



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NANOCÁPSULAS
CARGADAS DE KETOCONAZOL CON SISTEMAS
AUTOMICROEMUSIFICABLES”**

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

DIANA IRENE CONTRERAS ORTÍZ

MÉXICO, D.F.

AÑO 2015





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS

VOCAL: ALMA MIRIAM NOVELO TORRES

SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

1º SUPLENTE: MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

2º SUPLENTE: KENNETH RUBIO CARRASCO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN, LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

SUSTENTANTE: DIANA IRENE CONTRERAS ORTÍZ

Tabla de acrónimos y abreviaturas

| | |
|--------|---|
| ANOVA | Análisis de varianza |
| CV | Coeficiente de variación |
| f_2 | Factor de similitud |
| FEUM | Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos |
| g | Gramo |
| KTZ | Ketoconazol |
| ME | Microemulsión |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mV | Milivolt |
| NC | Nanocápsula |
| NE | Nanoesfera |
| nm | Nanómetro |
| NP | Nanopartícula |
| SC | <i>Stratum corneum</i> (estrato córneo) |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido |
| SMEDDS | <i>Self-microemulsifying drug delivery system</i> (sistemas automicroemulsionables) |
| USP | <i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopea de los Estados Unidos) |

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Marco teórico | 3 |
| 2.1 Sistemas nanoparticulados | 3 |
| 2.2 Nanocápsulas y nanoesferas: Características y fabricación | 3 |
| 2.3 Sistemas automicroemulsionables | 6 |
| 2.4 Principio activo de interés: ketoconazol | 8 |
| 2.5 La piel y su relación con nanopartículas | 9 |
| 3. Justificación | 13 |
| 4. Objetivos | 14 |
| 4.1 Objetivo general | 14 |
| 4.2 Objetivos particulares | 14 |
| 5. Hipótesis | 16 |
| 6. Metodología | 17 |
| 6.1 Selección de la formulación | 18 |
| 6.1.1 Evaluación de estabilidad y talla de partícula | 19 |
| 6.1.2 Evaluación de estabilidad | 19 |
| 6.1.2 Robustez de la formulación | 20 |
| 6.2 Adición de polímero y formación de NC's | 20 |
| 6.2.1 Polímeros de prueba | 20 |
| 6.2.2 Incorporación del polímero y robustez de la formulación | 21 |
| 6.3 Morfología | 22 |
| 6.4 Potencial ζ | 22 |
| 6.5 Densidad | 22 |
| 6.6 Validación del método analítico de cuantificación | 23 |
| 6.7 Liberación del KTZ a partir de las NC's | 24 |
| 6.7.1 Evaluación de la membrana de diálisis para pruebas de liberación | 24 |
| 6.7.2 Liberación de KTZ | 24 |
| 7. Resultados y discusión | 25 |
| 7.1 Selección de la formulación | 25 |
| 7.1.1 Evaluación de estabilidad y talla de partícula | 25 |

| | |
|--|----|
| 7.1.2 Robustez de la formulación..... | 27 |
| 7.2 Adición de polímero y formación de NC's..... | 28 |
| 7.2.1 Polímeros de prueba..... | 28 |
| 7.2.2 Incorporación del polímero y robustez de la formulación..... | 29 |
| 7.3 Morfología..... | 31 |
| 7.4 Potencial ζ | 32 |
| 7.5 Densidad..... | 37 |
| 7.6 Validación de métodos analíticos de cuantificación..... | 42 |
| 7.7 Liberación de KTZ..... | 46 |
| 7.7.1 Evaluación de la membrana..... | 46 |
| 7.7.2 Liberación de KTZ..... | 48 |
| 8. Conclusiones..... | 55 |
| 9. Perspectivas..... | 56 |
| 10. Referencias..... | 57 |
| Anexo 1 – Marcadores de densidad..... | 65 |
| Anexo 2 – Diagrama de fases para el potencial ζ | 66 |

1. Introducción

Desde hace varias décadas la producción de nanopartículas como alternativa a las formas de administración convencionales de principios activos se ha estudiado exhaustivamente. Su aplicación no se ha extendido satisfactoriamente debido a que los métodos actualmente disponibles para su fabricación presentan importantes desventajas, tales como el uso de grandes cantidades de agua y disolventes orgánicos, difícil purificación y pérdida de la estabilidad (Limayem I, Charcosset C, Fessi H. 2004).

El propósito principal del presente trabajo es desarrollar una formulación basada en un novedoso método de fabricación de nanocápsulas *in situ*. Este método consiste en utilizar sistemas automicroemulsionables como base para la formación de la nanocápsulas *in situ*, con lo que se lograría obtener las partículas deseadas sin necesidad de emplear métodos de fabricación con un alto costo energético, eliminando la necesidad de emplear complejos procesos de purificación.

Se seleccionó al ketoconazol como fármaco de trabajo debido a su baja solubilidad. Es un fármaco de uso predominantemente tópico, empleado para combatir micosis que usualmente se comercializa como una crema semisólida en la cual las partículas se encuentran suspendidas, lo que disminuye su capacidad de penetrar el estrato córneo, que es la zona donde lleva a cabo su acción terapéutica (Patel MR, Patel RB, Parikh JR, Solanki AB, Patel BG. 2011). Otras formas de comercialización incluyen soluciones, talcos, polvos, tabletas orales, shampoos, geles, suspensiones y óvulos (Rosenstein E. 2013); formas farmacéuticas de que también se utilizan para combatir infecciones micóticas.

De acuerdo con varios estudios realizados, las nanopartículas tienen la capacidad de mejorar la permeación de fármacos a través de la piel (Baroli B. 2010), por lo que la formulación de

este fármaco en nanocápsulas mejoraría su biodisponibilidad y por lo tanto, permitiría reducir la dosis necesaria para alcanzar el umbral terapéutico lo cual trae como beneficio para los pacientes una disminución de la posible toxicidad del principio activo.

El método de fabricación propuesto en este trabajo fue recientemente desarrollado por nuestro grupo de investigación y debido a que se obtuvieron resultados prometedores con la primera fórmula propuesta, es de particular interés determinar si la técnica desarrollada es efectiva al cambiar de formulación.

2. Marco teórico

2.1 Sistemas nanoparticulados

Las nanopartículas (NP's) se definen como sistemas compuestos de partículas coloidales submicrómicas con un diámetro que va desde 1 hasta 1000 nm, en las cuales el fármaco se puede encontrar disuelto, capturado, encapsulado, adsorbido, o unido químicamente a los constituyentes de la NP (Letchford K, Burt H. 2006). A la fecha, se ha estudiado una amplia gama de NP's que incluye liposomas, micelas, nanoesferas, niosomas, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, microemulsiones y nanotubos de carbono (Letchford K, Burt H. 2007)

Desde hace varias décadas se han estudiados a las NP's como una alternativa para los sistemas de liberación de fármacos. Dentro de las características que convierten a las NP's en prometedores vectores para la liberación de sustancias activas destacan: su tamaño subcelular mejora su absorción intracelular, mejoran la estabilidad de sustancias activas, y las protegen de factores de degradación como el pH. (Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. 2010)

De las diferentes formas de NP's que se han estudiado a lo largo de los años, un grupo importante está compuesto por los sistemas de NP's a base de materiales poliméricos, que de igual manera se pueden clasificar en nanocápsulas (NC's) y nanoesferas (NE's). Los tipos de polímeros utilizados para su fabricación pueden ser de origen natural o sintético. (Fanun M. 2010)

2.2 Nanocápsulas y nanoesferas: Características y fabricación

Las NE's son sistemas matriciales en los cuales la sustancia activa se encuentra uniformemente dispersa. Por otro lado, se considera que las NC's son sistemas vesiculares

en los cuales el fármaco se encuentra confinado a una cavidad, compuesta generalmente por un núcleo oleoso, rodeada de una membrana polimérica. Los materiales de fabricación más comunes son poliésteres y poliacrilatos para la sección polimérica y triglicéridos, alcoholes de cadena larga y aceites minerales como núcleos oleosos (Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001). Estos sistemas se encuentran típicamente estabilizados por surfactantes como fosfolípidos, polisorbatos, poloxámeros y surfactantes catiónicos (Filippov SK, Panek J, Stepanek P. 2012).

