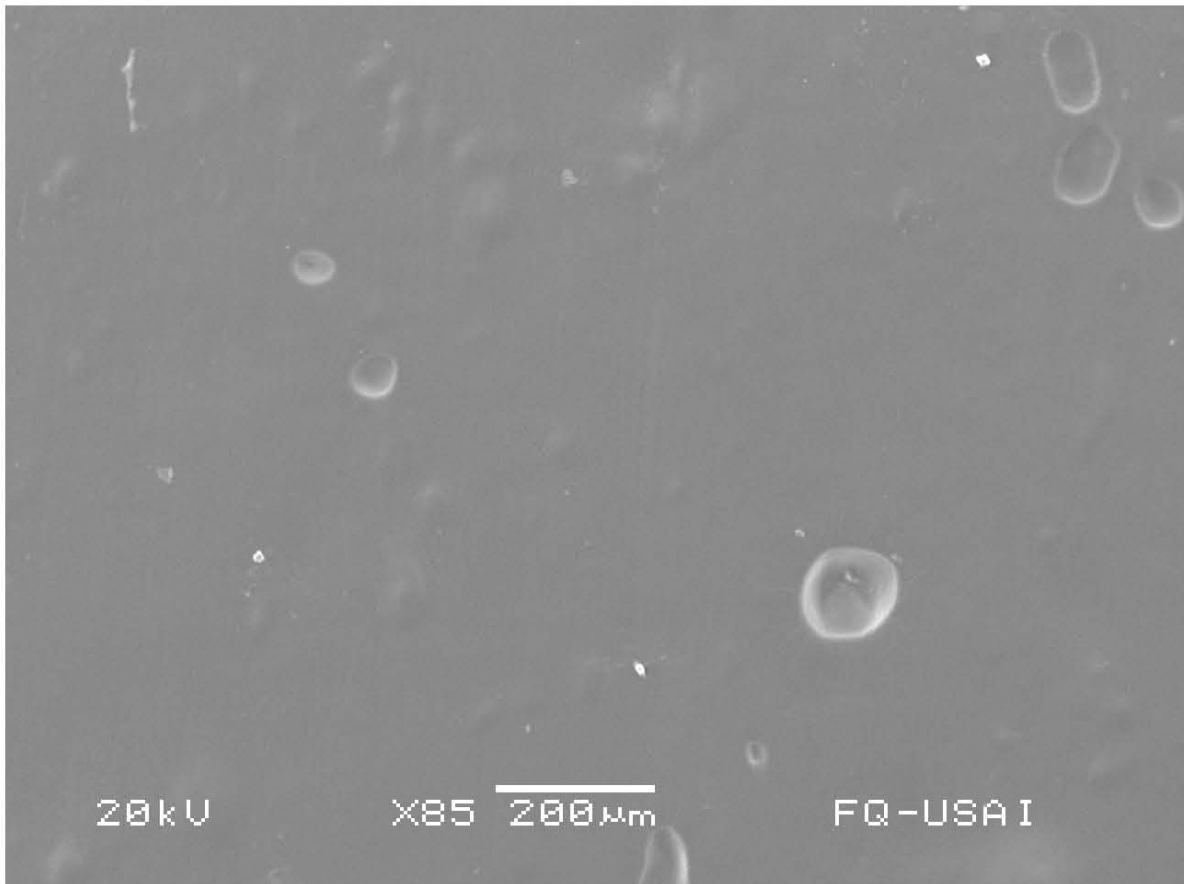


Figura 6.7. Micrografía Formulación 1

La formulación 1 presenta nanopartículas de diversos tamaños que van desde muy pequeños hasta de un tamaño importante y de formas tanto esféricas como ovoides y en cantidad escasa. Esto va acuerdo con los resultados de tamaño de partícula anteriores, ya que se presentan diferentes poblaciones de tamaño de partícula. En principio el ácido esteárico sufrió cambios en su morfología de materia prima para formar la nanopartícula, sin embargo esto no quiere decir que haya presentado cambios en su estructura, para lo cual se requieren otro tipo de estudios. En cuanto a la casiopeína III I a[®], no se encuentran los cristales característicos de la misma, debido a que la cantidad de fármaco se encuentra en disolución y además se puede inferir que se encuentra dentro de las nanopartículas.

