



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“DISEÑO FARMACÉUTICO, DESARROLLO Y CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE UN
SISTEMA COLOIDAL QUE CONTIENE CLOSANTEL”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B ABRAHAM FAUSTINO VEGA



TUTORA: Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad

AÑO: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a:

- ❖ Mi tutora Dra. María Josefa Bernad Bernad. Su compromiso con mi trabajo de investigación, entereza y calidad humana fueron importantes en la culminación del proyecto doctoral.
- ❖ Los miembros de mi comité tutorial, Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos, Dra. Luz María Melgoza Contreras y Dr. David Quintanar Guerrero. Sus comentarios durante las reuniones semestrales fueron aportaciones valiosas para el desarrollo del proyecto.
- ❖ Dr. Luis Medina Torres por su valiosa ayuda y asesoría en la caracterización reológica.
- ❖ Los miembros de mi jurado de examen de grado, Dr. Alberto Tecante Coronel, Dr. Jesús Gracia Fadrique, Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, Dr. José Ignacio Regla Contreras y Dra. María Isabel Aguilar Laurents por el valioso tiempo que invirtieron en la lectura de la tesis y no menos importante, las sugerencias para mejorarla.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo para la realización de esta tesis que fue posible gracias al financiamiento de los estudios de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas otorgándome la beca **178022**.
- ❖ La DGEP-UNAM, por su apoyo económico por medio de una beca complementaria durante la primera parte de este proyecto y por el apoyo económico para los congresos en donde se presentó este trabajo. Sin las becas provenientes de los proyectos CONACYT, DGEP-UNAM, el desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible.
- ❖ Este trabajo forma parte del **Macroproyecto Productividad** sostenible de los hatos de cría en pastoreo, auspiciado por la **UNAM** y que finalizó con la ayuda de una beca por un semestre.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Alberto Tecante Coronel
VOCAL:	Dr. Jesús Gracia Fadrique
VOCAL:	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
VOCAL:	Dr. José Ignacio Regla Contreras
SECRETARO:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 002 del Departamento de Farmacia, Edificio F, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria.

Los resultados más importantes fueron presentados en los siguientes congresos:

- **AERC 2009** 5th Annual European Rheology Conference April 15-17, Cardiff - United Kingdom, "Synthesis and rheological characterization of poly(DL-lactide) for controlled release of active principle in pharmaceutical applications";
- **Sixth International Symposium on Mixing in Industrial Process Industries-** ISMIP VI Niagara on the Lake, Niagara Falls, Ontario, Canada August 17-21, 2008 " Effect of the mixing in the stability of (dl-lactide-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled release of closantel in pharmaceutical applications"
- **ECIS 2007**(21st Conference of the European Colloid and Interface Society) September 10-14, 2007, Geneva, Switzerland, titled "Rheological characterization of polymeric poly (DL-lactide-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled release of closantel in pharmaceutical applications.

Tabla de contenido

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Parasitosis	17
2.1.1. Agentes biológicos que causan la parasitosis bovina	17
2.1.1.1 Parásitos externos	17
2.1.1.1.1 Garrapatas (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>)	18
2.1.1.1.2 Moscas (<i>Musca Domestica</i>)	18
2.1.1.2. Parásitos internos	18
2.1.2. Tratamiento de la parasitosis	19
2.1.2.1 Fármacos antiexoparasitarios	20
2.1.2.1.1 Closantel	22
2.2 Formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM)	23
2.2.1 Sistemas acarreadores	30
2.2.1.1 Sistemas coloidales	31
2.2.1.1.1 Liposomas	31
2.2.1.1.2 Niosomas	32
2.2.1.1.3 Micropartículas	32
2.2.1.1.4 Nanopartículas	34
2.2.1.1.4.1 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas	34
2.2.1.1.4.1.1 A partir de polímeros previamente sintetizados	35
2.2.1.1.4.1.1.1 A partir de microemulsiones:	35
2.2.1.1.4.1.1.2 Emulsificación-evaporación	35
2.2.1.1.4.1.1.3 Emulsificación-difusión	36
2.2.1.1.4.1.1.4 Desplazamiento del disolvente	36
2.2.1.1.4.1.1.5 Precipitación por adición de sales neutras	36
2.2.1.1.4.1.2 A partir de monómeros	37
2.2.1.1.4.1.2.1 Polimerización en emulsión	37
2.2.1.1.4.1.2.2 Polimerización en fase acuosa continua	37
2.2.1.1.4.1.2.3 Polimerización interfacial	37
2.2.1.1.4.2 Factores de formulación y de proceso involucrados en la elaboración de nanopartículas de PLGA	38
2.2.1.1.4.2.1 Relación de copolímero	38
2.2.1.1.4.2.2 Concentración de PLGA	38
2.2.1.1.4.2.3 Naturaleza y cantidad de la fase orgánica	39
2.2.1.1.4.2.4 Efecto del tensoactivo o estabilizante	39
2.2.1.1.4.2.5 Viscosidad de la fase continua y de la fase discontinua	40
2.2.1.1.4.2.6 Velocidad de homogenización y de agitación	40
2.2.1.1.4.2.7 Temperatura del agua añadida para la difusión del disolvente	40
2.2.1.1.4.3 Nanopartículas sólidas lipídicas (NSL)	41
2.3 Liberación del fármaco a partir de las nanopartículas	43
2.4 Remoción del organismo de los sistemas nanoparticulados	43
2.5 Sistemas dispersos farmacéuticos	44
2.5.1 Aplicaciones nanotecnológicas de los sistemas dispersos	45

2.5.2 Introducción a la reología _____	47
2.5.2.1 Deformación y flujo _____	48
2.5.2.2 Elasticidad _____	49
2.5.2.3 Flujo cortante _____	50
2.5.2.4 Esfuerzo cortante _____	51
2.5.2.5 Velocidad de deformación _____	52
2.5.2.6 Viscosidad _____	52
2.5.2.7 Clasificación reológica para fluidos _____	53
2.5.2.8 Viscoelasticidad lineal. Estudios oscilatorios _____	57
2.5.3 Reología de productos farmacéuticos _____	58
3 OBJETIVOS _____	63
3.1 Objetivo general: _____	63
3.2 Objetivos particulares: _____	63
4. MATERIALES Y MÉTODOS _____	64
4.1 Materiales: _____	64
4.2 Métodos _____	64
4.2.1 Construcción de los diagramas de fase pseudoternarios _____	64
4.2.2 Diagramas de fases pseudoternarios utilizando B-56, B-76 e isopropanol (IsoOH) ____	64
4.2.3 Diagramas de fases pseudoternarios B-56 con diferentes cotensoactivos _____	65
4.2.3.1 Obtención de nanopartículas poliméricas a partir de microemulsiones _____	65
4.2.4. Preparación y caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL) _____	66
4.2.4.1 Preparación de dispersiones sólidas de oxitetraciclina/lecitina _____	66
4.2.4.2. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL) de oxitetraciclina _____	66
4.2.4.3 Preparación de liposomas de oxitetraciclina _____	67
4.2.4.4 Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas de closantel por emulsión-evaporación ____	67
4.3 Estudios de interacción de PVA y closantel _____	67
4.4. Obtención de nanopartículas de PLGA y closantel por el método de desplazamiento de disolvente _____	69
4.5. Caracterización de nanopartículas _____	70
4.5.1. DSC, IR y difracción de rayos X _____	70
4.5.2. Tamaño de partícula y potencial Z _____	70
4.5.3. Morfología _____	71
4.5.4. Eficiencia de encapsulación _____	71
4.5.5. Liberación <i>in vitro</i> _____	72
4.5.6 Estudios reológicos _____	73
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	74
5.1 Comportamiento de fase de las microemulsiones _____	74
5.2 Diagramas de fases pseudoternarios realizados con diferentes cotensoactivos y B-56 ____	78
5.3 Diagrama de fases sistema B-56:IsoOH 1:2 con PLGA y closantel _____	80
5.4. Preparación y caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL) _____	80
5.4.1 Estudios de estabilidad _____	81
5.5 Obtención de nanopartículas de PLGA y closantel por el método de desplazamiento de disolvente _____	92

CONTENIDO

5.5.1 Estudios de interacción closantel-PVA _____	92
5.5.1.1 Tamaño de partícula _____	92
5.5.1.2 Análisis conformacional de la interacción PVA-closantel _____	93
5.5.1.3 Interacción de closantel y PVA en solución acuosa _____	94
5.5.1.4 Estudios reológicos de PVA con y sin closantel _____	96
5.5.2 Discusión reológica _____	98
5.5.2.1 Efecto de velocidad de corte _____	98
5.5.2.2 Efecto de closantel sobre las propiedades viscoelásticas del PVA _____	101
5.5.3 Influencia de la relación PLA-PGA en la obtención de nanopartículas _____	102
5.5.4 Influencia del pH en el comportamiento reológico de las NP de PLGA 50:50 _____	104
5.5.5 Comportamiento reológico de las nanopartículas de PLGA 50:50 a pH 7.4 _____	107
5.5.5.1 Efecto de la temperatura a 39°C _____	107
5.5.5.2 Nanopartículas de PLGA 50:50, comparación a 25 y 39°C _____	107
5.5.5.3 Estabilidad de nanopartículas de PLGA 50:50 (pH 7.4, 25 y 39 °C) _____	108
6. - CONCLUSIONES _____	110
7. - REFERENCIAS: _____	113

NOMENCLATURA

Símbolo		Unidades
G'	Módulo de almacenamiento	Pa
G''	Módulo de pérdida	Pa
T_g	Temperatura de transición vítrea	°C
$\tan \delta$	Tangente de pérdida	

SÍMBOLOS GRIEGOS

ω	Frecuencia angular	rad/s
δ	Ángulo de desfase	rad/s
λ	Tiempo de relajación	s

ABREVIACIONES

DSC	Calorimetría de Barrido Diferencial
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de protón
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
PVA	Alcohol Polivinílico
PBS	Amortiguador de fosfatos
DCM	Diclorometano
IsoOH	Isopropanol
Clos	Closantel
NP	Nanopartículas
PLGA	Ácido Poliláctico-co-glicólico
LA	Ácido Láctico
GA	Ácido Glicólico
DMAB	Bromuro de didodecilmetilamonio
NSL	Nanopartículas Sólidas Lipídicas
FDA	Food and Drug Administration
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
B-56	Éter cetílico decaoxietilenado ($C_{16\text{cetil}} E_{10}$)
B-76	Éter estearílico decaoxietilenado ($C_{18\text{estearil}} E_{10}$)
T-20	Monolaurato de sorbitán oxietilenado

RESUMEN

La tecnología farmacéutica proporciona diferentes dispositivos y sistemas para la mejora de la eficacia del fármaco, proponiendo el desarrollo de sistemas de liberación modificada.

Considerando lo anterior, se planteó elaborar nanopartículas de closantel y realizar su caracterización reológica, sometiendo el sistema al estudio de deformación y flujo.

Para ello se utilizaron distintos tipos de copolímero de ácido poliláctico-co-glicólico y el método de desplazamiento de disolvente. Se obtuvo la formación de sistemas de talla nanométrica con closantel, teniendo una composición de 94% de agua, 5% acetona y 1% de alcohol polivinílico.

Dada la presencia de alcohol polivinílico en el sistema, se estudió la interacción entre el closantel y este estabilizante, demostrándose que el principio activo interacciona con él ya que propicia variación de las propiedades reológicas del sistema nanoparticulado.

Se estudió la influencia de la relación ácido láctico/ácido glicólico en el copolímero sobre la generación de las nanopartículas, midiendo el tamaño de partícula, potencial zeta y caracterizándolo reológicamente. Arrojando que la proporción 50:50 muestra menores cambios estructurales al evaluarlo a diferentes condiciones en el reómetro. Como por ejemplo, el efecto de pH, observándose que los datos obtenidos de distribución de tamaño de partícula y estabilidad estructural se mantienen uniformes a pH 7.4, lo cual es interesante para obtener un preparado farmacéutico a pH fisiológico, evitando la posible irritación del organismo.

Al realizar el estudio de liberación in vitro, podemos mencionar que tales nanopartículas permiten una liberación más lenta en comparación con el fármaco libre.

Así mismo, se efectuaron estudios en función de la temperatura y tiempo de almacenamiento. Éstos muestran que las nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico 50:50 mantienen su estructura durante más tiempo, siendo estable en el intervalo de temperatura de 25 a 60 °C.

ABSTRACT

Pharmaceutical technology provides different devices and systems for the improvement of the drug effectiveness, proposing the development of modified delivery systems. Considering the above mentioned, PLGA-based closantel nanoparticles were prepared by the solvent displacement method. The influence of different types of copolymer of poly(lactic-co-glycolic acid) was tested on particles size, zeta potential and rheological properties by submitting the system to the study of deformation and flow.

Small spherical PLGA- based closantel nanometric particles were obtained with a mean diameter of 540 nm, taking a composition of 94% of water, 5% acetone and 1% of polyvinyl alcohol. Due to the presence of polyvinyl alcohol in the system, the interaction between closantel and this stabilizer was studied, demonstrating that the active ingredient interacts with it, favoring the variation of nanoparticles rheological properties.

PLGA 50:50 nanoparticles displays minor structural changes to evaluate it to different conditions in the rheometer, for example, the effect of pH, noting that structural stability and the particle size distribution were kept constant at pH 7.4, which is interesting for a pharmaceutical product at physiological pH, avoiding possible irritation on the application site. In vitro release kinetics study shows that these nanoparticles allow a delayed release in comparison with the free drug. Likewise, studies based on the temperature and storage time were conducted, showing that PLGA 50:50 nanoparticles maintained its structure for longer, remain stable in the range of temperature from 25 to 60 °C.

1. INTRODUCCIÓN

La presencia y el desarrollo de resistencias de ectoparásitos a los fármacos disponibles para su control, significa una amenaza permanente que pende sobre la viabilidad de la ganadería internacional y obviamente nacional, debido al gran impacto que tiene sobre la economía. Los compuestos ectoparasiticidas se presentan en diferentes formas farmacéuticas de acuerdo a la especie animal, edad, estado fisiológico y nutricional, tipo de parásito, magnitud del problema y número de animales afectados; a continuación se mencionan los métodos de aplicación más usuales:

Baño de aspersión: El sistema es poco estresante, pero no ofrece seguridad en cuanto a eficacia debido a la dificultad para mojar íntegramente a todos los animales y obtener un contacto fármaco-animal duradero, aspecto que puede favorecer el desarrollo de resistencias.

Baño de inmersión: Es un método estresante, necesidad de grandes volúmenes de ectoparasiticidas y la existencia de riesgos para el animal tales como lesiones, especialmente en vacas lecheras y la posibilidad de transmisión de gérmenes. Además el principio activo sufre el fenómeno de agotamiento dentro del baño, ocasionado por el arrastre de producto por los animales bañados, presencia de materia orgánica y por la actividad bacteriana.

Aplicación tópica: La impregnación corporal lograda con el espolvoreo suele ser insuficiente para lograr un buen control.

Aplicación dorsal: Implican la administración localizada de pequeños volúmenes de fármacos en la superficie dorsal del animal y cuentan con ventajas tales como: facilidad de aplicación, ausencia de estrés, dosis precisa y efecto residual.

Un inconveniente de todas las aplicaciones dorsales son que no deben aplicarse sobre animales mojados por la lluvia, ni en caso de viento fuerte que podría desviar el chorro del producto, ni tampoco si amenaza llover poco después del tratamiento.

En bovinos sobre todo, el mayor inconveniente de las aplicaciones dorsales basadas en acaricidas o insecticidas de contacto es la cobertura incompleta del cuerpo del animal (p.ej. las patas, las ubres, etc.) que reduce su eficacia contra algunas especies de moscas o garrapatas.

Las aplicaciones dorsales con piretroides pueden ser irritantes para el ganado, especialmente para los terneros y las vacas lecheras. Los animales irritados pueden echarse a correr alocadamente, la ordeña se hace imposible durante varios días, etc. El costo por tratamiento usando aplicaciones dorsales suele ser substancialmente superior al de los baños.

Los errores más frecuentes al emplear aplicaciones ectoparasiticidas consisten en aplicar el mismo volumen a todos los animales independientemente de su tamaño y peso, o en dejar algunos animales del rebaño sin tratar. Esto no es otra cosa que un modo más de subdosificar, y de aceptar así una eficacia o poder residual reducidos y un riesgo mayor de aparición de resistencia.

Inyectables: Por el momento se emplean ivermectina y closantel, aunque ambos permiten, según la especie, la vía oral. La principal ventaja de la inyección es el conocimiento exacto de la dosis administrada.

Plaquetas auriculares: Utilizadas en bovinos para control de insectos, son de material plástico (PVC, poliuretano), impregnadas con insecticidas que desprenden en forma continua y que alcanza toda la superficie corporal, aunque probablemente de modo insuficiente, permitiendo una protección de 3 a 5 meses, con resultados variables.

La mayoría de los métodos antes mencionados son poco eficaces para el animal, además implica un trabajo excesivo y extenuante para el ganadero, por otro lado en el caso de inyectables, las formulaciones son hechas a pHs básicos con el fin de disolver al principio activo y esto hace que al momento de aplicarlo el animal sufra necrosis en la zona de aplicación.

Para México, con una infraestructura muy incipiente en el área de investigación básica y desarrollo de nuevos medicamentos, una estrategia que se considera viable para el desarrollo de preparados idóneos contra ectoparásitos (moscas, ácaros, garrapatas, etc.) y endoparásitos, es la reformulación de principios activos ya existentes en preparados farmacéuticos estratégicos de liberación modificada [1-2].

El diseño y aplicación de sistemas de liberación modificada de fármacos, y los sistemas de dirección localizada de la actividad de un determinado fármaco son actualmente uno de los aspectos de mayor importancia en el desarrollo de nuevas formas de liberación. La utilización de materiales poliméricos como

soportes de fármacos para regular y modular su liberación en aplicaciones específicas es una perspectiva que ha adquirido gran interés (Figura 1).

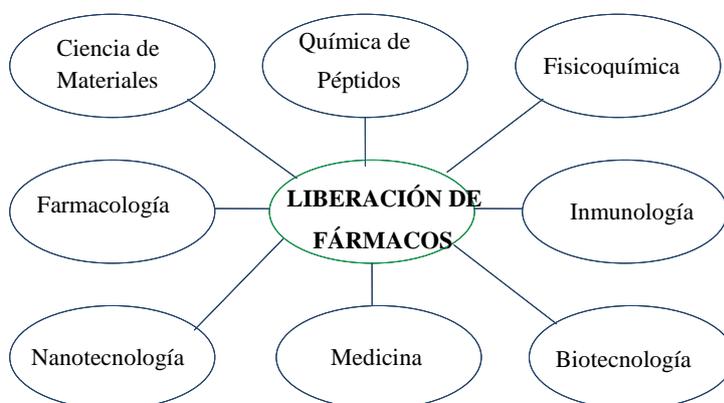


Figura 1. Disciplinas científicas relacionadas con la liberación de fármacos

El objetivo principal de la liberación modificada en principio es simple: conseguir la cantidad correcta del principio activo, en el momento y lugar precisos. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo que el fármaco está presente de forma efectiva utilizando una dosis única, y para eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos.

En un sistema de liberación modificada, el principio activo es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico, lipídico o una combinación de varios [3]. La velocidad de liberación de la sustancia activa desde dicho sistema al medio que la rodea, viene determinada por las propiedades del propio polímero y, en menor medida, depende de los factores ambientales, como pueden ser el pH [4], la temperatura [4] y los fluidos del organismo [5-7]. Por ello, los sistemas de liberación modificada deben ser capaces de permitir la administración de sustancias bioactivas de una forma lenta y continua durante extensos periodos [8-10].

La eficacia de un fármaco en una aplicación específica requiere la utilización de concentraciones adecuadas y con baja frecuencia. Sin embargo, las técnicas convencionales utilizadas, proporcionan frecuentemente un control muy pobre de las concentraciones de la sustancia en plasma, y el tiempo de residencia sólo se puede aumentar si se hace lo mismo con la cantidad o la frecuencia de

las dosis; ninguno de estos caminos es conveniente porque se puede superar el nivel mínimo de toxicidad, ocasionando con ello efectos nocivos para el organismo [3, 11-13]. Los sistemas convencionales de dosificación pueden dar lugar a periodos alternativos de ineficacia o de toxicidad, hecho particularmente problemático si la ventana terapéutica es estrecha [14].

En el caso ideal, el objetivo es conducir a la existencia de una concentración uniforme de fármaco, utilización de dosis más pequeñas y lograr la ausencia de efectos secundarios [11, 15-17].

Los materiales poliméricos permiten liberar de forma controlada fármacos de bajo peso molecular y permiten una gran variedad de rutas de administración (oral, parenteral, transdérmica, nasal, ocular, etc.). En casos en los que la actividad de los fármacos convencionales se pierde o se ve disminuida en el medio corporal, la combinación con macromoléculas puede mejorar la eficacia de estos fármacos, disminuyendo la respuesta inmunológica del paciente y de esta manera reducir la inactivación biológica del principio activo [18].

Los sistemas basados en materiales poliméricos diseñados para aplicaciones médicas tienen en cuenta una serie de factores tales como: la naturaleza de la enfermedad, las propiedades del fármaco, el tipo de terapia (puntual o crónica), la fisiología del paciente, la ruta de administración, la localización de la terapia, y las características del material polimérico empleado, incluyendo el mecanismo de liberación del fármaco. Los materiales poliméricos empleados en Medicina incluyen polímeros sintéticos que imitan polímeros naturales con modificaciones químicas. Estas modificaciones se hacen para mejorar la biocompatibilidad, degradabilidad, o para introducir otras propiedades deseadas. También se suelen conjugar químicamente con los fármacos modificando eficazmente las características bioquímicas y farmacológicas del fármaco. La permeabilidad de los materiales poliméricos puede ser modificada y controlada, se les puede dar forma fácilmente y pueden ser empleados de forma relativamente sencilla con una gran variedad de métodos.

Las principales ventajas de los sistemas poliméricos de liberación modificada, considerados desde el punto de vista farmacológico son [19-20]:

1. Los niveles de fármaco en plasma se mantienen de forma continua en el intervalo terapéutico deseado, pudiendo también ampliarse este

periodo en el cual la terapia es efectiva para disminuir así el número de dosis.

2. Los efectos no deseables, derivados de un metabolismo rápido o de una dosis excesiva, pueden reducirse e incluso eliminarse mediante un sistema polímero/fármaco.
3. Los fármacos que presentan "*in vivo*" unos tiempos de vida media pequeños, pueden protegerse de la degradación. También pueden protegerse los tejidos corporales sensibles a determinados fármacos, haciendo la administración menos invasiva, y
4. El aprovechamiento del fármaco es más eficaz y, por tanto, con un costo inferior. Se puede disminuir la dosis necesaria cuando se trata de un principio activo de alto costo.

Sin embargo, estas ventajas deben evaluarse junto con las posibles desventajas que se pueden presentar en cualquier aplicación clínica específica [13]:

1. Toxicidad o falta de biocompatibilidad del material polimérico usado.
2. Formación de productos secundarios nocivos procedentes del polímero, si éste es biodegradable.
3. La necesidad que existe en algunos casos de intervención quirúrgica para implantar el polímero en una localización apropiada.
4. Problemas derivados de la presencia del implante.
5. Alto costo de una determinada formulación polímero/fármaco, debido al precio del polímero o de su procedimiento de obtención.
6. Garantía de unas características de seguridad adecuadas, de forma que se eliminen fugas u otros factores que conduzcan a un control inadecuado.

Los polímeros deben estar libres de impurezas, estabilizadores, residuos de catalizador o emulsificantes. Generalmente, son sintetizados por procesos de polimerización que conducen a elevadas conversiones, son químicamente inertes y esto hace que su uso en Medicina sea posible. Otra característica importante de los polímeros a utilizar es que no sean susceptibles de rupturas químicas (por ejemplo hidrólisis), salvo que se pretendan sistemas que actúen por erosión. En este último caso, es fundamental que los productos resultantes no sean tóxicos [21].

El adecuado diseño de un dispositivo de liberación de fármacos para una aplicación biomédica, debe tener en cuenta que las propiedades físicas y mecánicas del polímero sean las apropiadas, ya que el fallo de estos sistemas a menudo tiene su origen en una inadecuada resistencia mecánica. En este sentido, los parámetros más importantes que han de ser considerados son las propiedades elásticas, el grado de hinchamiento, la resistencia a la tracción y a la compresión, la cizalla bajo cargas estáticas y dinámicas, la resistencia al desgarre y a la fatiga. La degradación térmica es de menor importancia debido a las relativamente pequeñas fluctuaciones de temperatura que se dan en el organismo [13].

Los requisitos de tipo biológico dependen de la aplicación específica del sistema de liberación. Los materiales poliméricos a utilizar no deben inducir fenómenos cancerígenos, tóxicos o nocivos en general [21-22]. La toxicidad se encuentra relacionada con la liberación (migración) de pequeñas cantidades de monómeros residuales u otros aditivos. Con excepción de los sistemas bioerosionables, las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los polímeros no deben ser modificadas por la acción del medio biológico. Además, no deben inducir reacciones inflamatorias al contacto con los tejidos y deben tener capacidad de esterilización [23].

Entre los biopolímeros utilizados en el desarrollo de sistemas nanoparticulados y microparticulados para la liberación modificada de fármacos destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico (PLGA). Estos biopolímeros están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral [24]. Además, gracias a su biocompatibilidad, han sido ampliamente empleados en numerosas aplicaciones biomédicas, tales como suturas reabsorbibles e implantes [25-27]. Recientemente los sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas están ganando aplicación en la industria farmacéutica, debido a que estos sistemas nanoparticulados han mejorado la solubilidad, farmacocinética y biodistribución de los fármacos. También estos sistemas son fáciles de administrar y los fármacos formulados a través de estos sistemas tienen menores efectos adversos, por otra parte al dirigir estos sistemas

nanoparticulados a un blanco específico pueden ser eficaces a dosis bajas, lo cual significaría bajos costos [28].

Aunado a lo antes mencionado, los sistemas de liberación modificados deben tener propiedades fisicoquímicas y mecánicas apropiadas para su adecuada administración y eficiencia. Por lo tanto, para contar con tal información, una de las caracterizaciones más importantes es la reológica. Aunque tanto la viscosidad como el esfuerzo de fluencia son unos de los parámetros reológicos más importantes, no son los únicos.

Los materiales, en general, no son enteramente elásticos (sólidos) o viscosos (líquidos) sino que su comportamiento es una mezcla de ambos. Por ejemplo, una crema hidratante es a la vez viscosa porque puede fluir bajo unas condiciones de esfuerzo y a la vez es elástica porque después de someterlo a un esfuerzo débil recupera parte de su forma original previa al esfuerzo. En reología a la parte elástica del material se le denomina G' (módulo de almacenamiento) y la parte viscosa G'' (módulo de pérdida). Para obtener G' y G'' es necesario realizar ensayos oscilatorios. En los ensayos de curva de flujo, el plato, el cono, o el cilindro giran de manera constante a una velocidad de cizalla determinada. Sin embargo en los ensayos oscilatorios, la geometría oscila, no gira. Esta oscilación tiene forma sinusoidal y por lo tanto es necesario definir la amplitud y la frecuencia de la oscilación.

En general, la reología es útil a la hora de:

1. Entender el comportamiento fundamental de un material.
2. Controlar la calidad de procesos como mezclado, bombeo, envasado y llenado.
3. Estudiar el efecto de diferentes parámetros como la formulación, el tiempo de almacenamiento, y la temperatura en la calidad y nivel de aceptación del producto final.

De esta manera, el desarrollo de sistemas nanoparticulados de closantel puede suponer un gran avance en el tratamiento de las parasitosis. A partir del conocimiento reológico de estos sistemas se podrá estudiar cómo afectan diferentes variables a los preparados farmacéuticos y así comprender el comportamiento de los mismos ante retos de temperatura o tiempo.

2. ANTECEDENTES**2.1 Parasitosis**

La parasitosis es el principal problema en toda explotación ganadera y ningún ganado o animal doméstico escapa de ella. Las enfermedades parasitarias son importantes tanto por la mortalidad que producen, como por las pérdidas en producción que ocasionan.

Según sea la ubicación de los parásitos, la parasitosis puede ser interna o externa y, atendiendo al grado de severidad del ataque, puede ser clínica o subclínica.

La parasitosis clínica es aquella que cursa con toda la sintomatología apreciable a simple vista (enflaquecimiento, diarrea, pelaje opaco y feo, etc.). La parasitosis subclínica, en cambio, se presenta en forma solapada, el animal se muestra aparentemente sano y puede pasar inadvertido si no se efectúan evaluaciones adicionales.

La producción ganadera se realiza predominantemente en áreas templadas y subtropicales, cuyas condiciones favorecen el desarrollo de parásitos gastrointestinales. La mejora de la producción forrajera permitió la mayor concentración de animales en los campos, con el consiguiente aumento de las parasitosis.

2.1.1. Agentes biológicos que causan la parasitosis bovina

Un parásito es aquel ser vivo que se nutre a expensas de otro ser vivo de distinta especie sin aportar ningún beneficio a este último, causándole daño o perjuicio para su salud y producción.

2.1.1.1 Parásitos externos

Como su nombre lo indica, son aquellos que encontramos sobre la piel de los animales. Los más conocidos son: garrapatas, moscas, piojos y pulgas.

2.1.1.1.1 Garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*)

Son muy comunes en climas tropicales. Chupan la sangre del ganado y transmiten microbios que causan enfermedades, llegando a producir la muerte del animal en algunas ocasiones.

Las garrapatas no dejan comer bien al animal y se calcula que una garrapata chupa 3 mL de sangre en 20 días; de ahí que un animal con 300 garrapatas, puede perder fácilmente un litro de sangre cada 20 días.

Los animales altamente infestados de garrapatas sufren de anemia, lo cual los convierte en animales débiles, flacos, poco activos y por consiguiente de bajo rendimiento. Por otro lado, las garrapatas son transmisores de agentes como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, agentes que provocan enfermedades que están asociadas con fiebre y anemia hemolítica progresivas.

2.1.1.1.2 Moscas (*Musca Domestica*)

Las moscas, al no dejar comer a los animales, les impiden alimentarse adecuadamente y por consiguiente no aumentan de peso, ni producen leche.

La mosca brava y la de los cuernos, son moscas picadoras y chupan también sangre. Se calcula que una vaca plagada de moscas puede perder 250 mL de sangre al día y disminuir su producción de leche en un 20%; esto quiere decir que si normalmente produce 5 litros, disminuirá un litro al día. La mosca también es responsable de la transmisión de muchas enfermedades, como fiebre de garrapatas (ranilla blanca), rayo, fiebre aftosa, mal de tierra, mastitis y otras enfermedades graves.

2.1.1.2. Parásitos internos

Los parásitos internos son organismos que viven y se alimentan dentro de los órganos internos del animal, afectando su desarrollo.

Los parásitos internos de los bovinos, que más perjudican económicamente una explotación ganadera, son las ascárides y los tremátodos. Las ascárides se adhieren a distintos órganos de sus huéspedes bovinos y se alimentan de su sangre.

Entre los tremátodos, la *Fasciola hepática* es la más importante en términos económicos, este parásito mide de 20 a 50 mm de largo por 6 a 12 mm de ancho y reside en los conductos biliares del huésped definitivo. Para completar su ciclo biológico, la *F. hepática* necesita dos huéspedes, uno intermediario (caracol) y otro definitivo (mamífero). Se ha señalado que un bovino con fasciolosis crónica deja de ganar aproximadamente 30 kg de carne, por lo que se pierden entre 48 millones y 72.9 millones de kg de carne, además de los hígados decomisados (1.6 a 2.4 millones), la pérdida de la producción de leche, baja de la fertilidad y abortos en algunos casos [29].

2.1.2. Tratamiento de la parasitosis

Los fármacos antiparasitarios son caros, por lo cual los tratamientos deben ser estratégicos en los periodos claves. Más o menos un mes y medio después de que los animales salen a pastoreo, los parásitos empiezan a causar daños, aun cuando los animales se ven aparentemente sanos. No debe esperarse que los animales manifiesten los síntomas (diarrea, enflaquecimiento, pelaje opaco) para efectuar la dosificación antiparasitaria.

En el mercado existen una amplia gama de antiparasitarios y frecuentemente van apareciendo nuevos productos. Pero más importante que el fármaco, es su aplicación en la época oportuna y que sean tratados todos los animales.

Por ejemplo, el control de la fasciolosis, en términos generales, depende de la aplicación correcta de varias medidas preventivas y curativas integradas a un sistema de manejo zootécnico. La aplicación estratégica de estas medidas requiere información epidemiológica sobre la prevalencia de la infección en las diversas zonas ganaderas y en las diferentes estaciones del año. Para establecer un modelo de control mediante tratamientos quimioterapéuticos, es necesario interpretar la situación epidemiológica, de acuerdo a las condiciones climatológicas y de manejo zootécnico locales. Hay que valorar si la transmisión del tremátodo ocurre todo el año, por efecto de la lluvia o el riego, y la temperatura [30], como acontece en varias zonas con clima cálido húmedo del Golfo de México en donde dicha transmisión ocurre todo el año, aunque con diferente grado de

intensidad [31] o si ésta ocurre en una o varias temporadas del año, como en las regiones con clima subhúmedo con una marcada temporada de lluvia, de junio a septiembre, que son las regiones de la costa del pacífico y del altiplano de México.