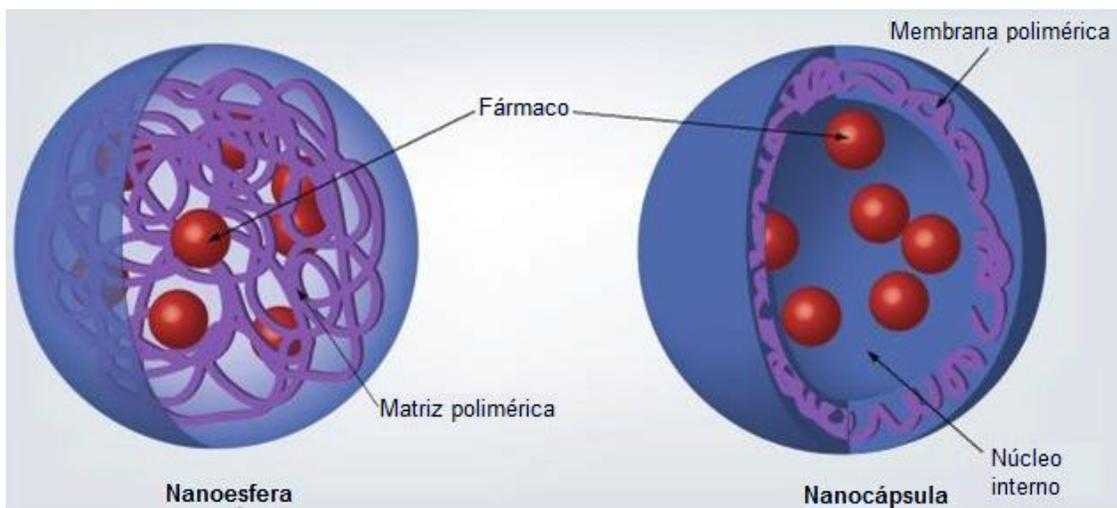


Figura 1. Estructura morfológica de nanocápsulas y nanoesferas (Bei D, Meng J, Youan BC. 2010)

De acuerdo con Mora-Huerta y cols. (2010) las NC's son sistemas más ventajosos que las NE's para la administración de sustancias activas, ya que:

- Poseen una estructura rígida que permite extender y controlar la liberación de fármacos por medio de difusión y disolución, que por ende proporcionan un excelente control farmacocinético.
- Poseen una superficie químicamente modificable.
- Exhiben un excelente perfil de biocompatibilidad y biodegradación, además de un incremento de la solubilidad y la biodisponibilidad.
- Protegen al fármaco de la degradación causada por el medio biológico.

- e) Causan una menor irritación en el sitio de liberación ya que el fármaco se encuentra aislado por la cápsula polimérica.

Se considera que la preparación de NC's se puede llevar a cabo mediante uno de dos métodos generales: dispersión de un polímero preformado y polimerización de monómeros (Pinto-Reis C, Neufeld RJ, Riveiro A, Veiga, F. 2006). A continuación se da una breve descripción de algunos métodos tradicionales para la fabricación de NC's.

1. Evaporación de disolvente: el polímero se disuelve en un disolvente inmisible en agua y el principio activo se dispersa o disuelve en la disolución polimérica. La dispersión o disolución resultante se emulsifica con un agitador rotor estator en la fase acuosa obteniéndose gotas discretas. Conforme se produce la evaporación del disolvente, las NC's se vuelven rígidas (O'Donnell PB, McGinity JW. 1997).
2. Nanoprecipitación: Requiere de dos disolventes que sean miscibles entre sí. Idealmente, el polímero y el fármaco son solubles en el primer disolvente pero no en el segundo. La nanoprecipitación ocurre debido a la rápida desolvatación del polímero cuando la disolución del mismo es añadido al segundo disolvente, de este modo el polímero precipita encapsulando al fármaco (Bilati U, Allémann E, Doelker E. 2005).
3. Emulsificación - *Salting out*: se selecciona un disolvente para el polímero que sea miscible con el agua y se obtiene la emulsión mediante la disolución en la fase acuosa de altas concentraciones de alguna sal o sacáridos, seleccionadas por su gran capacidad de producir el efecto de *salting-out*. La precipitación del polímero disuelto se induce al diluir la emulsión lo que produce una súbita disminución de la concentración de la sal o sacarosa en la fase continua de la emulsión, induciendo al disolvente del polímero a migrar fuera de las gotas de la emulsión (Vauthier C, Bouchemal K. 2009).

4. Polimerización *in situ*: en este método se añade una disolución del monómero en lugar del polímero en la fase acuosa y se procede a realizar una polimerización interfacial o reacciones de policondensación en emulsiones o microemulsiones. En general, se prefiere el uso de alquilcianoacrilatos debido a que se pueden producir NP's para aplicaciones *in vivo* (el-Samaligy MS, Rohdewald P, Mahmoud HA. 1986).

En los métodos previamente descritos es indispensable purificar las NC's obtenidas debido a que, dependiendo de la técnica seleccionada, se pueden encontrar las siguientes impurezas potencialmente tóxicas: disolventes orgánicos, estabilizantes, monómeros residuales, iniciadores de la polimerización y grandes agregados poliméricos (Limayem I, Charcosset C, Fessi H. 2004). Es por ello que se utilizan diferentes técnicas como ultrafiltración, ultracentrifugación, diálisis, filtración en gel y evaporación a presión reducida (Venier-Julienne MC, Benoît JP. 1996). La gran desventaja de estos métodos radica en que están diseñados para lotes pequeños además de ser altamente costosos y requieren del uso de equipo especializado. Debido a lo anterior, se propone formar NC's con una nueva metodología basada en los sistemas automicroemulsionables, SMEDDS por sus siglas en inglés (*self-emulsifying drug delivery system*).

2.3 Sistemas automicroemulsionables

Las microemulsiones (ME's) son dispersiones coloidales de baja viscosidad que son termodinámicamente estables, transparentes e isotrópicas. Consisten en microdominios de aceite estabilizados por una película interfacial que alterna moléculas de surfactante y cosurfactante (Date AA, Nagarsenker MS. 2008).

Los SMEDDS son sistemas isotrópicos compuestos por aceite, surfactante, cosurfactante y el fármaco (Zhao Y, Wang C, Chow AHL, Ren K, Gong T, Zhang Z, Zheng Y. 2010). Son

fácilmente dispersables en agua mediante leve agitación mecánica formando espontáneamente una microemulsión O/W (Nigade PM, Patil SL, Tiwari SS. 2012) cuyas partículas se encuentran en el rango nanométrico con un diámetro que va desde 20 nm a 200 nm (Elgannar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. 2009). La figura 2 muestra un glóbulo de microemulsión.

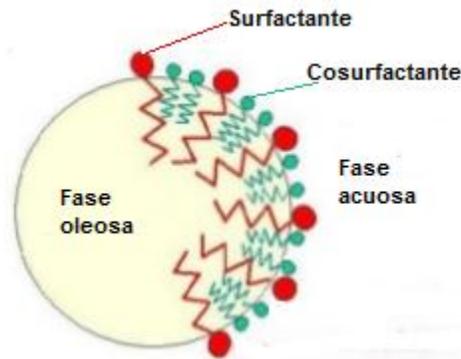


Figura 2. Estructura de un glóbulo de microemulsión. (Aher, SB. 2005)

El fenómeno de microemulsificación se encuentra influenciado por diversos factores, por lo que, para elaborar una formulación en base de dichos sistemas se debe de tomar en cuenta la naturaleza y concentración de cada uno de los componentes, la proporción aceite/surfactante y surfactante/cosurfactante, la temperatura, el pH de medio de dispersión y las propiedades fisicoquímicas del fármaco en cuestión como hidrofiliicidad/lipofiliicidad, pKa y polaridad (Lawrence MJ, Rees, GD. 2008).

Las ventajas que exhiben este tipo de sistemas sobre otras NP's son las siguientes (Pinto-Reis C, Neufeld RJ, Riveiro A, Veiga F. 2006):

- a) Reducción en la dosis del principio activo.
- b) Facilidad de manufactura y escalamiento.
- c) Aumento en la biodisponibilidad.
- d) Aumento en la capacidad de carga del fármaco.

e) Alta estabilidad de la suspensión coloidal.

Teniendo en cuenta las características previamente descritas, este tipo de sistemas resulta ideal para fármacos con una baja solubilidad en agua, como es el caso del ketoconazol, el fármaco seleccionado para la elaboración del presente trabajo.

2.4 Principio activo de interés: ketoconazol

El ketoconazol (KTZ) es un fármaco clase II de tipo imidazólico, como se puede observar en la figura 3, que puede ser formulado para uso tópico u oral (Richardson MD, Warnock DW. 2012). Su mecanismo de acción es el bloqueo del citocromo P450 C14 α -lanosterol demetilasa (abreviado LDM) en la ruta de síntesis del ergosterol, lo que su vez impide su síntesis. La falta de ergosterol aunado a la acumulación de 14 α -metil-esteroles interfiere con las funciones del mismo como componente predominante de la membrana celular de los hongos (Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. 2002).

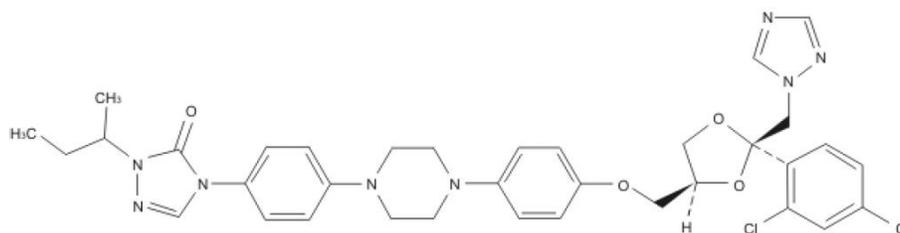


Figura 3. Estructura química del ketoconazol (Gregori Valdés, BS. 2005)

Este principio activo, en presentación tópica, es útil contra las siguientes enfermedades:

- a) Dermatofitosis: constituyen un grupo de micosis superficiales cuya característica es la parasitación de la piel (*tinea corporis*), cabello (*tinea capitis*) y uñas (*tinea unguis*) por alguna especie de dermatofitos, microorganismos cuyo distintivo es la utilización de queratina como fuente de alimento (Magaña García M. 1998).