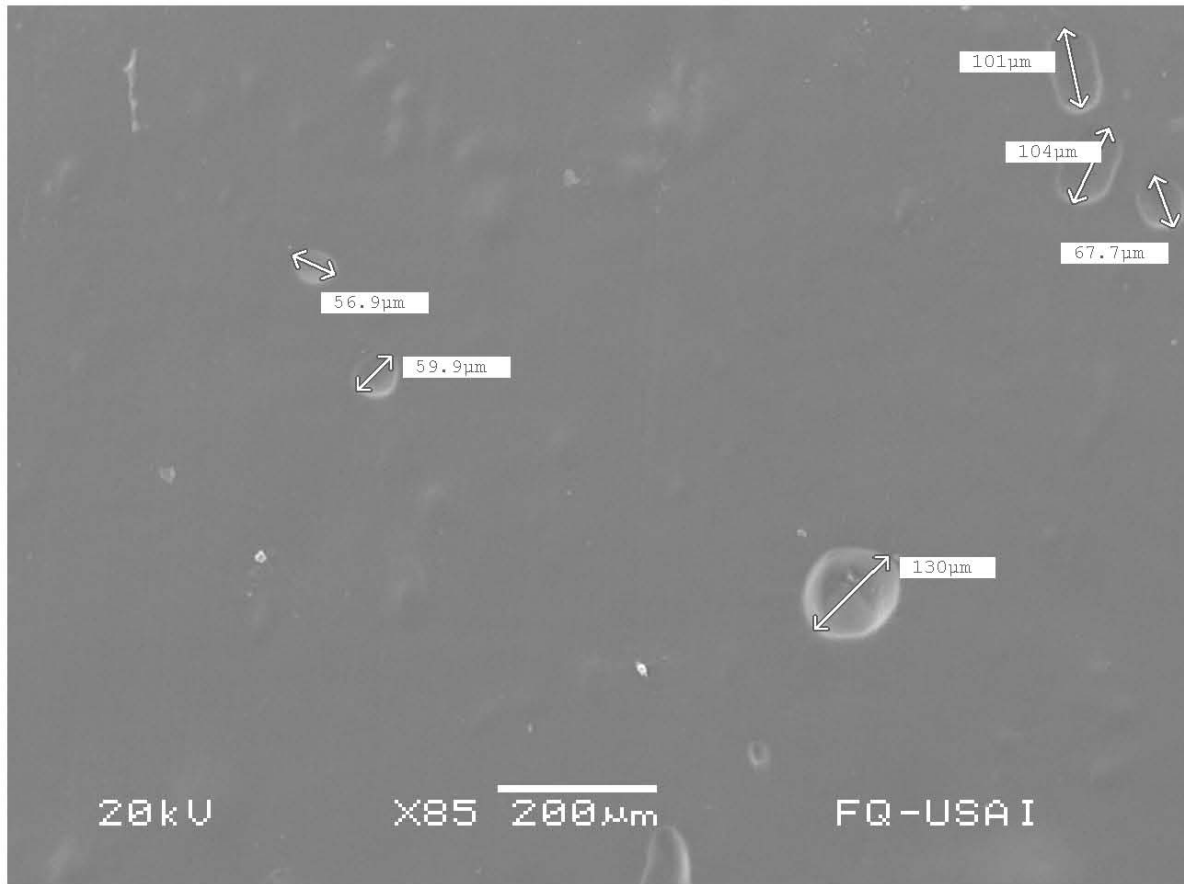


Figura 6.8. Micrografía Formulación 2

La formulación 2 presenta, al igual que la formulación 1 diversos tamaños y formas además de que el número encontrado en el campo es escaso. Sin embargo se presentan tamaños de partícula superiores a los detectados por el Zetasizer, lo cual nos habla de una cierta inestabilidad de la formulación con respecto al tiempo. Al igual que la formulación 1, el ácido esteárico se presenta de la misma forma y la caseína III I a[®] no se observa en esta micrografía por lo que también se puede decir que se encuentra totalmente encapsulada.