2.1.2.1 Fármacos antiectoparasitarios

Los productos más empleados son líquidos concentrados que contienen un principio activo contra el parásito pero que además tienen en su fórmula sustancias emulsificantes, disolventes y humectantes que juegan un papel muy importante en la calidad del producto. Los principios activos más usados en el combate contra los parásitos son: organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides sintéticos [32-33].

Compuestos clorados: son estimulantes del SNC, produciendo manifestaciones neuromusculares. Las sustancias activas son Aldrín, Hexacloruro de benceno, Clordano, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, Metoxicloro, Toxafeno, DDT y Hexaclorociclohexano (Lindano) [34]. Algunos de estos compuestos están prohibidos en México [35].

Organofosforados: se caracterizan por inhibir la actividad de la colinesterasa, produciendo exceso de estímulo colinérgico de tipo muscarínico, nicotínico y central [36]. Los organofosforados son lipofílicos, se absorben a través de la piel y se acumulan en tejido adiposo donde son liberados lentamente a la sangre y otros líquidos fisiológicos (leche), por acumulación pueden dar origen a un estado de envenenamiento crónico, motivo por lo que su uso es restringido.

A pesar de su estabilidad sobre el pelo, lana y piel, solo tienen una permanencia de 4 a 8 días al ser absorbidos por la piel o al ser eliminados por otras vías. Los medicamentos de mayor uso en este grupo son: Azinfosmetilo, Carbofenatión, Clorfenvinfós, Clorpirifós, Coumafós, Diazinón, Diclorvós, Dioxatión, Feniltrotion, Fentiión, Fosmet, Foxim, Malatión, Paratión, Tiofós y Triclorfón [34].

Carbamatos: Actúan de modo similar a los organofosforados inhibiendo la colinesterasa. Los principios activos más conocidos son: Carbaril, Carbofurán, Metonilo y Propoxur [34].

Piretroides: Actúan provocando un bloqueo de la actividad motriz o bien por la producción de excitación, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte.

Entre los fármacos más frecuentes en este grupo se encuentran: Aletrina, Cihalotrina, Cipermetrina, Deltametrina, Fenvalerato, Fenotrín, Flucitrinato, Flumetrina, Permetrina y Resmetrina. Estos compuestos tienen efectos residuales importantes [34].

Formamidinas: Ocasionan la muerte del ectoparásito por inhibición de la monoaminoxidasa, sus blancos más importantes son los receptores de la optopamina. El producto de mayor uso es el Amitraz [36].

Según *Encinas et al* [34] los componentes anteriores son neurotóxicos. Sus blancos más importantes son los canales axonales del sodio (DDT y piretrinas), la acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos), los receptores de la optopamina (formamidinas), y los receptores del GABA (Lindano).

Otros compuestos químicos utilizados han sido las benzolifenilúreas: la mayor parte de los representantes de este grupo son altamente eficaces contra los insectos pero no contra las garrapatas [36]. Las sustancias con acción sobre estos ectoparásitos como el Fluazurón, se caracterizan por interferir principalmente en la formación de la quitina, impidiendo la formación de la cutícula del parásito, considerándose inhibidores de las mudas y del crecimiento [37]. Por otro lado estas sustancias intervienen en el funcionamiento de las glándulas salivales, afectando la nutrición de los diversos estadios. Las células excretoras también se ven afectadas, ocasionando desequilibrios en la hemolinfa [36].

La reducción progresiva del volumen de acaricida es posible mediante la utilización de acaricidas de acción sistémica administrados por vía oral o subcutánea [37]. Entre los garrapaticidas sistémicos se encuentran los derivados de las lactonas macrocíclicas, los cuales han demostrado tener acción sobre garrapatas de uno y tres hospederos.

La ivermectina es uno de estos compuestos que aplicado a 200 µg/kg en inyección subcutánea controla las garrapatas [37]. Otros derivados de la ivermectina, como

moxidectina y doramectina, están siendo desarrollados con buenas perspectivas para su uso como garrapaticida [38].

El closantel (5 mg/kg) también se ha empleado como garrapaticida y ha demostrado eficaz protección sobre formas inmaduras de *B. microplus* y reducción en la eclosión de los huevos de hembras tratadas. Ofrece además, buena protección vía SC (6 semanas para *Amblyomma*) y por vía oral a igual dosis a los parásitos presentes en el animal [34].

2.1.2.1.1 Closantel

El closantel es un antihelmíntico de la familia de las salicilanilidas (Figura 2). Es un producto de síntesis [39] que se caracteriza por su acción sistémica de efecto prolongado y residual. Una vez introducido en el organismo, entra en el torrente sanguíneo y se une a las proteínas plasmáticas [40-41].

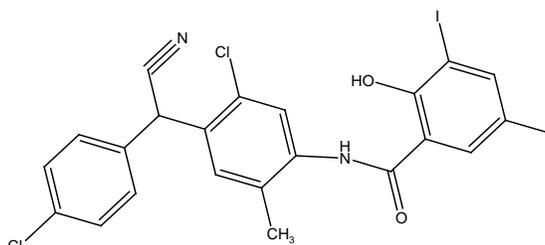


Figura 2. Closantel

Los parásitos hematófagos y linfófagos por su forma de alimentación, se exponen al fármaco. Éste provoca a nivel celular una interrupción en el transporte de energía, y el parásito al carecer de la misma, no puede realizar sus funciones vitales y muere.

El closantel puede utilizarse en formulaciones orales o inyectables, es altamente recomendado para el tratamiento y control de ecto y endoparásitos que afectan a: equinos, bovinos, ovinos y caninos. Ha demostrado una excelente actividad parasiticida contra nemátodos, tremátodos y artrópodos [42-44].

Propiedades fisicoquímicas del closantel**Fórmula molecular****Nombre químico:**

N-[5-cloro-4 [(-clorofenil) cianometil]-2-metilfenil]-2-hidroxi-3,5-diodobenzamida

Solubilidad

Soluble en dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tetrahidrofurano y acetona. Poco soluble en metanol y etanol. Prácticamente insoluble en agua.

Punto de fusión: 220-230 °C

Toxicidad

Aguda oral en ratones DL₅₀ 330 a 450 mg/kg.

Aguda oral en ratas 262 a 342 mg/kg

Desempeño biológico

La propiedad del closantel de adherirse a las proteínas plasmáticas le confiere una gran residualidad, desde las 24 h de su aplicación en que adquiere su máxima concentración y se extiende más allá de las 7 semanas, evitando las reinfestaciones, cualidad que carecen los antiparasitarios comunes (bencimidazoles y levamisoles) [45-46].

2.2 Formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM)

Durante varias décadas el tratamiento de las enfermedades ha sido acompañado por la administración de las formas farmacéuticas convencionales, tales como las tabletas, cápsulas, cremas, ungüentos, jarabes, aerosoles, inyectables y supositorios. Sin embargo, tales 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 es necesario administrar este tipo de medicamentos varias veces al día provocando así, molestias al paciente por la frecuencia alta de dosificación, además de los efectos adversos del fármaco y de que sólo una pequeña cantidad de fármaco llega al sitio donde se requiere.

En años recientes los avances en biotecnología y varios otros campos han llevado al desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada de fármacos. Inicialmente estos desarrollos estuvieron enfocados a la medicina humana, sin embargo el uso de tecnologías de liberación modificada fue iniciado a mitad de los años 70 para aplicación veterinaria [47-48].

En la medicina veterinaria, las razones principales por las cuales se formula un fármaco dentro de un sistema de liberación modificada son para reducir el estrés del animal cuando se le administra un medicamento y para reducir costos [49]. Los sistemas de liberación modificada son más convenientes de administrar que dosis repetidas. Adicionalmente estas formas de dosificación pueden reducir la exposición de los seres humanos a los fármacos que sean tóxicos a la manipulación [47, 50].

El mayor mercado para la aplicación de las tecnologías de liberación modificada en el área veterinaria es la prevención y control de las enfermedades a través de la liberación de fármacos antimicrobianos y antiparasitarios en los animales de compañía y de granja [49, 51].

Otro mercado incluye el control de la fertilidad en animales de compañía y promoción del crecimiento mediante agentes nutricionales en animales de granja. Áreas de menor interés, como manejo de animales silvestres y animales de zoológicos son otros nichos de oportunidad [47, 49].

En medicina veterinaria, los sistemas de liberación modificada pueden ser divididos en dos amplias categorías: animales destinados al consumo, el cual es el principal mercado con aproximadamente 70% de las ventas totales, y por otro lado los animales de compañía acapara el 30% restante. Los animales de consumo constan principalmente de ganado bovino, ovino, porcino y aves de corral, junto con el pescado y otros animales de los cuales se obtienen: huevo, carne o leche. Los animales de compañía comprenden principalmente caballos, perros y gatos [50].

Es muy importante conocer si el sistema de liberación del fármaco que se intenta formular es para fines individuales (animales de compañía) o para uso grupal (hatos de ganado). La razón de lo anterior es porque el precio es menos

importante para el caso de animales de compañía que para animales de consumo. De hecho el aspecto económico cambia entre los diferentes tipos de animales. Los ganaderos constantemente comparan el costo del tratamiento con los resultados. En general el costo de los sistemas de liberación modificada de fármacos es más alto que las terapias convencionales pero con la ventaja de que ofrecen mayores beneficios. Por ejemplo, cada visita del veterinario está asociada con el costo de su tiempo y experiencia, y entre más frecuente debe ser administrado un producto, más grande es el costo del tratamiento. Además, el desarrollo de un sistema de liberación permite el tratamiento de un mayor número de animales en una sola temporada. De este modo los mejores productos serán aquellos que maximicen los beneficios terapéuticos a un costo mínimo y máxima conveniencia al productor. En contraste, el mercado para los animales de compañía es algo diferente, ya que el costo potencial y el margen de ganancias asociado con un producto desarrollado para un animal de compañía puede ser mucho más alto, este costo dependerá del valor sentimental y de los recursos financieros del dueño [51].

En términos del esfuerzo en el desarrollo y en la naturaleza del trabajo a realizar, existen numerosas diferencias entre la medicina veterinaria y la humana; en primer lugar los productos veterinarios requieren de regulaciones adicionales que los medicamentos de uso humano, por ejemplo: análisis detallados de los residuos y seguridad para el manipulador, particularmente para los animales de consumo. Los residuos en tejidos son los niveles del fármaco que permanecen al momento del sacrificio. Para asegurar que estos niveles no causen daños a los humanos, el tiempo requerido después de la administración del fármaco debe estar en niveles no tóxicos y esto debe asegurarse. El sacrificio del animal antes de esta fecha no debe permitirse. Esta cuestión afecta fuertemente los aspectos económicos del producto, en particular, influye directamente en la propuesta de formulación para una aplicación dada. Sin embargo, todas las pruebas in vivo pueden llevarse a cabo en la especie para el cual ha sido diseñado el tratamiento; de esta manera se elimina la incertidumbre ligada a la correlación entre los modelos animales y de esta manera da una mayor ventaja. Además, muchos productos veterinarios son

almacenados en condiciones extremas de temperatura y de humedad, por lo tanto deben ser capaces de soportar tales condiciones [50-51].

Debido a las variaciones que existen entre las diferentes especies, cada producto para aplicación veterinaria deberá tener un diseño especial, y éste dependerá de la eficacia y potencia del fármaco dentro de cada especie en particular [47, 50].

Sistemas de liberación modificada de fármacos por vía oral

Aunque la vía de administración oral en humanos cuenta con algunas ventajas, esto no necesariamente aplica para los animales, en especial en cuanto a la fácil administración, ya que la vía oral está restringida para la liberación de fármacos. Aunque la administración de sistemas de liberación modificada en los humanos por vía oral reduce las fluctuaciones en las concentraciones séricas y es invaluable en el tratamiento de numerosas enfermedades, y de que se reduce la frecuencia de las administraciones de una o dos veces diarias, que en otras circunstancias requeriría de 3 y hasta cuatro veces diarias; en los rumiantes, estas extensiones en tiempo de entrega ofrecen poca o nula ventaja. En consecuencia, los sistemas orales (rumenal) de liberación de fármacos veterinarios, se desarrollan para liberar sus contenidos durante largos periodos (hasta varios meses) [51-53].

La mayoría de las formas de dosificación oral de liberación modificada caen dentro de una de las siguientes categorías:

- (1) Sistema matricial: El fármaco está disperso en una matriz polimérica y la liberación tiene lugar por la partición del fármaco dentro de la matriz polimérica y el medio de liberación. La liberación del fármaco a partir de este sistema puede ser sensible a los alimentos y al pH del contenido gastrointestinal.
- (2) Sistema reservorio: La forma de dosificación consta de un núcleo de fármaco rodeado por una membrana. La liberación del fármaco a partir de este sistema puede ser influenciado por los alimentos y el pH gastrointestinal.
- (3) Sistema osmótico: La presión osmótica es utilizada para la liberación de fármacos. Este evento se produce independientemente del pH o de otros parámetros fisiológicos. Este mecanismo puede utilizarse para liberar fármacos a

una velocidad predeterminada. Puede hacerse una categorización similar para productos orales (rumenal) formulados para uso veterinario [52].

Los recientes avances en tecnología de liberación de fármacos en humanos permiten adaptar patrones de liberación de fármacos para maximizar el efecto terapéutico. Por ejemplo, los sistemas Geomatrix® (SkyePharma) utilizan un sistema multicapa (núcleo de principio activo más barreras poliméricas) para lograr un perfil de liberación de fármacos deseado. Las barreras poliméricas consisten en hidroxipropilmetilcelulosa de distintos tipos, pesos moleculares y viscosidades. Éstas están incorporadas en proporciones específicas para lograr un patrón de liberación deseado, lo que permite una liberación de orden cero y la liberación modificada de dos fármacos diferentes dentro de una misma formulación. Existen otros numerosos ejemplos que están siendo comercializados o que se encuentran en desarrollo.

Se están haciendo esfuerzos similares en el ámbito veterinario, para lograr esto, las características anatómicas únicas de los animales están siendo explotadas. El enfoque, conocido por muchos años, involucra dispositivos densos que se hunden en la parte inferior del rumen donde se mantiene. Un ejemplo de un sistema de liberación de este tipo recientemente fue desarrollado para mejorar la eficacia de un medicamento existente, es la Cápsula del Tiempo, (Celentis). Éste libera óxido de zinc hasta por 6 semanas en el ganado ovino para tratar el eczema facial. El sistema de liberación consta de un núcleo de óxido de zinc, unido a agentes liberadores, los cuales son extruidos y, a continuación, se introducen en una capa cerosa impermeables al agua [52].

Otro ejemplo es el sistema terapéutico rumenal (RUTS) Push-Melt™. Dos fármacos, ivermectina y selenio, han sido exitosamente liberados utilizando esta tecnología por periodos de hasta 135 y 120 días, respectivamente. RUTS es un sistema osmóticamente gobernado. Después de la administración en el rumen, el incremento de temperatura provoca una capa de fármacos especialmente formulado para fundirse y de ésta manera fluir. Simultáneamente, el agua entra a través de la membrana semipermeable lo que resulta en el hinchamiento de la tableta osmótica, que empuja a un tapón que comprende ceras de parafina y CAB-

O-Sil (dióxido de silicio). El tapón se comporta como un pistón y empuja la capa de fármaco ahora líquido a través de un puerto de salida y fuera del dispositivo a través de un orificio. La velocidad de liberación puede ser hecha a la medida para maximizar el efecto terapéutico [53].

Por otra parte se han hecho esfuerzos para tratar de retardar el tránsito gastrointestinal de los fármacos, algunos ejemplos que se mencionan en la literatura son los siguientes:

Dispositivos gastroretentivos: prolongan la residencia gástrica y reducen los problemas asociados con el vaciamiento gástrico errático, se han hecho intentos para aumentar la retención gástrica. Los dispositivos incluyen:

Sistemas flotantes: sistemas hidrodinámicamente equilibrados, como por ejemplo microesferas flotantes que son sistemas multiparticulados de liberación modificada, tienen la ventaja de retención gástrica por hasta 12 h en los seres humanos. El fármaco está contenido en el núcleo interno hueco de la microesfera flotante y es liberado en el estómago a un ritmo lento. Tras la liberación del fármaco, el sistema residual es eliminado del estómago. Sin embargo, la mayoría de los estudios indican que la retención de estos sistemas está fuertemente afectada por el estado pandrial del paciente y el dispositivo transita más rápidamente cuando se está bajo ayuno [53].

Sistema hinchables: el dispositivo se hincha hasta un punto en que es incapaz de salir del estómago a través del píloro. En consecuencia, la forma de dosificación se conserva en el estómago durante más tiempo [53].

Dos propiedades importantes de estos sistemas son la velocidad a la cual ocurre el hinchamiento y la resistencia mecánica del dispositivo. En particular, los dispositivos hinchables necesitan hincharse completamente antes de que suceda el vaciamiento gástrico (es decir, debe lograr el hinchamiento dentro de 20 minutos o menos). Aunque todavía depende de la presencia de alimentos, un hallazgo prometedor de estos sistemas fue mantenerse durante más de 24 h dentro del estómago de perros alimentados [54].

- Sistemas bioadhesivos: el dispositivo está formulado para adherirse a un sitio dirigido dentro del tracto gastrointestinal, donde el fármaco es liberado.

- Sistemas modificados en su forma: formas no desintegrables hechas de elastómero o de mezclas de polietileno. Basándose en las funciones fisiológicas normales, el dispositivo se mantiene dentro del estómago debido a su tamaño, la forma o flexibilidad.
- Formulaciones de alta densidad: el dispositivo literalmente se hunde en el estómago, con lo que retrasa su salida durante el vaciado gástrico. Estas tecnologías destacan porque algunas podrían encontrar aplicación para la liberación de fármacos en pequeños animales, aunque existe marcada variación en la velocidad de vaciamiento gástrico tanto dentro, como entre especies; lo que lo convierte en un reto. Sin embargo, para las especies rumiantes, la duración deseada de liberación es generalmente en el orden de semanas o meses, en lugar de horas. Por lo tanto, las tecnologías descritas son poco probables de encontrar aplicación en este grupo de especies animales [52].

Sistemas de liberación modificada de fármacos por vía parenteral

A causa de las limitaciones de la transferencia de tecnologías orales humanas a especies de rumiantes y monogástricos, la liberación parenteral podría proporcionar una opción más favorable. Entre éstas se incluyen tecnologías como: microesferas, preparados liposomales, implantes y los inyectables que forman depósito, todos tienen potencial de ser aplicados tanto en humanos como en medicina veterinaria. Entre los productos inyectables ya comercializados, pueden nombrarse, entre otros:

1.- Implante de Formación *in situ* (Atrigel®)

El sistema ATRIGEL ® consta de polímeros biodegradables disueltos en un acarreador biocompatible. Cuando el sistema de polímero líquido se inyecta, forma un implante sólido en contacto con los fluidos acuosos del cuerpo. Si un fármaco es incorporado en la solución de polímero, queda atrapado dentro de la matriz polimérica solidificada. El fármaco es entonces liberado con el tiempo conforme el polímero se biodegrada [51-52, 55].

2.- Micropartículas

Ha habido varios usos veterinarios propuestos para formulaciones de microesferas. Las aplicaciones incluyen la liberación de vitamina B12, moxidectina, estradiol y progesterona, estradiol e ivermectina [51].

El primer producto veterinario comercialmente disponible basado en micropartículas fue lanzado en Nueva Zelanda (SMARTShot B12™). Este producto inyectable contiene vitamina B12 que continuamente se libera por más de 200 días. Más recientemente la FDA ha aprobado ProHeart®6 (Fort Dodge Animal Health) (moxidectina) para la protección contra la enfermedad de Heartworm causada por *Dirofilaria immitis* en perros. El producto se proporciona en dos viales independientes que se mezclan antes de su uso; la administración subcutánea de este producto proporciona una duración de seis meses de actividad terapéutica.

Además, una preparación de microesferas de ácido poliláctico (PLA) ha sido desarrollada para proveer una liberación prolongada de ivermectina para controlar parásitos.

En general los sistemas de liberación modificada abarcan una gama amplia de dispositivos; desde aerosoles para la terapia de inhalación hasta cápsulas de alta tecnología que liberan la carga a los sitios específicos del cuerpo [51].

2.2.1 Sistemas acarreadores

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 modifiquen las propiedades de las moléculas activas, incluyendo aquellas relacionadas con su comportamiento en el organismo. Muchos tipos de biomateriales han sido desarrollados, siempre considerando la finalidad última: lograr un sistema de liberación modificada, evitando afectar de manera negativa al

organismo y fármaco. Los materiales deben ser, preferentemente 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, lípidos, diferentes tipos de tensoactivos y polímeros naturales (albúmina, gelatina, colágeno, etc.) o sintéticos (polianhidros, poli- ϵ -caprolactona, polioctoésteres, etc.).

Para conocer como 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.

Los acarreadores más utilizados se pueden clasificar en tres grupos:

- a) **Coloidales:** liposomas, niosomas, micropartículas y nanopartículas.
- b) **Moleculares:** ciclodextrinas, anticuerpos y dendrímeros.
- c) **Celulares:** eritrocitos resellados.

2.2.1.1 Sistemas coloidales

Son todos aquellos constituidos por partículas menores a 1 μm . Entre los más mencionados en la liberación modificada se encuentran: liposomas, niosomas, nanopartículas y micropartículas.

2.2.1.1.1 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 3).

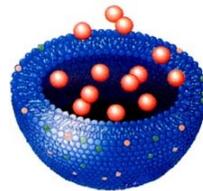


Figura 3. Esquema representativo de un liposoma

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 fármacos, a nivel farmacéutico y cosmético [56]. Los liposomas varían según el tipo de lípido utilizado, 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. En preparaciones farmacéuticas los más utilizados son los liposomas unilamelares (40-250 nm). Entre sus aplicaciones terapéuticas se encuentran la aplicación de doxorubicina (Doxil[®], Caelyx[®], Myocet[®]) clorhidrato de doxorubicina en capsulado en liposomas Stealth para administración intravenosa, además, Fungizone[®] (Amfotericina-B), Novasome[®] (vacuna Smallpox) y Nyotran[™] (Nistatina). Entre sus aplicaciones cosméticas se encuentra en el mercado: *Rovisome Acné* (Rovi), *Isozell*[®] (Lucas Meyer) y *Capture*[®] (Christian Dior) [57-58].

2.2.1.1.2 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 alquil-éteres 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 eficiencia de carga de fármaco 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 electrostática, mayor atrapamiento).

Entre sus aplicaciones terapéuticas se pueden mencionar la administración intravenosa de doxorubicina (Doxil[®]), la administración oral de metotrexato y la administración transdérmica de estradiol [59-61].

2.2.1.1.3 Micropartículas

Son partículas pequeñas, del orden de 1 a 100 μm . 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.

Las micropartículas cuando son inyectadas en algún tejido tienden a estar en ese lugar, por ejemplo, cuando fueron inyectadas micropartículas de 60 μm compuestas de un polímero de degradación lenta en el nervio ciático, se encontraron grandes cantidades de éstas en el sitio de aplicación ocho semanas después [62].

Las diferencias entre micro y nanopartículas pueden ser observadas en la cavidad abdominal de ratones; micropartículas de 5, 25, 60 y 250 μm inyectadas en ese sitio permanecieron ahí por al menos dos semanas. En contraste una masa igual de nanopartículas del mismo material mostró casi un completo aclaramiento en el peritoneo en el mismo periodo [63].

El tamaño tiene un marcado efecto en el destino de las partículas inyectadas en la vasculatura. Las micropartículas grandes pueden embolizar los vasos sanguíneos del mismo diámetro, y esta propiedad puede ser utilizada para ocluir intencionalmente el flujo sanguíneo, con o sin liberación de fármaco concurrente, como quimioembolización de carcinomas hepatocelulares. Para uso intravenoso, las partículas grandes podrían alojarse en la vasculatura pulmonar el cual podría o no ser un problema clínico. En general, es improbable que las micropartículas crucen la mayoría de las barreras biológicas, y por lo tanto frecuentemente la liberación es realizada en el sitio de interés.

Las partículas entran a las células por una serie de procesos llamado endocitosis, el cual incluye fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis es la toma de partícula de por lo menos 10 μm de diámetro, y puede ser realizado por relativamente pocas células, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. El mecanismo de pinocitosis puede ser hecho por todo tipo de células, y pueden capturar partículas submicrónicas y sustancias en solución. Consecuentemente las micropartículas pueden solamente ser liberadas dentro de células que son fagocíticas, mientras que las nanopartículas pueden ser liberadas en prácticamente cualquier célula.

El uso de micropartículas ha sido generalizado en los últimos años. Se pueden encontrar sistemas de liberación dirigidos prácticamente en 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 [64-65]. Se han utilizado con antineoplásicos, broncodilatadores, antiinflamatorios, etc., suponiendo un gran auge en el ámbito farmacéutico [66].

2.2.1.1.4 Nanopartículas

Son partículas coloidales las cuales tienen un tamaño entre los 10 y 1000 nm. Están hechas de materiales macromoleculares en el cual el fármaco está disuelto, atrapado o encapsulado. Este material debe ser preferentemente biodegradable.

Debido a que el diámetro del capilar más pequeño en el cuerpo humano es de alrededor de 4 μm , las nanopartículas deberán tener un menor diámetro para poder llegar a los sitios blancos en el cuerpo: Su tamaño pequeño también disminuirá una posible irritación en el sitio de inyección.

A pesar de que los liposomas, niosomas y microemulsiones son muy similares a las nanopartículas poliméricas con respecto a su tamaño, forma y modo de administración; las nanopartículas ofrecen ventajas adicionales, tales como: alta estabilidad cuando están en contacto con los fluidos biológicos, alta capacidad de carga y protección del fármaco por la matriz polimérica contra la degradación, todo esto llevando a una alta concentración intracelular del fármaco. También debido a su naturaleza polimérica, una liberación modificada puede ser alcanzada.

La elección del polímero, tamaño y método de preparación dependerá de la bioaceptabilidad del mismo, las propiedades fisicoquímicas del fármaco, del polímero y de la aplicación terapéutica [67].

2.2.1.1.4 1 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

Se mencionan muchos métodos en la literatura para llevar a cabo la elaboración de nanopartículas, ya sean de matriz polimérica o lipídica. En general se pueden

dividir en aquellos en el que se parte del polímero previamente sintetizado y a partir de los monómeros.

2.2.1.1.4.1.1 A partir de polímeros previamente sintetizados

2.2.1.1.4.1.1.1 A partir de microemulsiones:

A mitad de los años setenta, S. Friberg [68] y más tarde F. Gault propusieron un método basado en microemulsiones (ME) para preparar partículas monodispersas de tamaño nanométrico. Esta idea fue ampliamente aceptada y se vio reflejada en gran cantidad de publicaciones involucrando microemulsiones como patrones para formar nanopartículas, inicialmente inorgánicas [69-71].

Las microemulsiones son sistemas dispersos de dos líquidos inmiscibles estabilizados por un tensoactivo o mezclas con cotensoactivos. Son ópticamente transparentes, se forman espontáneamente y son termodinámicamente estables. Habitualmente presentan estructuras esféricas de tamaños nanométricos.

Su uso para formar sistemas nanométricos de diferentes materiales se basa en considerar que la forma y el tamaño de las nanogotas pueden servir para sintetizar nanopartículas [72-73].

Muchos sistemas diferentes basados en microemulsiones han sido utilizados para formar partículas de talla nanométrica. Inicialmente la mayor parte de los estudios se llevaron a cabo realizando la síntesis del material polimérico in situ, tratando las nanogotas como si fueran nanoreactores [74-75]. También se usan de este modo en la síntesis de nanopartículas inorgánicas, a partir de ME reversas usando el sistema para lograr nucleación controlada [76-79]. También, cabe la posibilidad de sintetizar nanopartículas orgánicas por procesos de precipitación desde ME. Se ha demostrado que la síntesis de nanopartículas en microemulsión permite obtener poblaciones monodispersas y en algunos casos controlar el tamaño de partícula por variación del tamaño de las “gotas de la microemulsión” [80].

2.2.1.1.4.1.1.2 Emulsificación- evaporación

- a) El polímero y el fármaco se disuelven en un medio orgánico inmiscible con el agua, esta solución se adiciona a una disolución acuosa de estabilizante

mediante agitación u otro mecanismo que lleve a disminuir el tamaño del glóbulo de la preemulsión formada.

- b) Se elimina el disolvente orgánico mediante vacío, calor o ambos.
- c) El resultado es la formación de una dispersión de nanopartículas [81-82].

2.2.1.1.4.1.1.3 Emulsificación-difusión

Se puede considerar una modificación del método antes mencionado.

- a) El polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente que sea parcialmente miscible con el agua (alcohol bencílico, acetato de etilo), y que previamente se satura con agua.
- b) Se adiciona la fase anterior a una disolución acuosa que contiene un estabilizante.
- c) Al adicionar más agua se genera una difusión espontánea del disolvente, lo que genera una turbulencia interfacial entre las dos fases llevando a la formación de las nanopartículas.
- d) El disolvente es eliminado mediante vacío, calentamiento o simple agitación mecánica [81-83].

2.2.1.1.4.1.1.4 Desplazamiento del disolvente

- a) Se disuelve el polímero, el fármaco, y en ocasiones, un estabilizante en un medio semipolar, miscible con el agua.
- b) Se adiciona la mezcla a una disolución acuosa con un estabilizante (alcohol polivinílico o pluronic F-68, principalmente) manteniendo agitación.
- c) Las nanopartículas se forman inmediatamente debido a una rápida difusión del disolvente no acuoso, el cual es eliminado mediante calentamiento, simple agitación o bajas presiones [81-82].

2.2.1.1.4.1.1.5 Precipitación por adición de sales neutras

Está basado en la separación de un disolvente miscible con agua de una disolución acuosa mediante precipitación.

- a) El polímero y el fármaco son disueltos en acetona (ya que se conoce muy bien su comportamiento).
- b) Mediante agitación es emulsificada en un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante coloidal.
- c) Se adiciona la suficiente cantidad de agua para que aumente la difusión de acetona a la fase acuosa y se formen las nanopartículas.
- d) Finalmente se elimina el disolvente [81-82].

2.2.1.1.4.1.2 A partir de monómeros

2.2.1.1.4.1.2 1 Polimerización en emulsión

- a) Para producir nanopartículas por polimerización *in situ*, se añade un monómero en una emulsión en lugar de la solución de polímero.
- b) Se inicia la reacción de polimerización.
- c) El fármaco puede ser adicionado en el medio de polimerización antes de la adición del monómero o al final de la reacción de polimerización.
- d) Precipitación de las nanopartículas [81].

2.2.1.1.4.1.2 2 Polimerización en fase acuosa continua

- a) Se disuelve el monómero en una disolución acuosa, con o sin estabilizantes, en la que también está disuelto el fármaco.
- b) Se inicia la polimerización mediante radiación o iniciación química.
- c) Debido a que el polímero es insoluble en el medio utilizado hay una precipitación y formación de las nanopartículas [81].

2.2.1.1.4.1.2.3 Polimerización interfacial

- a) Se disuelven fármaco y monómero en la fase en que son solubles.
- b) 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).
- c) Si el proceso de polimerización es muy rápido, se forma una capa impermeable del polímero, dando como resultado nanocápsulas.

Si el proceso es lento, la polimerización se dará en el total de la masa y se formarán nanopartículas sólidas [81].

Observando lo anterior, se puede decir que la metodología en la cual se parte de polímeros preformados es más sencilla, ya que debido a la naturaleza multicomponente del medio de polimerización es muy difícil predecir el peso molecular del material polimerizado, en algunos casos se puede inhibir la actividad del fármaco debido a que interactúa con algunos monómeros activos y finalmente una limitante principal es la presencia de residuos tóxicos (monómeros sin reaccionar y entrecruzadores).

2.2.1.1.4.2 Factores de formulación y de proceso involucrados en la elaboración de nanopartículas de PLGA

En general, los factores más importantes que afectan el tamaño de partícula son: la relación del copolímero, concentración del polímero, naturaleza y cantidad del disolvente, peso molecular del estabilizante polimérico, viscosidad, velocidad de agitación, temperatura y velocidad de adición de la fase orgánica [84].

2.2.1.1.4.2.1 Relación de copolímero

Las relaciones del copolímero de PLGA más usados son el 50:50 y el 75:25, Konan *et al.* [84] emplearon estos dos copolímeros y encontraron diferencias mínimas en los tamaños de partícula obtenidos (93 y 95 nm respectivamente). También Mittal *et al* [85] observaron lo mismo al elaborar nanopartículas de PLGA 50:50, 65:35 y 85:15, obtuvieron tamaños de 118,126 y 129 nm respectivamente.

2.2.1.1.4.2.2 Concentración de PLGA

Utilizando PVA al 2.5%, carbonato de propileno como disolvente e incrementar la concentración de PLGA de 1 a 4% (p/v), Kwon *et al* [84] observaron un aumento en el tamaño de partícula de 205 a 290 nm. En tanto que Lee *et al* [86] obtuvieron resultados similares, tamaños de 120 y 230 nm para concentraciones de PLGA de 1 y 5% respectivamente utilizando como disolvente acetato de etilo y como estabilizante pluronic F-127 al 5%. Mainardes *et al.* [87] encontraron la misma

respuesta, empleando 12.5, 25 y 50 mg de PLGA obtuvieron tamaños de 243, 255 y 360 nm respectivamente.