- b) Candidiasis cutánea: provocada generalmente por *C. albicans*, se presenta como lesiones pruriginosas, eritematosas y maceradas. (Wolff K et al. 2009).
- c) Pityriasis versicolor: infección superficial causada por la levadura *Pitysporum*. Las lesiones primarias son placas delgadas con una coloración ligeramente diferente al tono de piel natural. (Elston D, Tyring S, High W, Ferringer T. 2007).
- d) Dermatitis seborreica: afección crónica de la piel caracterizada por la inflamación de las áreas cutáneas en las que existe un mayor número de glándulas sebáceas como la nariz, las cejas, la piel detrás de las orejas, y el cuero cabelludo.(Peretta MD. 2005).

El KTZ es una base débil con dos valores de pKa: 6.51 y 2.94, es prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y puede presentar algún tipo de degradación en medio acuoso, incluyendo oxidación e hidrólisis (Skiba M, Skiba-Lahiani M, Marchais H, Arnaud P. 2000). Para su aplicación tópica, el KTZ usualmente encuentra disponible de forma comercial como suspensión en cremas semisólidas y shampoos, lo que provoca que se tenga una baja biodisponibilidad del principio activo ya que este tipo de partículas no tienen buena permeación en la piel. El shampoo está diseñado para aplicarse por cortos periodos de tiempo, lo que impide que se mantenga una concentración terapéutica apropiada en la piel, por lo que tampoco es apropiado (Patel MR, Patel RB, Parikh JR, Solanki AB, Patel BG. 2011). Es por ello que se busca mejorar la absorción del fármaco a través de la piel.

2.5 La piel y su relación con nanopartículas

Para poder comprender la forma en que las nanopartículas pueden mejorar la absorción de principios activos a través de las capas de la piel es fundamental primero comprender la morfología particular de este órgano, el cual es el más grande del cuerpo. (Feng Xu y

Tianjian Lu. 2011) elaboraron una lista donde enumeran varias funciones vitales de la piel en el organismo, dentro de las cuales destacan:

1. Sensorial: funciona como el órgano sensorial de sentidos cutáneos como dolor, calor, frío, presión y tacto.
2. Termorregulación: funge como generador de calor, radiador, conductor y vaporizador.
3. Defensa inmunológica: previene la entrada de partículas extrañas al cuerpo como microorganismos y protege al tejido interno de heridas.
4. Reservorio: almacena tejido adiposo y previene la pérdida excesiva de agua.
5. Excreción: de componentes como agua, sales, urea, ácido láctico, entre otros compuestos.

Todas las funciones previamente mencionadas son de gran importancia, pero es de particular interés para el presente trabajo lo relacionado con la función de barrera de la piel, ya que para poder absorber el fármaco es requisito penetrar los estratos de este órgano.

La piel se encuentra compuesta de varias capas morfológicamente diferentes. Exteriormente, se encuentra protegida por el estrato córneo (SC por sus siglas en inglés), la cual es la capa mostrada en la figura 4. Esta región superficial tiene un grosor entre 10 a 20 μm y es la principal barrera a la absorción percutánea de compuestos y a la pérdida de agua. La siguiente capa se denomina epidermis con un grosor de 50-100 μm , esta sección es responsable de la generación del SC. La dermis se encuentra adyacente a la epidermis y provee de soporte mecánico a la piel (Elias PM, Feingold KR. 2006).

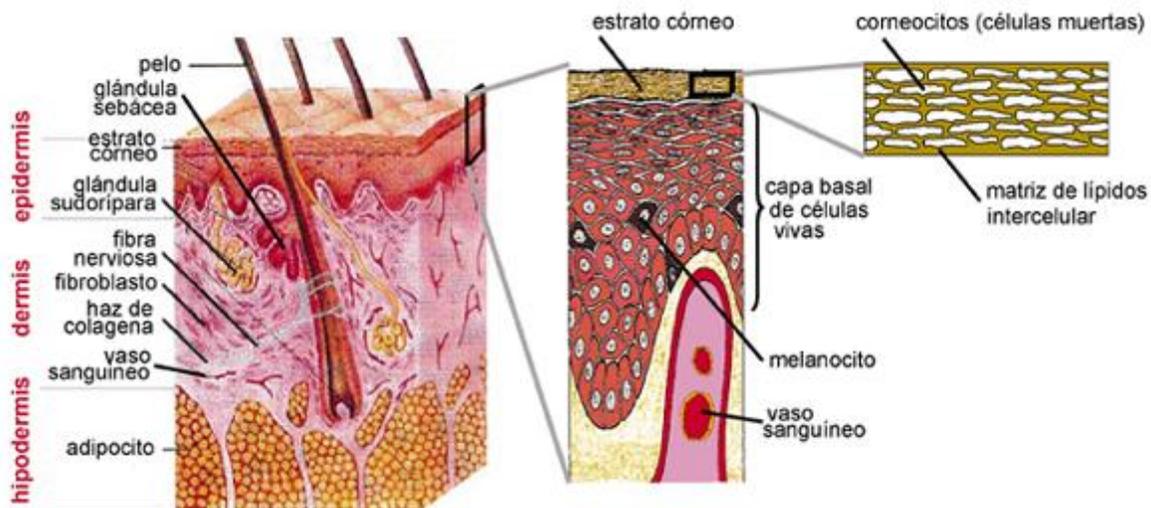


Figura 4. Estructura general de la piel (Gómez Ayala AE. 2009)

El SC se compone en su gran mayoría de unas células llamadas corneocitos, las cuales son planas, anucleares y ricas en proteínas. Estas células se encuentran altamente compactadas dentro de una matriz extracelular lipídica acomodada en bicapas. Este tipo de arreglo se ha llegado a denominar arreglo de “cemento y ladrillos”. Los corneocitos se unen gracias a los corneodesmosomas, que ayudan a formar una capa externa de gran resistencia a través del mantenimiento de la forma celular y el empaquetado regular (Prow TW, Grice JE, Lin LL, Raye R, Butler M, Becker W, Wurm EMT, Yoong C, Robertson T, Soyer HP, Roberts MS. 2011).

En las últimas décadas se había pensado que la penetración de sustancias tóxicas a través de las barreras de la piel se daba a través del fenómeno de difusión pasiva a través de las capas lipídicas que rodean a los corneocitos. Investigaciones recientes han atribuido un papel importante a los folículos capilares en la permeación de la piel, (Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiß B, Schaefer UF, Lehr CM, Wepf R, Sterry W. 2007) por lo que aún no se han elucidado completamente los mecanismos de transporte, particularmente para las nanopartículas.

Por otro lado, además de las características intrínsecas del SC, existen otros factores que tienen cierta influencia en la permeación de las NPs. Baroli B. (2010) indicó que los parámetros fisicoquímicos que pueden resultar primordiales para este tipo de vehículos son los siguientes: dimensiones de la partícula, selección de la ruta de penetración y coeficiente de difusión entre el vehículo de dispersión y la piel. Las NP's poseen un tamaño reducido, lo que facilita su movimiento a través de las capas del SC. También es de gran importancia utilizar un principio activo que sea poco soluble en medio acuoso para facilitar su difusión a la matriz lipídica del SC Prow TW, Grice JE, Lin LL, Raye R, Butler M, Becker W, Wurm EMT, Yoong C, Robertson T, Soyer HP, Roberts MS. 2011).

Se ha demostrado que NC's cargadas con clorhexidina presentaron una liberación prolongada y actividad antimicrobiana prolongada y su transporte se dio a través de los conductos de la piel (Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. 2007). Lo anterior demuestra que las NC's son una vía alternativa que puede resultar muy atractiva para liberaciones cutáneas prolongadas, además de mejorar la permeabilidad y en general volver más eficiente los tratamientos, por lo que se optó utilizar este nuevo tipo de sistemas de liberación para el KTZ, el cual requiere una acción prolongada en las capas superficiales de la piel, que es la zona donde se concentran la mayoría de las infecciones cutáneas provocadas por hongos patógenos.

3. Justificación

Las técnicas actuales de fabricación de nanocápsulas limitan su aplicación a nivel industrial, ya que el costo-beneficio no es redituable debido a la dificultad del escalamiento de las tecnologías de fabricación y las complicaciones que se presentan para su posterior purificación. Estos sistemas farmacéuticos tienen un gran potencial para facilitar y controlar la administración de fármacos insolubles en agua, por lo que resulta de gran interés desarrollar un método que no solamente facilite su fabricación y escalamiento, sino que además evite la necesidad de utilizar costosas técnicas de purificación. El método que se propone en este trabajo para la fabricación de NC's cargadas de KTZ es novedoso debido a que sólo se requiere de agitación mecánica para su elaboración y no es necesario realizar pasos posteriores para la purificación de las mismas, con lo que se resolverían varios de los problemas que impiden su manufactura a mayor escala.