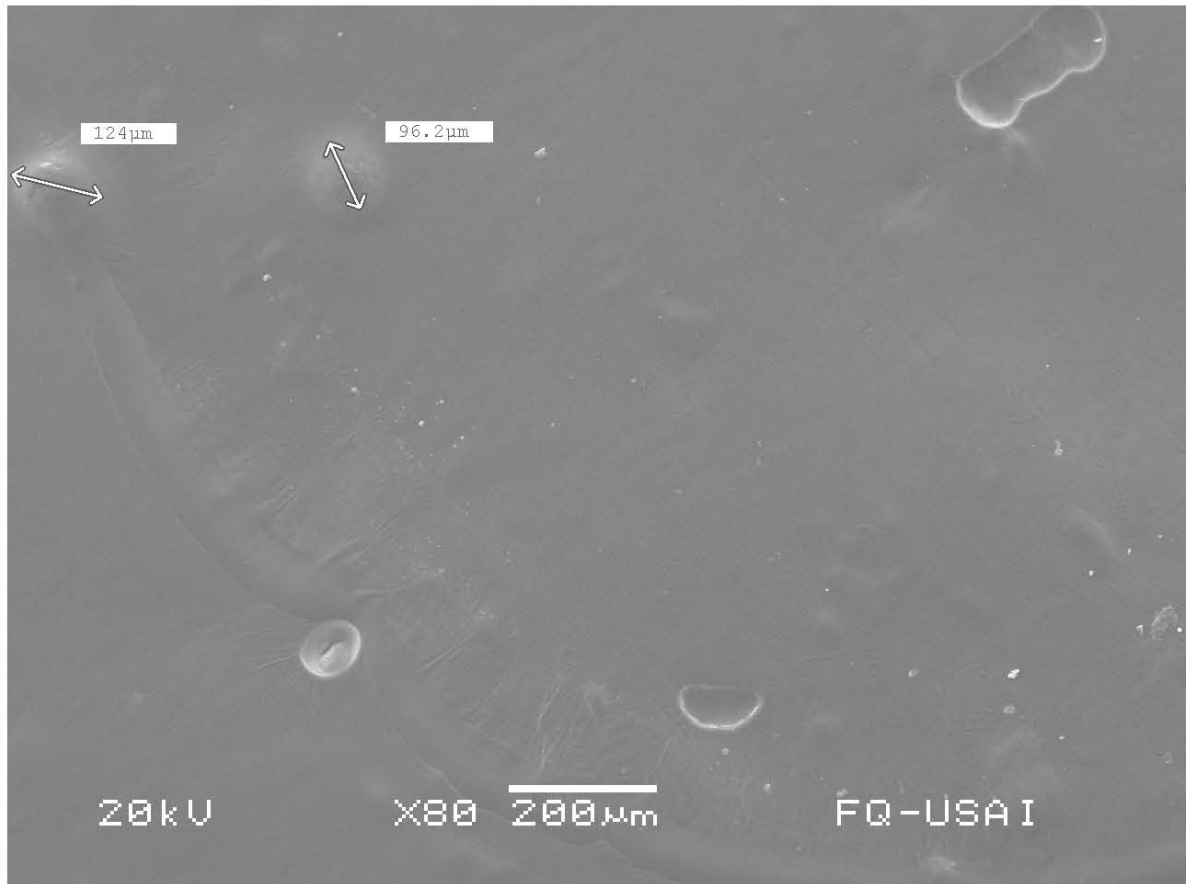


Figura 6.9. Micrografía Formulación 3

En cuanto a la formulación 3, se presentan nanopartículas de morfología parecida a las anteriores, por lo que podemos decir que las condiciones del proceso y los materiales utilizados son los factores que definen la morfología y el tamaño de las nanopartículas. En esta formulación se presentan nanopartículas con tamaños más uniformes, lo que coincide con los resultados obtenidos anteriormente.

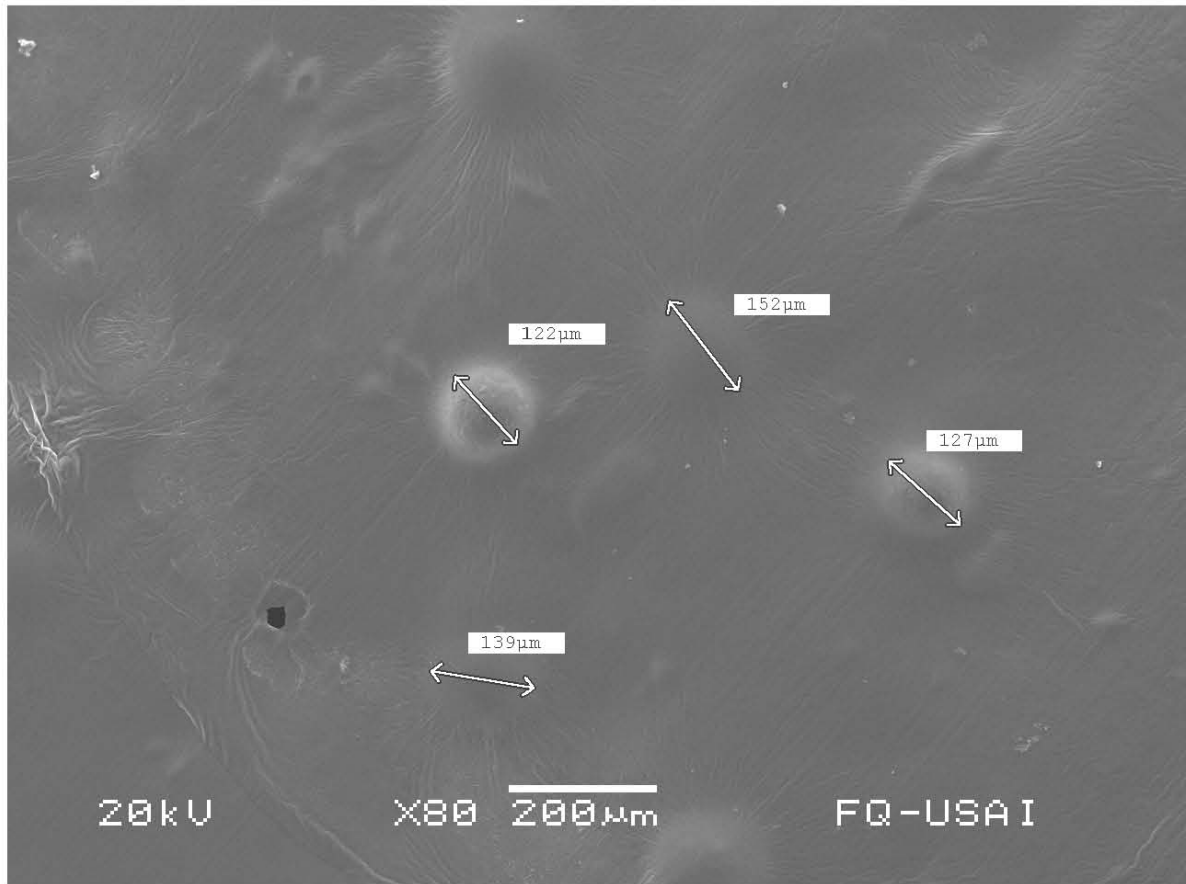
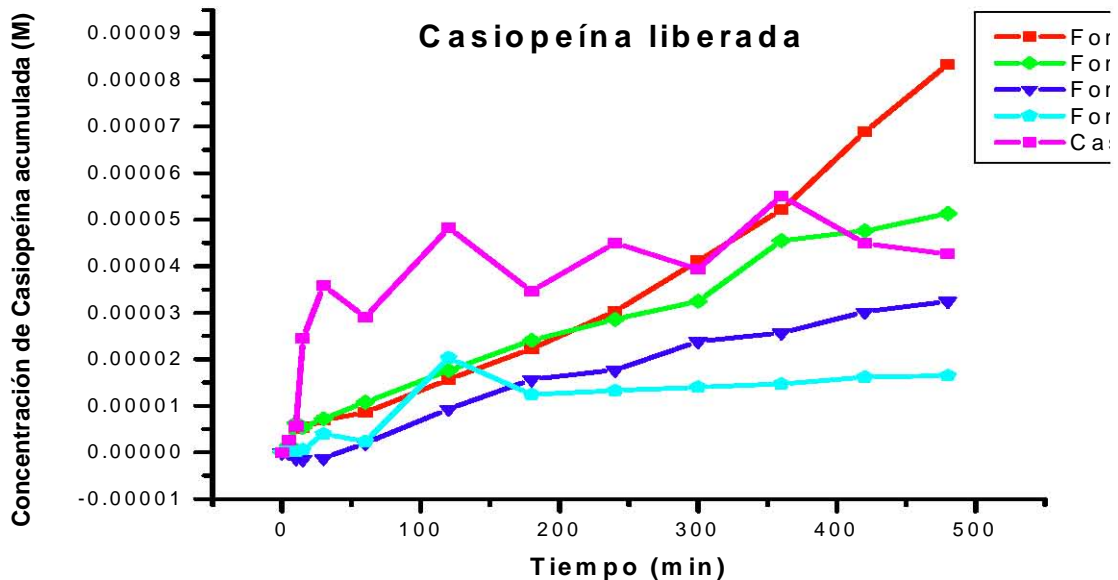