2.2.1.1.4.2.3 Naturaleza y cantidad de la fase orgánica

De acuerdo con los resultados obtenidos por Choi *et al* [88], el tamaño es afectado de la siguiente manera, al utilizar diferentes disolventes para disolver al PLGA 75:25 y como estabilizante poloxámero 188: 120 nm para acetato de etilo, 125 nm para etilcetona y 260 nm utilizando alcohol bencílico. Los autores sugieren que con los disolventes con baja relación de intercambio (relación entre difusión del disolvente hacia el agua y viceversa) y alta interacción polímero disolvente producen nanopartículas menores debido a que producen regiones pequeñas de saturación [84]. Nguyen *et al.* [89] prepararon nanopartículas de PLGA, obteniendo tamaños de 200.4 y 642.3 nm utilizando dimetilacetamida y acetona respectivamente. Por otra parte al cambiar la proporción de fase interna (disolvente orgánico), Mainardes *et al.* [87] encontraron que al variar de 1 a 3 mL de diclorometano los tamaños de partícula fueron los siguientes: 298, 275 y 248 nm respectivamente.

2.2.1.1.4.2.4 Efecto del tensoactivo o estabilizante

Kwon *et al* [90] utilizaron PEG, Tween 80, gelatina, dextrano, pluronic L63, PVA y Bromuro de dimetil amonio (DMAB). Sólo PVA y DMAB formaron nanopartículas con el método de emulsión difusión. Con DMAB al 2% se obtuvo un tamaño de partícula de 76 nm y con PVA al 5% se obtuvo un tamaño de 210 nm. Al incrementarse la concentración de DMAB de 2 al 4% el tamaño disminuyó a 75 nm. El menor tamaño de partícula obtenido con DMAB se atribuyó a que disminuye la tensión superficial comparada con el PVA [84]. Mainardes *et al.* [87] evaluaron tres concentraciones de PVA, 0.15, 0.30 y 0.70 % p/v, y los tamaños de partículas fueron de 335, 260 y 242 nm respectivamente en concordancia con lo arriba mencionado.

2.2.1.1.4.2.5 Viscosidad de la fase continua y de la fase discontinua

Ahlin *et al* [91] prepararon fases continuas con diferentes viscosidades utilizando PLGA de diferentes masas moleculares. La concentración del PLGA fue de 5% en alcohol bencílico y las viscosidades fueron las siguientes: 0.03, 0.036 y 0.046 Pa.s para PLGA 50:50 (12 kDa), PLGA 75:25 (12 kDa) y PLGA 75:25 (63 kDa) respectivamente. Se obtuvieron nanopartículas de 175, 220 y 280 nm al incrementar la viscosidad de 0.03 a 0.046 Pa.s, la conclusión de esto fue que el tamaño de la nanopartícula incrementa con el incremento de la viscosidad de la fase dispersa, mientras que una disminución es observada cuanta más viscosa es la fase continua.

2.2.1.1.4.2.6 Velocidad de homogenización y de agitación

Lee *et al* [86].evaluaron el efecto de la velocidad de homogenización (añadiendo la fase orgánica a la fase acuosa). El intervalo de velocidad probado fue de 5,000 a 15,000 rpm para una suspensión con 5% de PVA por un tiempo fijo de 7 minutos. Se obtuvieron tamaños de 200 nm para velocidades de hasta 11,500 rpm, y a revoluciones más altas (22,000), tamaños de partícula de 120 nm, al emplearse mayores velocidades ya no se obtuvieron decrementos significativos. En estos experimentos no se menciona el sistema hidrodinámico los cuales pudieran afectar el tamaño de gota.

2.2.1.1.4.2.7 Temperatura del agua añadida para la difusión del disolvente

Una importante reducción en el tamaño de las nanopartículas puede ser obtenido al controlar la temperatura del agua que se añade para permitir la difusión del disolvente. Kwon *et al*. [90] con PVA al 5% y con DMAB al 2% con una velocidad constante de adición de agua de 16 mL/s, para ambos tensoactivos se observó un decremento con el incremento de la temperatura de agua adicionada. Utilizando DMAB, los tamaños obtenidos fueron de 65 y 78 nm para temperaturas de 60 °C y 25 ° C respectivamente. Empleando PVA, se obtuvieron tamaños de 170 y 204 nm para temperaturas de 60 °C y 25 °C respectivamente. A pesar de dichas ventajas,

el inconveniente de esto es el efecto de la temperatura del agua sobre la estructura polimérica, debido a que la T_g del PLGA está por debajo de 60 °C.

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, existen varios métodos para la elaboración de nanopartículas de PLGA, cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas, pero como siempre, será el principio activo el que determine cual método elegir de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y de la aplicación que se le quiera dar.

2.2.1.1.4.3 Nanopartículas sólidas lipídicas (NSL)

Además de las nanopartículas formadas a partir de polímeros naturales o sintéticos, destacan actualmente las formadas a partir de lípidos sólidos, conocidas como nanopartículas sólidas lipídicas (NSL). Éstas surgieron en 1991 y reúnen las ventajas de los sistemas tradicionales, por una parte se pueden utilizar moléculas no tóxicas para el organismo, como en el caso de los liposomas pero con mayor estabilidad, y por otra parte se consiguen tamaños nanométricos [92-93].

Las técnicas usadas para preparar NSL son: homogeneización por alta presión (en frío o en caliente), microemulsión, 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 homogeneiza con alta presión. La emulsión se enfría y la resolidificación del lípido lleva a la formación de las estructuras nanométricas. También es posible encapsular fármacos sensibles a la temperatura o moléculas hidrofílicas mediante mezclado en frío, de este modo se evita en parte, la migración del fármaco a la fase acuosa durante el proceso inicial de formación de la preemulsión.

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 NSL 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 NLS es necesario eliminar una cantidad excesiva de agua.

En el tercer caso, el lípido se disuelve 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 no ser soluble precipitará dando lugar a las NSL. Sin embargo este método tiene el problema, como en el caso de nanopartículas convencionales, de emplear disolventes orgánicos [92].

En el último caso, el fármaco se disuelve en una fase interna acuosa que es emulsificada a velocidad alta (Ej. ultraturrax) 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.

Naturaleza química y estructura cristalina: los lípidos pueden formar partículas muy cristalinas, lo cual hace que se forme una red perfecta y las moléculas extrañas, el fármaco, sea eliminado. Para evitar esto, se utilizan mezclas de lípidos.

Polimorfismo del lípido: si hay posibilidad de diferentes modos de cristalización, puede encontrarse con que el lípido cristalice diferente en el seno de la disolución que en el proceso de manufactura de nanopartículas y por ello, durante la producción de NSL el fármaco pueda ser expulsado del seno lipídico para así formar una red cristalina más perfecta [94].

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 [95].

2.3 Liberación del fármaco a partir de las nanopartículas

Las nanopartículas liberan el fármaco en la mayoría de los casos, por la interacción que tienen directamente con su medio. 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 [67].

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 está fuertemente influenciada por el ambiente biológico en que se encuentran. El efecto del medio es mayor cuando se trata de dosificaciones extensas, ya que puede haber un mayor grado de unión a proteínas plasmáticas y con ello el retraso en la liberación del activo.

2.4 Remoción del organismo de los sistemas nanoparticulados

Los sistemas nanoparticulados presentan rápido aclaramiento por los macrófagos del sistema reticuloendotelial. Éste puede ser evitado, o al menos disminuido de los siguientes modos: modificando el tamaño de partícula, modificando la carga eléctrica y la hidrofobicidad superficial, o modificando algunos grupos expuestos en la superficie. Se ha observado que a menor tamaño y más hidrofílica sea la superficie, menor es la interacción con muchos de los componentes del organismo y por ello es menor respuesta inmune, por otra parte se ha demostrado que las partículas cargadas negativamente (potencial Z ~ -40 mV) son más fácilmente removidas por el sistema de reticuloendotelial que para partículas neutras

(potencial Z ~ ± 10 mV). [96-97]. Para lograr esto se puede modificar químicamente 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 electrónicas adecuadas a las 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. Ej.: Alto contenido de grupos carboximetilo disminuye la activación del sistema del complemento [94, 98-101].

2.5 Sistemas dispersos farmacéuticos

Los sistemas dispersos están formados por al menos dos fases: la sustancia que está dispersa conocida como la fase dispersa, discontinua o interna y una fase dispersante, continua o externa. Basándose en el tamaño de las partículas de la fase dispersa, las dispersiones generalmente se clasifican como dispersiones moleculares, dispersiones coloidales y dispersiones gruesas. Las dispersiones moleculares tienen partículas inferiores a 1 nm de tamaño. Las dispersiones coloidales tienen tamaños de partícula entre 1 nm y 1 μm . Las microemulsiones, las nanopartículas y los liposomas son algunos ejemplos de dispersiones coloidales. Las dispersiones gruesas tienen tamaño de partícula superior a 1 μm , que incluye a las suspensiones y emulsiones [102]. Las dispersiones con una fase de partículas sólidas se denominan suspensiones, aquellos con una fase líquida de partículas se denominan emulsiones y aquellos con una fase gaseosa de partículas se denominan espumas. Los sistemas dispersos tienen tantas aplicaciones comerciales e industriales, que no es posible enumerar todas ellas [103].

2.5.1 Aplicaciones nanotecnológicas de los sistemas dispersos

Los recientes avances en la capacidad científica para observar y controlar la materia a nivel de nanoescala ha abierto un nuevo campo de investigación: la nanociencia. La aplicación de nuevas tecnologías basadas en el desarrollo de materiales nanoestructurados y nuevos utensilios para hacer nanomáquinas abren un área nueva de desarrollo: la nanotecnología, con un gran impacto económico y social. Uno de los sectores más sensibles es la aplicación biomédica en la cual la nanotecnología aplicada a la salud está siendo sujeta de un especial interés.

La nanotecnología involucra materiales, aparatos y sistemas a escala nanométrica, siendo sin lugar a dudas los nanomateriales los de mayor impacto y desarrollo en la actualidad.

Los nanomateriales y nanopartículas se definen como materiales o partículas que cuentan con al menos una de sus dimensiones externas o estructuras internas en la nanoescala y que posiblemente tenga características diferentes a las del mismo material a escala convencional. Según un reciente análisis de mercado de la nanotecnología, el mercado mundial total de materiales nanoparticulados fue de 492.5 millones de dólares en el año 2000 y 900.1 millones de dólares en 2005 [103].

Los nanomateriales dispersos en líquidos, conocidos como nanodispersiones, tienen muchas aplicaciones prácticas. Una aplicación importante de tales sistemas se encuentra en el área de liberación de fármacos como ya se ha comentado ampliamente en secciones anteriores. La mayoría de los fármacos, especialmente aquellos que son poco solubles, funcionan mejor en forma de nanopartículas. Un número significativo de los nuevos fármacos descubiertos actualmente son poco solubles. La biodisponibilidad de los fármacos poco solubles puede mejorarse significativamente reduciendo el tamaño de partícula a las dimensiones nanométricas, aumentando así el área superficial del fármaco o incluyéndolas en sistemas poliméricos con la finalidad de lograr larga acción o incluso ubicación espacial determinada. Los fármacos nanoparticulados pueden ser formulados en diferentes formas farmacéuticas o como nanodispersiones. Sin embargo, la mayoría de las técnicas de producción actualmente utilizadas para la fabricación

de fármacos nanoparticulados generalmente dan nanodispersiones como producto final. Las aplicaciones de las nanodispersiones no solo se limitan a la liberación de fármacos por sí solo. Algunas otras áreas en las que las nanodispersiones son de importancia son: cosmética, biomedicina, tintas y pinturas [103].

En tecnología farmacéutica muchas formulaciones inyectables de sistemas dispersos, si se pretende para la liberación de fármacos a nivel local (por ejemplo, para curar la lesión ósea) o como implante intramuscular para prolongar la liberación de fármacos [104], requieren de formulaciones que posean propiedades reológicas adecuadas para lograr estos efectos terapéuticos deseados. Estas adecuadas propiedades reológicas también son necesarias para prevenir la separación de fases de las emulsiones debido al cremado o sedimentación de las suspensiones durante el almacenamiento. La reología desempeña un papel importante en la formulación, mezcla, manejo, procesamiento, transporte, almacenamiento y rendimiento de tales sistemas [105].

Así por ejemplo, Rosenblatt *et al.* [106] reportaron un estudio reológico de una dispersión concentrada de fibras de colágeno en solución acuosa utilizada para corregir defectos de contornos dérmicos a través de una inyección intradérmica. Se estudió el efecto de las fuerzas electrostáticas en la reología del colágeno inyectable mediante mediciones reológicas oscilatorias de dispersiones a diferentes fuerzas iónicas (0.06–0.30). Utilizando la teoría de Kamphuis *et al.*[107] para interpretar los espectros asociados a los tiempos de relajación en dispersiones concentradas, las fibras de colágeno mostraron ser más flexibles a medida que aumenta la fuerza iónica. Este resultado analizado a nivel molecular supone que las fibras de colágeno son una fase de cristal líquido de moléculas de colágeno en forma de varilla rígida y que se encuentran separadas de la solución. Las fuerzas electrostáticas afectan a la fracción de volumen de agua presente en las fibras de colágeno que a su vez modifica la rigidez de las fibras. Las dispersiones de fibra de colágeno flexible muestran propiedades de flujo similar a una emulsión en tanto que las dispersiones de fibra de colágeno rígida muestran propiedades de flujo similar a una suspensión. Los cambios en la rigidez de la fibra

alteran significativamente la inyectabilidad de las dispersiones de colágeno la cual es crítica en la aplicación clínica [105].

2.5.2 Introducción a la reología

La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia. La utilización de la reología en el análisis y caracterización del comportamiento de productos farmacéuticos y cosméticos es relativamente reciente. Es sabido en la actualidad, que el comportamiento de los materiales a nivel macroscópico y microscópico puede variar al aplicárseles una fuerza, lo cual se relaciona con la estructura interna de los mismos [108].

El tener esa información permite:

1. Caracterizar la materia y definir sus parámetros reológicos como viscosidad, consistencia y propiedades viscoelásticas.
2. Diseñar equipos adecuados de procesamiento industrial, conociendo previamente la caracterización del material a procesar.
3. Diseñar materiales nuevos con respuestas mecánicas muy específicas y bien definidas.

Los materiales utilizados para el desarrollo de formas farmacéuticas deben tener propiedades fisicoquímicas y mecánicas apropiadas para su adecuada administración y eficiencia. Por ejemplo, muchos sistemas dispersos inyectables son pseudoplásticos, lo cual es una característica muy útil porque poseen una viscosidad alta bajo pequeños esfuerzos para prevenir la sedimentación o cremado, pero presentan una baja viscosidad bajo grandes esfuerzos lo cual facilita su inyección [105].

Muchos procesos farmacéuticos y cosméticos, tales como selección de nuevos ingredientes, preparación de formulaciones, empacado de materiales y almacenaje, están asociados con un flujo complejo del material; así como el comportamiento final del medicamento (extensibilidad [109], adhesividad, liberación de activo [110-111] y eficiencia terapéutica [112].

Estos estudios datan de hace 45 años [113-114], pero hasta la fecha su importancia se refleja en la continuidad de los mismos en sistemas muy diversos [115] y diferentes fenómenos como sedimentación [116].

2.5.2.1 Deformación y flujo

El objetivo básico de la reología es determinar la relación entre el esfuerzo aplicado y la deformación producida en un material de naturaleza fisicoquímica dada. Esta relación es ya conocida para sólidos elásticos sometidos a pequeñas deformaciones (Ley de Hooke, Ecuación 1), para líquidos sencillos y gases (Ley de Newton de la viscosidad, Ecuación 2). Sin embargo, no siempre existe una relación lineal entre esfuerzo y deformación debido a complejidades en la estructura y morfología de algunos materiales. Pero tanto en los casos sencillos, como en los casos complejos, se tienen las mismas variables fundamentales, deformación y esfuerzo [117].

$$\sigma = G\gamma \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\sigma = \eta\dot{\gamma} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde σ es el esfuerzo cortante, η es la viscosidad, $\dot{\gamma}$ es la velocidad cortante y G es el módulo de Young

La deformación de un cuerpo se logra a través de la aplicación de una fuerza sobre la superficie del mismo. Es pertinente mencionar que si bien el flujo es una forma de deformación, también es el término más comúnmente utilizado para referirse al movimiento de fluidos, mientras que la deformación es generalmente utilizada para referirse al de los sólidos. Así pues, la deformación de un cuerpo puede ser clasificada en dos tipos generales: deformación espontánea irreversible o elasticidad y deformación irreversible o flujo (Figura 4) [118-120].

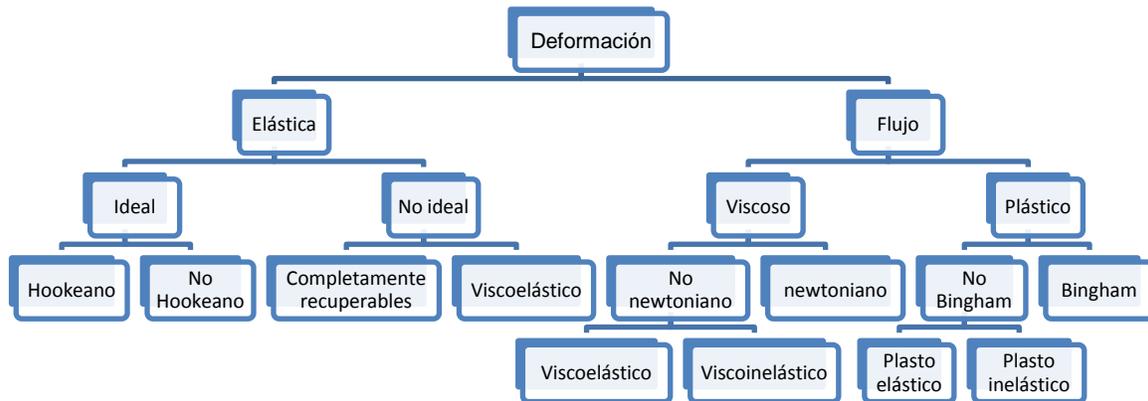


Figura 4: Clasificación de los materiales de acuerdo a la deformación que sufren [120]

2.5.2.2 Elasticidad

Un cuerpo es perfectamente elástico si se presenta instantáneamente una deformación con la aplicación de una fuerza y desaparece completa e instantáneamente con la eliminación de la misma [117].

Ciertos cuerpos para deformaciones pequeñas, bajo esfuerzos axiales, presentan elasticidad ideal y el esfuerzo aplicado es directamente proporcional a la deformación relativa provocada. En ecuaciones matemáticas que describen este comportamiento, a la constante de proporcionalidad se le llama módulo de elasticidad y presenta diferentes formas en función de la deformación aplicada, como el módulo de Young, el cual describe la distorsión de un cuerpo bajo simple tensión; módulo de corte y rigidez, que describe la deformación de un cuerpo bajo esfuerzo de corte, y el módulo de carga que describe la deformación de un cuerpo bajo presión hidrostática.

Un cuerpo sólido que tiene elasticidad es referido como hookeano; cuando no la presenta se dice que es no hookeano, es decir, es un cuerpo elástico no ideal. Los cuerpos elásticos no ideales son aquellos que frente a la aplicación de un esfuerzo presentan una deformación no instantánea, que no desaparece instantáneamente

con la eliminación del mismo. Se clasifican en sólidos elásticos completamente recuperables y sólidos elásticos incompletamente recuperables o viscoelásticos.

2.5.2.3 Flujo cortante

De la misma manera que para definir deformación elástica es necesario hablar de una fuerza, así para flujo lo es definir corte. El corte es una forma de deformación considerada como un proceso en el que planos paralelos infinitamente delgados, de los líquidos se deslizan uno sobre otro. De esta manera, el corte es un caso especial de deformación laminar que presenta diversas geometrías. La deformación laminar puede ser planar, rotacional y de torsión. Por lo anterior puede considerarse que un fluido es una sustancia que se deforma continuamente cuando se sujeta a un esfuerzo de corte. Este esfuerzo es un componente de fuerza tangencial a la superficie, y que dividida por el área de la superficie es el esfuerzo de corte promedio [119].

Para comprender mejor el fenómeno anterior, imaginemos que una sustancia se encuentra entre dos placas paralelas escasamente separadas, de gran longitud, y que los efectos en sus bordes son prácticamente despreciables (Figura 5). La placa inferior está fija y una fuerza es aplicada a la placa superior; cuando la fuerza provoca el movimiento de la placa superior con una velocidad constante, se establece que la sustancia entre las placas es un fluido. El fluido en contacto inmediato con la placa tiene la misma velocidad que ésta; es decir, no hay deslizamiento y fluye a una nueva posición en forma paralela a la placa; la velocidad varía uniformemente desde cero en la placa estacionaria, a la velocidad máxima en la placa superior. Por lo tanto, la fuerza aplicada es directamente proporcional al área y a la velocidad en la placa superior, e inversamente proporcional a la distancia entre las placas. La velocidad de deformación es la velocidad a la cual una capa se mueve relativamente con respecto a la capa adyacente [119].

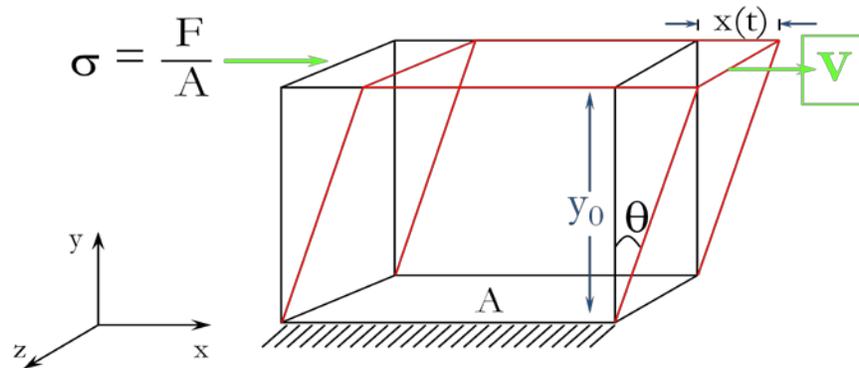


Figura 5: Flujo cortante simple

En donde σ es el esfuerzo cortante, F es la fuerza, A es el área y V es la velocidad

2.5.2.4 Esfuerzo cortante

Es un esfuerzo dado en la superficie de un cuerpo, de las componentes de la fuerza que actúan sobre un plano a través de un punto determinado, por lo que se tienen esfuerzos de tensión, de compresión y de corte, dependiendo si las componentes son tangencialmente hacia fuera o adentro del plano sobre el cual actúan las componentes de la fuerza. El esfuerzo se expresa en unidades de fuerza por unidad de área (Ecuación 3). La aplicación de una fuerza es especialmente importante en sustancias líquidas y semisólidas, ya que se pueden caracterizar al flujo. La expresión matemática que define el esfuerzo de corte en términos de flujo está dada por la ley de la viscosidad de Newton, donde se establece el flujo en una sola dirección, paralela al plano. Por lo anterior se considera necesario disponer de expresiones matemáticas del esfuerzo cortante considerando las tres direcciones en el espacio [119]. Por otra parte la ecuación 4 representa la deformación cortante en el flujo cortante.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\gamma = \frac{X(t)}{Y_0} \quad \text{Ecuación 4}$$

En donde γ es la deformación cortante, $X(t)$ cambio de posición en función del tiempo, Y_0 es la altura; F es la fuerza y A es el área.

2.5.2.5 Velocidad de deformación

El esfuerzo cortante realizado sobre un material, que está colocado entre dos placas, está relacionado con la velocidad relativa de la placa superior y con la distancia entre las placas. A una determinada velocidad de la placa superior, es mayor el trabajo a realizarse por unidad de masa cuanto menor es la distancia entre las placas. La medición específica de este trabajo por unidad de masa se denomina velocidad de deformación, y está definida matemáticamente como la relación de la velocidad relativa dividida por la distancia entre las placas (Ecuaciones 5 y 6).

$$\dot{\gamma} = \frac{V}{Y_0} = \frac{1dX(t)}{Y_0dt} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\dot{\gamma} = \frac{\Delta\gamma}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 6}$$

En donde $\dot{\gamma}$ es la rapidez de deformación o velocidad cortante

2.5.2.6 Viscosidad

La viscosidad de un fluido se define como la fricción interna de un material o su resistencia al flujo. Su expresión matemática está determinada por la relación del esfuerzo cortante entre la velocidad de deformación (Ecuación 7), para un cuerpo viscoso ideal. La viscosidad o coeficiente de viscosidad se expresa en poises (dinas*s/cm²) o mPa*s. Para un fluido viscoso ideal, el coeficiente de viscosidad es una constante y corresponde a la pendiente en un punto dado de una gráfica (reograma) de esfuerzo de corte vs velocidad de deformación (Figura 6). Para un fluido viscoso no ideal, el mismo reograma presenta una relación no lineal y por lo tanto no es posible obtener el coeficiente de viscosidad como una constante; por lo que se obtiene un coeficiente dado por la pendiente de una línea recta tangente en un punto de la curva, la cual es llamada viscosidad aparente, ésta se utiliza en ecuaciones de interés práctico para fluidos que presentan una relación no lineal. La viscosidad es frecuentemente referida como viscosidad absoluta o dinámica para diferenciarla de la viscosidad cinemática, la cual está determinada por la relación de la viscosidad absoluta dividida por la densidad del fluido [121].

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$$

Ecuación 7

En donde η es la viscosidad; σ =esfuerzo cortante y $\dot{\gamma}$ es la rapidez de deformación.

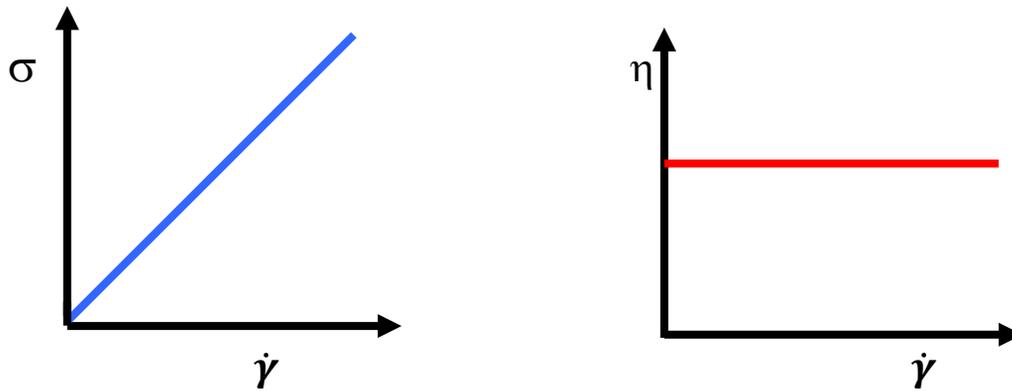


Figura 6: Reogramas para un fluido newtoniano

2.5.2.7 Clasificación reológica para fluidos

La clasificación del comportamiento reológico para fluidos está basada en su comportamiento al flujo, generalmente son fluidos newtonianos y no newtonianos (Figura 7) [120].

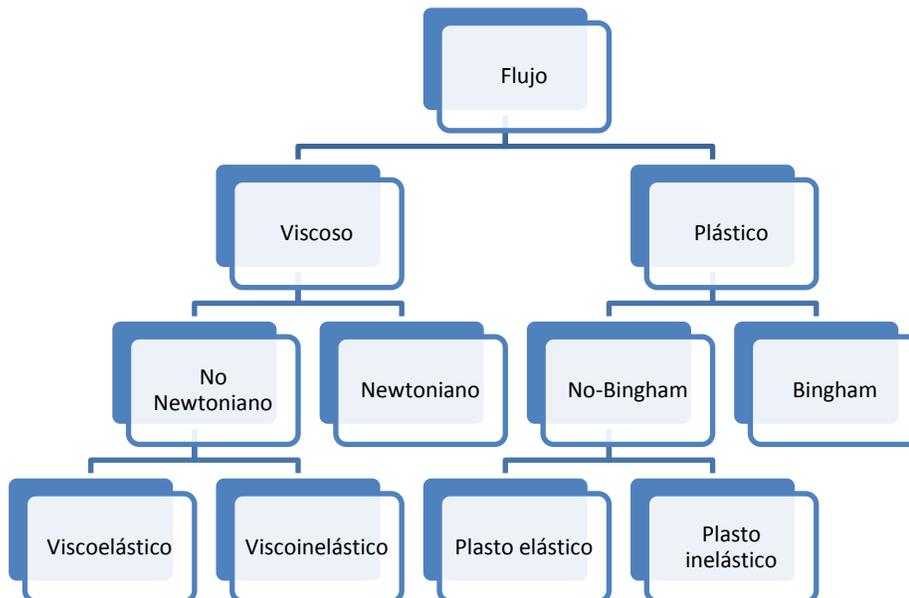


Figura 7: Flujo y sus variantes

Los fluidos newtonianos son aquellos cuya relación esfuerzo de corte vs velocidad de deformación es lineal y su viscosidad es una constante. La viscosidad de un fluido newtoniano está determinada únicamente por la temperatura y composición. Los fluidos no newtonianos son aquellos cuya relación esfuerzo de corte y velocidad de deformación no es lineal y pueden ser viscoelásticos o viscoinelásticos. Los viscoelásticos son aquellos que presentan una deformación viscoelástica y tienen un comportamiento reológico de características de sólido (componente elástico) y de líquido (componente viscoso). Los viscoinelásticos son fluidos que al someterlos a un esfuerzo presentan una deformación irreversible o flujo, se les considera fluidos no newtonianos por excelencia. Los fluidos viscoinelásticos pueden ser clasificados como independientes o dependientes del tiempo [122].

Los fluidos viscoinelásticos independientes del tiempo son aquellos en que a una temperatura constante, su viscosidad depende únicamente de la magnitud del esfuerzo de corte o de la velocidad de deformación. Son fluidos adelgazantes al corte o pseudoplásticos aquellos en los que la viscosidad disminuye, cuando la velocidad de deformación aumenta. Los fluidos espesantes al corte o dilatantes son aquellos en los que la viscosidad aumenta cuando la velocidad de deformación aumenta (Figura 8).

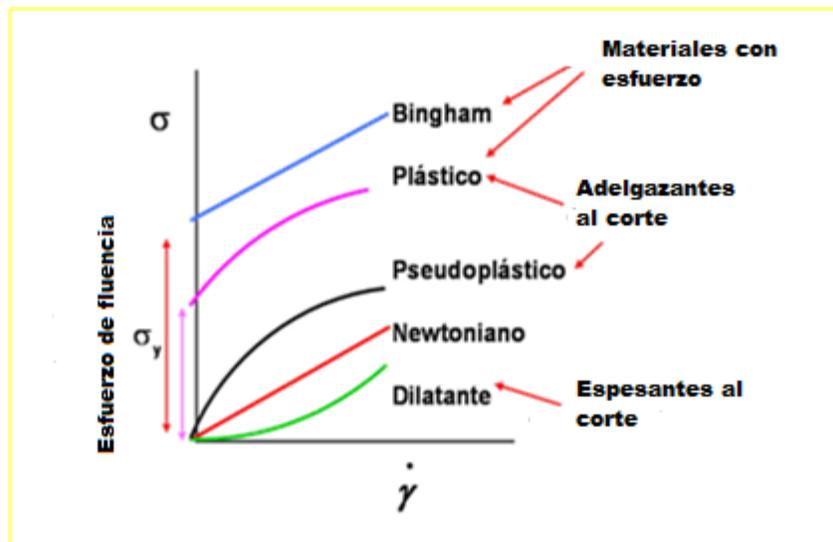


Figura 8: Reogramas para los diferentes tipos de fluidos

Los fluidos viscoelásticos dependientes del tiempo se clasifican en tixotrópicos o anti-tixotrópicos. Los fluidos tixotrópicos son aquellos en que a una temperatura y velocidad de deformación constante, presentan una disminución del esfuerzo de corte y de viscosidad (Figura 9). Los anti-tixotrópicos son aquellos fluidos que a una temperatura y velocidad de deformación constante presentan un aumento en el esfuerzo de corte y en la viscosidad (Figura 10).