Otra gran ventaja de este método es que permite la conservación de la estructura y funcionalidad de las NC's, confiriendo un mayor tiempo de residencia del principio activo en el sitio de aplicación y un mejor control en la rapidez de liberación.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar y evaluar una nueva metodología para la fabricación de NC's *in situ* basada en sistemas automicroemulsionables determinando talla de partícula, potencial ζ , densidad, morfología y perfil de liberación con la finalidad de determinar la viabilidad del método propuesto.

4.2 Objetivos particulares

- a) Seleccionar una formulación SMEDDS que permita la obtención de glóbulos de aceite con una talla entre 150 a 250 nm para la incorporación de un polímero farmacéutico.
- b) Llevar a cabo las pruebas de adición de polímero determinando su capacidad de incorporación a la fórmula propuesta con la finalidad de establecer el sistema definitivo.
- c) Realizar la caracterización física de las NP's obtenidas considerando la talla de partícula de las NC's (dispersión dinámica de luz), la morfología (microscopía electrónica de barrido), el potencial ζ (electroforesis Doppler), y la densidad boyante (centrifugación isopícnica) para obtener información indirecta acerca de su estructura y estabilidad.
- d) Validar los métodos analíticos de cuantificación a utilizar durante los estudios de liberación considerando especificidad, precisión, linealidad, exactitud y precisión intermedia.

e) Evaluar la liberación del fármaco seleccionado a partir de las NC's obtenidas por el método de membrana de diálisis con el propósito de establecer la estructura interna y el mecanismo de liberación.

5. Hipótesis

El método de obtención de nanocápsulas *in situ* mediante sistemas automicroemulsionables será capaz de dar lugar a la formación de nanocápsulas *in situ* a través de sistemas automicroemulsionables. Las nanocápsulas así obtenidas exhibirán propiedades físicas y un perfil de liberación característicos de un sistema tipo reservorio.

6. Metodología

Para el desarrollo experimental se siguió la metodología planteada en la figura 5:

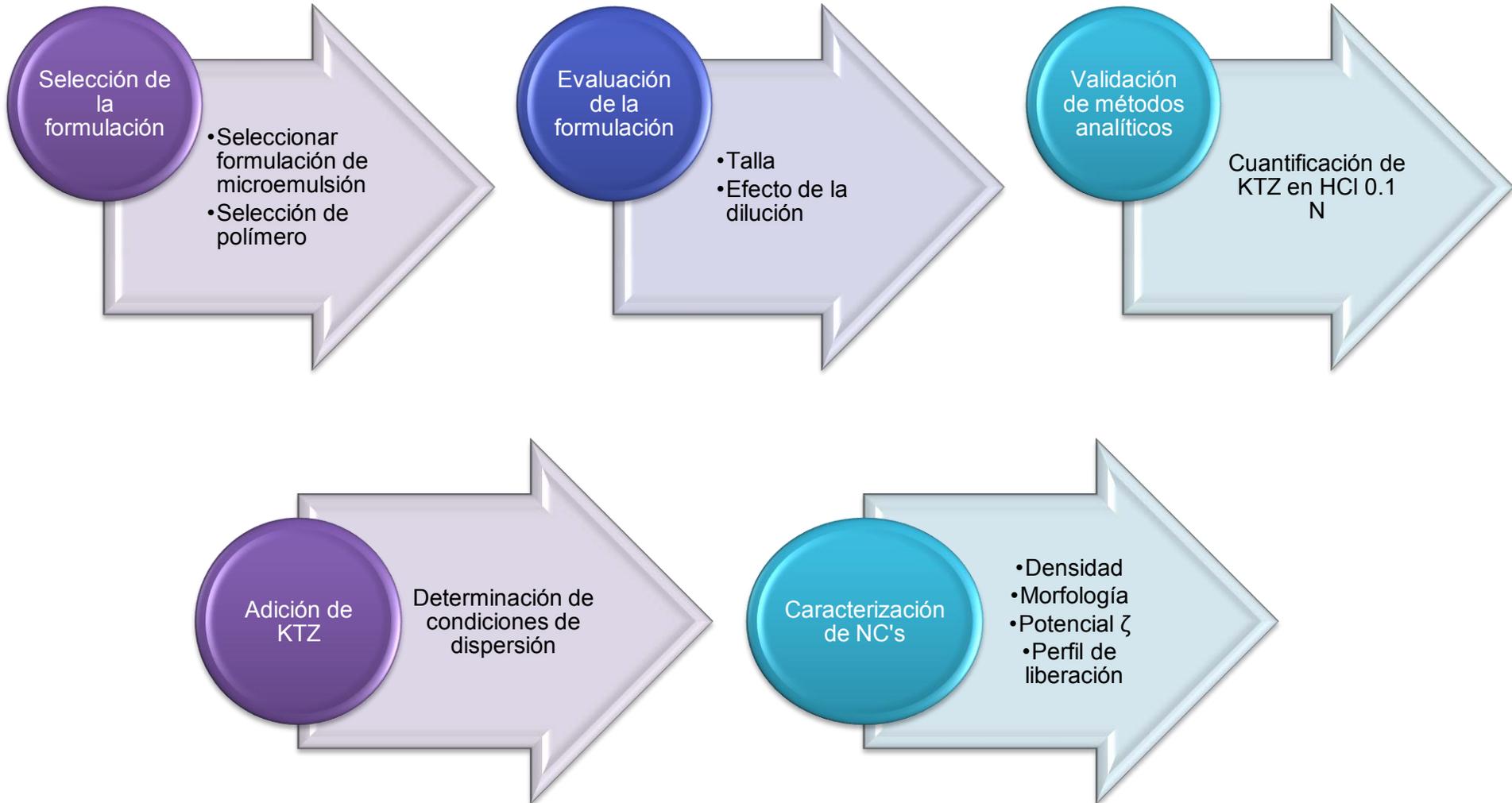


Figura 5. Actividades realizadas durante el proceso experimental.

6.1 Selección de la formulación

En primer lugar se estableció la formulación de la ME en base a los excipientes propuestos. De acuerdo con lo consultado en la literatura (Elnaggar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. 2009), se planteó realizar pruebas con varias formulaciones utilizando dos fases oleosas diferentes: Maisine 35-1 (gliceril monolinoleato) y Labrafac (triglicéridos cáprico-caprílico); dos tensoactivos diferentes, Tween 80 (polioxietilensorbitanmonooleato) y Kolliphor EL (macrogolglicerol ricinoleato); y finalmente, el mismo cotensoactivo para todas las formulaciones, etanol al 96 % v/v. Se seleccionaron tres proporciones óptimas considerando lo mencionado en estudios previos realizados por Elnaggar YSR y cols. (2009) y por nuestro grupo de trabajo, como se indica en la tablas 1, 2, 3 y 4.

| Formulación | Maisine 35-1 | Tween 80 | Etanol 96% |
|-------------|--------------|----------|------------|
| A1 | 40 | 40 | 20 |
| A2 | 50 | 30 | 20 |
| A3 | 60 | 30 | 10 |

Tabla 1. Proporciones en porcentaje para las formulaciones A1, A2 y A3.

| Formulación | Maisine 35-1 | Kolliphor EL | Etanol 96% |
|-------------|--------------|--------------|------------|
| B1 | 40 | 40 | 20 |
| B2 | 50 | 30 | 20 |
| B3 | 60 | 30 | 10 |

Tabla 2. Proporciones en porcentaje para las formulaciones B1, B2, B3.

| Formulación | Labrafac | Tween 80 | Etanol 96% |
|-------------|----------|----------|------------|
| C1 | 40 | 40 | 20 |
| C2 | 50 | 30 | 20 |
| C3 | 60 | 30 | 10 |

Tabla 3. Proporciones en porcentaje para las formulaciones C1, C2 y C3.

| Formulación | Labrafac | Kolliphor EL | Etanol 96% |
|-------------|----------|--------------|------------|
| A1 | 40 | 40 | 20 |
| A2 | 50 | 30 | 20 |
| A3 | 60 | 30 | 10 |

Tabla 4. Proporciones en porcentaje para las formulaciones D1, D2 y D3.

Para cada formulación, se elaboró un concentrado de 3 mL. Primero se adicionó la fase oleosa, después el tensoactivo y por último, el cotensoactivo cuidando que éste no se evaporara. Posteriormente, se dispersó 1 mL del concentrado en 50 mL de agua destilada mediante leve agitación mecánica para obtener la correspondiente ME.

6.1.1 Evaluación de estabilidad y talla de partícula.

La talla de partícula se determinó a través de dispersión dinámica de luz, la cual es una técnica fisicoquímica que se utiliza para la determinación de la distribución del tamaño de partículas en suspensión. Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de luz láser sobre la suspensión, el cual se dispersa al alcanzar las numerosas partículas suspendidas. (Cuadros Moreno A, Casañas Pimentel R, San Martín Martínez E, Yañez Fernández J. 2014).