Figura 6.10. Micrografía Formulación 4

La formulación 4 presenta tamaños de partículas uniformes y una morfología más definida ya que no se presentan estructuras amorfas como en las anteriores micrografías lo que hace suponer que la cantidad de ácido esteárico propuesta para esta formulación influye tanto en el tamaño como en la morfología que presenta.

6.7 Liberación *in vitro*

Para el estudio de liberación *in vitro* se utilizaron celdas de Franz horizontales y se realizó un muestreo de cada una de las formulaciones durante 8 horas. Las muestras se comparan con la liberación que presenta la Casiopeína III I a[®] disuelta.



Gráfica 6.3 Liberación *in vitro* Casiopeína III I a[®]

Como se puede observar en la gráfica anterior, la Casiopeína III I a[®] presenta un perfil de liberación muy irregular en comparación con las demás formulaciones que presentan una tendencia regular. Se detectan cantidades importantes de fármaco liberado en los primeros minutos porque se trata de un proceso de difusión a través de una membrana que permite su paso hacia el receptor y en el cual existe una diferencia importante de gradientes de concentración entre el donador y el receptor.

Todas las formulaciones liberan menos fármaco en el mismo periodo de tiempo en comparación con el fármaco disuelto, lo cual demuestra que se consiguió un sistema de liberación prolongada en cada caso.

Los tamaños de partícula son determinantes en un proceso de disolución y de difusión. Entre más grande sea las partícula mayor será el tiempo de disolución

y dependiendo de la membrana que se utilice, ésta puede impedir el paso hacia el receptor. En este caso, se esperaría que la formulación 2 liberara el fármaco más rápido porque presenta un tamaño de partícula pequeño en comparación con la formulación 1, la cual presenta un tamaño de partícula mucho mayor. Sin embargo lo anterior no aplica para las formulaciones propuestas en este trabajo porque la formulación 2 libera una menor cantidad de fármaco que la formulación 1 en el mismo periodo de tiempo. Las formulaciones 2 y 3 tienen tamaños similares y su liberación sigue la misma tendencia. Esto demuestra que el tamaño no afecta de ninguna manera el perfil de liberación de las formulaciones realizadas.

La formulación 1 libera más fármaco en el mismo periodo de tiempo en comparación con el resto de las formulaciones. Esto indica que la liberación está en función de la concentración de ácido esteárico, ya que entre más ácido esteárico haya, se libera menor cantidad de fármaco en el mismo tiempo, tal como se demuestra en la gráfica anterior. La formulación 4 libera menos fármaco y es la formulación que tiene mayor cantidad de lípido. Este lípido está actuando como una barrera entre el fármaco y el medio lo cual impide la difusión inmediata del fármaco retardando así su liberación.

La formulación 4 presenta un perfil de liberación ideal para los fines requeridos en este trabajo, ya que libera mucho menos fármaco que la molécula en disolución en el mismo periodo de tiempo y además, a partir del minuto 200, se presenta un comportamiento constante, lo cual indica que se está liberando en cada punto una muy pequeña cantidad de fármaco y que además, para liberar el 100% de fármaco se requiere un tiempo aproximadamente 4 veces mayor; esto permite que el fármaco se encuentre en circulación más tiempo, y que probablemente las concentraciones en sangre sean constantes para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

6. 8 Calorimetría Diferencial de Barrido

Los termogramas que se obtienen por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC), permiten observar el comportamiento térmico de los sólidos

tanto cristalinos como amorfos ya que pueden presentar fenómenos de fusión, cristalización o degradación, entre otros. En los termogramas de cada una de las formulaciones realizadas pueden existir cambios en comparación con los termogramas que se realizaron a las materias primas, debido a las interacciones que se presentan entre el fármaco y el lípido utilizado cuando se lleva a cabo el proceso de preparación de nanopartículas. Este estudio también permite evaluar si el fármaco está encapsulado dentro de las nanopartículas o se encuentra solamente disuelto en el medio.