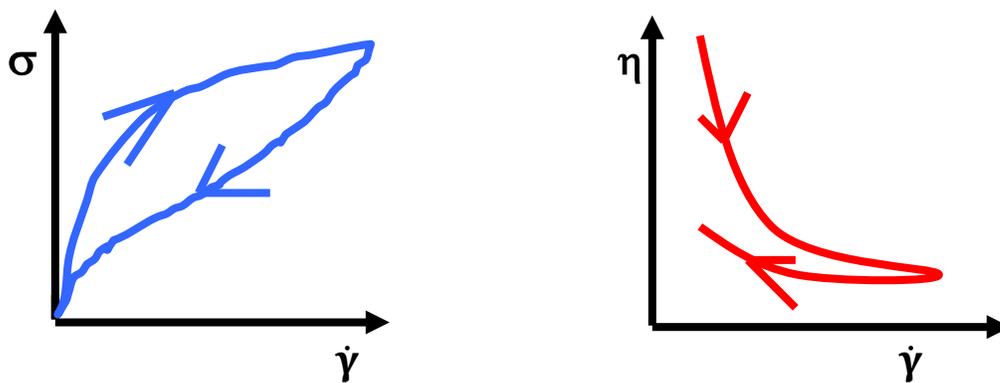


Figura 9: Reogramas de un fluido tixotrópico (hay histéresis)

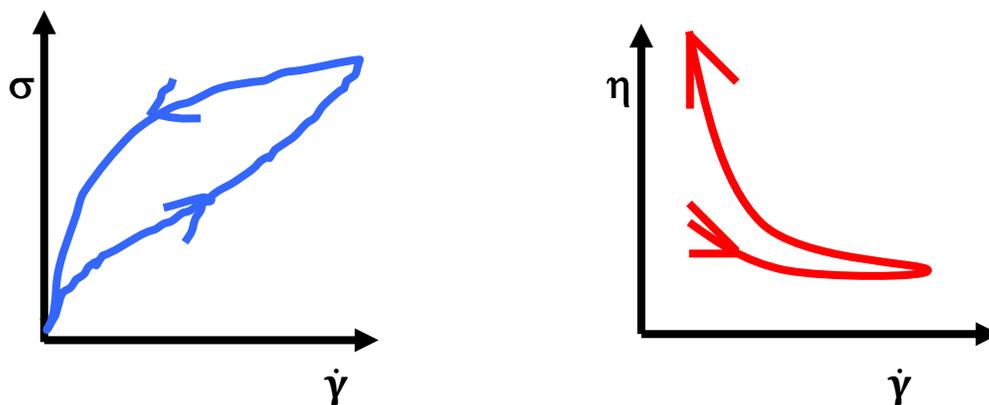


Figura 10: Reogramas para un fluido anti-tixotrópico (hay histéresis)

El comportamiento encontrado en los productos farmacéuticos y cosméticos es, generalmente, el tixotrópico [123]. El comportamiento tixotrópico describe la degradación de la estructura durante la fase de llenado, y durante la fase de descarga se recupera la estructura original. La recuperación depende del tiempo que se le permite al material para recuperarse. Además un material tixotrópico

tendrá un comportamiento pseudoplástico cuando se aplique una deformación gradual. Esto es debido a la orientación de las estructuras moleculares o a que las partículas cambian para alinearse en la dirección del flujo. Sin embargo, la orientación original puede ser restablecida un tiempo después de que la fuerza externa es removida. Una curva tixotrópica de ida y vuelta representa la historia de deformación del material y provee de información cualitativa acerca de su dependencia del tiempo. El área de la curva indica la rapidez con que la estructura del material se recupera después de que cesa la deformación. Esta área es dependiente de la naturaleza de la muestra y del tiempo que transcurre después de que cesa la deformación. Esta prueba está relacionada con la cinética de los cambios estructurales como los que se han encontrado en los sistemas coloidales. Una curva tixotrópica es observada cuando el material no recupera su estructura después de que deja de aplicarse el esfuerzo.

La información obtenida de esta prueba es importante; por ejemplo, una suspensión con una fluidez (facilidad con la que fluye) apropiada durante la aplicación y preparación requiere de una cierta viscosidad, puesto que así las partículas pueden ser dispersadas eficientemente en el contenedor o la película puede ser formada después de la aplicación [123-125].

Los fluidos plásticos de Bingham son aquellos en que la relación esfuerzo de corte y velocidad de deformación es lineal, pero para esfuerzos de corte pequeños se comportan como sólidos, presentando características elásticas y únicamente por el incremento del esfuerzo de corte hasta un cierto valor el sistema fluye, denominándose fluidos con esfuerzo de corte o esfuerzo de cedencia inicial.

Fluidos plásticos no Bingham son aquellas sustancias plásticas que no presentan una relación proporcional entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación, y presentan un esfuerzo inicial. Se clasifican en plastoelásticos y plastoinelásticos, si tras ser sometidos al esfuerzo presentan reversibilidad parcial o total a la deformación.

2.5.2.8 Viscoelasticidad lineal. Estudios oscilatorios

Aunque los experimentos rotatorios proporcionan la información referente a las propiedades de flujo de un sistema, tales como valor de cedencia, tixotropía, y curva de flujo constante, son solamente una parte de la caracterización reológica completa de éste.

La prueba dinámica oscilatoria es una herramienta mucho más poderosa para revelar las estructuras microscópicas de un material viscoelástico; por lo tanto, es más atractiva y útil desde un punto de vista práctico.

Inicialmente en esta prueba se realiza un barrido de esfuerzos para determinar la región viscoelástica lineal de un sistema material para realizar una prueba dinámica subsiguiente. El máximo esfuerzo al cual G' (módulo de almacenamiento) permanece constante es llamado esfuerzo crítico; el cual indica la mínima energía necesaria para romper la estructura, independientemente de la concentración. Por lo tanto, si la diferencia en el esfuerzo crítico de dos semisólidos es conocida, el grado de dispersión de las partículas o ingredientes puede ser medido [126].

Cuanto más alto es el esfuerzo crítico, el sistema se dispersa mejor. El punto crítico se puede llamar también esfuerzo de cedencia dinámica si se grafica G' vs esfuerzo.

La presencia de un esfuerzo de cedencia dinámica de magnitud conveniente puede utilizarse como criterio para determinar si, por ejemplo, un vehículo mantendrá características semisólidas adecuadas bajo una determinada deformación [127-130].

Las mediciones de esfuerzos oscilatorios pueden ser explicados desde un punto de vista instrumental: Un esfuerzo cortante sinusoidal (o deformación) más pequeño que el valor crítico es impuesto en un fluido, y la amplitud de la deformación que resulta (o del esfuerzo) y el ángulo de la fase entre el esfuerzo impuesto y la deformación de salida son medidos. Experimentalmente, esto puede ser realizado imponiendo un desplazamiento sinusoidal pequeño (dentro de la zona viscoelástica lineal) en el material bajo barrido de frecuencia controlada o de temperatura.

En general, el material puede responder a este tipo de deformación a través de dos mecanismos: almacenamiento de la energía (elasticidad) y disipación de la energía (viscosidad). Cuantitativamente, estas respuestas pueden ser representadas como módulo de almacenamiento (G'), energía almacenada por unidad de volumen y módulo de pérdida (G''), energía disipada por unidad de velocidad de deformación por unidad de volumen [105].

El módulo de almacenamiento (G') representa el carácter elástico del sistema, y el módulo de pérdida (G'') está relacionada con las características viscosas del sistema.

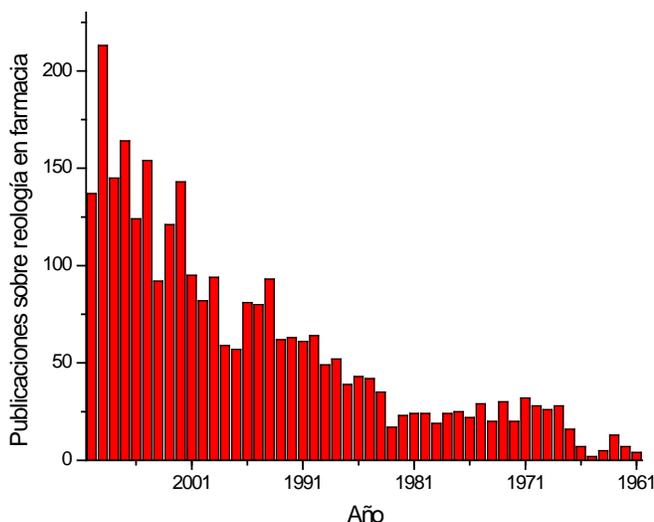
Generalmente, la fuerza de interacción de la estructura interna en un material es medida por la magnitud del cociente $G''/G' = \tan \delta$, δ es el ángulo que indica el tiempo de retraso entre el esfuerzo aplicado y la deformación. Cuanto más pequeño es la $\tan \delta$ (o mayor el G'), más fuerte es la interacción [105, 131].

El desfase entre la deformación y el esfuerzo se encuentra en el intervalo comprendido entre 0 y $\pi/2$ radianes. Si se toma el primer valor, la parte imaginaria del módulo complejo es cero y la parte real se reduce al módulo elástico G' , es decir, la respuesta del material es la de un sólido elástico, en el caso contrario, la parte real del módulo complejo es la que se anula y se tendrá el comportamiento de un fluido newtoniano. Los valores intermedios de δ corresponden a comportamientos viscoelásticos en los cuales coexisten tanto propiedades elásticas como viscosas [119, 131].

El barrido de frecuencias es una herramienta útil para caracterizar la microestructura de un material viscoelástico. Aplicando una deformación constante por debajo del valor crítico y una rampa de frecuencia revela la microestructura del material, en respuesta a diferentes velocidades de deformación [119].

2.5.3 Reología de productos farmacéuticos

Es evidente que esta área es de suma importancia en el campo farmacéutico y en particular en lo que se refiere a nuevos sistemas de liberación de fármacos, como puede verse en el aumento de publicaciones relacionadas con el tema en los últimos 20 años (Figura11).



**Figura 11: Publicaciones de reología en farmacia de los últimos 20 años
(Recopilación realizada por Dra Bernad Bernad)**

Como en otras áreas, la reología puede ayudar a resolver no solo problemas macroscópicos relacionados con su preparación, sino también a conocer las características estructurales y procesos que gobiernan su comportamiento en condiciones de flujo o deformación.

Una gran parte de los estudios reológicos se han llevado a cabo con la finalidad de poder obtener una formulación adecuada a partir del conocimiento de los cambios estructurales y fenómenos que tienen lugar en los preparados, al cambiar diferentes parámetros de formulación. La mayoría de estos estudios han sido realizados para formas semisólidas (ungüentos, geles y cremas), logrando una optimización en el desarrollo de formulaciones [132-134] al estudiar cómo afectan variables tales como la adición de excipientes farmacéuticos de uso habitual como la polivinilpirrolidona [135] o la adición de algunos electrolitos [136] sobre las propiedades reológicas del medicamento en cuestión.

También el conocimiento del comportamiento ante el flujo de distintos excipientes, abre el camino para su posible uso en diferentes tipos de preparados. No cabe duda que los carbómeros [137] supusieron en su momento, un gran avance en el desarrollo de geles así como el conocimiento termoinverso de los poloxámeros

[138], que hace que puedan ser utilizados para sistemas de gelificación *in situ* por vía parenteral.

No obstante, la cuantiosa cantidad de investigaciones realizadas a formas semisólidas, es evidente que la reología puede dar valiosa información sobre otros tipos de preparados como suspensiones, con base en su concentración (diluidas [139] o concentradas [140]), microemulsiones [141] y disoluciones poliméricas que cambian su comportamiento dependiendo de su concentración [142].

Es de destacar, igualmente, el uso de la reología para ayudar a diseñar procesos de manufactura adecuados, evitando gastos excesivos y la tan usada herramienta prueba-error. Desde hace 40 años han sido informados una gran variedad de trabajos de investigación, demostrando que el tiempo y velocidad de mezclado influyen en las características finales de los preparados, además de que es posible utilizar la medida del torque dinámico como un control en proceso, considerando su gran relación con la viscosidad. Concluyendo que las propiedades reológicas, así como el tamaño de partículas en sistemas dispersos pueden ser controlados si se fijan las variables de proceso [143].

Del mismo modo, se han llevado a cabo estos estudios con la finalidad de conocer la estabilidad o posibles cambios conformacionales en el proceso de almacenaje, estudiando por ende variables como la temperatura [144].

Entre los fenómenos más interesantes en nuevos sistemas de liberación de fármacos se encuentra la mucoadhesión, hecho indispensable para mantener formas farmacéuticas de larga duración en el organismo, sobre todo en lo que se refiere a administración vía mucosas. Para conocer si éste fenómeno ocurre o no, los estudios de elección son los reológicos, dado que se ha demostrado que el módulo de almacenamiento (G') de la mucosa varía por la interpenetración de las moléculas mucoadhesivas [145-146]. Las vías de administración que han cobrado mayor interés a este nivel, y cuyos estudios han demostrado la importancia de la reología, para lograr un buen conocimiento de las características de los medicamentos son principalmente la periodontal [147], nasal [148], vaginal [149], tópica [150] y ocular [151].

Con respecto a la vía parenteral, la reología cobra gran importancia debido al fenómeno llamado inyectabilidad [152-153]. Es decir, la facilidad con que la preparación pueda ser manipulada en el exterior e inyectarla. Además de que ésta debe tener un comportamiento preestablecido en el interior del organismo, como es el caso de los sistemas de gelación *in situ*, cuyo comportamiento puede depender de la temperatura, la concentración del polímero y la presencia o ausencia de algunas sales [154].

Finalmente, es conocido que el comportamiento newtoniano ocurre en fluidos simples sin posibilidad de estructuras supermoleculares o bien en sistemas dispersos muy diluidos, en los que no cabe la posibilidad de interacciones interpartículas. Sin embargo, en el caso de sistemas complejos como preparados poliméricos o sistemas estructurados nanodispersos el comportamiento reológico indica fluidos no newtonianos. Así, geles, suspensiones, emulsiones, etc., pueden mostrar una gran variedad de comportamientos con base en diversas contribuciones como partículas sólidas o racimos poliméricos en una fase líquida. Las estructuras o configuraciones de estos preparados dependen de las interacciones intermoleculares entre y dentro de las partículas (grandes moléculas o pequeñas partículas). Si se trata de partículas aisladas, las propiedades reológicas dependerán solo de la distribución espacial en el campo de flujo, pero si se forman agregados o hay cambios intrapartículas entonces éstos podrán verse afectados por el flujo o la deformación y se verá reflejado en la reología del sistema. Así, una gran interrelación existe entre el comportamiento estructural y las propiedades reológicas. Entre los muchos trabajos relacionados con esta área, puede mencionarse el realizado por Yalpani *et al.* [155], sobre un excipiente de amplio uso en farmacia, el chitosán, el cual muestra diferentes comportamientos en estudios de corte, desde conducirse como un fluido newtoniano, pasando por un comportamiento dilatante y terminando como un fluido pseudoplástico en función de la velocidad de corte. Toda esta pauta está directamente relacionada con la configuración de sus ramificaciones laterales, así como con la longitud de las mismas.

A nivel general, y considerando el carácter amorfo de muchos polímeros, es sabido que su comportamiento varía en función de la temperatura, comportándose a bajas temperaturas como vidrio (rígidos) y por encima de su transición vítrea como caucho (elásticos). Esto se refleja en modificaciones en su reología, debido a limitaciones topológicas en su movilidad por interacciones intermoleculares favorecidas o no por la configuración de la macromolécula [156]. La adición de fármacos a sistemas con estas características puede afectar su estructura, actuando como plastificantes, y por ende su comportamiento reológico y a su vez esto puede influir sobre la liberación de este principio activo [157].

Así, es evidente que el conocimiento de la macroestructura y la microestructura puede utilizar como herramienta muy valiosa la reología [158]. Pudiendo, posteriormente conocer a profundidad las razones del funcionamiento de un preparado a muchos y diferentes niveles, como ya ha sido comentado a lo largo de esta sección.

Recientes trabajos muestran que la reología sigue en auge como herramienta para conocer muchas facetas de sistemas novedosos de liberación modificada, como por ejemplo el diseño de sistemas termoinversos basados en quitosán-fosfatos para administración de inyectables [159] y sistemas inteligentes de liberación de insulina [160].

Con base en la bibliografía comentada anteriormente en este apartado, se puede concluir que la investigación reológica es indispensable en el área de diseño y desarrollo de medicamentos [161], ya que ayuda a resolver diferentes tipos de problemas relacionados con la formulación, el proceso de manufactura, el almacenaje y la liberación de los mismos, optimizando tiempos y resultados. Además de dar valiosa información sobre los cambios estructurales de los preparados farmacéuticos sometidos a flujo y/o deformación (efectos mecánicos).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Obtener un sistema nanométrico de closantel basada en lípidos o polímeros empleando el método de desplazamiento de disolvente, para administración parenteral en bovinos; y de esta forma evitar un uso indiscriminado del fármaco.

3.2 Objetivos particulares:

- ❖ Utilizar la oxitetraciclina como fármaco modelo para generar tres sistemas coloidales con la finalidad de elegir cuál de ellos genera mejores resultados (tamaño de partícula y capacidad de carga) y aplicarlo al closantel.
- ❖ Optimizar la metodología para la obtención de nanopartículas de closantel, utilizando lípidos o polímeros con el fin de obtener homogeneidad en la distribución de tamaño de partícula.
- ❖ Caracterizar fisicoquímicamente los sistemas nanoparticulados para una mejor comprensión del comportamiento de los mismos.
- ❖ Evaluar el comportamiento reológico (cizalla simple y cizalla oscilatoria) de las nanopartículas en función de la relación LA/GA, pH, temperatura y tiempo, con el fin de establecer si existe alguna relación con dichas variables.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales:

El fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH_2PO_4), el hidróxido de sodio (NaOH), la acetona, isopropanol (IsoOH) y el diclorometano (CH_2Cl_2), grado reactivo analítico, fueron marca Baker[®].

Los polímeros PLGA 50:50, 75:25, 65:35 y 85:15 y el PVA (alcohol polivinílico) (PM: 102,500; 88% de hidrólisis) fueron comprados en Sigma-Aldrich.

El closantel fue amablemente donado por Laboratorios Pisa Salud Animal (México).

La lecitina de soya, B-56, B76 y T-20 fueron comprados en Sigma Aldrich.

Todos los reactivos fueron utilizados como se recibieron, sin ningún tratamiento adicional.

En todos los experimentos se empleó agua desionizada (resistividad 18.2 M Ω -cm).

4.2 Métodos

4.2.1 Construcción de los diagramas de fase pseudoternarios

Para obtener nanopartículas, en un inicio se partió de microemulsiones, para ello fue necesario construir los diagramas de fase para los sistemas pseudoternarios (fase acuosa, fase orgánica y tensoactivos/cotensoactivos) con la finalidad de determinar zonas de microemulsión.

4.2.2 Diagramas de fases pseudoternarios utilizando B-56, B-76 e IsoOH

Los diagramas de fase pseudoternarios se construyeron de la siguiente manera: se prepararon 5 relaciones constantes de B-56: IsoOH (p/p) (1:0, 1:1, 1:2, 2:1 y 0:1) y B-76: IsoOH (1:0, 1:1, 1:2, 2:1, 3:1, 1:3 y 0:1) y cada una de las relaciones anteriores se adicionaron a diferentes cantidades de diclorometano (10, 25, 50, 75 y 90%).

Para cada mezcla de tensoactivo-cotensoactivo se construyó un diagrama de fases.

- a) Los diagramas se construyeron titulando con agua las mezclas anteriores en celdas termostataadas a 25 °C y bajo agitación magnética vigorosa (300 rpm). La mezcla se agitó suavemente en un vortex por varios segundos y se dejó reposar durante 15 minutos hasta que ya no hubo ningún cambio visible.
- b) Se adicionó agua poco a poco para determinar los límites entre las diferentes fases.

La determinación de fases se hizo en forma visual [162-163].

Tras la adición de un volumen conocido de agua, la disolución se revisó para asegurar su aspecto y se registró la cantidad de agua necesaria para formar zonas transparentes, turbias o lechosas.

- c) Los resultados fueron representados en los diagramas conocidos como triángulo de Gibbs.

4.2.3 Diagramas de fases pseudoternarios B-56 con diferentes cotensoactivos

Los diagramas de fase pseudoternarios se obtuvieron de la siguiente manera: 2 relaciones constantes de B-56: 1-butanol (1:1,1:2), B-56: 1-Isobutanol (1:1,1:2) y B-56: 1-pentanol (1:1,1:2). Se siguió la metodología mencionada en la sección

4.2.2

4.2.3.1 Obtención de nanopartículas poliméricas a partir de microemulsiones

Con base en los resultados anteriores, se eligieron las siguientes composiciones a las que se adicionaron el PLGA y el closantel. El sistema seleccionado para adicionar tanto el fármaco como el polímero fue la relación (1:2) B-56 e isopropanol respectivamente, ya que fue el único en el cual se observaron zonas de microemulsión suficientemente amplias.

El procedimiento para incluir polímero y fármaco fue el siguiente:

- a) Una vez definida la proporción de agua, diclorometano y mezcla de tensoactivo-cotensoactivo 80%, 4% y 16% respectivamente, se adicionaron tanto el polímero como el fármaco al diclorometano y se procedió cómo ya se mencionó anteriormente.

4.2.4. Preparación y caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL)

Con la finalidad de obtener las nanopartículas, se eligieron tres técnicas de formación de sistemas lipídicos coloidales: Dispersiones sólidas, emulsión- evaporación (técnica ampliamente empleada para generar nanopartículas) y liposomas por hidratación de fase reversa; utilizando como matriz lipídica, lecitina de soya, T-20 como tensoactivo y oxitetraciclina como fármaco modelo: La técnica de emulsión- evaporación fue empleada para generar sistemas lipídicos de closantel.

4.2.4.1 Preparación de dispersiones sólidas de oxitetraciclina/lecitina

Las dispersiones sólidas de oxitetraciclina y lecitina fueron preparadas por el método de evaporación de disolvente utilizando diclorometano. La oxitetraciclina y la lecitina fueron disueltas en pequeñas cantidades de diclorometano que después fue evaporado utilizando presión reducida. Las partículas coloidales fueron producidas dispersando el sólido obtenido en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4, 0.1M). La suspensión resultante fue sonicada por 30 minutos y almacenada hasta su uso. La relación final fármaco/lecitina fue de 1:1 (molar).

4.2.4.2. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL) de oxitetraciclina

Las NSL fueron producidas por el método de emulsión- evaporación de disolvente. La oxitetraciclina y la lecitina fueron disueltos en diclorometano y después fue emulsificado en una solución amortiguadora (pH=7.5, 0.1M) con T-20 (5% p/v). La emulsión fue obtenida por agitación en un homogeneizador (CAT X-120, PolyScience, Niles, IL) durante 2 minutos a 14 000 rpm. El diclorometano fue removido de la emulsión por evaporación a temperatura ambiente con agitación constante durante 3 horas. La relación final fármaco/lecitina fue 1:1 (molar).

4.2.4.3 Preparación de liposomas de oxitetraciclina

Los liposomas con o sin oxitetraciclina fueron preparados por el método de hidratación de película delgada. En resumen, la lecitina (83 mg) y el fármaco (50 mg) fueron disueltos en diclorometano. El disolvente orgánico se evaporó en un rotaevaporador a 35°C y bajas presiones (Laborota 4000 Heindolph), originando una película delgada con la oxitetraciclina. Esta película fue hidratada con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.5, 0.1M). La dispersión de liposomas obtenida fue colocada en un baño sonicador por 1 h (Cole Palmer 8890). La relación final de fármaco y lecitina fue 1:1 (molar).

4.2.4.4 Preparación de NSL de closantel por emulsión-evaporación

El closantel y la lecitina fueron disueltos en diclorometano y después fue emulsificados en una solución amortiguadora (pH=7.4, 0.1 M) con T- 20 (5% p/v). La emulsión fue obtenida por agitación en un homogeneizador (Ika T Basic) durante 2 minutos a 10 000 rpm. El diclorometano fue removido de la emulsión por evaporación bajo agitación constante durante 12 horas. La relación final fármaco/lecitina fue 1:1 (molar). Al final se realizó una filtración rápida para eliminar partículas de polvo y por último se midió el tamaño de partícula y el potencial Z por dispersión dinámica de luz (Nanosizer ZS3600, Malvern instruments Co. UK).

4.3 Estudios de interacción de PVA y closantel

La interacción de closantel con el PVA se caracterizó siguiendo la evolución del espectro de absorción. Se llevaron a cabo estudios a 25 °C utilizando el método de espectroscopía UV-Vis. Los espectros de UV de closantel en solución acuosa (pH 7.4 y fuerza iónica 0.1 M de NaCl) fueron obtenidos, ya sea por sí solo, 7.53×10^{-5} M, o en presencia de diferentes concentraciones de PVA (de 4.7×10^{-6} a 1.7×10^{-4} M). El producto del número de sitios de unión en el PVA y la constante de enlace (K) fueron obtenidos ajustando los datos experimentales a la ecuación (8) empleando el método no lineal de Levenberg-Marquardt.

$$\Delta A = \frac{nK_b[CLOS]_t[PVA]\Delta\varepsilon}{1+K_b[PVA]}$$

Ecuación 8

En donde ΔA = Absorbencia total; n =# de sitios de unión en la cadena polimérica; K_b = Constante de unión; $[Clos]$ = Concentración de closantel; $[PVA]$ = Concentración de PVA y $\Delta\varepsilon$ = Diferencia de absorptividad molar entre el fármaco libre y el embebido.

Los datos fueron el resultado de 3 mediciones sobre la misma muestra, y éstas fueron analizadas dentro de 24 horas. En todos los casos, fue utilizado PVA a diferentes concentraciones como blanco. El tamaño de las partículas y la distribución del tamaño de la mezcla se midieron por dispersión de la luz dinámica (Nanosizer ZS3600, Malvern instruments Co. UK). Una cantidad adecuada de la mezcla PVA/closantel fue colocada en la celda del nanosizer. El tamaño promedio de cada muestra se determinó tres veces. El análisis conformacional se obtuvo mediante el uso de Montecarlo con el campo de fuerza cyvyl en Spartan 04 (Wavefunction, Illinois). Estos estudios se realizaron en modelos de closantel y PVA (25 unidades monoméricas) a una distancia de 16 Å a fin de asegurar que no hubiera interacción entre ellos, por otra parte, se realizaron otros cálculos con una molécula de closantel cerca de una molécula de PVA y el mismo estudio con una relación estequiométrica de 2:1 (fármaco: PVA), 1:1(PVA-PVA), 1:2 (PVA: fármaco) y 2: 2: (fármaco: PVA).

Para los estudios reológicos y de dispersión de luz dinámica (DLS) las soluciones de PVA fueron preparadas de la siguiente manera: en un frasco con tapa hermética de plástico, se disolvió 1.0 g (9.5×10^{-6} mol) de PVA en 100 mL de amortiguador de fosfatos (pH = 7.4, 0.1 M) con agitación magnética continua por 12 h a 300 rpm a 25 °C, para obtener la solución al 1% (p/v). Por otra parte se disolvieron 10 mg (1.5×10^{-5} mol) de closantel en 10 mL de acetona. Por último, la solución de closantel fue vertida en 50 mL de PVA 1% (m/v) a fin de obtener las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL respectivamente, entonces la mezcla se agitó durante 24 horas a 25 °C para eliminar la acetona.

Para medir las respuestas reológicas de los sistemas, se utilizó un reómetro AR2000 (TA Instruments, UK). Se eligió una geometría de doble cilindro coaxial

con un espacio de anillo existente de 0.5 mm para las condiciones de estudio. Los experimentos realizados fueron los de cizalla estacionaria y oscilatoria a 25 °C.

4.4. Obtención de nanopartículas de PLGA y closantel por el método de desplazamiento de disolvente

Con base en la bibliografía y considerando que el método de nanoprecipitación también llamado de desplazamiento de disolvente es uno de los procedimientos más fáciles de preparación de nanoesferas; es reproducible, rápido, económico (no requiere de equipos sofisticados) y utiliza polímeros preformados como material inicial en vez de monómeros [25, 67, 81-82, 164] se optó por usarlo con la finalidad de obtener nanopartículas moderadamente pequeñas (típicamente 200 nm y con distribución monomodal), menores comparadas con las obtenidas por emulsión-evaporación de disolvente. No obstante, cualquier modificación a una metodología implica tener que llevar a cabo la optimización de la misma para el sistema particular a elaborar, así para este trabajo se modificaron las siguientes variables: cantidad de fase orgánica, velocidad y tiempo de agitación.

En general las nanopartículas se elaboraron del siguiente modo: Se disolvieron 10 mg (1.5×10^{-5} mol) de closantel y 100 mg (9.75×10^{-7} mol) del polímero en acetona, cada uno por separado. Al final se mezclaron ambas soluciones (polímero y fármaco).

Posteriormente, en 100 mL de PVA al 1% en solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.4, 0.1M), se añadieron de 50 μ L en 50 μ L la fase orgánica, utilizando agitación magnética a 300 rpm y a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la incorporación de ambas fases, se homogeneizó a 14,000 rpm durante 3 minutos (ultraturrax). Transcurridos los 3 minutos, se añadió 100 mL más del amortiguador de fosfatos para completar un volumen total de 200 mL de fase acuosa.

Mediante agitación magnética y a temperatura ambiente se dejó evaporar el disolvente orgánico. Transcurridas aproximadamente 12 horas, se filtraron y caracterizaron las nanopartículas.

4.5. Caracterización de nanopartículas

4.5.1. DSC, IR y difracción de rayos X

Con la finalidad de conocer la cristalinidad de la muestra, así como su comportamiento térmico y una aproximación sobre la interacción entre fármaco y polímero, se llevaron a cabo las técnicas de calorimetría de barrido diferencial (DSC) y rayos X de polvos.

Mediante DSC se puede encontrar información de interacciones intermoleculares, así como de estabilidad al someter las materias primas a una técnica para formación de nanopartículas o bien puede ser un indicador de la estabilidad de las nanopartículas formadas a través del tiempo. Se pueden presentar la desaparición, disminución y desplazamiento de picos de fusión [165].

De igual modo, la difracción de polvos de RX nos dará indicio de si el fármaco se incluyó a nivel molecular y si conserva sus características de cristalinidad, sirviendo como apoyo la técnica de FTIR.

4.5.2. Tamaño de partícula y potencial Z

El estudio del tamaño de partícula es necesario porque de éste dependerá: su distribución en el organismo, y por ende su toxicidad; así el LD₅₀ en ratas es de 154000/g para un diámetro de 13.5 μm y 705/g para uno de 90.7 μm . En general, el aclaramiento por el sistema reticuloendotelial será mayor a medida que el tamaño de partícula aumenta.

El diámetro de las partículas e índice de polidispersidad fueron determinados usando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Nanosizer ZS3600, Malvern instruments Co. UK) basado en la dispersión cuasi-elástica de la luz. Las mediciones del tamaño fueron hechos por triplicado, las nanopartículas fueron suspendidas en agua deionizada a 25 °C.

La dispersión dinámica de luz (DLS) o también llamada espectroscopía de correlación fotónica es la técnica más ampliamente usada para determinar la distribución y tamaño de partícula [166-169].

La medición del potencial Z ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales. La determinación 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 +30 mV y menores de -30 mV) debido a la repulsión de las partículas cargadas [170-171]. El conocimiento del potencial zeta es determinante para estimar la unión a macrófagos y la agregación entre partículas [172-174].

4.5.3. Morfología

La morfología de las nanopartículas elaboradas fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) usando un microscopio electrónico JEOL modelo JEM-5900LV operado a 20 kV. Una gota de la muestra se colocó en un portamuestras con cinta de carbón conductora y fue secada a temperatura ambiente.

Existe un gran número de publicaciones en los cuales se menciona la microscopía electrónica como técnica analítica de caracterización morfológica para sistemas coloidales, entre las cuales se mencionan las siguientes:

Pannyam *et al.* [168] usaron Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) para determinar el tamaño promedio y distribución de partícula, TEM es también usada para estudiar la forma, agregación y detalles internos [168, 175-176]. SEM es usada para la caracterización superficial (forma, agregación y distribución) [83, 177-181] y Crio-TEM es usada para observar la formación micelar de PLGA-g-PEG [182].

4.5.4. Eficiencia de encapsulación

Las nanopartículas fueron disueltas en diclorometano y la cantidad de closantel fue determinada por espectroscopía de UV-Vis. La eficiencia de encapsulación (Ecuación 9) fue determinada como la relación de closantel atrapado en las nanopartículas con la cantidad teórica del fármaco utilizado en la preparación. La carga de fármaco en el polímero fue expresado como capacidad de carga.

$$EE\% = \left(\frac{Q_t - Q_f}{Q_t} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

En donde **EE**: eficiencia de encapsulación; **Qt**: Cantidad teórica y **Qf**: Cantidad real incorporada

4.5.5. Liberación *in vitro*

Existen muchas técnicas usadas para realizar estudios de liberación *in vitro* para sistemas coloidales (celdas o bolsas de difusión separadas por una membrana artificial o biológica, técnicas de ultracentrifugación o ultrafiltración y técnicas de ultrafiltración/centrifugación) [67]. A pesar de que se han hecho esfuerzos en estos métodos, aún existen dificultades técnicas para estudiar la liberación *in vitro* del fármaco a partir de las nanopartículas [183-184]. Estas son atribuidas a la separación de las nanopartículas del medio de liberación. Con el fin de separar a las nanopartículas y evitar estas técnicas tediosas, ha sido usada la diálisis, aquí la dispersión de nanopartículas es adicionada a las bolsas o celdas de diálisis de diferentes cortes moleculares [185-188]. En este método, el estudio cinético no es llevado a cabo bajo condiciones diluidas, debido a que las nanopartículas no están directamente diluidas en el medio de liberación, sino que son separadas del medio de liberación por medio de una membrana.



Figura 12: Celda de difusión de Franz

Así, en este trabajo el estudio de liberación del fármaco a partir de las muestras obtenidas se realizó mediante celdas horizontales de difusión de Franz (Figura 12) utilizando como medio en el donador y receptor disolución reguladora pH 7.4 (condiciones fisiológicas) separados por una membrana de celulosa regenerada, por la cual es inerte a los componentes de la fórmula, es semipermeable a iones y tiene un tamaño de poro de aproximadamente 12,000-14,000 Da, (SpectraPor). Se colocó 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 con

agitación constante. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 24 horas, recuperando el volumen de la alícuota analizada. Se cuantificó la cantidad de fármaco liberado a cada tiempo utilizando espectrofotometría UV-Visible, considerando la longitud de onda a la cual absorbe el fármaco y comparando cada absorbencia contra una curva patrón previamente realizada.

4.5.6 Estudios reológicos

Las muestras se analizaron empleando un reómetro modelo AR2000 de esfuerzo controlado equipado con una geometría de doble cilindro coaxial (doble gap) con un espacio anular existente de $\Delta h=0.5$ mm para las condiciones de estudio. Todas las pruebas se realizaron al menos por triplicado y a dos temperaturas fijas de 25 y 39 °C. Las pruebas reométricas fueron analizadas tanto en flujo de cizalla simple en una ventana de observación de 1 a 600 s^{-1} , como en flujo de cizalla oscilatoria a una ventana de deformación de 1 a 600 rad/s, en estas pruebas previamente se determinó la región de viscoelasticidad lineal para cada una de las condiciones estudiadas. En las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud de deformación se siguió la evolución de los módulos G' (de almacenamiento), G'' (viscoso) y la $\tan(\delta)$, estos análisis proporcionan la respuesta del material sin romper la estructura del mismo.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento de fase de las microemulsiones

El conocimiento del comportamiento de fases de un sistema ternario ha sido de gran trascendencia en diferentes áreas de la química [189-190].