Se realizó la medición de las ME en celdas de cuarzo con el equipo Coulter Nanosizer N4 Plus a 4 °C durante ciclos de 4 minutos con las diluciones adecuadas, cada muestra se midió por triplicado.

6.1.2 Evaluación de estabilidad

Se ha determinado que someter a las ME's a centrifugación ayuda a determinar su estabilidad mediante la observación de una separación de fases irreversible y la formación de aglomerados, lo cual a su vez indica la incompatibilidad de la formulación (Jain J, Fernandes C, Patravale V. 2010). La resistencia de la capa interfacial se ve reflejada en la capacidad de

la microemulsión de conservar sus características frente al proceso de centrifugación (Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. 2003).

La estabilidad acelerada se llevó a cabo centrifugando 1.5 mL de la ME a 10,000 RPM durante 15 minutos. Las formulaciones que no mostraron evidencia de separación de fases ni proporcionaron glóbulos con una talla menor a 250 nm fueron sometidas a la prueba de robustez. Esta prueba se efectuó por triplicado para cada una de las muestras.

6.1.2 Robustez de la formulación

Se procedió a realizar una evaluación de la robustez de las formulaciones más prometedoras mediante diluciones seriadas. En este caso, se realizaron diluciones a partir de las dispersiones iniciales de las ME's desde 1 en 100 partes hasta 1 en 1000 partes de agua destilada, con la finalidad de cuantificar la talla de partícula y buscar algún cambio drástico en los valores obtenidos, de forma similar al procedimiento descrito por Elnaggar y cols (2009).

6.2 Adición de polímero y formación de NC's

6.2.1 Polímeros de prueba

Una vez seleccionada la formulación más adecuada (talla menor a 250 nm, estable y resistente a la dilución), se procedió a realizar las pruebas de incorporación del polímero. Los polímeros *Carbopol 934 (Lubrizol)*, *Carbopol 971 (lubrizol)*, *Eudragit (HELM)*, *Policarbofilo (Lubrizol)* y *Ethocel (HELM)* fueron seleccionados debido a que son altamente solubles en el cotensoactivo de la formulación y biocompatibles.

6.2.2 Incorporación del polímero y robustez de la formulación

Para elaborar el concentrado se incorporó el polímero al etanol, a una temperatura de 30°C. Una vez que se obtiene un gel traslúcido se añade el tensoactivo, posteriormente la fase oleosa previamente calentada a 70°C para mejorar su fluidez y finalmente se añade el fármaco, el proceso se muestra en la figura 6.

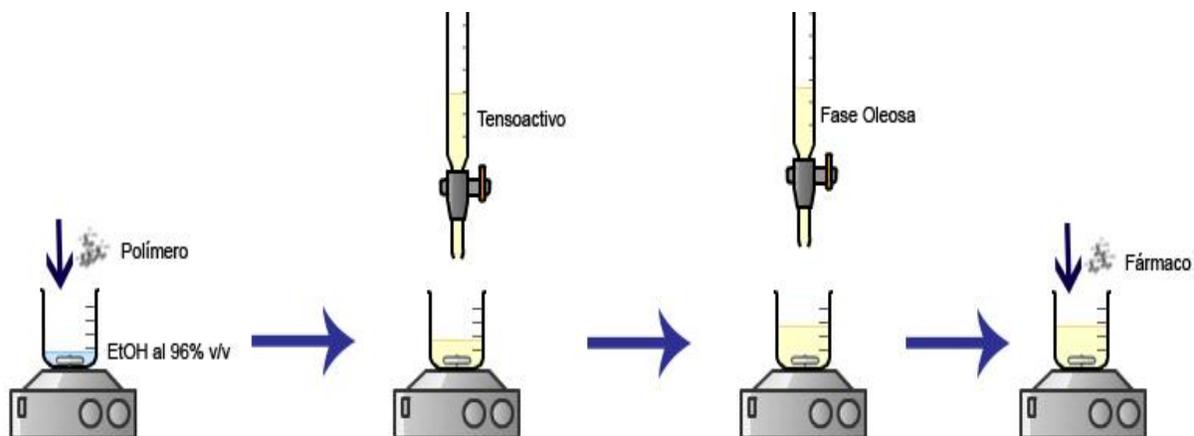


Figura 6. Diagrama de preparación del concentrado de la formulación.

El concentrado obtenido se dispersa en agua destilada a 30 °C con ayuda de un agitador magnético, como se indica en la figura 7.

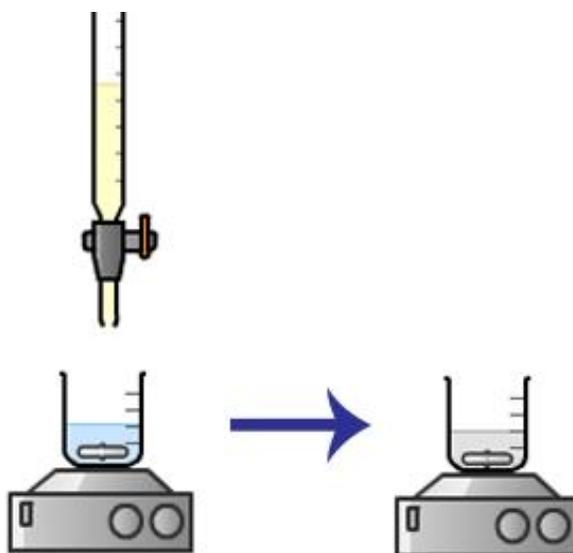


Figura 7. Dispersión del concentrado en agua para obtener las NC's.

Una vez obtenidas las posibles NC's se determinó la talla de partícula y se realizó una dilución de 5 en 50 partes de agua de la dispersión de NC's obtenida para determinar que efectivamente se formaba una capa polimérica que impide a las NC's variar su tamaño.

6.3 Morfología

Para obtener la muestra a analizar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se concentraron las NC's en una ultracentrífuga preparativa a 30,000 RPM durante 3 horas a 10 °C, se removió el sobrenadante y posteriormente se resuspendió el botón de NC's obtenido en 5 mL de agua destilada. La muestra se colocó en un portamuestras y se dejó secar a temperatura ambiente. La preparación se cubrió con una capa de oro (~20 nm) y se analizó mediante SEM utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6010LA.

6.4 Potencial ζ

Las muestras se analizaron siguiendo el método de dispersión basado en la electroforesis de Láser Doppler. Esta técnica se utiliza para medir el movimiento de partículas con carga en un campo eléctrico que hace uso del efecto Doppler. La luz incidida en la muestra se dispersa a partir de una partícula en movimiento y experimenta un cambio de frecuencia (Kaszuba M, Corbett J, Mcneil Watson F, Jones A. 2010).

Las diluciones se llevaron a cabo usando agua bidestilada. Se efectuaron 3 mediciones con 15 corridas a una temperatura de 25 °C en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern.

6.5 Densidad

Esta prueba se llevó a cabo mediante el método de centrifugación isopícnica de acuerdo a lo descrito en la literatura (Mendoza N, Noriega EK, Nava MG, Mendoza SE, Ganem A, Quintanar D. 2011) en un medio de Percoll al 45% v/v con NaCl 0.15 M. Este método

isopícnico se basa en que las partículas se separan sólo en función de su densidad. Una mezcla de la muestra junto con los marcadores de densidad se someten a centrifugación y las partículas se mueven hasta que su densidad sea equivalente a la del medio, punto conocido como la posición de equilibrio. (Word TS, Work E. 1978).

Se elaboró una curva de calibración utilizando una dispersión de Percoll con marcadores de densidad (*Density Marker Beads* Sigma, los valores de densidad se encuentran mencionados en el Anexo 1). Los marcadores y las muestras se sometieron a un ciclo de centrifugación a 15,000 RPM durante 3 horas a una temperatura de 4 °C.

6.6 Validación del método analítico de cuantificación

Las cuantificaciones se realizaron mediante espectrofotometría UV/Vis en un equipo Varian Cary 50. Se realizó la validación de la cuantificación de KTZ en HCl 0.1 N.

Para la validación se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- a) Especificidad: se efectuó un barrido con una longitud de onda desde 200 a 400 nm y se verificó que ningún componente de la formulación interfiriera con la cuantificación de la sustancia de interés, el fármaco.
- b) Precisión: se prepararon por sextuplicado tres disoluciones a la concentración del analito, el coeficiente de variación (CV) debe ser menor al 3%. Este parámetro indica la capacidad del método de obtener resultados repetibles.
- c) Linealidad: se cuantificaron por triplicado cinco niveles de concentración, para cada nivel de concentración el criterio de aceptación es un CV menor al 3% y la linealidad de los datos debe ser mayor a 0.999; esto es muestra de que se pueden interpolar los valores de concentración obtenidos a partir de una curva patrón.
- d) Exactitud: se realizó la medición por triplicado de tres diferentes concentraciones. El CV debe de ser menor al 3% para que el resultado sea aceptable.