Se realizaron termogramas de ácido esteárico y de la casiopeína III I a[®] como referencia y se comparan con cada una de las formulaciones presentadas.

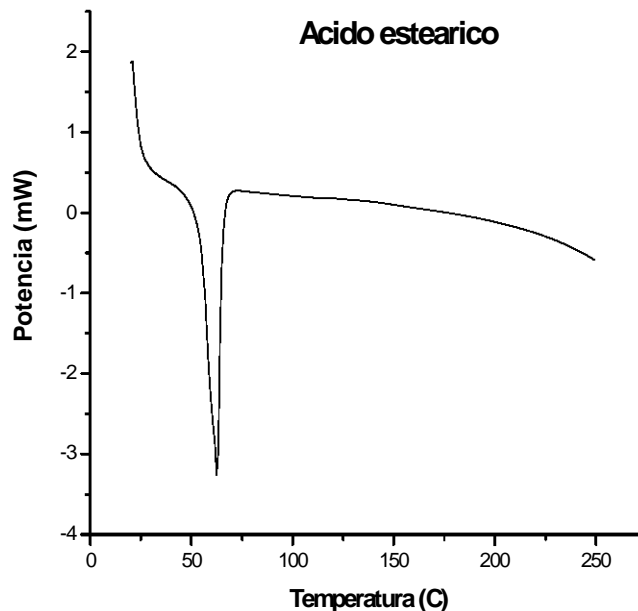


Figura 6.11. Termograma de ácido esteárico

El termograma anterior nos muestra el comportamiento térmico del ácido esteárico, en el cual se puede observar un pico de fusión en aproximadamente 60° C, además de que no se muestran otro tipo de picos significativos en este termograma, lo cual indica que efectivamente se trata del ácido esteárico y por lo tanto la materia prima no contiene impurezas de ningún tipo. Esto es muy importante ya que para poder comparar los termogramas de los excipientes contra los de las formulaciones, es necesario que las materias primas no estén

contaminadas con algún otro compuesto para poder llegar a una conclusión válida.

El comportamiento térmico de la Casiopeína III I a[®] se muestra en siguiente figura:

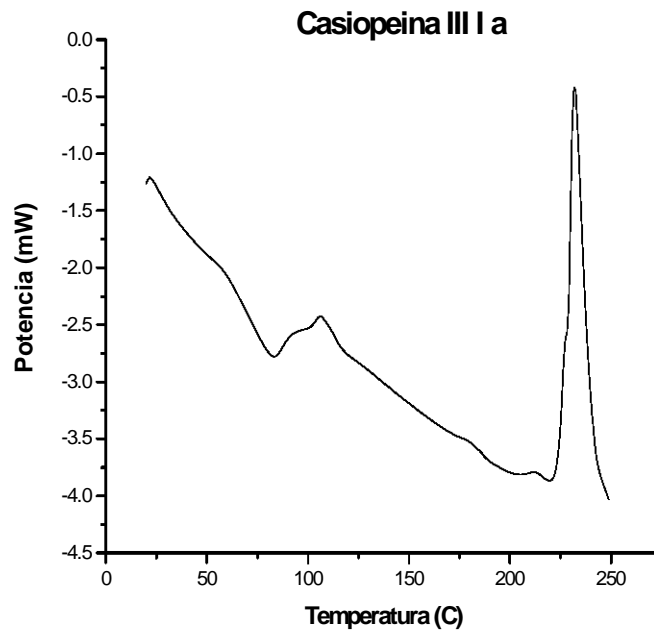


Figura 6.12. Termograma de Casiopeína III I a[®]

Para el caso de la Casiopeína III I a[®], se puede observar un pico en aproximadamente 90°C lo cual es indicativo de la presencia del agua que se encuentra coordinando a la casiopeína. El segundo pico podría considerarse una fusión o degradación como principio activo que sería en aproximadamente 240°C.

A continuación se muestran los termogramas de cada una de las formulaciones realizadas.