Así, para lograr una buena caracterización estructural de los sistemas y determinar adecuadamente las zonas de microemulsión, se procedió a la construcción de los diagramas de fase.

Inicialmente se estudió el comportamiento de fases de los sistemas ternarios H_2O :DCM:IsoOH y H_2O :DCM:B-76, con la finalidad de conocer si éstos, el tensoactivo y el cotensoactivo, por si solos tenían la capacidad de formar microemulsiones. Como puede observarse, H_2O , DCM y B-76 no forman microemulsiones en las condiciones estudiadas [191-194], mientras que isopropanol, DCM, H_2O forman una sola fase transparente en una parte significativa del diagrama. Dado que el isopropanol es miscible en todas las proporciones con H_2O y con DCM, es probable que éste a altas concentraciones favorezca la solubilidad del DCM en H_2O , funcionando como un cosolvente. Sin embargo, a medida que éste va disminuyendo ya no tiene este comportamiento y se observa una fase turbia, estable, al menos a tiempos cortos (Figura 13).

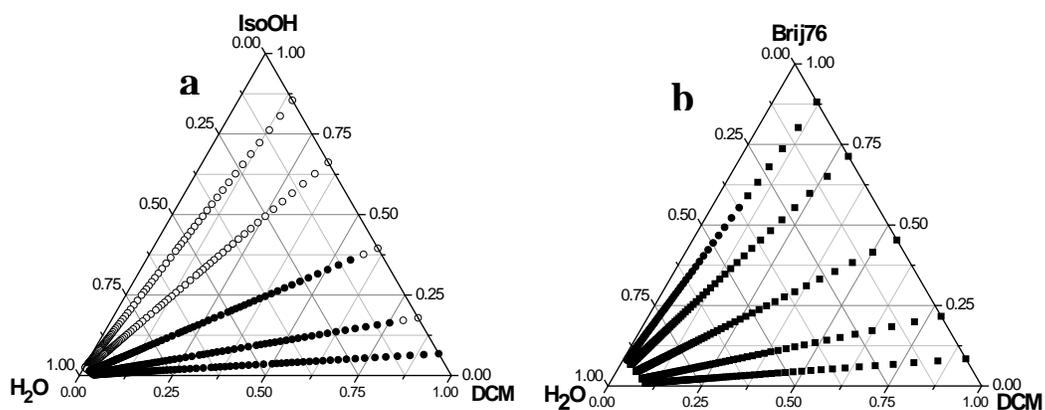


Figura 13: a) Isopropanol (IsoOH)

b) B-76, en donde \circ =transparente, \bullet = turbio y \blacksquare = insoluble

Posteriormente, para conocer el efecto de la variación en composición del emulsificante (tensoactivo: cotensoactivo) sobre el comportamiento de fases se

construyeron los diagramas de fase, observando los cambios según la composición [195-196].

Las distintas mezclas DCM-emulsificante (relación 1:0.33, 1:0.05, 1:1, 1:2 y 1:3) llevaron a la formación de diversas fases, tales como microemulsión transparente, solución viscosa transparente, dos fases separadas y dispersión turbia, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.

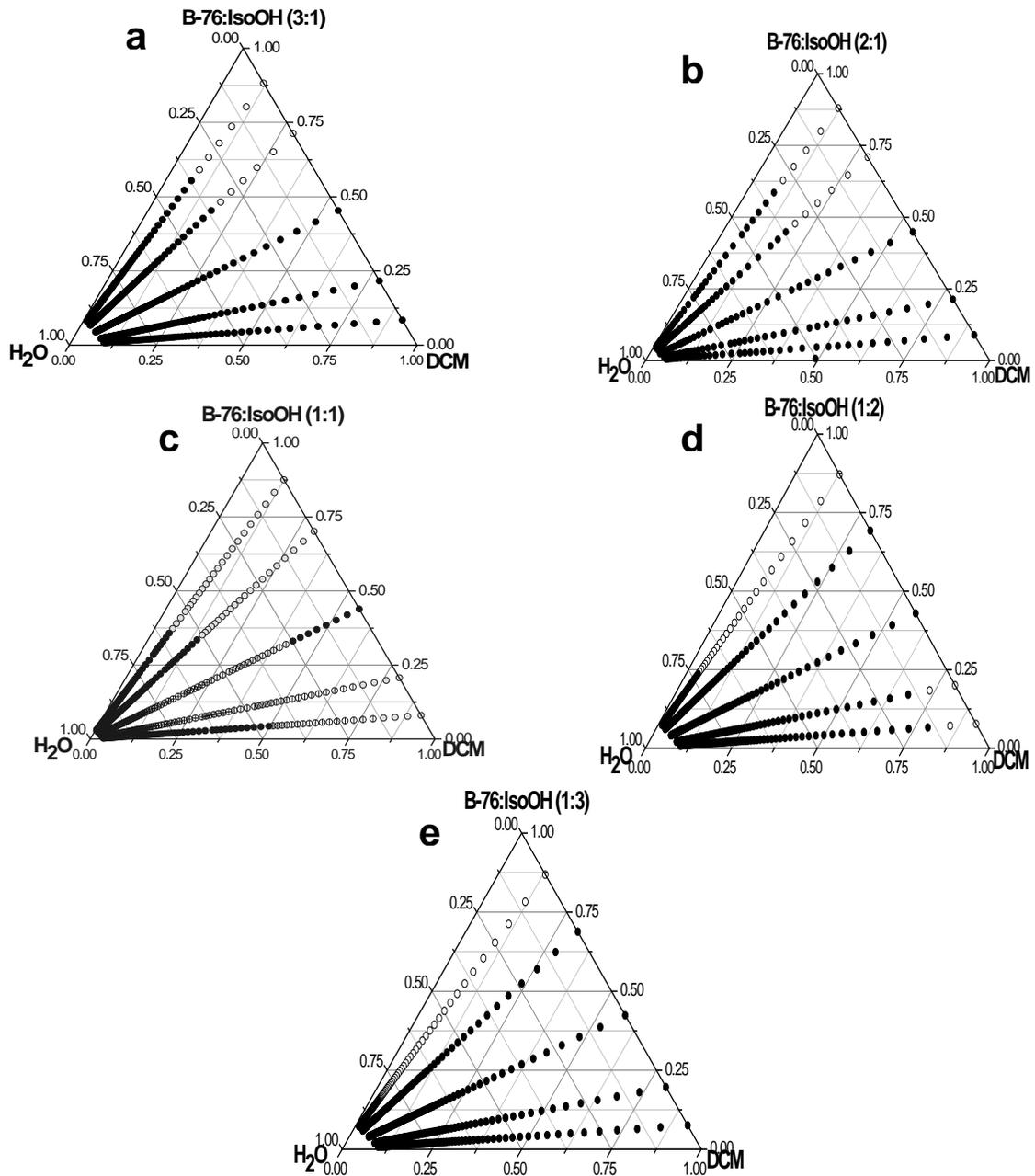


Figura 14: a) B-76:IsoOH 3:1 b) B-76:IsoOH 2:1 c) B-76:IsoOH 1:1, d) B-76:IsoOH 1:2 y e) B-76:IsoOH 1:3 en donde (○=transparente, ●=turbio, ◻=turbio 2 fases y ◻=opalescente)

Se puede observar en los 5 diagramas construidos, una extensa área bifásica y un área transparente relativamente pequeña. En general, se observa inicialmente una zona transparente, a cualquier composición de la mezcla de emulsificantes, la cual es variable en función de la cantidad de cotensoactivo (isopropanol). Al seguir adicionando agua se presenta una amplia zona de turbidez o bien dos fases transparentes perfectamente separadas; indicando la incapacidad del sistema emulsificante para formar el sistema disperso; aunque bien pudiera también tratarse de algún sistema tipo Winsor donde coexisten una fase micelar y un exceso de alguno de los componentes.

Los tamaños de las gotas concuerdan en orden de magnitud con otros reportados en la literatura para sistemas en microemulsión [197].

El comportamiento de fase en función de la cantidad de isopropanol muestra una zona de microemulsión agua en aceite para las cinco mezclas de emulsificantes estudiadas. Sin embargo, al ir aumentando gradualmente la cantidad de alcohol, manteniendo fija la cantidad del B-76, el área de microemulsión aceite en agua aumenta gradualmente, cambiando ligeramente entre 1:2 y 1:3. En los casos con menor cantidad de cotensoactivo, la microemulsión es probablemente inestable debido a un desbalance en la tensión interfacial de la interface, llevando a la contracción o desaparición de la microemulsión. A medida que disminuye la proporción del emulsificante las regiones anisotrópicas, que pueden consistir de varias estructuras, aumentan, mostrando una mayor área para cantidades menores del cotensoactivo.

Para el B-56 (Figura 15), se observa que éste por sí solo, al igual que el B-76, no es capaz de formar microemulsiones [191-193]. Además se puede ver que el área de microemulsión aumenta considerablemente, en particular la zona o/w, lo cual es lógico teniendo en consideración que a mayor hidrofiliidad del tensoactivo se favorecen más las formaciones aceite en agua y viceversa [198-199]; éste presenta un HLB de 12.9; muestra una cadena hidrofílica similar al B-76, pero con una cadena hidrocarbonada de 16 C, frente a los 18 del B-76.

Una de las teorías para explicar la formación de microemulsiones es la de Israelachvili, basada en el empaquetamiento geométrico, la cual implica que la

estabilidad de la microemulsión depende de las interacciones atractivas interfaciales (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión de van der Waals, etc.) [200] que promueven la integridad y continuidad de la capa interfacial. Por otra parte, el impedimento estérico de las moléculas en la interface hará que no haya continuidad en la capa interfacial debido a la formación de huecos intermoleculares. Con base en esto, se puede asumir que los alcoholes favorecen la estabilidad de una microemulsión debido a su capacidad para colocarse en la interface y evitar la repulsión entre las cadenas hidrofóbicas del tensoactivo, o bien librando un posible impedimento estérico debido al volumen de los éteres grasos polioxietilenados

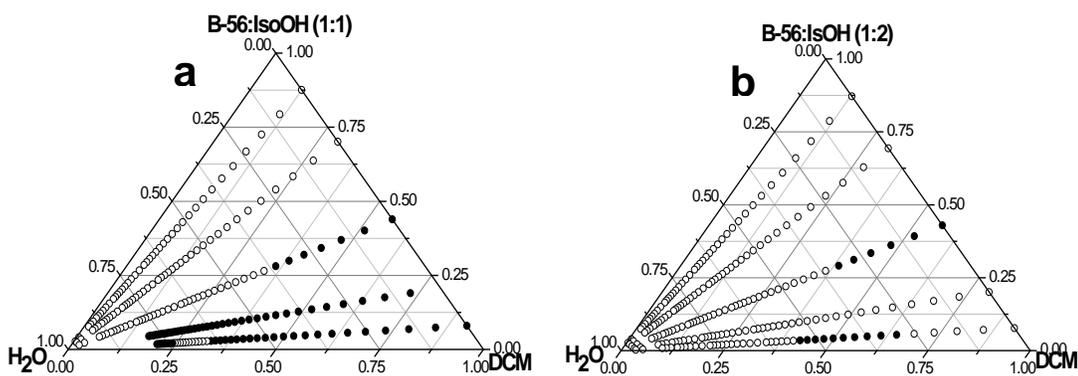


Figura 15: a) B-56:IsoOH 1:1

b) B-56:IsoOH 1:2 en donde (○=transparente, ●= turbio)

Los resultados concuerdan con otros similares de la bibliografía, en la cual se reporta que debido al posible comportamiento oleoso de este alcohol, la formación de estructuras continuas lipofílicas se ve favorecida [162].

Lo anterior implica que la presencia del isopropanol favorece las microemulsiones de cualquier tipo. Los grupos hidroxilo terminales del tensoactivo son hidrofílicos y en conjunto con el cotensoactivo no iónico, parece contribuir en la formación de las microemulsiones, las cuales pueden captar mayor cantidad de agua o de aceite en su fase interna.

Acharya A., et al [201] trabajaron con mezclas de B-52:IsoOH y encontraron porcentajes similares de áreas monofásicas.

5.2 Diagramas de fases pseudoternarios realizados con diferentes cotensoactivos y B-56

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos al cambiar el isopropanol por alcoholes de cadena más larga. Puede observarse que éstos no favorecen la formación de microemulsiones. Según se reporta en la bibliografía es posible que éstos no tengan una gran afinidad por la interface y por lo tanto no tengan la capacidad de modificar la estabilidad de la misma, colocándose preferentemente en el seno de la solución. Se observa principalmente comportamientos tipo Winsor; Winsor tipo I: con dos fases, la inferior, una microemulsión o /w en equilibrio con un exceso de aceite; Winsor tipo II: Con dos fases, la fase superior, una microemulsión w/o en equilibrio con un excedente de agua; Winsor tipo III: con tres fases, la fase intermedia, microemulsión (o/w y w/o, bicontinua) en equilibrio con excedente superior aceite y exceso inferior de agua; Winsor tipo IV: una sola fase, aceite, agua y tensoactivo homogéneamente mezclados [202-203].

En conclusión, los diagramas de B-76 en las distintas relaciones muestran pequeñas áreas de microemulsión, por lo cual el sistema de elección para usarse como horma de nanopartículas fue con el B-56, ya que con éste se pudieron obtener regiones de microemulsión en las cuales pudieran incorporarse tanto el PLGA como el closantel.

De las relaciones estudiadas de B-56 e isopropanol, la relación en la cual se obtuvo una mejor zona de microemulsión, fue la 1:2; siendo la composición más adecuada para el propósito de este trabajo, la que consta de una proporción de 80% de agua, 16 % de tensoactivo/cotensoactivo y 4% de diclorometano. Se logró obtener zonas de microemulsión con la menor cantidad de tensoactivo, la menor de agua y la mayor de fase orgánica, cumpliendo con la premisa de formar glóbulos de tamaño muy pequeño.

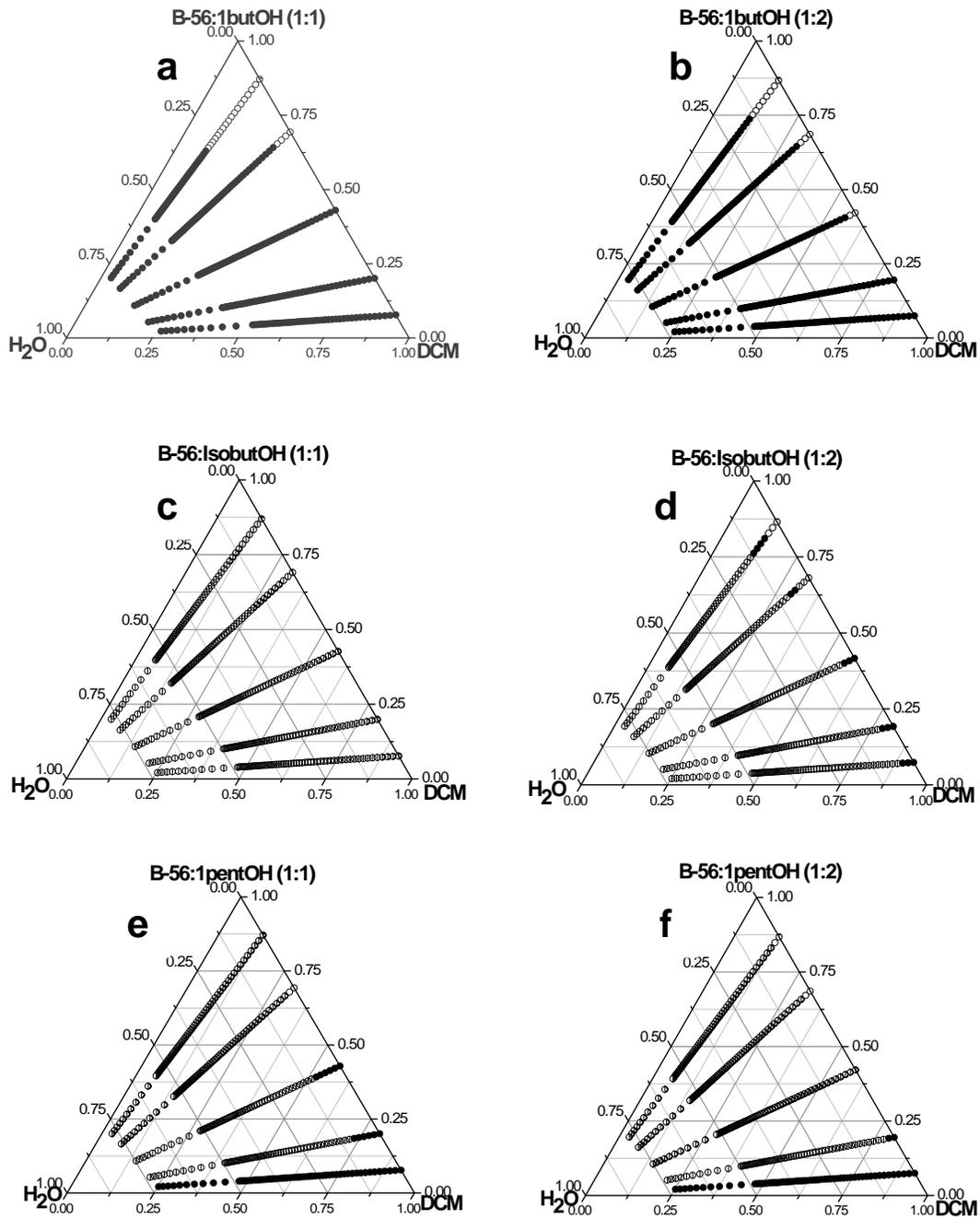


Figura 16: a) B-56:1-BuOH 1:1 b) B-56:1-BuOH 1:2 c) B-56:IsobuOH 1:1, d) B-56:IsobuOH 1:2 , e) B-56:1pentOH 1:1 e) B-56:1pentOH 1:2; en donde (○=transparente, ●= turbio, ■=turbio 2 fases y ▧=opalescente)

5.3 Diagrama de fases sistema B-56:IsoOH 1:2 con PLGA y closantel

Como puede observarse en la Figura 17 la presencia de pequeñas cantidades de PLGA (5×10^{-8} M) desfavorece completamente el sistema, evitando la formación de una microemulsión. Este estudio se hizo con distintas cantidades de PLGA y closantel (5×10^{-8} M y 6×10^{-3} M), juntos y por separado no lográndose en ningún momento el objetivo. Probablemente la baja proporción de DCM y tensoactivo no fueron suficientes para lograr la disolución de estas moléculas, y estabilizar el sistema formado.

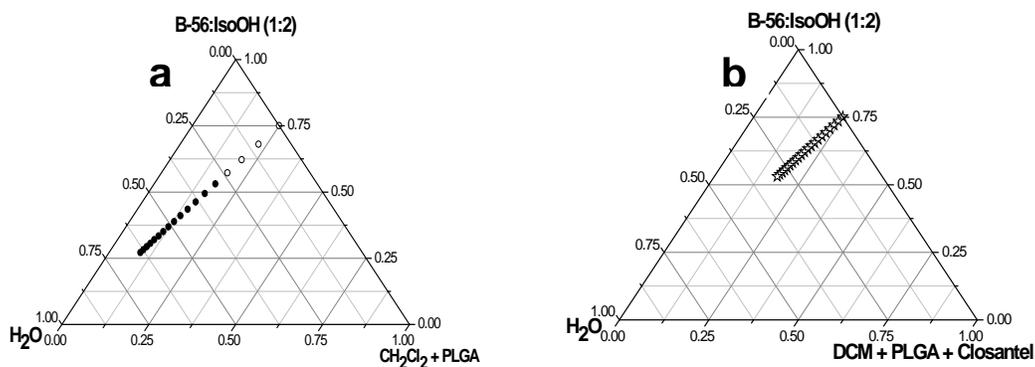


Figura 17: Diagrama de fases en donde se muestra la zona de incorporación de fármaco y de polímero

5.4. Preparación y caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas

Dado que no se consiguió lo que se deseaba, se cambió el PLGA por lecitina y se probaron diferentes técnicas de fabricación de sistemas nanométricos, elaboración de dispersiones sólidas (DS), técnica de hidratación de capa fina (liposomas) y emulsión-evaporación.

Debido a que el closantel no es una molécula de fácil manejo, por sus pobres propiedades de solubilidad en muchos disolventes, se optó por usar oxitetraciclina (OTC) con la finalidad de observar con esta molécula, el comportamiento del sistema obtenido para cada método. Posteriormente los resultados obtenidos se trasladaron al fármaco en estudio, el closantel.

5.4.1 Estudios de estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad a 6 meses de almacenamiento de las tres formulaciones basadas en lípidos en comparación con muestras recién preparadas (controles). La observación visual mostró un color blanco para las cuatro muestras al tiempo cero (OTC libre, SD, NSL y liposomas), en tanto que un color oscuro fue observado para la solución de OTC libre después de seis meses. Las otras tres muestras mantuvieron su aspecto (Figura 18). Los espectros de UV-Vis mostraron una nueva banda alrededor de 360 nm después de 6 meses para la OTC libre, mientras que para las otras tres muestras éstos permanecieron invariables (Figura 19). El aumento de estabilidad puede atribuirse a la inclusión de la OTC en sistemas coloidales, que la protege de la degradación de factores tales como la luz. De estas observaciones no es posible indicar un orden de correlación en términos de estabilidad. Curiosamente, todas las formulaciones al final de 6 meses de almacenamiento mostraron buen comportamiento frente a la degradación.

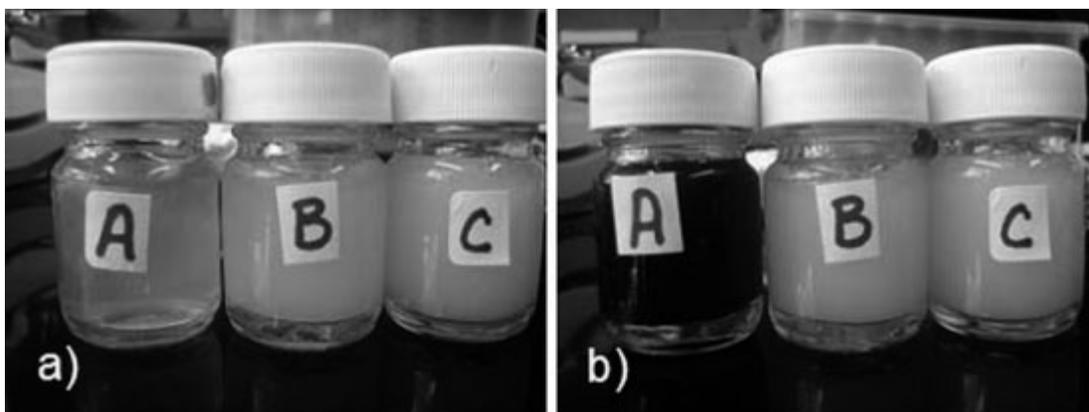


Figura. 18: Apariencia de las muestras de OTC: a) Tiempo 0 y b) a los 6 meses (A= disolución de OTC, B= OTC en NSL y C= OTC en liposomas)

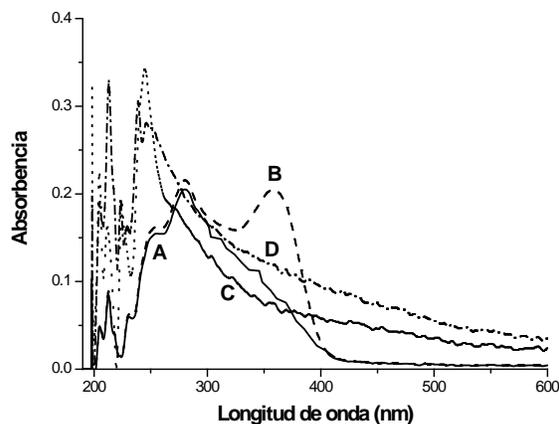


Fig. 19: Espectros de UV-Vis de Oxitetraciclina (A y B es la OTC libre; C y D son los liposomas a tiempo cero y 6 meses respectivamente)

5.4.2 Morfología

Las micrografías de SEM (Figura 20, a, b y c) muestran la morfología de los diferentes sistemas coloidales formados. Se observa, en b y c, formas esféricas y elipsoidales de talla submicrónica que efectivamente indican la formación de las NSL o liposomas, y no se aprecia OTC sin incorporar como en el caso de las DS (Figura 20a), en donde se aprecian cristales de OTC dispersados en lecitina y no se observa ninguna forma definida de otro tipo de partículas formadas.

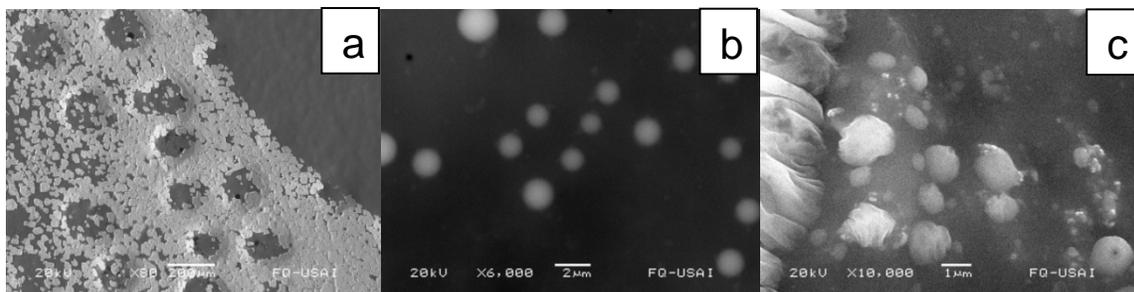


Figura 20. Micrografías de SEM. a) Dispersión Sólida, b) NSL y c) Liposomas

5.4.3 Tamaño y distribución de partícula

Las medidas del tamaño de partícula de los sistemas coloidales revelaron que la técnica usada para obtener estos nanosistemas afecta al tamaño de los mismos. El tamaño e índice de dispersión de las partículas obtenidas fue menor para NSL e incrementándose para liposomas y DS respectivamente (Tabla 1).

A pesar de que las muestras contienen la misma cantidad de OTC y lecitina, el tamaño de partícula se ve influenciado por la técnica empleada para la preparación de los coloides. Para NSL la presencia de T-20 disminuye la tensión superficial del medio acuoso favoreciendo el incremento del área superficial de la mezcla OTC y lecitina en el proceso de emulsificación, reduciéndose el tamaño de gota y por lo tanto generando partículas de tamaño reducido (7.57 nm), además el índice de polidispersidad (PDI) fue de 0.2 indicando homogeneidad de tamaño. En el caso de liposomas el tamaño de partícula es mayor (214.27 nm) debido a la formación de estructuras complejas. Los liposomas forman bicapas lipídicas que incluyen un volumen del medio acuoso en el que se prepararon, además existen reportes que con la técnica empleada se generan liposomas uni, oligo y multilamelares, que concuerda con el PDI de 0.5 obtenido. Para DS, el tamaño de partícula y PDI son los mayores de las tres preparaciones, atribuido principalmente al proceso de preparación en el cual no se utilizó tensoactivo ni energía para disminuir el tamaño, dando como resultado dispersiones coloidales groseras y multimodales (319 nm, PDI 0.642).

5.4.4 Potencial zeta

La medida de potencial zeta permite predecir la estabilidad de las dispersiones. En teoría, valores pronunciados de potencial zeta, más positivos o negativos, tienden a evitar la agregación de partículas debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no puede ser estrictamente aplicada a sistemas que contienen estabilizadores [204-208]. Los sistemas preparados presentan valores de potencial zeta en orden creciente NLS<DS<liposomas como se aprecia en la Tabla 1. Los liposomas presentan el valor más negativo de potencial zeta (-23.8 mV, vs -68mV para vesículas vacías) y es el más cercano al límite de estabilidad (-30 mV). Lo anterior se debe a que la técnica empleada para la preparación de liposomas permite la formación ordenada de las bicapas lipídicas, exponiendo las cargas negativas de los fosfolípidos (zwitteriones a pH 7.5) hacia el exterior. Debido a la incorporación de OTC en la bicapa y la presencia de sales en el medio (fosfatos y sodio) la carga en superficie se ve modificada y los grupos negativos de potencial

zeta son neutralizados [209]. En el caso de DS, el valor de potencial zeta es de -11.30 mV, este valor indica la disminución de cargas negativas en la superficie de las partículas comparado con lo mostrado para liposomas. La lecitina se encuentra en la superficie de la partícula pero no se encuentra organizada sino adsorbida sobre la superficie de los cristales de OTC de manera aleatoria. Por último, para NSL el potencial zeta es de -3.02 mV, lo que la hace la preparación más inestable de la serie. Este valor de potencial zeta se debe a que las cargas negativas de la PC han sido neutralizadas por la incorporación del amortiguador de fosfatos (PBS) durante la formación de las NSL, esto porque se ha permitido un mayor contacto de PBS con la estructura lipídica cambiando la orientación de las cargas en la superficie de las partículas hasta casi nulificarlas reflejado en el valor de potencial Z cercano a cero.

TABLA 1: Diámetro de partícula y potencial para los tres sistemas coloidales

Muestra	Diámetro hidrodinámico ± DE (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiencia de carga de fármaco
NSL	7.57	0.249	-3.02	79 %
Liposomas	214.27	0.540	-23.80	45 %
DS	319.82	0.642	-11.30	81%

5.4.5 Porcentaje de encapsulación

El prerrequisito para obtener una capacidad de carga suficiente es la alta solubilidad del fármaco en el lípido. La naturaleza de los mismos es también importante debido a su capacidad para formar partículas cristalinas con una perfecta red (p.e: triglicéridos monoácidos) que lleva a la expulsión del fármaco [210]. Lípidos más complejos, como mezclas de mono, di y triglicéridos con ácidos grasos llevan a cristales no tan perfectos, con numerosas imperfecciones que ofrecen espacio para los fármacos [211]. Aunque el lípido y su concentración son los mismos para los tres sistemas estudiados, el porcentaje de encapsulación varía entre ellos. Hay trabajos que informan que la eficacia de encapsulación

aumenta en función del tamaño y también, en el caso de liposomas, que a menor tamaño mejor capacidad de encapsular [212].

Los resultados en la Tabla 1 muestran que los liposomas son las partículas que menor cantidad de OTC encapsula, seguida de las NSL y las DS respectivamente. El porcentaje de encapsulación bajo en liposomas es debido a que la OTC tiene más afinidad por el medio orgánico, incorporándose solamente en la bicapa lipídica, lo que limita la eficiencia de carga y se reduce a 45%. La cantidad de fármaco encapsulado en NSL y DS es alto, probablemente debido a las técnicas de fabricación que implican la incorporación de la OTC desde el inicio de la técnica. Tomando en cuenta que esta molécula es hidrofóbica, no difunde hacia el medio acuoso y aumenta de este modo la eficacia de encapsulación en los sistemas.

5.4.6 Velocidad de liberación *in vitro*

Los perfiles de liberación de la OTC en disolución y OTC en NSL, liposomas y DS son mostrados en la Figura 21. Se aprecia que el porcentaje liberado de OTC en disolución es el más alto comparado con los sistemas en que OTC está cargado, lo que es lógico porque se encuentra disuelta y sólo tiene la membrana de separación entre celdas como impedimento para pasar al receptor, logrando un 51.46% liberado a las 48 h que duró el estudio. La velocidad de liberación se ve disminuida cuando la OTC está formulada en los acarreadores lipídicos. Las cantidades liberadas de OTC a partir de cada uno de los sistemas a las 48 h son: 9.59% de OTC en DS, en liposomas (15.88%) y en NSL (20.53%).

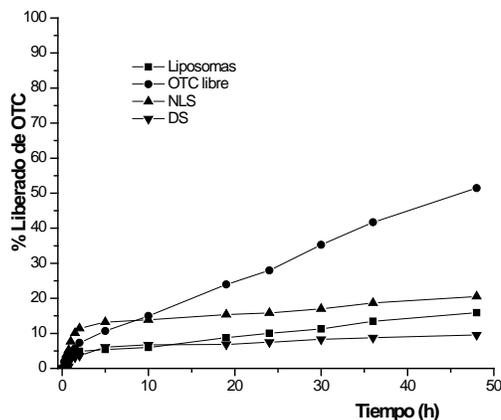


Figura 21. % Liberado de OTC *in vitro*: ●= OTC libre, ■ = Liposomas, ▲ = NSL y ▼ =DS

El microambiente del sistema coloidal retiene al fármaco logrando de este modo una liberación más lenta con respecto a la OTC libre. Las cantidades liberadas están en concordancia con el tamaño del coloide, a mayor área superficial más rápida es la liberación. Además, las NSL tienen tensoactivo en su formulación, el cual favorece la liberación. También, para las tres formulaciones se observa un efecto “burst” inicial, el cual probablemente se debe a un efecto de desorción del fármaco situado en las capas externas

Dado que la mejor técnica resultó ser la de emulsión-evaporación, se trasladó la metodología al closantel. Se inició buscando los parámetros de formulación que lograban dar un sistema de menor tamaño, más uniforme (menor índice de dispersión) y mayor estabilidad electrocinética.