- e) Precisión intermedia: dos analistas efectuaron la cuantificación de una misma concentración en dos días diferentes, los datos deben de mostrar un CV menor al 3% para que se considere que el método es reproducible.

6.7 Liberación del KTZ a partir de las NC's

6.7.1 Evaluación de la membrana de diálisis para pruebas de liberación

Para llevar a cabo la prueba de permeación del fármaco, se prepararon bolsas de diálisis de celulosa de 13 cm cada una (*dialysis tubing cellulose membranes*, Sigma-Aldrich) y se añadió a cada bolsa 25 mL de una solución estándar de KTZ de 1000 µg/mL en 350 mL de HCl 0.1 N, (USP 24/NF 19). Estas bolsas se sujetaron a los vástagos del aparato de disolución I (canastillas) y el equipo se ajustó a una velocidad 100 RPM y a una temperatura de 37 °C. El volumen de las muestras fue de 3 mL y se recolectaron a los siguientes tiempos: 15 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min, realizado la correspondiente reposición de medio. Se cuantificó el KTZ en el medio de disolución mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 270 nm.

6.7.2 Liberación de KTZ

En el caso de la liberación de las NC's, se conservaron las condiciones experimentales anteriormente descritas. Se tomaron 25 mL de la dispersión para cada bolsa de diálisis.

Una vez preparadas las bolsas, se sujetaron a los vástagos del disolutor y se colocaron en contacto con 350 mL del medio previamente planteado. La temperatura del experimento fue de 37°C, a 100 RPM. La cuantificación del KTZ liberado se llevó a cabo a los 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 minutos. De cada vaso colocado en el disolutor se tomó una muestra de 3mL por cada tiempo y se realizó la reposición del medio.

7. Resultados y discusión

7.1 Selección de la formulación

La metodología de obtención de nanopartículas *in situ*, mediante sistemas automicroemulsionables, depende de la selección adecuada de una ME con la talla de partícula deseada y que además, sea altamente estable. Esto se debe a que dicha ME da lugar al núcleo oleoso de las NC's al momento de su formación. Como se hizo mención en la metodología se utilizó como base el trabajo previamente desarrollado por Elnaggar y cols. (2006) para determinar las proporciones de prueba en lugar de construir un diagrama de fases ternario (Rao SVR, Shao J. 2008). Esto se realizó con la intención de optimizar el tiempo utilizado para la selección de la formulación apropiada.

Como fase oleosa, se consideró utilizar Maisine 35-1 y Labrafac ya que ambos son triglicéridos de cadena media que tienen la propiedad de formar microemulsiones, además de ser de uso farmacéutico. Se utilizó como tensoactivo el Kolliphor EL (aceite de ricino polioxil 32), el cual se usó previamente de forma exitosa en la formulación de nanopartículas poliméricas (Ye Z, Squillante E. 2013). Finalmente, se optó por seleccionar al etanol como contensoactivo debido a que es un alcohol de cadena corta, capaz de disolver algunos polímeros farmacéuticos y que tiene la capacidad de formar microemulsiones (Mouri A, Diat O, Lerner DA, El Ghzaoui A, Ajovalasit A, Dorandeu C, Maurel JC, Devoisselle JM, Legrand P. 2014), lo cual es fundamental para la formación *in situ* de las NC's.

7.1.1 Evaluación de estabilidad y talla de partícula

Inicialmente, se procedió a evaluar la talla de partícula y la estabilidad de las formulaciones de prueba con la intención de descartar aquellas que no cumplieran con los parámetros deseados.

Para cada formulación de prueba, se determinó la talla de partícula y la estabilidad acelerada de acuerdo a la metodología propuesta, los resultados para cada tipo de formulación se exponen en la tabla 5:

| Muestra | Talla (nm) | Estabilidad acelerada |
|---------|-------------------|-----------------------|
| A1 | 127.0 ± 52.9 | Estable |
| A2 | 112.0 ± 13.3 | Estable |
| A3 | 422.1 ± 34.2 | Estable |
| B1 | 75.7 ± 2.9 | Estable |
| B2 | Aglomerado oleoso | No estable |
| B3 | Aglomerado oleoso | No estable |
| C1 | 51.3 ± 6.9 | Estable |
| C2 | 83.3 ± 23.2 | Estable |
| C3 | 221.8 ± 2.2 | Estable |
| D1 | 261.7 ± 6.4 | Estable |
| D2 | 152.0 ± 53.0 | Estable |
| D3 | 134.7 ± 65.7 | Estable |

Tabla 5. Evaluación de la talla de partícula y estabilidad acelerada para los lotes de prueba

Como se puede observar en la figura 8, sólo las formulaciones B2 y B3 resultaron ser inestable pues después de la centrifugación formaron un aglomerado oleoso que no se pudo reconstituir (figura 8), por lo que se descartó medir la talla de partícula de las mismas.

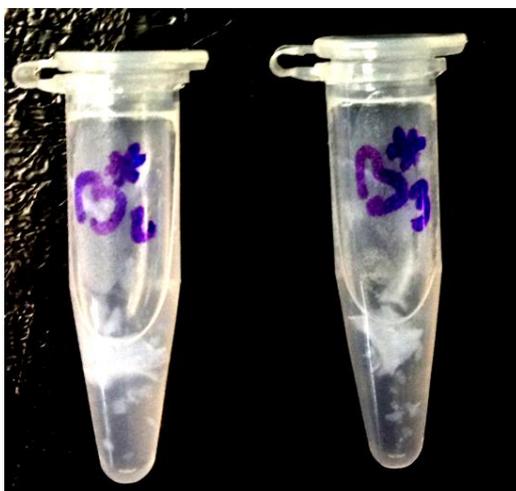


Figura 8. Fotografía de las muestras de las formulaciones B2 y B3 posterior al proceso de centrifugación.

7.1.2 Robustez de la formulación

En base a la talla de partícula se seleccionaron las muestras para la siguiente etapa del proceso. Las formulaciones de prueba fueron A2 (talla: 112.0 ± 13.3 nm), B1 (talla: 75.7 ± 0.2 nm) y C3 (talla: 221.8 ± 2.2 nm) ya que las otras formulaciones mostraron una desviación estándar que no se aseguraba el tamaño de los glóbulos esperado de la ME. A2 y C3 no distan en sobremanera de la talla planteada inicialmente; B1 se consideró gracias a su gran estabilidad, pues no presentó ningún cambio visible en su apariencia tras el periodo de centrifugación.

Esta prueba indica la capacidad del sistema de soportar diluciones sin que presente variaciones importantes en la talla de partícula.

Los resultados para la talla de partícula se presentan en la figura 9:

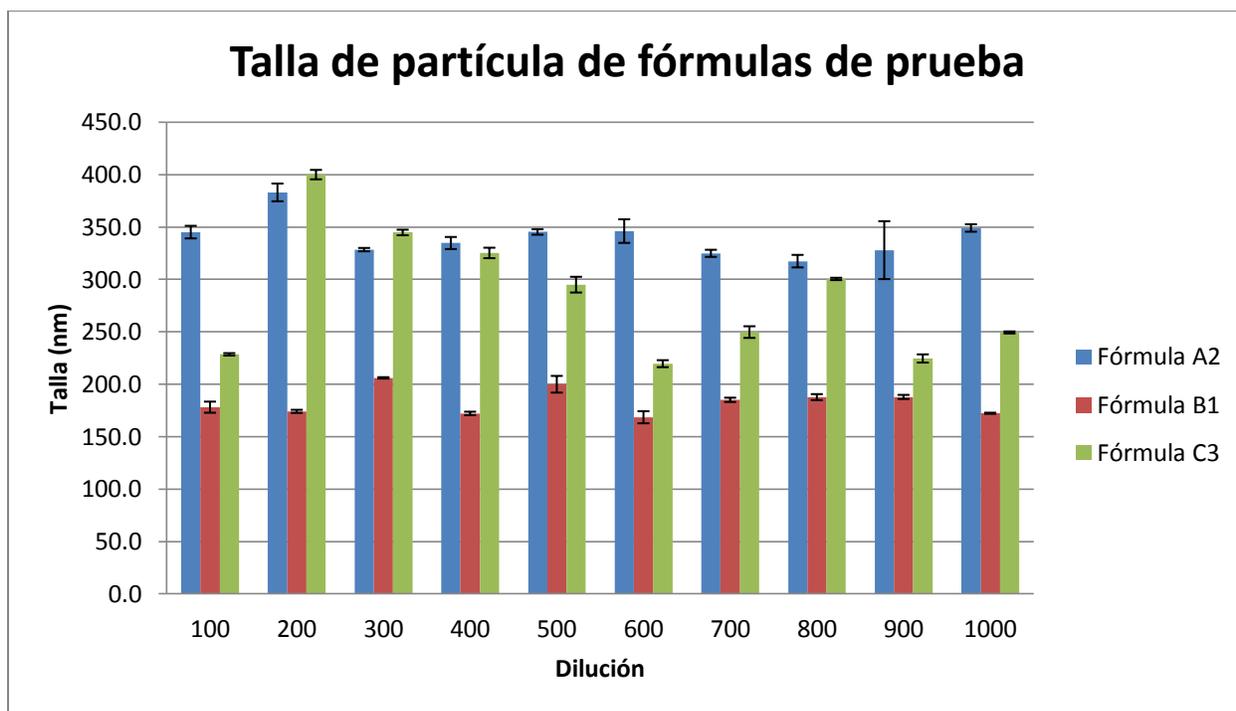


Figura 9. Robustez de la formulación: Talla de partícula de acuerdo a las diluciones efectuadas para los lotes de prueba A2, B1 y C3