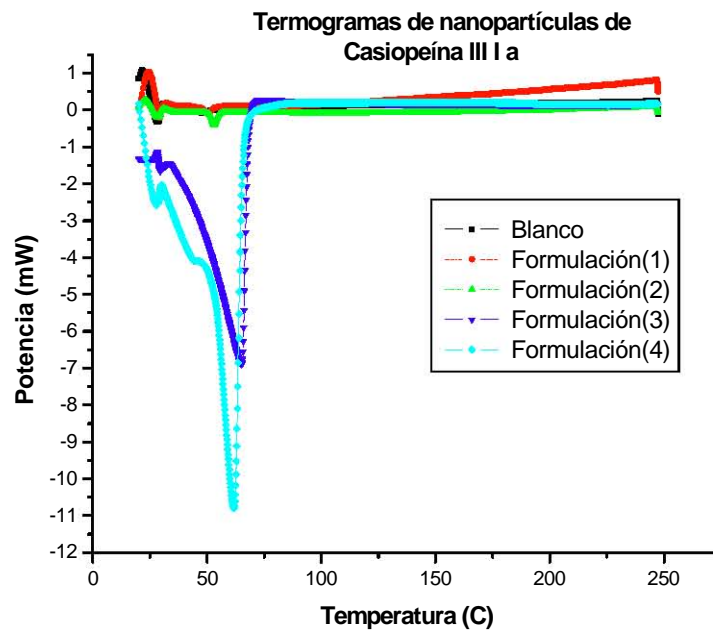


Figura 6.13. Termogramas de SLN

Los termogramas anteriores muestran un pico característico en aproximadamente 60°C; la intensidad del pico está en función de la concentración, en este caso de ácido esteárico. Así, se tiene que las formulaciones 1 y 2 presentan un pico de menor intensidad que las formulaciones 3 y 4. EL pico que se presenta en todos los casos es parecido al que se presenta en el ácido esteárico como materia prima y no se observa ningún otro pico, por lo que se puede decir que no hay formación de nuevas especies y por lo tanto es posible que no haya interacción entre los excipientes y el fármaco. Si llegara a establecerse alguna interacción entre el fármaco y los excipientes, ésta sería de carácter débil, debido a que durante la fabricación de las formulaciones no hubo ningún tipo de proceso que pudiera derivar en la formación de enlaces covalentes que modificaran la estructura del principio activo o de alguno de los excipientes utilizados. Es importante señalar que para asegurar que no haya interacción entre excipientes y fármaco se requieren otro tipo de estudios.

En cuanto al principio activo se refiere, el pico de fusión de éste no se presenta en ninguno de los termogramas de las formulaciones, por lo que se puede decir que el fármaco se encuentra encapsulado en las nanopartículas, lo que indica, en un principio, que el proceso de fabricación de las nanopartículas fue eficiente. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el fármaco fuera de la nanopartícula y que esté en tan pequeña cantidad de que el equipo no detecte su presencia o que los excipientes que se encuentran dentro del medio (poloxámero), actúen como camuflaje y por ello no se detecta la presencia del fármaco.

Para demostrar que en efecto se obtuvo una encapsulación del fármaco, se realizaron termogramas de mezcla de ácido esteárico y el principio activo. Las cantidades seleccionadas para este estudio fueron la menor proporción de Casiopeína III I a[®] con respecto al ácido esteárico, para saber si se trata de la sensibilidad del equipo o si se obtuvo la encapsulación. El resultado se muestra en la Figura 6.14.

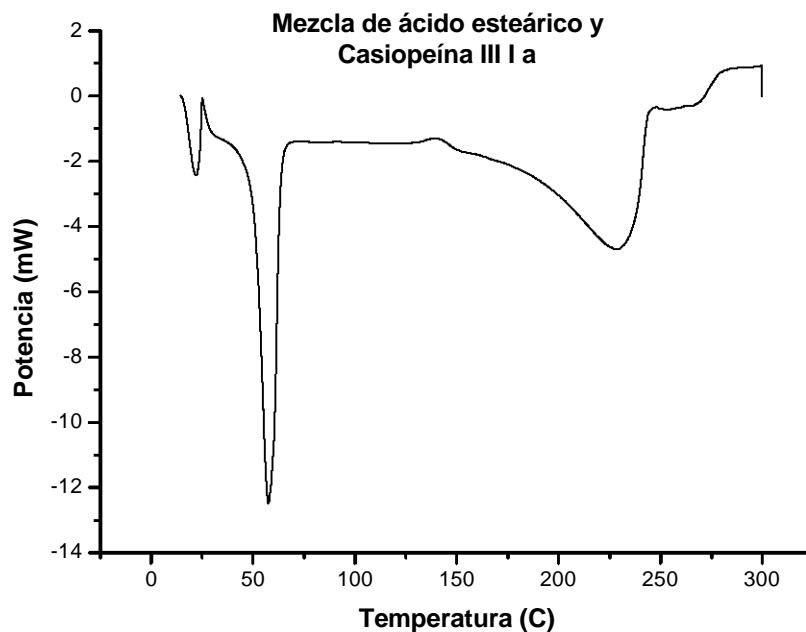


Figura 6.14. Termograma de mezcla de ácido esteárico y Casiopeína III I a[®]

Como se puede observar, se muestra el pico característico del ácido esteárico, pero además de éste, se presenta otro pico en aproximadamente 240°C, lo

cual indica que se trata del fármaco. Sin embargo, éste pico no es igual al de la casiopeína que se mostró como materia prima, lo cual indica que el principio activo sufrió algún tipo de descomposición o que posiblemente se descoordinó al estar en contacto directo con el ácido esteárico. Estudios previos han demostrado que éste fármaco se degrada en medios ácidos, por lo que se puede decir que ácido esteárico descompone al fármaco cuando se realiza una mezcla simple de éstos.