Se eligió como disolvente orgánico el diclorometano, por la gran solubilidad de los componentes de la formulación en el mismo y como tensoactivo el T-20 por su baja toxicidad en el organismo [213-214]. Se llevó a cabo el estudio al 1, 2, 3 y 5%. (m/v) Los resultados se muestran en la siguiente gráfica (Figura 22) y tabla (Tabla 2). Puede observarse que a bajas concentraciones de estabilizante, los sistemas dispersos nanoparticulados muestran más de una población, mientras que al 3 y 5% ya son monodispersos y con un PDI bajo (< 0.3). Por lo tanto 5% de T-20 (p/v) fue la cantidad determinada para todos los estudios posteriores.

Tabla 2: Comparación entre el tamaño de partícula para cada formulación evaluada en el experimento a tiempo cero y 1 semana después

Experimento 1				
Formulación	Caracterización inicial		Caracterización final	
	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
	Promedio			
1 (T20 al 1%)	11.280	0.372	216.100	0.474
2 (T20 al 2%)	9.918	0.364	41.400	0.355
3 (T20 al 3%)	8.328	0.235	65.540	0.337
4 (T20 al 5%)	8.110	0.224	57.630	0.454

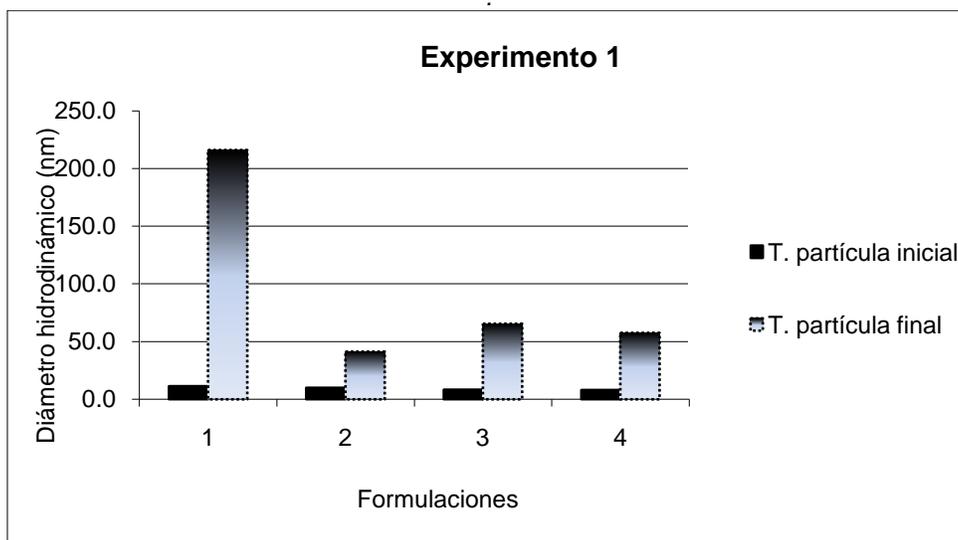


Figura 22: Comparación entre el tamaño de partícula para cada formulación evaluada en el experimento 1 después de su elaboración (inicial) y después de 10 días.

Sin embargo al llevar a cabo un estudio de tamaño en función del tiempo (Figura 22), se puede observar que la población de nanopartículas aumenta considerablemente su tamaño, así como el PDI. Esto da indicio de la falta de estabilidad cinética del sistema. Por ello, se procedió a adicionar sales al medio (inicialmente agua), trabajando a pH 7.4 con amortiguador de fosfatos a diferentes cantidades: 0.01 M, 0.1 M, y 0.2 M (Figura 23).

Tabla 3. Comparación entre el tamaño de partícula para cada formulación evaluada en el experimento 2.

Experimento 2			
Formulación	Diámetro hidrodinámico (nm)		PDI
	Promedio	DE	Promedio
1 (PBS 0.01M)	10.370	0.091	0.291
2 (PBS 0.1M)	10.140	1.088	0.238
3 (PBS 0.2M)	10.990	0.102	0.305

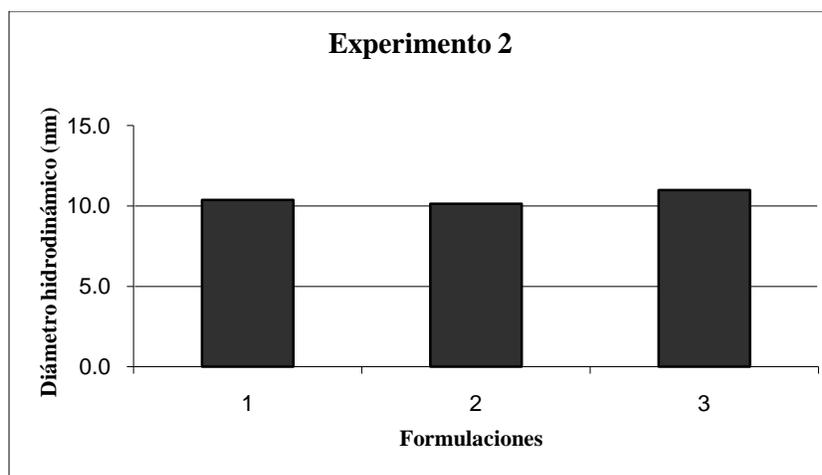


Figura 23. Comparación entre el diámetro de partícula para cada formulación evaluada en el experimento 2.

Sin embargo se observa que el potencial zeta en presencia de estas sales es muy bajo (-4.04, -1.69 y -1.04 mV, respectivamente para cada concentración usada de fosfatos). Esto indica que no hay mejora en la estabilidad del sistema. No obstante se repitieron estos experimentos aumentando al doble la cantidad de lecitina y closantel utilizados y modificando el volumen de DCM necesario para dispersar el closantel. Con el amortiguador 0.01M aparecen de nuevo dos poblaciones, indicando la falta de estabilidad del sistema, aunque con 0.1 y 0.2M se obtienen sistemas monodispersos, durante la fabricación de los mismos se encontraron problemas de separación de fases en el caso de mayor cantidad de sales.

Tabla 4. Comparación entre el tamaño de partícula para cada formulación evaluada en el experimento 3 después de su elaboración y una semana después.

Experimento 3: Doble cantidad de closantel y de lecitina (3 Concentraciones de PBS)				
Formulación	Caracterización inicial F1, F2 y F3		Caracterización final	
	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
	Promedio			
1 (PBS 0.01M)	8.916	0.310	11.580	0.350
2(PBS 0.1M)	8.911	0.111	9.126	0.167
3 (PBS 0.2M)	9.725	0.138	11.480	0.221

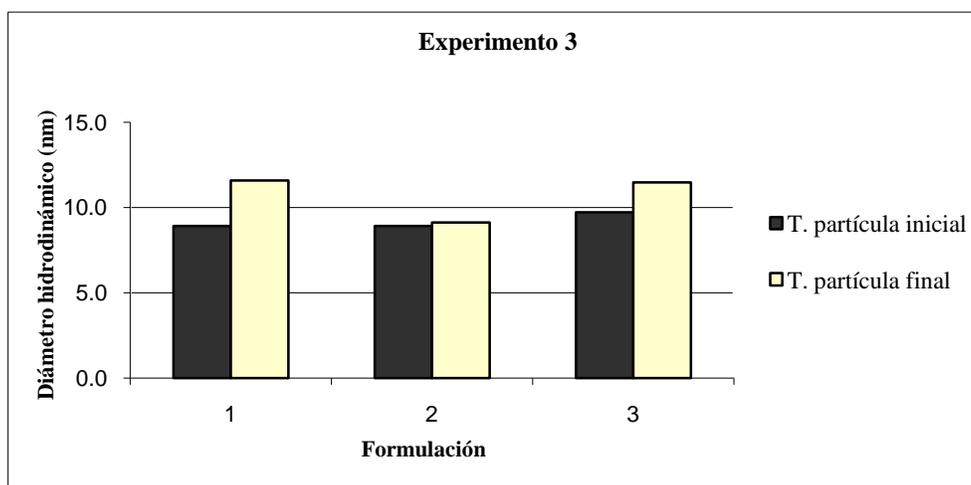


Figura 24: Comparación entre el tamaño de partícula para cada formulación evaluada en el experimento 3 después de su elaboración (inicial) y después de 1 semana.

La mayor estabilización a cortos plazos se logra con fosfatos 0.1M, por lo que se elige como medio acuoso de trabajo.

Con la finalidad de obtener sistemas con mayor carga de lecitina y closantel, se volvió a formular con 3% de T-20, dado que los resultados son muy similares a los obtenidos con cantidades mayores del mismo. Los resultados son muy parecidos a los anteriormente reportados con menor cantidad de fármaco y lípido.

Con la finalidad de mejorar el potencial zeta de los preparados se estudiaron diferentes sales y en distintas proporciones. Los resultados se muestran en la tabla 5 y Figura 25, para KCl, mientras que con NaCl no fue posible lograr el sistema deseado, ya que se formaba una dispersión altamente viscosa como una crema, probablemente debido a la fuerte interacción entre los glóbulos formados.

Tabla 5: Mejoramiento del potencial Z con adición de KCl a las NSL

(M) 10 ⁻⁵	Potencial Z (mV)
0	-4.28
1.34	-6.32
2.64	-8.11
4.02	-10.7
5.36	-8.98
6.70	-12.1

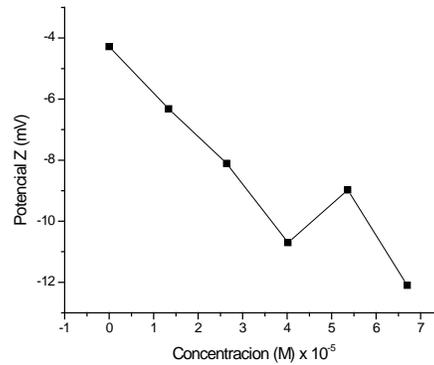


Figura 25: Gráfica del potencial Z en función de la concentración de KCl

Microscopía Electrónica de Transmisión

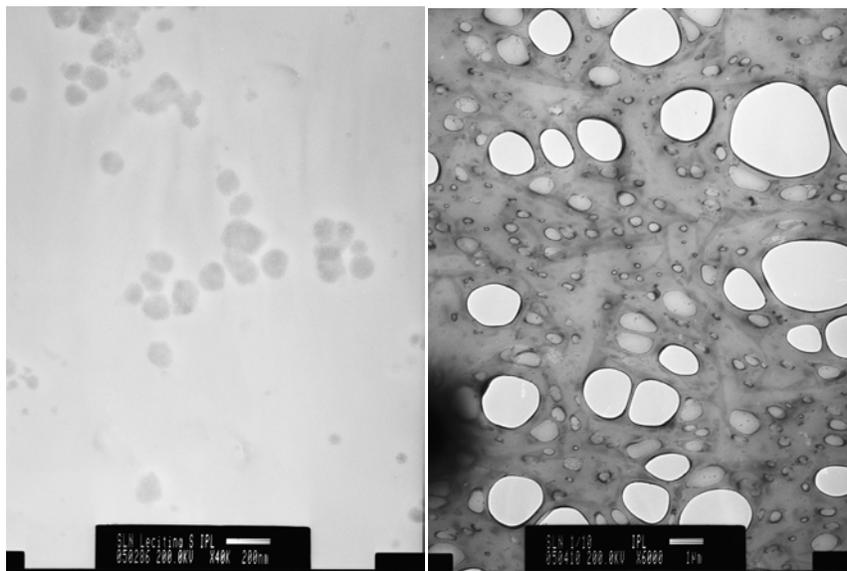


Figura 26: Micrografía electrónica de transmisión de las NSL

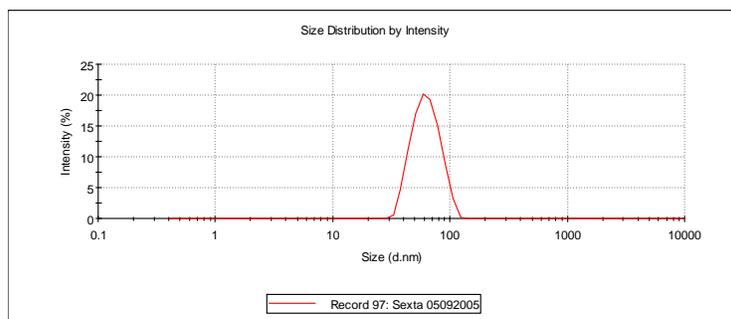


Figura 27: Diámetro promedio de las NSL empleando la técnica de dispersión dinámica de luz.

CONSIDERACIONES GENERALES DURANTE LAS METODOLOGÍAS DE ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES

- La solubilidad del closantel en DCM es de 3.4 mg/mL, por ello del experimento 1 al 3 se llevó a cabo la disolución completa del closantel antes de mezclarlo con lecitina haciendo el cálculo pertinente del volumen requerido, y a su vez con la fase acuosa (T-20 a diferentes concentraciones en PBS)
- En los experimentos 4 y 5 se fijó el volumen de DCM (50 mL) para generar solamente una dispersión y no una solución del principio activo.
- La solubilidad de la lecitina de soya es completa y sólo se requirió de poco volumen del disolvente orgánico durante el desarrollo de las formulaciones para cada experimento.
- En las formulaciones 2 y 3 del experimento 2 en la etapa de mezclado mecánico constante a 300 rpm en principio se utilizó la velocidad de agitación al doble, es decir, a 600rpm dado que en principio se formaba una sustancia espesa que difícilmente se mezclaba a 300rpm.
- En las formulaciones 1, 2 y 3 del experimento 3, se utilizó también al inicio del mezclado mecánico una velocidad de agitación de 600 rpm, para luego disminuir a 300 rpm debido a que presentó características similares a las formulaciones 2 y 3 del experimento 2.
- En el experimento 4 al inicio de la etapa de mezclado se empleó una velocidad de agitación de 900rpm debido a que presentó una consistencia más espesa que las formulaciones obtenidas en el experimento 2 (formulaciones 2 y 3) y 3 (formulaciones 1, 2 y 3) para luego disminuir esta velocidad a 300 rpm.
- En el experimento 4 y 5 se trabajó a una temperatura de 40 °C para favorecer la evaporación del disolvente orgánico; en tanto que en las demás formulaciones de los experimentos 1, 2 y 3 se trabajó a temperatura ambiente.
- En todas las formulaciones se llevó a cabo una filtración a través de un filtro cuyo tamaño de poro fue de 125µm.

5.5 Obtención de nanopartículas de PLGA y closantel por el método de desplazamiento de disolvente

5.5.1 Estudios de interacción closantel-PVA

Con la finalidad de conocer la interacción entre el estabilizante (PVA) y el fármaco (closantel), se realizaron mezclas de PVA al 1% y diferentes cantidades de fármaco (10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$).

5.5.1.1 Tamaño de partícula

La Figura 28 muestra la variación de tamaño de partícula como función de la cantidad de closantel adicionado, se observa un ligero aumento del diámetro hasta la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, y después se observa un ligero descenso a 30 $\mu\text{g/mL}$ para finalmente caer entre 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$.

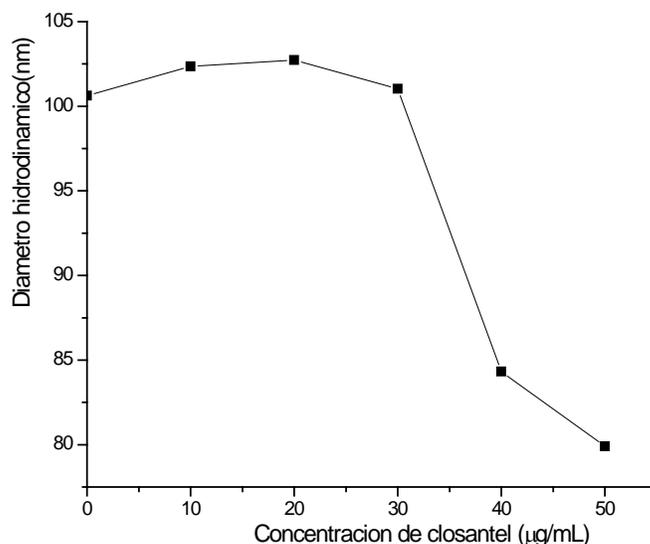


Figure 28: Diámetro de las partículas en solución de PVA 1% (p/v) a diferentes concentraciones de closantel

Estos datos sugieren que el tamaño de partícula debido meramente al PVA es de aproximadamente 100 nm, y a medida que entra en escena un tercer componente, en este caso el closantel, el cúmulo de PVA empieza a interactuar con el fármaco debido posiblemente a una mayor afinidad por éste que por las moléculas de disolvente (agua) y de esta manera disminuir su tamaño, y finalmente a medida

que aumenta el closantel se observa una precipitación debido a una saturación con el polímero (por encima de 50 $\mu\text{g/mL}$). Lo anterior puede comprenderse mejor si se hace referencia a la mezcla de un polímero con un “buen disolvente” (altamente compatible), en este caso la interacción entre disolvente y polímero hace que el cúmulo macromolecular se expanda a partir del estado no perturbado en ausencia de estas interacciones; la expansión en presencia de un disolvente “pobre” es menor, en este caso el closantel hace que el agua no tenga tan buena afinidad con el PVA, y si lo haya entre el estabilizante y el fármaco.

5.5.1 2 Análisis conformacional de la interacción PVA-closantel

Los resultados experimentales sugieren que las moléculas de PVA tienen diámetros hidrodinámicos de alrededor de 100 nm, teniendo en cuenta los estudios teóricos es posible decir que estos datos corresponden al cúmulo de PVA, resultado que concuerda con otras investigaciones anteriores [215]. Lo anteriormente mencionado es apoyado el siguiente análisis conformacional:

El modelo de PVA (PM= 1275 g/mol) muestra que la configuración más estable (Figura 29a) tiene una forma globular y presenta un volumen de 3231 Å^3 , indicando que tiene un radio de aproximadamente 11 Å ; haciendo la relación de volúmenes con el PVA usado (PM=104,500 g/mol), se considera que su volumen es de aproximadamente 82 veces mayor que el modelo. El radio de una sola molécula de PVA sería de 4 nm, en tanto que experimentalmente se observó un radio veinticinco veces más grande. Esto sugiere que la agrupación de polímeros ocupa alrededor de $4 \times 10^6 \text{ nm}^3$, lo que implica como máximo 15,000 moléculas de PVA, ya que no se considera el volumen ocupado por el disolvente.

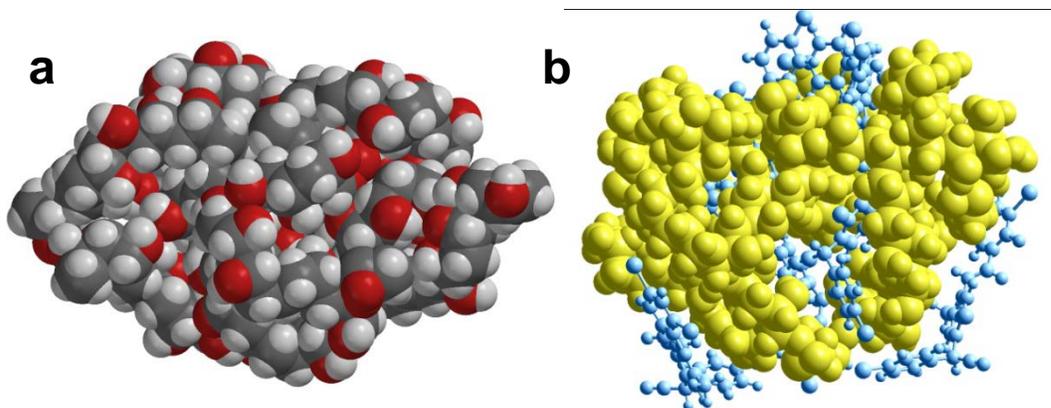


Figure 29: Modelo de interacción de PVA-closantel obtenido por análisis conformacional

Cálculos de análisis conformacional sugieren que la asociación de closantel con el polímero es más estable (Figura 3b) a medida que aumenta el número de moléculas de closantel hasta 30 $\mu\text{g/mL}$. Este hecho podría explicar los datos experimentales mostrados en la Figura 28. Además, esta caída abrupta de tamaño puede estar relacionada con la ruptura del cúmulo debido a que el fármaco interactúa principalmente con la superficie del polímero, y de esta forma, a determinadas concentraciones desfavorece las interacciones intermoleculares PVA-PVA.

5.5.1 3 Interacción de closantel y PVA en solución acuosa

La solución acuosa de closantel ($7.53 \times 10^{-5} \text{ M}$) muestra una absorción máxima en 377 nm. Al adicionar PVA, en el intervalo de concentración de 4.7×10^{-6} a 1.7×10^{-4} , la absorción máxima no cambia, pero se observa un incremento en la señal (efecto hipercrómico). Estos cambios en el espectro de absorción indican una interacción entre el fármaco y el PVA. El proceso de interacción entre closantel y PVA puede ser representado por el siguiente equilibrio:



donde **N** es el sitio de unión en la cadena polimérica y **[N]** es el producto del número de sitios de unión en la cadena polimérica **n** y **[PVA]**, es decir, **[N] = n [PVA]**. La constante de interacción (**K**) para el equilibrio anterior está dada por Ecuación 10:

$$\Delta A = \frac{nK_b[\text{Closantel}]_t[\text{PVA}]\Delta\epsilon}{1+K_b[\text{PVA}]}$$

Ecuación 10

donde ΔA es la absorbancia total del closantel a cada concentración de PVA menos absorbancia de closantel sin polímero y $\Delta\epsilon$ es la diferencia de la absorptividad molar entre fármaco libre y atrapado. Los valores de absorbancia de las respectivas concentraciones de PVA fueron ajustados a una ecuación de isoterma de enlace. La Figura 30 muestra la gráfica, ΔA vs $[\text{PVA}]$ y el ajuste lineal de mínimos cuadrados. A partir del ajuste se calcularon: el producto del número de los sitios de enlace por la constante de enlace (nK) y la diferencia entre el coeficiente de extinción del fármaco atrapado y el libre ($\Delta\epsilon$). Bajo esta condición, el nK y el $\Delta\epsilon$ se estimaron a 377 nm y se encontró que éstos son de 93709 M^{-1} y $10322 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

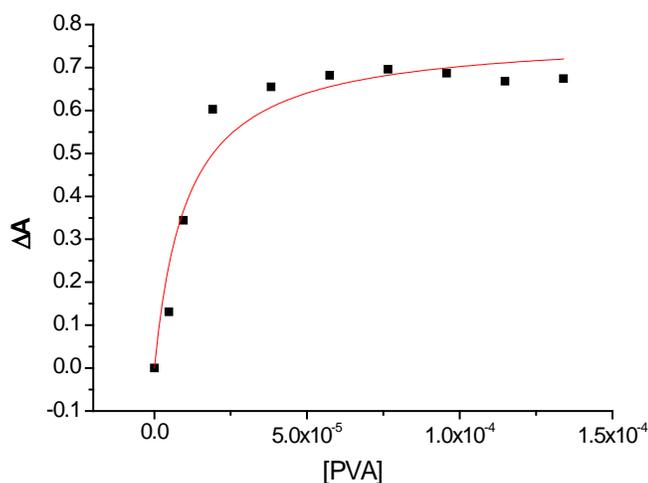


Figura 30. Isoterma de unión de closantel a diferentes concentraciones de PVA (4.7×10^{-6} a 1.7×10^{-4}), a pH 7.4.

El cambio hipercrómico observado en el espectro de UV-Vis indica una probable interacción del closantel con las regiones hidrofóbicas del PVA, debido a la naturaleza hidrofóbica del fármaco, pero el closantel tiene un grupo OH fenólico que se ioniza en estas condiciones, lo que hace que se pueda incrustar también en las regiones hidrofílicas del PVA. Por lo tanto, es posible que teniendo en cuenta la concentración de closantel, éste se encuentre en el cúmulo de PVA a

baja concentraciones, mientras que a concentraciones altas una porción de closantel esté fuera del PVA, adsorbido en su superficie.

5.5.1 4 Estudios reológicos de PVA con y sin closantel

Los estudios de viscosidad de PVA al 1% y del mismo con diferentes concentraciones de closantel (10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$) se muestran en la Figura 31.

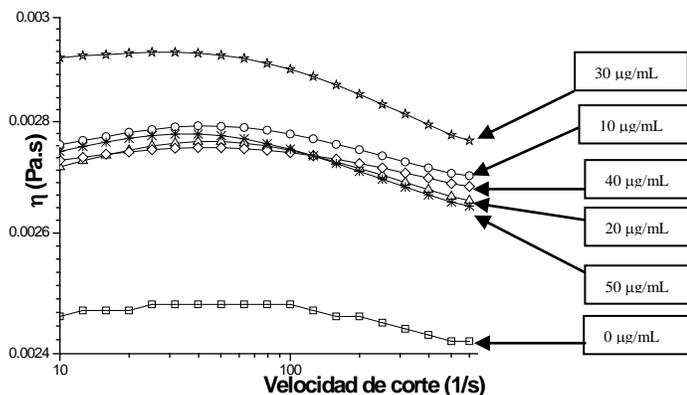


Figura 31: Viscosidad a 25 °C de PVA 1% con diferentes concentraciones de closantel

Se observa un valor constante de viscosidad a bajos cortes ($<100 \text{ s}^{-1}$), este comportamiento es indicativo de que la fuerza hidrodinámica no afecta a la estructura del sistema, sin embargo a valores altos de velocidad de corte ($>100 \text{ s}^{-1}$), se observa una ligera caída, indicando que la fuerza hidrodinámica supera a las fuerzas viscosas y ésta cae; el comportamiento es similar para los 6 sistemas evaluados, siendo más marcado este comportamiento de adelgazamiento para la muestra de 30 $\mu\text{g/mL}$.

La viscosidad del sistema de PVA y closantel aumenta a medida que incrementa la concentración de closantel en el intervalo de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$, notándose un marcado incremento a 30 $\mu\text{g/mL}$, y finalmente desciende ligeramente.

Con respecto a las pruebas oscilatorias de estos sistemas, las cuales se muestran en la Figura 32, se observa que todos los sistemas muestran el mismo comportamiento en el módulo viscoso (G''). La pendiente de G'' de PVA con diferentes cantidades de closantel prácticamente se mantiene constante. En todos los casos existe un cambio de la pendiente alrededor de aproximadamente 50 rad/s, que podrían indicar cambios conformacionales en el sistema.

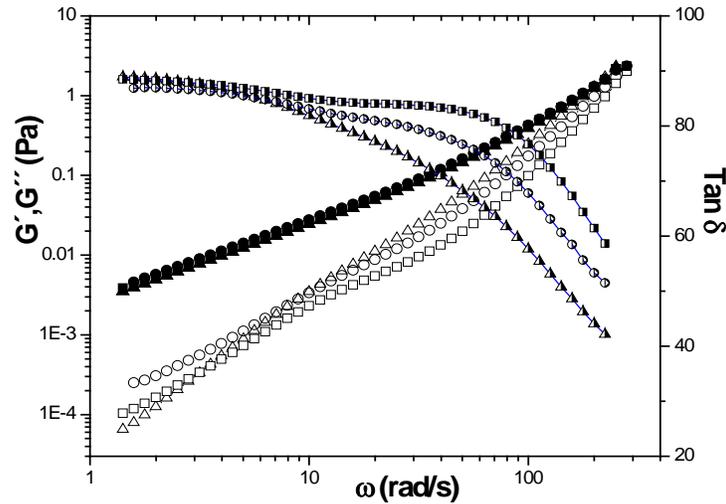


Figura 32: Espectros mecánicos a diferentes concentraciones de closantel. G' ($\Delta= 0$, $\circ= 30$ y $\square= 50$ $\mu\text{g/mL}$) y G'' ($\Delta= 0$, $\bullet= 30$ and $\blacksquare= 50$ $\mu\text{g/mL}$) a 25 $^{\circ}\text{C}$ como función de la frecuencia angular.

Por otro lado el comportamiento del módulo elástico (G') es mucho más complejo; si se considera la pendiente de todos los sistemas, se pueden observar tres zonas claramente diferentes: uno por debajo de 10 rad/s (tiempos largos), otra más entre 10 y 100 rad/s y por último por arriba de los 100 rad/s (tiempos cortos); estas zonas podrían ser indicativos de cambios estructurales que existen en el sistema (PVA-closantel) como función de la frecuencia, y además como función de la cantidad de closantel presente en el medio. Con respecto al ángulo de pérdida, el comportamiento es el mismo para los 6 sistemas estudiados, lo cual es indicativo de que G' y G'' cambian con la misma proporción para todas las frecuencias estudiadas. A bajas frecuencias el valor de G' es menor que G'' indicando un predominio de un comportamiento viscoso, pero a frecuencias altas G' es el que predomina, mostrando un comportamiento más elástico del sistema. En la literatura se menciona que el módulo elástico (G') es influido por el efecto de interacciones de puente de hidrógeno, en este caso el closantel puede estar modulando dicho comportamiento [216].

5.5.2 Discusión reológica

Para conocer cómo influye el fármaco en el comportamiento reológico del sistema, se calcularon varios parámetros (a partir de la ecuación de Stokes-Einstein), entre ellos, coeficiente de difusión (**D**) y el número de Reynolds (**Re**). En la Figura 33, (**D** vs **Re**) a diferentes concentraciones de closantel se observa que hasta la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ la difusión va disminuyendo, probablemente se deba a un efecto de la viscosidad y que al aumentar ésta, disminuye el movimiento browniano de las moléculas en el medio, sin embargo a 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de closantel la difusión aumenta considerablemente, aunque la viscosidad es similar en los distintos sistemas, lo que indica un efecto debido al tamaño de las partículas, como se observó en la Figura 28 el tamaño disminuye en gran proporción.

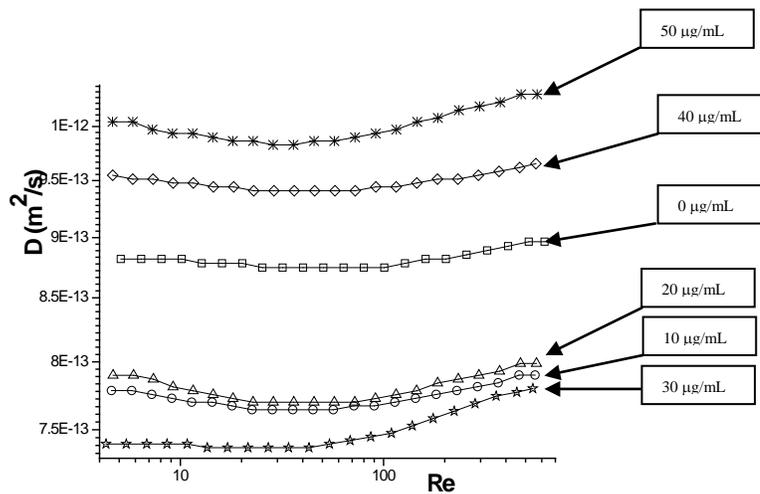


Figura 33: D vs Re a diferentes concentraciones de closantel en PVA al 1%

5.5.2 1 Efecto de velocidad de corte

En el eje de las x se puede ver un decremento inicial, inmediatamente después un aumento, y a altas velocidades de corte se alcanza una constante en el valor de **D**. Este comportamiento indica que si la velocidad de corte no es suficientemente grande, el material no se alinea con el flujo y sólo se muestra el efecto de la viscosidad, pero cuando aumenta la velocidad de corte, se logra la alineación del material, y el comportamiento es lineal, asintótico al eje horizontal. La Figura 33 muestra **D** vs **Re** a diferentes concentraciones de closantel, valores altos de

número de **Re** indican un gran efecto de la velocidad de corte generada por el reómetro en relación con la viscosidad del fluido, valores bajos de **Re** implica un régimen de flujo dominada por efectos viscosos. Comparando las seis muestras, se observa un comportamiento similar, excepto en la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ de closantel. A bajos **Re**, la **D** es pequeña debido a un componente viscoso, pero cuando aumenta **Re**, sólo la velocidad de corte influye no así la viscosidad, por lo tanto, el efecto convectivo supera el efecto difusivo. En la muestra de 30 $\mu\text{g/mL}$, a valores altos de **Re**, aumenta la difusión, probablemente por debajo de 100 **Re** la molécula tiene una cierta configuración, pero el efecto del movimiento lo propaga y guía, por lo tanto **D** aumenta, podría ser un efecto de desenrollamiento del sistema al pasar de una configuración globular a una configuración elipsoidal, que favorecería los fenómenos difusivos.

Se podría considerar que a partir de 100 **Re** el sistema tiene una distribución de partículas de diferentes configuraciones, una mezcla, es decir, no hay homogeneidad. Las muestras con alta concentración de closantel muestran valores altos de **D**, lo que es debido al tamaño pequeño de sus clusters, lo que indica una gran compactación por un efecto de colapso debido a las interacciones hidrofóbicas.

Por otro lado se calcularon los tiempos característicos de cada muestra (a partir de la Figura 33); los cuales se muestran en la Figura 34. Como ya ha sido comentado anteriormente, estos resultados concuerdan con que a bajas concentraciones de closantel el sistema es más estructurado, es necesaria más energía para realizar cambios, y λ es más grande, sin embargo para 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de closantel, el sistema sufre cambios más pequeños de estructuración y λ disminuye de esta forma, indicando que es más fácil modificar su configuración.