De acuerdo con la figura 9, las formulaciones A2 y C3 tienen una gran variabilidad en cuanto a la talla dependiendo de la dilución. Esta diferencia entre las muestras depende en gran

medida en las proporciones de los componentes de la ME. De acuerdo con López-Quintela M. (2003) el radio de la gota depende de la flexibilidad de la película de surfactante en la interfase, lo que a su vez está dado por los componentes y sus respectivas proporciones. Por ejemplo las formulaciones A2 y C3 (con diferentes composiciones) presentan tallas de partícula por arriba de la especificación deseada. Por otro lado, la formulación B1 se mantuvo con un tamaño entre 150 a 200 nm durante todas las pruebas efectuadas, lo que indica que esta muestra es altamente estable frente a la dilución, lo que le brinda una mayor reproducibilidad en cuanto a la talla de las NP's independientemente del volumen de dispersión a utilizar. Es por ello que se descartaron las muestras A2 y C3 y la formulación B1 resultó seleccionada para realizar las pruebas de incorporación de polímero.

7.2 Adición de polímero y formación de NC's

7.2.1 Polímeros de prueba

Es indispensable que el polímero a utilizar sea soluble en etanol en una proporción de 0.2 g de polímero por cada 1 mL de fase oleosa; para que pueda ser incorporado en el concentrado de la ME; además de ser capaz de formar la estructura rígida de las NC's al contacto con el agua sin que aquélla se degrade. Debido a la intención final del proyecto de utilizar las NC's en una formulación tópica, se consideró el uso de polímeros bioadhesivos. La problemática de su uso radica en que no son polímeros que se solubilicen fácilmente en etanol debido a su estructura, en la que abundan las cadenas largas y altamente ramificadas (Roy SK, Prabhakar B. 2010).

| Polímero | Incorporación al concentrado | Formación de grumos insolubles | Observaciones |
|---------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Carbopol 931 | Parcial | Sí | Polímero bioadhesivo |
| Carbopol 974 | Parcial | Sí | Polímero bioadhesivo |
| Eudragit | Parcial | Sí | Altamente soluble en etanol |
| Policarbofilo | Parcial | Sí | Polímero bioadhesivo |
| Ethocel | Completa | No | Altamente soluble en etanol |

Tabla 6. Resultados de las pruebas de incorporación de polímero

Se realizaron las primeras pruebas con polímeros bioadhesivos, pero en los tres casos se observó que no se incorporaban adecuadamente a la formulación ya que se formaron grumos insolubles, como se indica en la tabla 6. Posteriormente, se procedió a realizar pruebas con polímeros no bioadhesivos pero con una alta solubilidad en etanol, el único polímero que se logró incorporar en su totalidad fue el Ethocel, por lo que este polímero y aquellos que mostraron una incorporación parcial en la formulación fueron seleccionados para realizar pruebas de incorporación.

7.2.2 Incorporación del polímero y robustez de la formulación

Para realizar las pruebas de incorporación de polímero se utilizó la formulación B1 empleando la metodología previamente descrita en el punto 6.2.2. Lo que se espera determinar en esta prueba es la formación de una capa rígida de polímero en la interfase entre la fase oleosa y la fase acuosa, con esta capa de polímero las NC's obtienen una forma definida y claramente delimitada, por lo que no debería de alterarse su tamaño aún sometidas a un proceso de dilución (Fery A, Weinkamer R. 2007).

A cada polímero se le asignó una clave arbitraria para facilitar la presentación de la información y el manejo de datos: Carbopol 934 (PC1), Carbopol 971 (PC2), Eudragit (PE), Policarbofilo (PCA) y Ethocel (PET) y los resultados de la talla de partícula se muestran a continuación en la tabla 7:

| Muestra | Talla (nm) | Muestra | Talla (nm) |
|-----------|-------------|-----------|-------------|
| B1-PC1 | 184.5 ± 3.1 | B1-PE/50 | 170.9 ± 0.7 |
| B1-PC1/50 | 203.6 ± 1.7 | B1-PCA | 125.1 ± 1.5 |
| B1-PC2 | 180.0 ± 2.4 | B1-PCA/50 | 150.2 ± 0.6 |
| B1-PC2/50 | 196.3 ± 2.4 | B1-PET | 142.5 ± 0.8 |
| B1-PE | 158.0 ± 1.9 | B1-PET/50 | 149.4 ± 2.0 |

Tabla 7. Talla de partícula de las NC's obtenidas a partir de los polímeros de prueba.

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 7, en la mayoría de los casos, se puede apreciar un aumento de la talla de partícula entre las dispersiones iniciales y las diluciones efectuadas. Esto se puede deber a que las partículas encapsuladas no están del todo formadas y tienden a ensancharse con la dilución siguiendo la misma propensión a aumentar su tamaño observada en la prueba de robustez de la ME. Por otro lado, el concentrado al que se le añadió el Ethocel (B1-PET) tuvo una muy ligera variación de talla entre la muestra inicial y la dispersión, lo que indica que existe una alta probabilidad de que las NC's se formaran bajo las condiciones de esta formulación.

El mecanismo de formación de las NC's mediante este método no ha sido del todo elucidado, pero se especula que puede ser ligeramente similar al mecanismo de formación de NP's mediante el método de nanoprecipitación, también conocido como método de desplazamiento de disolvente. En esta técnica, se utilizan dos disolventes que sean miscibles entre sí, el polímero preferentemente debe ser soluble sólo en uno de ellos, se inyecta la solución del polímero al otro disolvente y las NP's se forman al momento en que un disolvente difunde en el otro, provocando la precipitación del polímero (Bilati U, Allémann E, Doelker E. 2005).

En la situación particular de la formación de NC's *in situ*, es posible que se dé una nanoprecipitación pero en la interfase de los glóbulos de la ME. Los cotensoactivos tienen la propiedad de mejorar la capacidad de los tensoactivos de disminuir la tensión interfacial, lo

que provee a los sistemas de una gran estabilidad y la capacidad de obtener gotas de tamaño nanométrico (Date AA, Nagarsenker MS. 2008). De acuerdo con las características de la región interfacial de las gotas de la ME, el polímero que se encuentra disuelto en el cotensoactivo, se deposita en la interfase y dado que no es soluble en agua, éste precipita formando una película rígida alrededor del núcleo oleoso.

7.3 Morfología

Se analizaron las NC's obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, como se puede observar en las figuras 10 y 11:

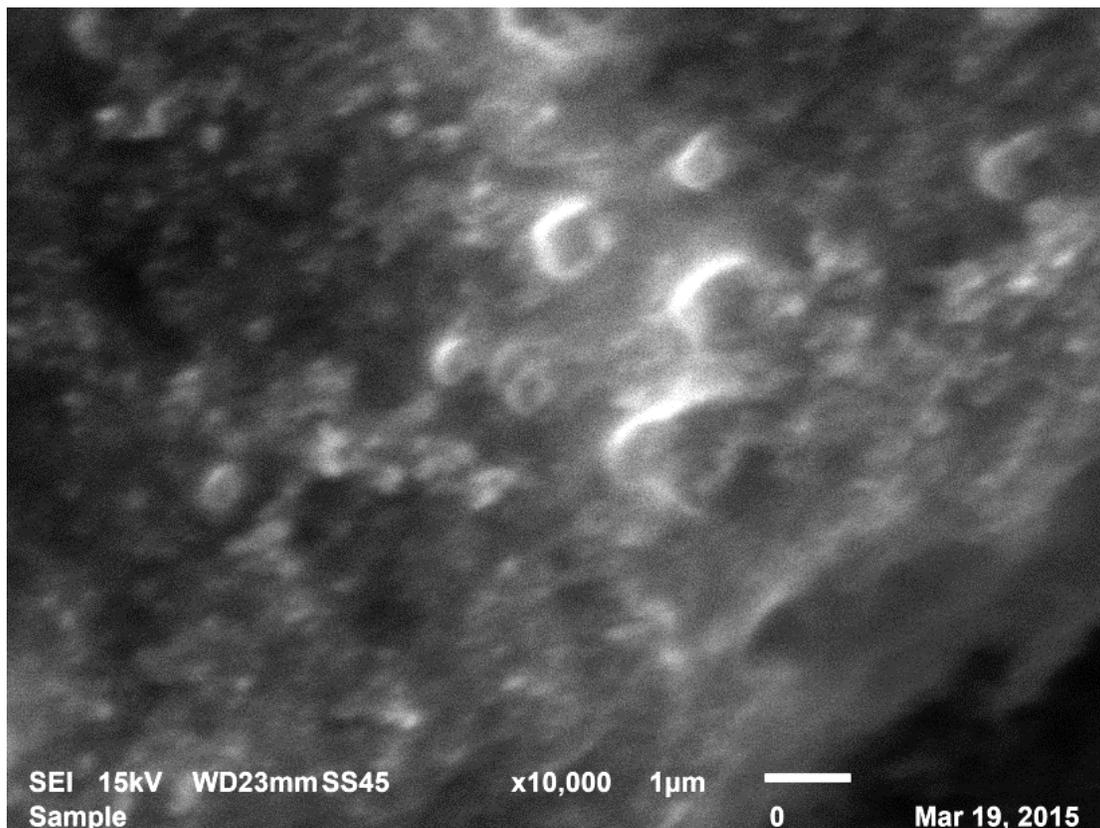


Figura 10. Imagen de NC's a un aumento de x10,000.