En el caso de cada una de las formulaciones propuestas, el fármaco se encuentra disuelto en agua, por lo que para saber si el factor disolución del principio activo interviene en el hecho de que no se detecte la presencia del fármaco por el equipo o que tenga alguna interacción con el ácido esteárico, se realizó una suspensión de ácido esteárico con el fármaco disuelto en agua. El resultado se muestra en siguiente termograma:

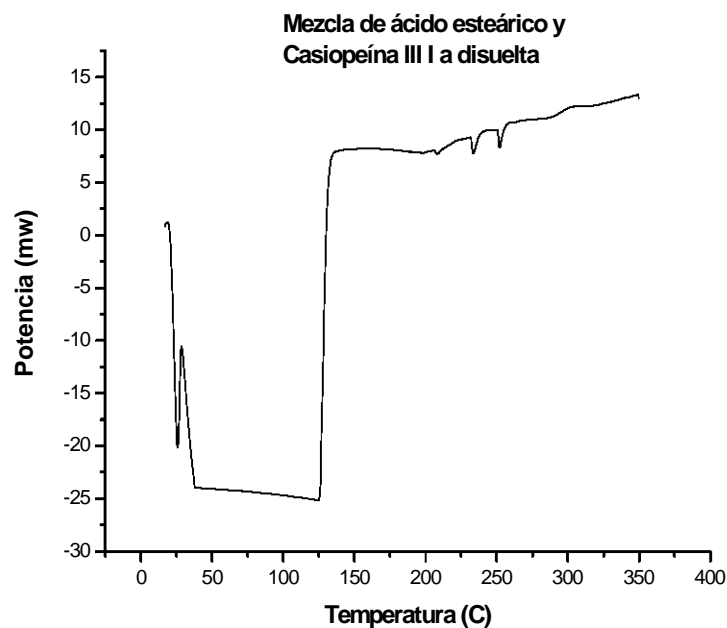


Figura 6.15. Termograma de mezcla de Casiopeína III I a® disuelta y ácido esteárico

En la figura anterior, se observa un pico muy pronunciado debido al agua presente en la muestra. Además se observan dos pequeños picos en aproximadamente 230°C y 250°C, lo cual indica que el fármaco sufrió una

descomposición al estar en estas condiciones y sin embargo su presencia es detectada. Estos pequeños picos no se encuentran en los termogramas de cada una de las formulaciones. Esto indica que el principio activo se encuentra dentro del ácido esteárico, el cual lo protege de las condiciones extremas a las cuales se sometió en los casos anteriores y si se encuentra una pequeña proporción de fármaco fuera de la nanopartícula, no es posible detectarla porque se encuentra protegida por el resto de los excipientes.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se logró estabilizar una emulsión múltiple w/o/w durante el tiempo necesario para la fabricación de SLN.
2. Se obtuvieron 4 lotes diferentes de SLN con diferentes cantidades de ácido esteárico lo cual queda demostrado por diferentes técnicas.
3. Las nanopartículas obtenidas muestran tamaños de partícula adecuados para su administración parenteral en el momento de su preparación. Sin embargo a los tres meses, se observa un crecimiento de las mismas que conlleva a una inestabilidad de la formulación y a un tiempo de vida de cada una limitado.
4. El potencial Z indica que las nanopartículas tienen una tendencia a unirse en el tiempo, mismo que se corrobora en el punto anterior. Se plantea en el futuro, la adición de electrolitos para evitar la agregación.
5. Se consigue una liberación del fármaco para cada una de las formulaciones de manera prolongada, en comparación con el fármaco en disolución.
6. Los estudios de DSC aseguran la encapsulación del fármaco y no existencia de una simple mezcla entre fármaco y excipientes.
7. La formulación mas adecuada para una formulación intravenosa es la formulación 4, debido a que el tamaño de partícula y el potencial Z cumplen con los parámetros establecidos para esta vía de administración.

Las perspectivas para este trabajo son probar la formulación seleccionada en un sistema *in vivo* y compararlo contra el cisplatino, para así tener un perfil de liberación de esta formulación y proponerlo como una alternativa más eficaz para el tratamiento contra el cáncer.

IX. BIBLIOGRAFÍA:

1. Anthony S., D. L., Eugene B., Joseph B., Jean D., Kurt J., "Principios de Medicina Interna". 13ª Edición. Vol II. sección:3 Enfermedades Neoplásicas. p 2089-2166 . Principios de Medicina Interna (ed. Neoplásicas, E.) (2000).
2. Gracia I., R. I., Gómez C. Knight's in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds
Metal Based Drugs 8, 19-27 (2001).
3. Ruíz L., G. I., de la Rosa E., Sumano H.. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeinas I, II, III. Journal of Inorganic Biochemistry, 406 (1993).
4. Ruíz L., G. I., Moreno R. . The antitumor activity of several transition metal complexes. . Journal of Inorganic Biochemistry. , 615 (1991).
5. E. García, M. M., L. Ruíz. . Acute Toxicity of Casiopeine, a new type of cytotoxic agent. West Pharmacology Society. 34, 65-67 (1991).
6. Vauthier, C., Dubernet, C., Chauvierre, C., Brigger, I. & Couvreur, P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. Journal of Controlled Release 93, 151-160 (2003).
7. Muller, R. H., Mader, K. & Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50, 161-177 (2000).
8. Gilman, G. a. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (McGraw – Hill. , 1996).
9. Klug, C. Conceptos de Genética (Prentice Hall, 1999).
10. Jarquin, J. A. 5-22 (UNAM, Mexico, 2001).
11. Rendón Garrido Elena, T. M. E. 1-39 (UNAM, México, 1998).
12. Susana, R. S. 10-12 (UNAM, México, 2003).
13. Mukhopadhyay, R., Dubey, P. & Sarkar, S. Structural changes of DNA induced by mono- and binuclear cancer drugs. Journal of Structural Biology 150, 277-283 (2005).
14. Iijima, H. et al. Measurement of DNA adducts in cells exposed to cisplatin. Analytical Biochemistry 333, 65-71 (2004).
15. Chaney, S. G. et al. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. Journal of Inorganic Biochemistry 98, 1551-1559 (2004).
16. Perez-Cabre, M. et al. Pd(II) and Pt(II) complexes with aromatic diamines: study of their interaction with DNA. Journal of Inorganic Biochemistry 98, 510-521 (2004).
17. Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 478, 23-43 (2001).
18. Ruíz R. y col. Jornadas de Trabajo de Casiopeínas (UNAM, 2002).
19. Trejo Solis C., P. G., Gracia I., Bravo M.E. Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells in vitro and in vivo through Caspase- Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. Neoplasia 7, 563-574 (2005).
20. Arnaudeau, C., Tenorio Miranda, E., Jenssen, D. & Helleday, T. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. Mutation Research/DNA Repair 461, 221-228 (2000).
21. Zambrano, B. G. in Farmacia 13-38 (UNAM, Mexico, 2004).
22. Jörg, K. Colloidal Drug Delivery Systems (Marcel Dekker, Inc, New York, 1994).
23. Sahoo, S. K. & Labhasetwar, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discovery Today 8, 1112-1120 (2003).
24. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E. & Benoit, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials 24, 4283-4300 (2003).
25. Barratt, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. Pharmaceutical Science & Technology Today 3, 163-171 (2000).