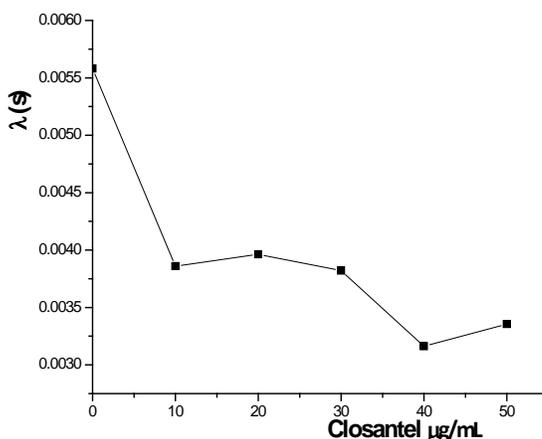


Figura 34: Tiempo característico (λ) vs ($\mu\text{g/mL}$) a diferentes concentraciones de closantel en solución de PVA al 1%.

Todos los resultados pueden ser explicados basados en el hecho, también ya demostrado, de que el closantel muestra afinidad por las moléculas de PVA, interactuando con ellas, (véase la sección de interacción); por otra parte, los estudios teóricos muestran la formación de rizos en presencia de closantel, favoreciendo la formación de cúmulos de PVA-fármaco a medida que aumenta el closantel, también es posible desfavorecer la unión de más de una molécula de PVA en el cúmulo y que exista una ruptura de éste a 30 μg de closantel, disminuyendo el tamaño, desordenando el sistema, mostrando de esta manera un aumento en la difusión y una disminución del tiempo característico.

También probablemente el PVA en agua adopta una conformación con un núcleo central formado por unidades hidrofóbicas rodeadas de bucles, conformados por largos bloques de alcohol vinílico hidrofílico (OH), que son altamente solvatados formando una capa exterior.

Por el contrario, entre más bajo el grado de "blockiness" y PVAs de bajo peso molecular poseen bloque de acetato de longitudes más cortas, que están estadísticamente más secuenciados a lo largo de la cadena. Como resultado, es probable que esté menos solvatado por el disolvente, causando que la cadena se contraiga más en el disolvente, resultando en una conformación más densa. Una ilustración esquemática de estas conformaciones propuestas se muestra en la Figura 29.

Esencialmente, uno podría esperar que el PVA se contraiga a medida que las interacciones intramoleculares entre las cadenas aumenten. En el caso de PVAs con regiones hidrofílicas más largas, éste se encuentra relajado en el disolvente, obteniéndose un radio hidrodinámico mayor ya que el coeficiente de difusión (a partir de la ecuación de Stokes-Einstein) disminuye. Es concebible que la difusión traslación del cúmulo pseudomicellar del PVA sea más lenta debido también al movimiento interno de la micela, es decir, un proceso de disociación-asociación consecutivos de la pseudo-micela además del movimiento aleatorio en el disolvente. Existen simultáneamente un efecto hidrofóbico de asociación y un efecto de repulsión electrostática dentro de las macromoléculas. Con el aumento de la concentración de closantel, los efectos hidrofóbicos de asociación son reforzados, y la asociación intermolecular aumenta, por lo que la viscosidad aumenta.

La adición de closantel mejora la asociación intermolecular debido a que la afinidad entre PVA y el fármaco es mejor que la de PVA y la molécula de disolvente. Por otro lado, el fuerte efecto hidrofóbico cubre la repulsión intermolecular y hace que la molécula de polímero se contraiga.

5.5.2 2 Efecto de closantel sobre las propiedades viscoelásticas del PVA

Los cambios en el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') de las soluciones PVA en función de la frecuencia (ω) son mostrados en la Figura 32. La pendiente (2.76×10^{-3}) de la G'' de PVA con diferentes cantidades de closantel muestra que tienen casi el mismo valor y dependiente a todos los valores de frecuencia. Debe observarse que la pendiente de la G'' incrementa con el aumento de la cantidad de closantel a valores altos de ω (tiempos cortos) y a valores bajos de ω (tiempos largos) sólo la pendiente de 30 $\mu\text{g/mL}$ es casi constante e independiente de ω .

Se sabe que G' está influenciado por efecto de las interacciones de puente de hidrógeno debido a las diferentes cantidades de closantel. Existen evidencias de que el PVA en agua no asume una conformación aleatoria, sino una supraestructura mediada por la interacción entre segmentos del polímero o la

interacción de polímero-disolvente, en el caso cuando el closantel, un fármaco hidrofóbico es agregado a la solución de PVA, la interacción entre las moléculas de agua y PVA se vuelve menos importante, y la interacción entre polímero y fármaco incrementa, este cambio influye en el módulo elástico (G') y esto es más evidente a frecuencias bajas debido a que el sistema tiene más posibilidades de interactuar. Los puentes de hidrógeno tiene una gran influencia en las propiedades de bulto del PVA; Sin embargo, existen pocos estudios sobre la influencia de dicha unión sobre la estructura del PVA en solución acuosa.

5.5.3 Influencia de la relación PLA-PGA en la obtención de nanopartículas

Las nanopartículas se elaboraron con diferentes relaciones de LA/GA, esto con la finalidad de contar con suficiente información que nos indicara cómo se modifica la estabilidad estructural y tamaño de partícula del sistema nanoparticulado a medida que incrementa la cantidad de ácido láctico (Tabla 6); por otra parte se elaboraron nanopartículas sin fármaco (closantel) con el objetivo de evidenciar cómo afecta la presencia de éste en las propiedades reológicas, tamaño de partícula y potencial Z del sistema.

Tabla 6: Influencia de la relación de L/G en el tamaño de partícula de NP de PLGA

Np PLGA	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)
50/50	454	-4.13
65/35	1020	-3.57
75/25	1300	-5.20
85/15	1380	-3.18

La respuesta reológica de los sistemas nanoparticulados que contienen closantel se muestra en la Figura 35a, observando que el modulo viscoso (G'') es semejante para todos los sistemas, mientras que el modulo elástico (la estructura del material) muestra mayores cambios para los sistemas con mayor composición de láctico, posiblemente debido a sus mayores tamaños de partícula y a una mayor variabilidad de de los mismos, ($\sim\%CV=3.9$), por otro lado, el sistema más estable es el PLGA 50/50 cuyo tamaño de partícula fue el menor y el más homogéneo ($\%CV=0.05$). La respuesta reológica de los sistemas nanoparticulados que no contienen closantel se muestran en la Figura 35b, observando que el

sistema elaborado con PLA muestra un comportamiento más variables en ambos módulos (G'' y G'). El módulo elástico para los sistemas sin closantel muestra menor variabilidad en su comportamiento (independencia respecto a la frecuencia) comparados con los que tienen closantel, influyendo más en el PLA para ambos módulos como se puede observar.

De nuevo, en las muestras sin closantel se evidencia que el aumento de láctico en la composición del polímero conlleva a más cambios de pendiente en la gráfica de G' vs frecuencia, indicando inestabilidad estructural del sistema en función de este parámetro.

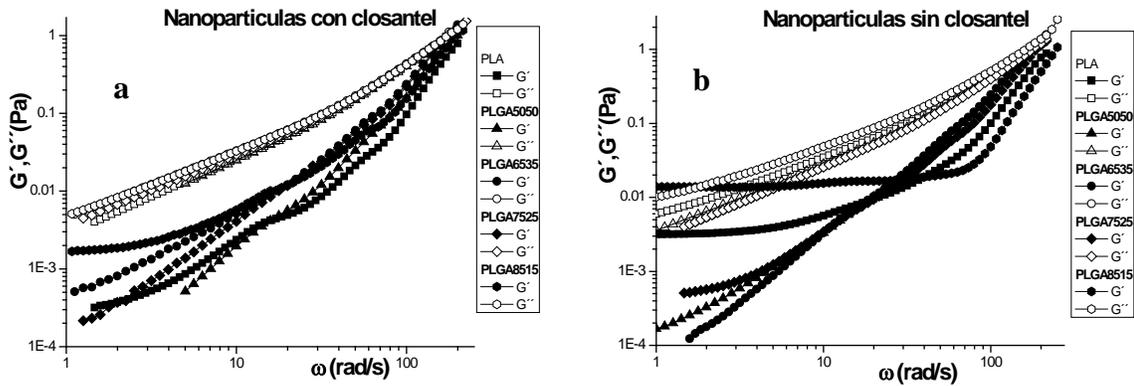


Figura 35: Espectros mecánicos de a) Np con closantel y b) Np sin closantel

La Figura 36 (a y b) muestra el diagrama de Black el cual representa la evolución del ángulo de fase δ respecto al módulo complejo de los sistemas nanoparticulados con closantel y sin closantel respectivamente, se sabe que un ángulo de fase con valores en un intervalo de 0° - 90° indican materiales con propiedades viscoelásticas; ángulo de fase cercanos a 90° el material aumenta su modulo viscoso y valores cercanos a 0° el material aumenta su módulo elástico. Los sistemas sin closantel tienen una disminución pronunciada del ángulo de fase, y los sistemas con closantel una disminución menor debida a que posiblemente el fármaco esta interactuando con el polímero y modificando sus propiedades viscoelásticas cómo ya se ha mencionado en los estudios de interacción, cabe agregar que la presencia del PVA (estabilizante) permite tener una

pseudosolubilidad del closantel en el medio, razón por la cual puede atribuirse un comportamiento diferente cuando el fármaco está presente.

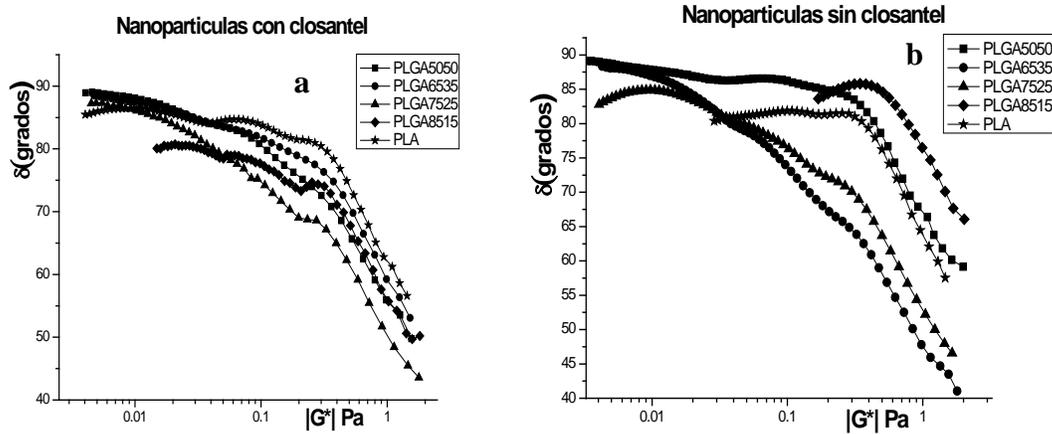


Figura 36: Diagramas de Black a) Np con closantel y b) Np vacías

5.5.4 Influencia del pH en el comportamiento reológico de las NP de PLGA 50:50

Los tamaños de partícula a los diferentes pH utilizando PLGA 50:50, mostraron que las nanopartículas formuladas en amortiguador de fosfatos a pH7.4 generaron menores tamaños de partícula (454 nm) con un índice de polidispersidad de 0.15, en comparación con los otros sistemas en los cuáles los tamaños de partículas son mayores a 500 nm (Figura 37b) e índice de polidispersidad mayores a 0.4. Estos datos pueden hacer suponer, en principio, que la formulación a pH de 7.4 es aquella que mostrará menor variabilidad de comportamiento en función de la velocidad de corte y/o frecuencia.

La respuesta reológica se evaluó a diferentes valores de pH (5, 7, 7.4, 9 y 10); los resultados a la cizalla simple presentan un comportamiento newtoniano en el intervalo de pH estudiado (Figura 37a).

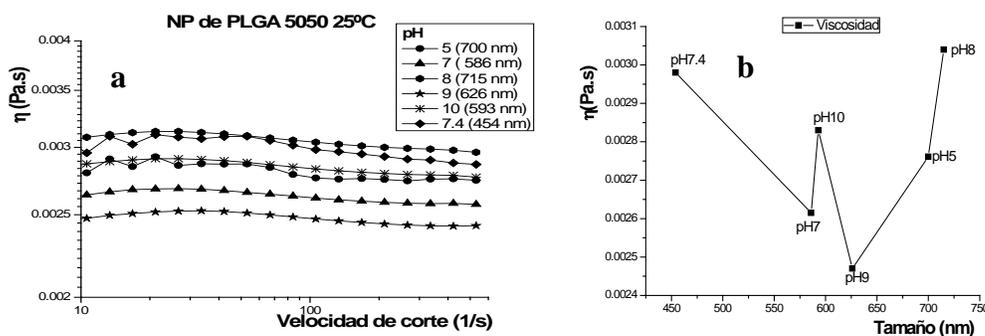


Figura 37: NP de PLGA 5050 a diferentes pH a) Curva de viscosidad y b) η vs tamaño

Existe una primera parte en la cual el tamaño de partícula es el que rige la viscosidad, es decir a menor tamaño de partícula, mayor área superficial y por lo tanto mayor viscosidad ($\text{pH}7.4 > \text{pH}7 > \text{pH}9$), otra zona en la cual los tamaños de partícula van incrementando ($\text{pH}8 > \text{pH}5 > \text{pH}9$), lo cual hace que la cantidad de PVA disponible en el medio sea mayor y esto a su vez permite que mayor cantidad de closantel esté presente y esto hace que ambos sean los causantes de valores crecientes de viscosidad. Y por último a pH de 10 en el cual la solubilidad del closantel es el que influye mayormente en la viscosidad del sistema, mostrando tamaño de partícula intermedio entre las dos zonas arriba mencionadas.

Por otro lado, en las pruebas de flujo de cizalla oscilatoria (Figura 38a y 38b), en la zona de viscoelasticidad lineal (>50% de deformación), el efecto del pH respecto a sus módulos evidenció una disminución con respecto a la estabilidad estructural, en particular a tiempos largos (bajas frecuencia < 20 rad/s), donde el módulo elástico (G') presentó el siguiente comportamiento: a pH 5 y 7.4 poca dependencia con la frecuencia, con un intervalo más grande para el pH de 7.4; en seguida una ligera disminución a pH 7, pero ligeramente independiente de la frecuencia; para pH de 8 y 10 se observa el mismo descenso y comportamiento; finalmente una mayor disminución de este módulo para el pH 9 y marcada dependencia con la frecuencia.

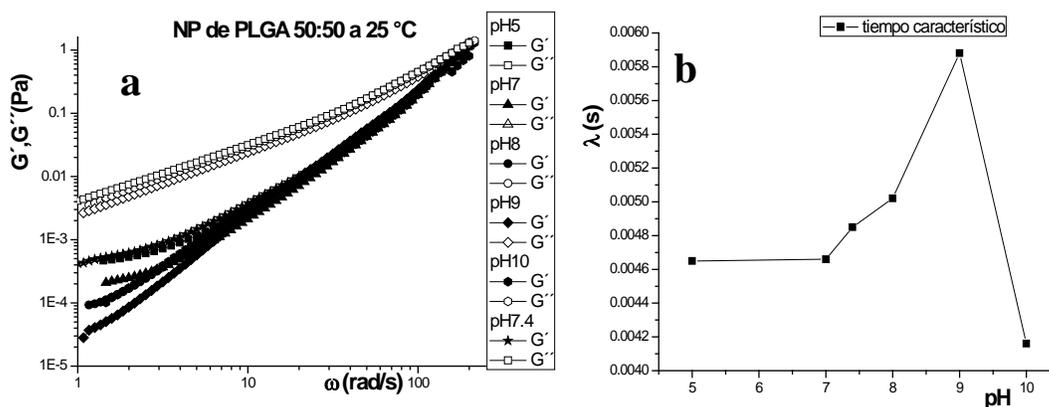


Figura 38: Np de PLGA 50:50 a diferentes pH a): Espectros mecánicos y b): Tiempo característico (λ)

Lo anterior puede explicarse considerando que a bajas frecuencias el sistema se encuentra en mayor desorden debido a que existe una mayor libertad de movimiento, contrario a lo que sucede a altas frecuencias en la cual el sistema se encuentra prácticamente estático y no se permite que las interacciones predominen; en este sentido, la formulación realizada a pH7.4 es la que mayor estabilidad presenta puesto que es menos dependiente de la frecuencia a bajos valores de la misma, seguido de la formulación a pH5, pH7, pH8 y 10, y finalmente la formulación a pH9 es la que mayor dependencia tiene con la frecuencia. Respecto al módulo viscoso (G'') no existen diferencias entre los diferentes pH estudiados. Por otra parte, para tener una mejor comprensión de este comportamiento, se graficaron los tiempos característicos (λ) de los sistemas (Figura 38b); en dicha gráfica puede observarse que los valores de tiempo característico de los sistemas presenta un valor constante de pH5 a pH7, un ligero aumento en el intervalo de 7 a 9, y finalmente un descenso en la formulación realizada a un pH de 10, estos comportamientos están relacionados con la estructura del material, indicando que las formulaciones entre 5 y 7 son las que están menos estructuradas, pH7.4 y pH8 presentan los valores intermedios de estructuración, a pH9 presenta la mayor estructuración y a pH10 es la menos estructurada, lo cual implica que a este pH se necesita menos energía para realizar cambios en el sistema.

5.5.5 Comportamiento reológico de las nanopartículas de PLGA 50:50 a pH 7.4

5.5.5.1 Efecto de la temperatura a 39 °C

Con la finalidad de contar con mayores elementos con respecto a la estabilidad estructural de los sistemas nanoparticulados de PLGA 5050 en función del tiempo, se realizaron curvas de cizalla simple y oscilatorias a una temperatura de 39°C (Figura 39 a y b).

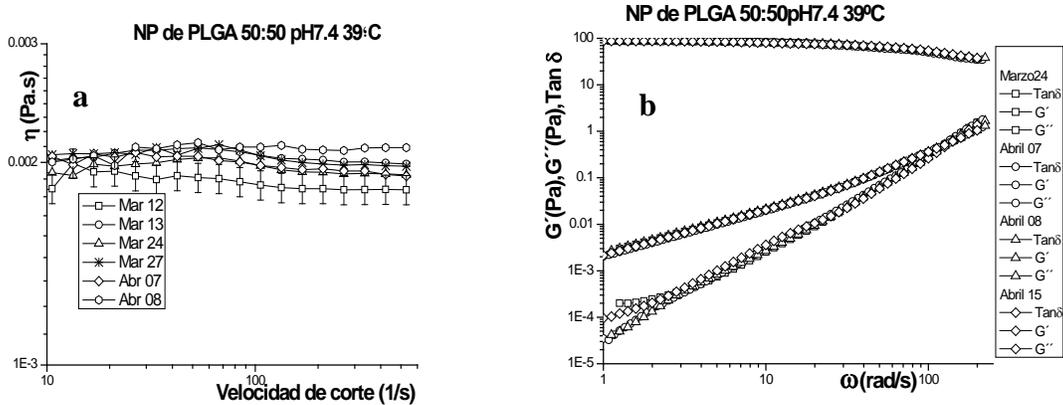


Figura 39: NP de PLGA 5050 a diferentes tiempos a) Viscosidad y b) Espectros mecánicos

5.5.5.2 Nanopartículas de PLGA 50:50, comparación a 25 y 39 °C

El efecto de la temperatura a 25 y 39 °C, sobre el comportamiento reológico para la formulación a pH 7.4, muestra lo siguiente: Los estudios de viscosidad presentan un comportamiento newtoniano a ambas temperaturas, con una ligera disminución de la viscosidad por efecto de la temperatura a 39 °C, además a baja cizalla (<50 1/s) a 25 °C presenta un ligero aumento de la viscosidad tal vez asociado a la estructura (Figura 40).

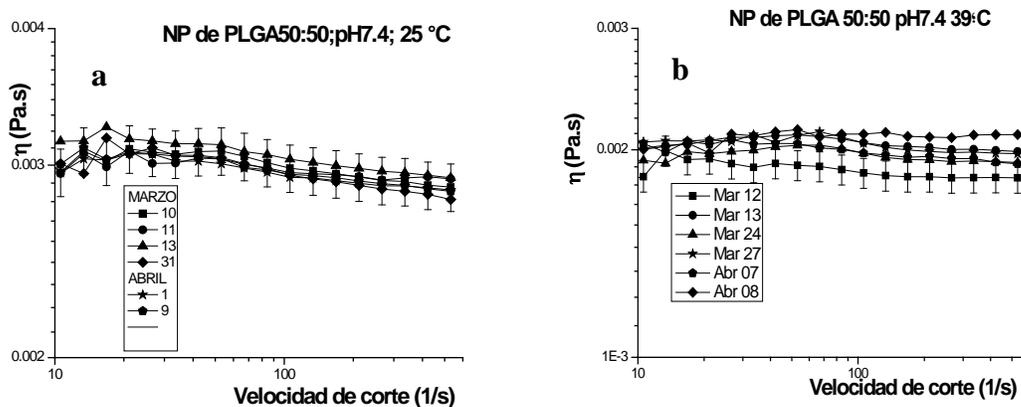


Figura 40: Viscosidad de Np de PLGA 5050 a diferentes temperaturas y tiempos a) 25°C y b) 39°C

Por otro lado, en las curvas de cizalla oscilatoria, el módulo viscoso (G'') sufre una ligera disminución al aumentar la temperatura (Figura 41a). Por su parte, el módulo elástico (estructura del material) presenta a valores de frecuencia menores de 20 rad/s diferencias entre las dos temperaturas, valores más altos y más estable a 25 °C que a 39°C, esto sucede posiblemente porque a bajas frecuencias el sistema además de tener movimiento libre se adiciona la energía cinética de las mismas al aumentar la temperatura (tiempos cortos), lo cual se comprobó con los espectros mecánicos con barrido de temperatura (a un tiempo fijo ~ 6 rad/s y deformación fija ~ 60%) (Figura 41b).

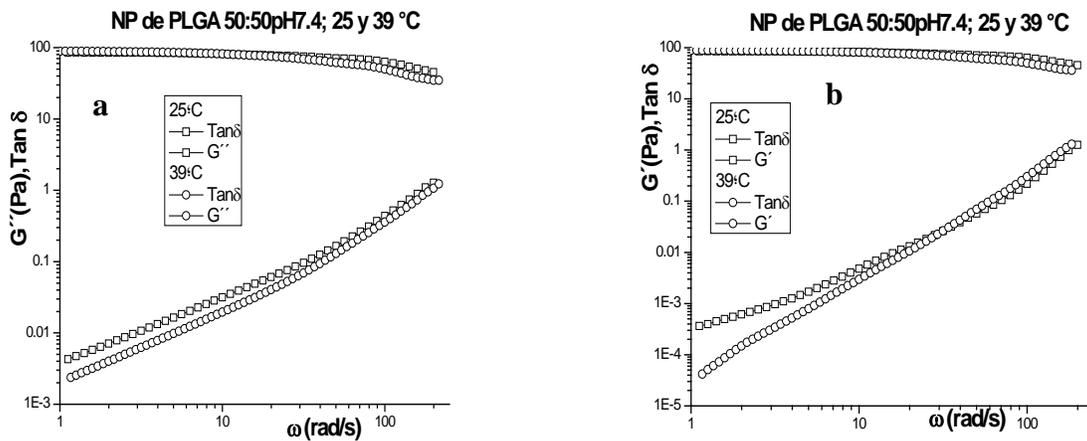


Figura 41: Espectros Mecánicos a 25 y 39 °C a) Módulo viscoso (G'') y b) Módulo elástico (G')

5.5.5.3 Estabilidad de nanopartículas de PLGA 50:50 (pH 7.4, 25 y 39 °C)

Con la finalidad de verificar la estabilidad de los sistemas nanoparticulados formulados con PLGA 5050 y a pH de 7.4, se hizo seguimiento de la viscosidad y de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de tales sistemas por aproximadamente 30 días (Figura 42a y 42b). Lo que se puede observar en dichas gráficas es que el sistema es muy estable, ya que tanto los valores de viscosidad como los dos módulos permanecen constantes con respecto al tiempo.

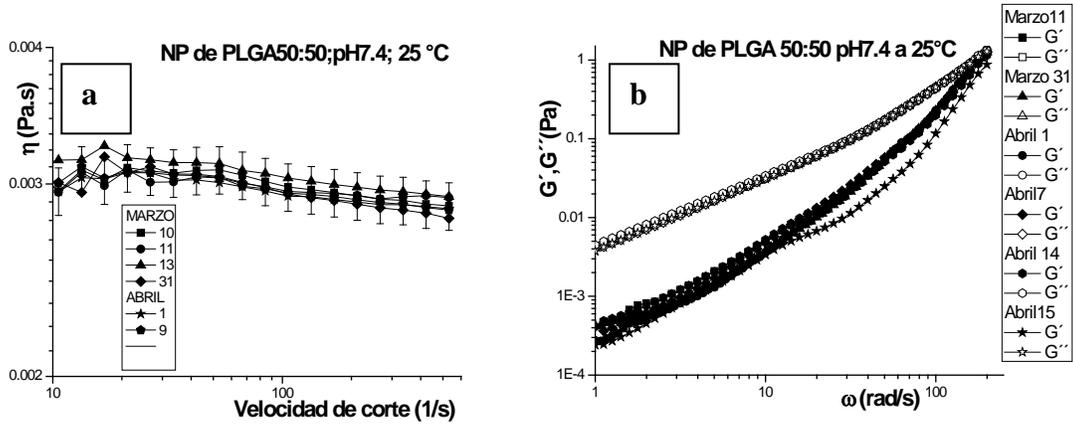


Figura 42: Np de PLGA 5050 a diferentes tiempos; a) Viscosidad y b): Espectros mecánicos

Los mismos módulos fueron monitoreados con respecto al tiempo y a la temperatura (Figura 43a y 43b), encontrándose que se mantuvieron sin cambios, en especial puede apreciarse que en un intervalo de temperatura de 25 a 65 °C el sistema se mantiene conformacionalmente estable, a partir de 65 °C ambos módulos empiezan a sufrir cambios, y en cierto grado más inestables.

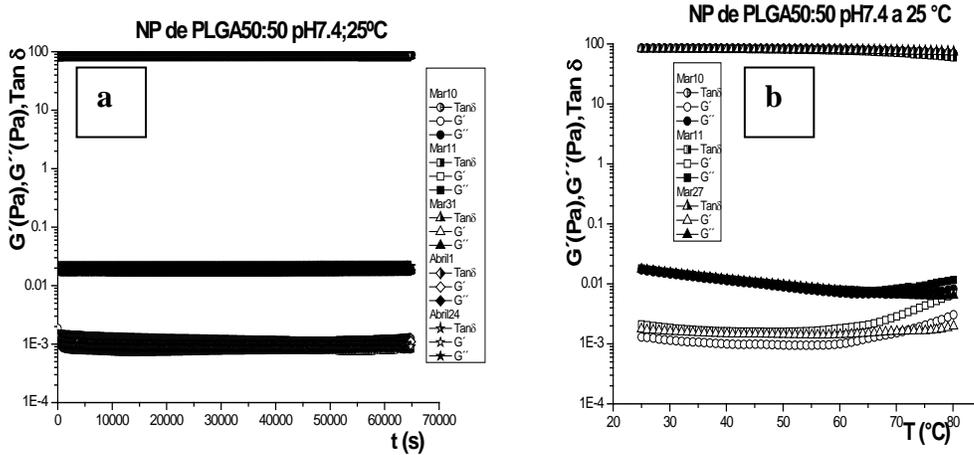


Figura 43: Espectros mecánicos de NP de PLGA 5050 a) Diferentes tiempos y b): Diferentes temperaturas

6. - CONCLUSIONES

- ❖ La generación de nanopartículas poliméricas a partir de las microemulsiones no fue posible ya que el sistema fue inestable.
- ❖ Se generaron sistemas lipídicos de oxitetraciclina por el método de emulsión evaporación, posteriormente esta técnica fue empleada para obtener NSL de closantel.
- ❖ La técnica de desplazamiento de disolvente permitió formar nanopartículas poliméricas de PLGA y closantel, utilizando PVA como estabilizante.
- ❖ Existe una interacción entre el PVA y closantel, presentando una constante de enlace de 93709 M^{-1} , aseveración que es apoyada por el cambio hipercrómico en UV-Vis. Los cálculos de análisis conformacionales sugieren que la asociación de closantel con PVA es más estable hasta $30 \mu\text{g/mL}$ y por arriba de ésta hay una ruptura del cúmulo desfavoreciendo la interacción.
- ❖ Los estudios de viscosidad del sistema de PVA y closantel, indican que en el intervalo de 0 a $20 \mu\text{g/mL}$ la viscosidad permanece constante, notándose un marcado incremento a $30 \mu\text{g/mL}$.
- ❖ En las pruebas oscilatorias para los 6 sistemas de PVA-closantel, G' y G'' cambian con la misma proporción para todas las frecuencias estudiadas. A bajas frecuencias predomina un comportamiento viscoso y a frecuencias altas predomina un comportamiento elástico, éste último puede estar influenciado por el efecto de interacciones de puente de hidrógeno (fármaco-PVA).
- ❖ Los coeficientes de difusión calculados incrementan a concentraciones altas de closantel, indicando una gran compactación por un efecto de colapso debido a las interacciones hidrofóbicas.
- ❖ A bajas concentraciones de closantel el sistema es más estructurado (λ grandes), comportamiento no observado a concentraciones mayores a $30 \mu\text{g/mL}$.

- ❖ La estabilidad estructural de las nanopartículas es favorecida a menor contenido de ácido láctico, la relación 50:50 es la que mejores resultados arroja (menor tamaño de partícula y estructuralmente menos variable).
- ❖ Las pruebas oscilatorias muestran que las nanopartículas sin closantel presentan menor variabilidad en el módulo elástico.
- ❖ El pH 7.4 es la que más favorece la obtención de nanopartículas de PLGA, resultado que está relacionada con las características de solubilidad del fármaco.
- ❖ El tamaño de partícula es la principal variable que afecta la viscosidad en las formulaciones obtenidas a diferentes pH.
- ❖ En las pruebas oscilatorias, el módulo elástico presenta a bajas frecuencias los cambios más marcados, fenómeno que está controlada principalmente por la interacción entre fármaco y polímero.
- ❖ La viscosidad de las NP de PLGA 50:50 a 25 y 39 °C presentan un comportamiento newtoniano, y se mantienen estables durante aproximadamente dos meses. La temperatura de 25 °C muestra un módulo elástico más alto y menos variable que a 39 °C.
- ❖ Los estudios de estabilidad acelerada realizados a las nanopartículas de PLGA 50:50 a pH 7.4 no mostraron cambios estructurales.

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Existen varias líneas de investigación con las que se pueden ampliar los resultados del presente trabajo. En primer lugar es recomendable realizar los estudios de interacción entre PVA de diferentes pesos moleculares, porcentajes de hidrólisis y closantel con el fin de obtener constantes de interacción para los mismos, de esta forma sería posible obtener información que nos permita generar nanopartículas con mayor carga de fármaco.

Por otra parte se recomienda evaluar la interacción entre el PVA y los diferentes tipos de PLGA, de ésta manera podría observarse el impacto que éste puede tener en las características de las nanopartículas generadas, por ejemplo: porcentaje de encapsulación y tamaño

Una vez que se hayan obtenido las nanopartículas con las características deseadas (% de carga y tamaño), éstas deberían caracterizarse reológica y calorimétricamente en función de la concentración de nanopartículas con el fin de obtener un patrón que pueda indicarnos de manera indirecta el posible comportamiento que puedan tener éstas una vez que estén dentro del organismo.

7. - REFERENCIAS:

1. McKellar, Q.A., *Chemotherapy and delivery systems helminths*. Veterinary Parasitology, 1994. **54**: p. 249-258.
2. Devalapally, H., A. Chakilam, and M.M. Amiji, *Role of nanotechnology in pharmaceutical product development*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(10): p. 2547-2565.
3. Fassihi, R.A. and W.A. Ritschel, *Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: In vitro and in vivo evaluation*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1993. **82**(7): p. 750-754.
4. Katime I, K.O.y.K.D., *Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones.*, ed. S.E.d.I.U.d.P. Vasco. 2004, España.
5. Brannon-Peppas, L. and N.A. Peppas, *Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanisms of drug release from pH-sensitive swelling-controlled systems*. Journal of Controlled Release, 1989. **8**(3): p. 267-274.
6. Gehrke, S.H. and E.L. Cussler, *Mass transfer in pH-sensitive hydrogels*. Chemical Engineering Science, 1989. **44**(3): p. 559-566.
7. Bae, Y.H., T. Okano, and S.W. Kim, *'On-off' thermocontrol of solute transport. I. Temperature dependence of swelling of N-isopropylacrylamide networks modified with hydrophobic components in water*. Pharmaceutical Research, 1991. **8**(4): p. 531-537.
8. Wood, J.M., D. Attwood, and J.H. Collett, *The influence of gel formation on the diffusion of salicylic acid in polyHEMA hydrogels*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1982. **34**(1): p. 1-4.
9. Collett, J.H., D. Attwood, and J.M. Wood. *SOME EFFECTS OF GEL STRUCTURE ON DRUG RELEASE FROM POLY(2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE) GELS*. in *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry*. 1983. Seattle, WA, USA: ACS, Div of Polymer Chemistry.
10. Pywell, E.J., S.H. Yalkowsky, and J.H. Collett, *The effect of a rate controlling membrane on release from polyhema hydrogels*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1986. **12**(11-13): p. 1767-1775.
11. Urquhart, J., *Rate-controlled drug dosage*. Drugs, 1982. **23**(3): p. 207-226.
12. Civiale, C., et al., *In vivo-in vitro correlation of salbutamol release from a controlled release osmotic pump delivery system*. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 1991. **13**(7): p. 491-498.
13. Dumitriu, S., *Polymeric Biomaterials*, ed. I. Marcel Dekker. 1994, Nueva York.
14. Vert, M., *Polyvalent polymeric drug carriers*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1986. **2**(3): p. 291-327.
15. Langer, R. and N. Peppas, *CHEMICAL AND PHYSICAL STRUCTURE OF POLYMERS AS CARRIERS FOR CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE AGENTS: A REVIEW*. Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics, 1983. **C23**(1): p. 61-126.
16. Chandrasekaran, S.K., *Controlled release of scopolamine for prophylaxis of motion sickness*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1983. **9**(4): p. 627-646.