26. Kaur, I. P., Garg, A., Singla, A. K. & Aggarwal, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 269, 1-14 (2004).
27. Alfonso, G. *Remington. Farmacia* (Editorial Panamericana, España, 2003).
28. Lasic, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* 16, 307-321 (1998).
29. Uchegbu, I. F. & Vyas, S. P. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 172, 33-70 (1998).
30. Hou, D., Xie, C., Huang, K. & Zhu, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 24, 1781-1785 (2003).
31. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. & Garcia-Celma, M. J. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, 102-110 (2005).
32. Hu, F.-Q. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 167-173 (2005).
33. Galindo-Rodriguez, S. A. et al. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25, 357-367 (2005).
34. Trotta, M., Debernardi, F. & Caputo, O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 257, 153-160 (2003).
35. Garcia-Fuentes, M., Torres, D. & Alonso, M. J. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27, 159-168 (2003).
36. Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *International Journal of Pharmaceutics* 188, 155-164 (1999).
37. Shahgaldian, P., Da Silva, E., Coleman, A. W., Rather, B. & Zaworotko, M. J. Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters. *International Journal of Pharmaceutics* 253, 23-38 (2003).
38. Sukhorukov, G., Fery, A. & Mohwald, H. Intelligent micro- and nanocapsules. *Progress in Polymer Science* 30, 885-897 (2005).
39. Ibrahim, H., Bindschadler, C., Doelker, E., Buri, P. & Gurny, R. Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *International Journal of Pharmaceutics* 87, 239-246 (1992).
40. Allemann, E., Gurny, R. & Doelker, E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *International Journal of Pharmaceutics* 87, 247-253 (1992).
41. Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J. S. & Muller, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release* 30, 83-96 (1994).
42. Tan, C. P. & Nakajima, M. [beta]-Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry* 92, 661-671 (2005).
43. Chellat, F., Merhi, Y., Moreau, A. & Yahia, L. H. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials* 26, 7260-7275 (2005).
44. Mu, L. & Feng, S. S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol(R)): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release* 86, 33-48 (2003).
45. Konan, Y. N., Gurny, R. & Allemann, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 233, 239-252 (2002).
46. Gillian, B. Characterization of Colloidal Drug Carrier Systems with Zeta Potential Measurements. *Pharmaceutical Technology Europe*, 1-7 (1999).
47. Connah Malcolm, K. M. *The use of Zeta Potential in the Pharmaceutical Industry*. Malvern Instruments (1999).

48. Venkateswarlu, V. & Manjunath, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 95, 627-638 (2004).
49. Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M. & Muller, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 278, 71-77 (2004).
50. Wissing, S. A. & Muller, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release* 81, 225-233 (2002).
51. Jennings, V., Schafer-Korting, M. & Gohla, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release* 66, 115-126 (2000).
52. Castelli, F., Puglia, C., Sarpietro, M. G., Rizza, L. & Bonina, F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics* 304, 231-238 (2005).
53. R.H Müller, C. J., O. Kayser. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 3-19 (2001).
54. Singh, M., Sharma, R. & Banerjee, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances* 20, 341-359 (2002).
55. Loftsson, T. & Masson, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics* 225, 15-30 (2001).
56. Bibby, D. C., Davies, N. M. & Tucker, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 197, 1-11 (2000).
57. Hirayama, F. & Uekama, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, 125-141 (1999).
58. Duchene, D., Wouessidjewe, D. & Ponchel, G. Cyclodextrins and carrier systems. *Journal of Controlled Release* 62, 263-268 (1999).
59. Patri, A. K., Kukowska-Latallo, J. F. & Baker, J. J. R. Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 2203-2214 (2005).
60. Duncan, R. & Izzo, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 2215-2237 (2005).
61. Sears, Z. *Física General* (Editorial Aguilar, Mexico, D.F, 1981).