17. Ranade, V.V., *Drug delivery systems: 3B. Role of polymers in drug delivery*. Journal of Clinical Pharmacology, 1990. **30**(2): p. 107-120.
18. Zolnik, B.S., et al., *Minireview: Nanoparticles and the immune system*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 458-465.
19. Langer, R.S. and N.A. Peppas, *Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems*. Biomaterials, 1981. **2**(4): p. 201-214.
20. Graham, N.B., *Controlled drug delivery systems*. Chemistry and Industry (London), 1990(15): p. 482-486.
21. Jeyanthi, R. and K.P. Rao, *Controlled release of anticancer drugs from collagen-poly(HEMA) hydrogel matrices*. Journal of Controlled Release, 1990. **13**(1): p. 91-98.
22. Jeyanthi, R. and K.P. Rao, *Collagen-poly(HEMA) hydrogels for the controlled release of anticancer drugs. Preparation and characterization*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 1990. **5**(2): p. 194-211.
23. Bruck, S.D. and E.P. Mueller, *Materials and biological aspects of synthetic polymer in controlled drug release systems: problems and challenges*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1988. **5**(3): p. 171-188.
24. Niu, C.H., *PDA perspective on peptide formulation and stability issues*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(11): p. 1331-1334.
25. Muthu, M.S., *Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview*. Asian Journal of Pharmaceutics, 2009. **3**(4): p. 266-273.
26. Anderson, J.M. and M.S. Shive, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **28**(1): p. 5-24.
27. Lewis, D.H., *Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers*, in *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, L.R. Chasin M., Editor. 1990, Marcel Dekker: New York. p. 1-41.
28. Dobrovolskaia MA, A.P., Hall JB, McNeil SE *Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution*. Mol Pharm 2008. **5**: p. 487-495.
29. Olaechea, F., *FASCIOLA HEPÁTICA*, S.A.d.P. Animal, Editor. 2004, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
30. R.H., Q., *Epidemiología de Fasciolosis. En Control de enfermedades parasitarias en el ganado bovino*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. División de Educación Continua. Depto. de Parasitología. 1996, México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Rangel RLJ, M.D., *Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco*. Vet Méx, 1994. **25**: p. 327-331.
32. Alfonso Guerra, A.V.R., M.; Méndez Mellor, L. y Quintana Torrente, *Caracterización de una cepa de referencia de la garrapata B. microplus para la evaluación de efectividad y resistencia de garrapaticidas en Cuba*, in *Congreso Biotecnología*. 2005.
33. Rivera, M., ed. *Hemoparasitosis Bovinas*. 1996, ANAUCO EDICIONES: Caracas, Venezuela.
34. Encinas, A., Oleada, A. y Pérez, R., ed. *Garrapatas duras*. Parasitología Veterinaria. 1999, Mc Graw-Hill- Interamericana: Madrid.

35. <http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatification/tabid/252/language/en-US/Default.aspx>.
36. Parra, M.H., Peláez, S.L., Segura, C.F., Arcos, J.C., Londoño, A., Díaz, E. y Vanegas, M.A., ed. *Manejo integrado de garrapatas en bovinos*. Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias. Vol. 2. 1999. 72-77.
37. Ortiz, M.y.F., B.R, *Experiencia de un programa estratégico de control en *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense*, empleando inhibidores de crecimiento (Fluazurón), ivermectina y baños convencionales en bovinos naturalmente infectados, en México*, in *Congreso Biotecnología 2005*.
38. Rodríguez, D., ed. *Las Ivermectinas. Trabajo de salud y explotación canina*. Facultad de Medicina Veterinaria. 2002: UNAH, Cuba.
39. M.A.C. and Sipido, V.K., *Antiparasitic salicylanilide derivatives*, Janssen, Editor. 1977: United States.
40. Guerrero, J., *Closantel: A review of its antiparasitic activity*. Preventive Veterinary Medicine, 1984. **2**(1-4): p. 317-327.
41. Stoev, G., *Determination of closantel residues in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **710**(1-2): p. 234-238.
42. C., G.L., et al., *Efficacy of closantel against *Fasciola hepatica* in Korean native goats*. Veterinary Parasitology, 1996. **65**(3-4): p. 307-311.
43. Waruiru, R.M., *Efficacy of closantel, albendazole and levamisole on an ivermectin resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep*. Veterinary Parasitology, 1997. **73**(1-2): p. 65-71.
44. Taylor, M., *Use of anthelmintics in sheep*. In Practice, 1999. **21**(5): p. 222-223,225.
45. Lanusse, C.E. and R.K. Prichard, *Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics*. Veterinary Parasitology, 1993. **49**(2-4): p. 123-158.
46. Rothwell, J.T., E. Lacey, and N.C. Sangster, *The binding of closantel to ovine serum albumin, and homogenate fractions of *Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 2000. **30**(6): p. 769-775.
47. Rothen-Weinhold, A., R. Gurny, and M. Dahn, *Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals*. Pharmaceutical Science and Technology Today, 2000. **3**(7): p. 222-231.
48. Scott, N.R., *Nanoscience in Veterinary Medicine*. Veterinary Research Communications, 2007. **31**(1): p. 139-144.
49. Th.F. Vandamme, K.J.E., *Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**: p. 1415- 1436.
50. Imran Ahmed, K.K., *Pharmaceutical challenges in veterinary product development*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. 871-882.
51. Yichun Sun, D.W.S., Yingxu Peng, James R. Johnson, Atul J. Shukl, *Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**: p. 1481- 1496.
52. Rathbone, M.J. and M.N. Martinez, *Modified release drug delivery in veterinary medicine*. Drug Discovery Today, 2002. **7**(15): p. 823-829.
53. Eytan A. Klausner, E.L., Michael Friedmana, Amnon Hoffmana, *Expandable gastroretentive dosage forms*. Journal of Controlled Release, 2003. **90**: p. 143-162.

54. Sutton, S.C., *Companion animal physiology and dosage form performance*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**: p. 1383– 1398.
55. A.K. Walduck, J.P.O., H.E. Benson, R. Pranker, *Biodegradable implants for the delivery of veterinary vaccines: design, manufacture and antibody responses in sheep*. Journal of Controlled Release, 1998. **51**: p. 269–280.
56. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 238-252.
57. Elsayed, M.M.A., et al., *Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **332**(1-2): p. 1-16.
58. Meybeck, A., *Liposomes used in cosmetics*. Les liposomes en cosmétique, 2008(323-324): p. 60-66.
59. Kaur, I.P., et al., *Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **269**(1): p. 1-14.
60. Uchegbu, I.F. and S.P. Vyas, *Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **172**(1-2): p. 33-70.
61. Jörg, K., *Colloidal Drug Delivery Systems*. 1994, New York: Marcel Dekker, Inc. 221-315.
62. Kohane, D.S., et al., *Biocompatibility of lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine in the epineurium*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **59**(3): p. 450-459.
63. Kohane, D.S., et al., *Biodegradable polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **77**(2): p. 351-361.
64. O'Hagan, D.T. and R. Rappuoli, *Novel approaches to vaccine delivery*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(9): p. 1519-1530.
65. O'Hagan, D.T., *Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **34**(2-3): p. 305-320.
66. O'Hagan, D.T., M. Singh, and R.K. Gupta, *Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single- dose controlled-release vaccines*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **32**(3): p. 225-246.
67. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
68. Friberg, S., I. Lapczynska, and G. Gillberg, *Microemulsions containing nonionic surfactants-The importance of the pit value*. Journal of Colloid and Interface Science, 1976. **56**(1): p. 19-32.
69. B.Nagy, J., et al., *Surfactants in Solution*, ed. M. KL. Vol. 10. 1989, New-York: Plenum.
70. Boutonnet, M., et al., *The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions*. Colloids and Surfaces, 1982. **5**(3): p. 209-225.
71. Fendler, J.H., *Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry*. Chemical Reviews, 1987. **87**(5): p. 877-899.
72. Eastoe, J. and B. Warne, *Nanoparticle and polymer synthesis in microemulsions*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1996. **1**(6): p. 800-805.

73. Esumi, K., K. Matsuhisa, and K. Torigoe, *Preparation of rodlike gold particles by uv irradiation using cationic micelles as templates*. Langmuir, 1995. **11**: p. 3285-3287.
74. Gasco, M.R. and M. Trotta, *Nanoparticles from microemulsions*. International Journal of Pharmaceutics, 1986. **29**(2-3): p. 267-268.
75. Gasco, M.R., S. Morel, and R. Manzoni, *Incorporation of doxorubicine in nanoparticles obtained by polymerization from nonaqueous microemulsion*. Farmaco, Edizione Pratica, 1988. **43**(12): p. 373-380.
76. Lopez-Quintela, M.A., *Synthesis of nanomaterials in microemulsions: Formation mechanisms and growth control*. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2003. **8**(2): p. 137-144.
77. Capek, I., *Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions*. Advances in Colloid and Interface Science, 2004. **110**(1-2): p. 49-74.
78. Destrée, C. and J. B.Nagy, *Mechanism of formation of inorganic and organic nanoparticles from microemulsions*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **123-126**(SPEC. ISS.): p. 353-367.
79. Rojas, S., et al., *Preparation of carbon supported Pt and PtRu nanoparticles from microemulsion: Electrocatalysts for fuel cell applications*. Applied Catalysis A: General, 2005. **285**(1-2): p. 24-35.
80. Destrée, C. and J. B.Nagy, *Mechanism of formation of inorganic and organic nanoparticles from microemulsions*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **123-126**(SPEC. ISS.): p. 353-367.
81. Vauthier, C. and K. Bouchemal, *Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**(5): p. 1025-1058.
82. Lassalle, V. and M.L. Ferreira, *PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation*. Macromolecular Bioscience, 2007. **7**(6): p. 767-783.
83. D. Quintanar-Guerrero, E.A., E. Doelker, and H. Fessi, *A mechanism study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique*. Colloid and Polymer Science, 1997. **275**(7): p. 640-647.
84. Astete, C.E. and C.M. Sabliov, *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. **17**(3): p. 247-289.
85. Mittal, G., et al., *Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo*. Journal of Controlled Release, 2007. **119**(1): p. 77-85.
86. Lee, S.J., et al., *Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide)*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2005. **255**(1-3): p. 19-25.
87. Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, *PLGA nanoparticles containing praziquantel: Effect of formulation variables on size distribution*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **290**(1-2): p. 137-144.
88. Choi, S.W., et al., *Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. **201**(1-3): p. 283-289.

89. Nguyen, V.-G., *The performance of poly(DL-lactide-co-glicolide) nanoparticles without surfactant as potencial carriers for drug delivery*. Applied Chemistry, 2004. **8**(2): p. 450-453.
90. Kwon, H.Y., et al., *Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **182**(1-3): p. 123-130.
91. P. Ahlin, N.J., and J. Kristl, *Influence of formulation variables on the size of PLGA and PLA nanoparticles prepared by an emulsification-diffusion technique*. Scientia Pharmaceutica, 2001. **69**(3): p. S167-S168.
92. Müller, R.H., K. Mäder, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 161-177.
93. Wissing, S.A., O. Kayser, and R.H. Müller, *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(9): p. 1257-1272.
94. Heurtault, B., et al., *Physico-chemical stability of colloidal lipid particles*. Biomaterials, 2003. **24**(23): p. 4283-4300.
95. Manjunath, K., J.S. Ready, and V. Venkateswarlu, *Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems*. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 2005. **27**(2): p. 127-144.
96. Li, S.D. and L. Huang, *Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles*. Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 496-504.
97. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution*. Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 487-495.
98. Tan, C.P. and M. Nakajima, *[beta]-Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation*. Food Chemistry, 2005. **92**(4): p. 661-671.
99. Sukhorukov, G., A. Fery, and H. Mohwald, *Intelligent micro- and nanocapsules*. Progress in Polymer Science, 2005. **30**(8-9): p. 885-897.
100. Chellat, F., et al., *Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting*. Biomaterials, 2005. **26**(35): p. 7260-7275.
101. Wang, Y.X., et al., *Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(8): p. 1362-1373.
102. Sangster, N.C. and J. Gill, *Pharmacology of anthelmintic resistance*. Parasitology Today, 1999. **15**(4): p. 141-146.
103. Pal, R., *Rheology of Particulate Dispersions and Composites*. Surfactant science, ed. A.T. Hubbart. Vol. 136. 2007, Ontario, Canada.
104. Martini, A. and S. Lauria, *Sustained release injectable products*. American Pharmaceutical Review, 2003. **6**(3): p. 16-20.
105. Swarbrick, J., *Injectable Dispersed Systems Formulation, Processing, and Performance*, ed. D.A.T.P. SCIENCES. 2005, New York: Taylor & Francis Group.
106. Rosenblatt, J., B. Devereux, and D.G. Wallace, *Effect of electrostatic forces on the dynamic rheological properties of injectable collagen biomaterials*. Biomaterials, 1992. **13**(12): p. 878-886.
107. Kamphuis, H., R.J.J. Jongschaap, and P.F. Mijnlief, *A transient-network model describing the rheological behaviour of concentrated dispersions*. Rheologica Acta, 1984. **23**(4): p. 329-344.

108. Barnes H.A. , H.J.F., Walters K. , *An Introduction to Rheology*. Rheology Series. 1989: Elsevier Science.
109. Barry, B.W. and A.J. Grace, *Sensory testing of spreadability; investigation of the rheological conditions operative during application of topical preparations*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1971. **23**.
110. Christoff, K., *Effect of surface-active substances (SAS) on the structural rheological properties of ointment bases and release velocity of drugs. 1. Effect of Tween 80 on vaselinum album*. Einfluss der oberflÄchenaktiven Substanzen (OAS) auf die strukturrheologischen Eigenschaften der Salbengrundlagen und die Abgabegeschwindigkeit von Arzneimitteln. 1. Einfluss von Tween 80 auf Vaselinum album., 1967. **22**(6): p. 251-253.
111. Kasza, P. and L. Gyarmati, *Evaluation of correlation between selected rheological parameters of ointments and their in vitro release data*. Pharmazie, 1978. **33**(8): p. 526-527.
112. Attwood, D., J.H. Collett, and C.A. O'Connor, *Influence of gamma irradiation on the rheological properties of gels of the poloxamine, Synperonic T908*. International Journal of Pharmaceutics, 1991. **70**(1-2): p. 147-152.
113. Wood, J.H., G. Catacalos, and S.V. Lieberman, *A rheological study of the aging of Veegum suspensions*. Journal of pharmaceutical sciences, 1963. **52**: p. 354-358.
114. Hamill, R.D. and R.V. Petersen, *Effects of aging and surfactant concentration on the rheology and droplet size distribution of a nonaqueous emulsion*. Journal of pharmaceutical sciences, 1966. **55**(11): p. 1268-1274.
115. Burgess, D.J. and O.N. Sahin, *Influence of protein emulsifier interfacial properties on oil-in-water emulsion stability*. Pharmaceutical Development and Technology, 1998. **3**(1): p. 21-29.
116. Adikwu, M.U., *Suspending properties of Prosopis africana gum*. S.T.P. Pharma Sciences, 1994. **4**(2): p. 139-144.
117. J. Goodwin, R.W.H., *Rheology for Chemists: An Introduction*. 2000, Cambridge: Royal Society of Chemistry. 300.
118. Barnes, H.A., Hutton, J.E y Walters, K. , *An introduction to rheology*, ed. E.S.P. B.V. 1994, Holanda. 201.
119. Barnes, H.A., *A Handbook of Elementary Rheology*. 2000: Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics University of Wales. 204.
120. Wassermann, L., *From Heraklit to W. Scott Blair*. Rheology, 1991. **1**: p. 32-39.
121. Schramm, G., *A practical approach to Rheology and Rheometry*. 2nd ed. 2004: Thermo Electron (Karlsruhe) GmbH.
122. Steffe, J.F., *Rheological Methods in Food Process Engineering*. 1996: Freeman Press. 418.
123. Lee, C.H., V. Moturi, and Y. Lee, *Thixotropic property in pharmaceutical formulations*. Journal of Controlled Release, 2009. **136**(2): p. 88-98.
124. Macosko, C.W., *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. 1994, New York: VCH Publishers.
125. Aminabhavi, T.M., S.A. Agnihotri, and B.V.K. Naidu, *Rheological properties and drug release characteristics of pH-responsive hydrogels*. Journal of Applied Polymer Science, 2004. **94**(5): p. 2057-2064.
126. Malkin, A.Y., *Rheology Fundamentals* Fundamental Topics in Rheology. 1994: ChemTec Publishing.

127. Park, E.K. and K.W. Song, *Rheological evaluation of petroleum jelly as a base material in ointment and cream formulations: Steady shear flow behavior*. Archives of Pharmacal Research, 2010. **33**(1): p. 141-150.
128. Marquardt, D., et al., *Determination of (Pseudo)plastic flow properties of pharmaceutical semisolids using rheological AUC parameters*. Pharmaceutical Development and Technology, 1997. **2**(2): p. 123-133.
129. Davis, S.S., *Viscoelastic properties of pharmaceutical semisolids. 3. Nondestructive oscillatory testing*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1971. **60**(9): p. 1351-1356.
130. Niraula, B.B., T.N. Seng, and M. Misran, *Vesicles in fatty acid salt-fatty acid stabilized o/w emulsion - Emulsion structure and rheology*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004. **236**(1-3): p. 7-22.
131. Chávez C., A.E., Noguez M., N. A., et al., *Reología y sistemas farmacéuticos 2003*, México D.F: Asociación Farmacéutica Mexicana.
132. Lowther, N., et al., *A novel depot preparation of desferrioxamine-B: Development of formulation principles*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1999. **25**(11): p. 1157-1166.
133. Ceulemans, J., L. Van Santvliet, and A. Ludwig, *Evaluation of continuous shear and creep rheometry in the physical characterisation of ointments*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **176**(2): p. 187-202.
134. Boylan, J.C., *Rheological study of selected pharmaceutical semisolids*. Journal of pharmaceutical sciences, 1966. **55**(7): p. 710-715.
135. Kassem, M.A. and A.G. Mattha, *Rheological studies on dispersions of polyvinylpyrrolidone. II. Effect of some pharmaceutical additives*. Pharmaceutica acta Helvetiae, 1970. **45**(1): p. 28-41.
136. Shin, W.W. and K.P. Lee, *Effect of electrolytes on rheological properties of Young-II bentonite suspension*. Archives of Pharmacal Research, 1985. **8**(2): p. 91-98.
137. Barry, B.W. and M.C. Meyer, *The rheological properties of Carbopol gels. II. Oscillatory properties of Carbopol gels*. International Journal of Pharmaceutics, 1979. **2**(1): p. 27-40.
138. Lenaerts, V., C. Triqueneaux, and M. Quarton, *Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127 aqueous solutions*. International Journal of Pharmaceutics, 1987. **39**(1-2): p. 121-127.
139. Chatterji, A.K. and G.W. Kapse, *Rheology of dilute aqueous suspensions of some reactive solids*. Nature, 1963. **200**(4909): p. 868-870.
140. Ratsimbazafy, V., E. Bourret, and C. Brossard, *Effect of formulation on the rheology of theophylline compound suspensions in Gelucires*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1997. **49**(9): p. 852-857.
141. Osman-Gardabbou, H., et al., *Thickening of hydrophilic/lipophilic and lipophilic/hydrophilic microemulsions. I. Comparative study of the gelling agent influence on the physical characteristics of the H/L and L/H microemulsions*. S.T.P. Pharma Sciences, 2000. **10**(3): p. 220-223.
142. Ben-Kerrou, L., et al., *Temperature- and concentration-dependence in pseudoplastic rheological equations for gum guar solutions*. International Journal of Pharmaceutics, 1980. **5**(1): p. 59-65.
143. Lashmar, U.T., J.P. Richardson, and A. Erbod, *Correlation of physical parameters of an oil in water emulsion with manufacturing procedures and stability*. International Journal of Pharmaceutics, 1995. **125**(2): p. 315-325.

144. Boylan, J.C., H.G. Dekay, and G.S. Banker, *Temperature-induced rheological variability in an emulsion system*. Journal of pharmaceutical sciences, 1962. **51**: p. 742-748.
145. Mortazavi, S.A., B.G. Carpenter, and J.D. Smart, *An investigation of the rheological behaviour of the mucoadhesive/mucosal interface*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. **83**(1-3): p. 221-225.
146. Madsen, F., K. Eberth, and J.D. Smart, *A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration*. Journal of Controlled Release, 1998. **50**(1-3): p. 167-178.
147. Dabhi, M.R., et al., *Formulation development of smart gel periodontal drug delivery system for local delivery of chemotherapeutic agents with application of experimental design*. Drug Delivery. **17**(7): p. 520-531.
148. Harris, A.S., et al., *Effect of viscosity on particle size, deposition, and clearance of nasal delivery systems containing desmopressin*. Journal of pharmaceutical sciences, 1988. **77**(5): p. 405-408.
149. Valenta, C., et al., *Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone*. Journal of Controlled Release, 2001. **77**(3): p. 323-332.
150. Larsen, N.E. and E.A. Balazs, *Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1991. **7**(2): p. 279-293.
151. Ceulemans, J. and A. Ludwig, *Optimisation of carbomer viscous eye drops: An in vitro experimental design approach using rheological techniques*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002. **54**(1): p. 41-50.
152. Brinks, G.J., et al., *Formulation of a concentrated dispersion as a carrier for the delivery of prostaglandin E2 in the cervical canal*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1988. **14**(4): p. 489-497.
153. Oliveira, S.M., et al., *Characterization of polymeric solutions as injectable vehicles for hydroxyapatite microspheres*. AAPS PharmSciTech. **11**(2): p. 852-858.
154. Xuan, J.J., et al., *Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam*. International Journal of Pharmaceutics. **395**(1-2): p. 317-323.
155. Yalpani, M., et al., *Unusual rheology of a branched, water-soluble chitosan derivative*. Nature, 1983. **302**(5911): p. 812-814.
156. Abbas, K., et al., *Rubber state of ionic fluorozirconate glasses*. Nature, 1987. **326**(6112): p. 479-480.
157. Sherriff, M. and R.P. Enever, *Rheological and drug release properties of oil gels containing colloidal silicon dioxide*. Journal of pharmaceutical sciences, 1979. **68**(7): p. 842-845.
158. Goggin, P.L., et al., *An investigation into the supramolecular structure of ternary gel systems using oscillatory rheometry, microscopy, and low frequency dielectric spectroscopy*. Journal of pharmaceutical sciences, 1999. **88**(7): p. 661-669.
159. Li, X., et al., *Gel-sol-gel thermo-gelation behavior study of chitosan-inorganic phosphate solutions*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2010. **75**(3): p. 388-392.
160. Taylor, M.J., S. Tanna, and T.S. Sahota, *Glucose-sensitive gel rheology of dextran-concanavalin A mixtures suitable for self-regulating insulin delivery*. Pharmaceutical Development and Technology. **15**(1): p. 80-88.

161. Eros, I., *Rheology and stability of disperse and coherent pharmaceutical form*. Acta Pharmaceutica Hungarica, 1994. **64**(6): p. 199-207.
162. Sahoo, L., G. Hota, and P.K. Misra, *Organization of amphiphiles, Part-III: Effect of hydrophobicity and hydrophilicity on the phase behaviour of some ethoxylated surfactants*. Indian Journal of Chemical Technology, 2003. **10**(3): p. 269-273.
163. Behera, P.K., et al., *Microemulsions: Phase behaviour, spectral and kinetics studies*. Sambalpur University Journal of Science and Technology, 1991. **10**(7).
164. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
165. K. Dillen, W.W., J. Vandervoort, and A. Ludwig, *The influence of the use of viscosifying agents as dispersion media on the drug release properties from PLGA nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**: p. 539-549.
166. Y. Konan, R.C., J. Favet, M. Berton, R. Gurny, and E. Allemann, *Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrinloaded nanoparticles for photodynamic therapy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003. **55**: p. 115-124.
167. Y. Jeong, Y.S., C. Choi, M. Jang, G. Shin, and J. Nah, *Surfactant-free nanoparticles of Poly(DL-Lactide-co-glycolide) prepared with Poly(L-lactide)/Poly (ethylene glycol)*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **89**: p. 1116-1123.
168. J. Panyam, S.S., S. Prabha, T. Bargar, and V. Labhasetwar, *Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **262**: p. 1-11.
169. Y. Konan, M.B., R. Gurny, and E. Allemann, *Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **18**: p. 241-249.
170. N. Csaba, P.C., A. Sanchez, F. Dominguez, and M. Alonso, *PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene therapy*. Biomacromolecules, 2005. **6**: p. 271-278.
171. T. Ameller, V.M., P. Legrand, R. Gref, G. Barrat, and J. Renoir, *Polyester Poly(ethylene Glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: Physicochemical and opsonization properties*. Pharmaceutical Research, 2003. **20**(7): p. 1063-1070.
172. K. Win, a.S.F., *Effect of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 2713-2722.
173. M. Blanco, a.M.A., *Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997. **43**: p. 287-294.
174. L. Dailey, E.K., M. Wittmar, T. Gessler, T. Schmehl, C. Roberts, W. Seeger, and T. Kissel, *Surfactant-free, biodegradable nanoparticles for aerosol therapy based on the branched polyesters, DEAPA-PVAL-g-PLGA*. Pharmaceutical Research, 2003. **20**(12): p. 2011-2020.

175. J. Panyam, W.Z., S. Prabha, S. Sahoo, and V. Labhasetwar, *Rapid endolysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery.* . The FASEB Journal, 2002. **16**: p. 1217-1226.
176. T. Riley, T.G., S. Stolnik, C. Xiong, M. Garnett, L. Illum, and S. Davis, *Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999. **16**: p. 147-159.
177. P. Pietzonka, E.W., S. Duda-Johner, P. Langguth, and H. Merkle, *Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir affects the outcome of in vitro particle uptake studies.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. **15**: p. 39-47.
178. C. Song, V.L., H. Murphy, X. Qu, W. Humphrey, R. Shebuski, and R. Levy, *Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery.* Journal of Controlled Release, 1997. **43**: p. 197-212.
179. S. Pamujula, R.G., T. Freeman, V. Srinivasen, L. Bostanian, V. Kishore, and T. Mandal, *Oral delivery of spray dried PLGA/amifostine nanoparticles.* Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2004. **56**: p. 1119-1125.
180. B. Kim, D.K., S. Cho, and S. Yuk, *Hydrophilized poly(lactide-co-glycolide) nanospheres with poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer.* Journal of Microencapsulation, 2004. **21**(7): p. 697-707.
181. P. Pietzonka, B.R.-R., P. Langguth, H. Wunderli-Allenspach, E. Walter, and H. Merkle, *Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to caco-2 monolayers mimics particle uptake.* Pharmaceutical Research, 2002. **19**(5): p. 595-601.
182. B. Jeong, C.W., M. Park, Y. Sohn, A. Gutowska, and K. Char, *Phase transition of the PLGA-g-PEG copolymer aqueous solutions.* Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**: p. 10032-10039.
183. Washington, C., *Drug release from microdisperse systems. A critical review.* Int. J. Pharm., 1990. **58**: p. 1-12.
184. B. Magenheimer, S.B., *Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach.* S.T.P. Pharm. Sci., 1991. **1**: p. 221-224.
185. M.S. El-Samaligy, P.R., H.A. Mohmoud, *Poly alkylcyanoacrylate nanocapsules.* J. Pharm. Pharmacol., 1986. **38**: p. 216-218.
186. A.M. LeRay, M.V., J.C. Gautier, J.P. Benoit, *End-chain radiolabeling and in vitro stability studies of radiolabeled poly(hydroxy) nanoparticles.* J. Pharm. Sci. , 1994. **83**: p. 845- 851.
187. M. Fresta, G.P., G. Giammona, G. Cavallaro, N.Micali, P.M. Furneri, *Pefloxacin loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles; characterization of the colloidal drug carrier formulation.* J. Pharm. Sci., 1995. **84**: p. 895-901.
188. G. Cavallaro, M.F., G. Giammona, G. Puglisi, A.Villari, *Entrapment of b-lactams antibiotics in poly ethylcyanoacrylate nanoparticles: studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system.* Int. J. Pharm., 1994. **111**: p. 31-41.
189. Ganguli, A.K., A. Ganguly, and S. Vaidya, *Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials.* Chemical Society Reviews, 2010. **39**(2): p. 474-485.
190. Jadhav, K.R., et al., *Applications of microemulsion based drug delivery system.* Current Drug Delivery, 2006. **3**(3): p. 267-273.
191. Paul, B.K. and S.P. Moulik, *Microemulsions : An overview.* Journal of Dispersion Science and Technology, 1997. **18**(4): p. 301-367.

192. Maidment, L.J., V. Chen, and G.G. Warr, *Effect of added cosurfactant on ternary microemulsion structure and dynamics*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1997. **129-130**: p. 311-319.
193. Warisnoicharoen, W., A.B. Lansley, and M.J. Lawrence, *Nonionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behaviour*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **198**(1): p. 7-27.
194. Alany, R.G., et al., *Effects of alcohols and diols on the phase behaviour of quaternary systems*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **196**(2): p. 141-145.
195. In, M. and R. Zana, *Phase behavior of gemini surfactants*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2007. **28**(1): p. 143-154.
196. Kahlweit, M., E. Lessner, and R. Strey, *Phase behavior of quaternary systems of the type H_2O -oil-nonionic surfactant-inorganic electrolyte. 2*. Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(10): p. 1937-1944.
197. Hickey, S., et al., *Analysis of the phase diagram and microstructural transitions in phospholipid microemulsion systems using high-resolution ultrasonic spectroscopy*. Langmuir, 2006. **22**(13): p. 5575-5583.
198. Garti, N., et al., *Water Solubilization and Chain Length Compatibility in Nonionic Microemulsions*. Journal of Colloid And Interface Science, 1995. **169**(2): p. 428-436.
199. Kale, N.J. and L.V. Allen Jr, *Studies on microemulsions using Brij 96 as surfactant and glycerin, ethylene glycol and propylene glycol as cosurfactants*. International Journal of Pharmaceutics, 1989. **57**(2): p. 87-93.
200. Martin, A., *Physical Pharmacy*. 1993, Philadelphia: Lea and Febiger.
201. Acharya, A., et al., *Physicochemical investigations of microemulsification of coconut oil and water using polyoxyethylene 2-cetyl ether (Brij 52) and isopropanol or ethanol*. Journal of Colloid And Interface Science, 2002. **245**(1): p. 163-170.
202. Winsor, P.A., *Hydrotrophy, solubilisation and related Emulsification processes. Part I*. Transactions of the Faraday Society, 1948. **44**: p. 376-398.
203. Baran Jr, J.R., *Winsor I \leftrightarrow III \leftrightarrow II microemulsion phase behavior of hydrofluoroethers and fluorocarbon/hydrocarbon catanionic surfactants*. Journal of Colloid and Interface Science, 2001. **234**(1): p. 117-121.
204. Lucks, J.S., B.W. Muller, and R.H. Muller, *Inorganic suspensions - Interaction with salts and ionic surfactants*. International Journal of Pharmaceutics, 1990. **58**(3): p. 229-235.
205. Carstensen, H., B.W. Muller, and R.H. Muller, *Adsorption of ethoxylated surfactants on nanoparticles. I. Characterization by hydrophobic interaction chromatography*. International Journal of Pharmaceutics, 1991. **67**(1): p. 29-37.
206. Radomska-Soukharev, A., *Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 411-418.
207. Han, F., et al., *Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **315**(1-3): p. 210-216.
208. Malzert-Fréon, A., et al., *Influence of the introduction of a solubility enhancer on the formulation of lipidic nanoparticles with improved drug loading rates*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2010. **75**(2): p. 117-127.

209. Fatouros, D.G. and S.G. Antimisiaris, *Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin*. Journal of Colloid and Interface Science, 2002. **251**(2): p. 271-277.
210. Westesen, K. and B. Siekmann, *Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **151**(1): p. 35-45.
211. Mehnert, W., et al., *Solid lipid nanoparticles - A novel carrier system for cosmetics and pharmaceuticals / 2nd communication: drug incorporation, drug liberation, sterilisation*. Solid lipid Nanoparticles - Ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika 2. Mitteilung: Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit", 1997. **59**(6): p. 511-514.
212. Ferdous, A.J., N.Y. Stemberge, and M. Singh, *Role of monensin PLGA polymer nanoparticles and liposomes as potentiator of ricin A immunotoxins in vitro*. Journal of Controlled Release, 1998. **50**(1-3): p. 71-78.
213. FAO/WHO, *Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications, Seventeenth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*, W.H.O.T.R. Ser, Editor. 1974.
214. Abdul-Hussain, S. and D. Acosta, *In vitro model to evaluate the cytotoxicity of two groups of surfactant mixtures with rat keratinocyte cultures*. Toxic Substances Journal, 1993. **13**(1): p. 1-14.
215. Budhlall, B.M., et al., *Characterization of partially hydrolyzed poly(vinyl alcohol). Effect of poly(vinyl alcohol) molecular architecture on aqueous phase conformation*. Macromolecules, 2003. **36**(25): p. 9477-9484.
216. Li, H., et al., *Hydrogen bonding governs the elastic properties of poly(vinyl alcohol) in water: Single-molecule force spectroscopic studies of PVA by AFM*. Macromolecules, 2000. **33**(2): p. 465-469.