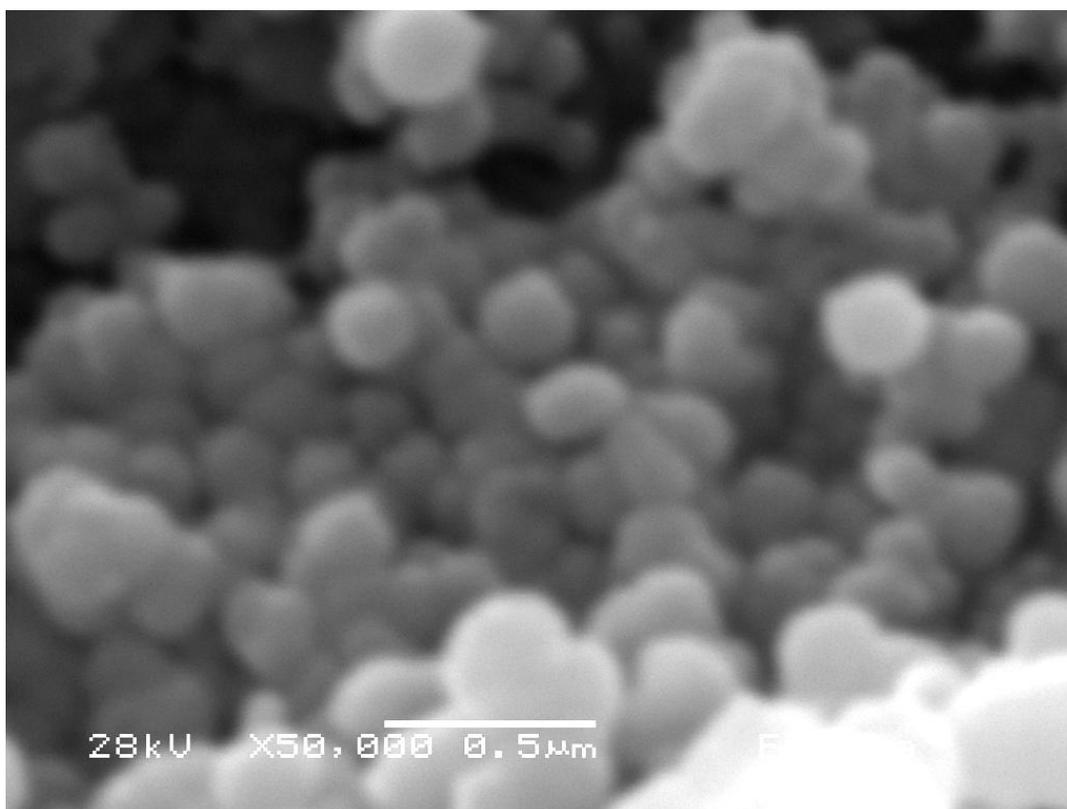


Figura 11. Imagen de NC's a un aumento de x50,000

Como se puede determinar en las micrografías obtenidas, las NC's se agregan formando una película a partir de la que se pueden distinguir partículas incrustadas con forma esférica, contornos irregulares y bordes definidos presumiblemente NC's. En general, éstas poseen un tamaño uniforme a lo largo del campo cuya dimensión es coincidente con la talla de partícula determinada por la técnica de dispersión dinámica de luz.

Estos resultados son de particular importancia ya que indican que es posible obtener NP's a partir de la formulación y la metodología propuestas. Aunque no proporcionan información acerca de la estructura interna de las NP's obtenidas por lo que se realizaron ensayos indirectos para determinar su estructura interna.

7.4 Potencial ζ

La figura 12 incluye los resultados obtenidos para cada corrida de cada muestra analizada en relación al potencial ζ .

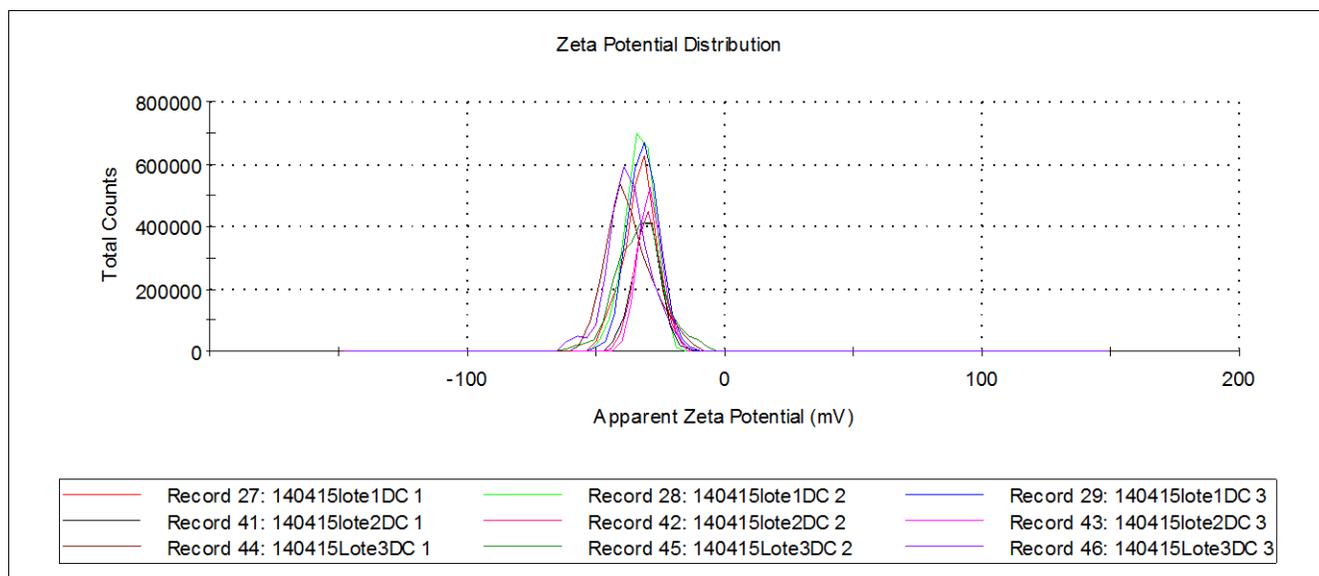


Figura 12. Distribución del potencial ζ para cada una de las muestras analizadas

Los valores numéricos para el potencial ζ de cada una de las muestras se presentan en la tabla 8:

| | Lote 1 (mV) | Lote 2 (mV) | Lote 3 (mV) |
|----------|----------------|----------------|----------------|
| | -33.1 | -36.9 | -30.5 |
| | -33.1 | -32.9 | -29.7 |
| | -31.5 | -37.3 | -28.8 |
| Promedio | -32.6 | -35.7 | -29.7 |
| DE | 0.9 | 2.4 | 0.9 |
| CV | 1.0 | 1.1 | 1.0 |

Tabla 8. Valores numéricos del potencial ζ para cada una de las muestras analizadas

A primera vista, las gráficas del potencial ζ se superponen unas a otras lo que podría indicar que no hay diferencia entre las muestras, para confirmar o desmentir esta afirmación, se realizó el análisis estadístico de los datos. Se elaboró un ANOVA (tabla 9) para determinar si existe una diferencia significativa en los valores obtenidos para cada lote:

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>P</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 54.62888889 | 2 | 27.31444444 | 10.9306 3584 | 0.00998 737 | 5.14325285 |
| Dentro de los grupos | 14.99333333 | 6 | 2.49888889 | | | |
| Total | 69.62222222 | 8 | | | | |

Tabla 9. ANOVA para los tres lotes de NC's evaluados

Ya que el valor crítico para F es menor al valor calculado para los datos, esto indica que existe una diferencia significativa entre alguno de los tres lotes referente a los otros. Para determinar el origen de la variación, se realizó una T-Student de dos colas y un $\alpha=0.05$.

| Comparación | Valor de T |
|--------------|------------|
| Lote 1/Lote2 | 0.10539066 |
| Lote 1/Lote3 | 0.01612654 |
| Lote2/Lote3 | 0.01541988 |

Tabla 10. Resultados de la prueba de T-Student para las comparaciones de los pares de lotes

De acuerdo con los datos de la T-Student en la tabla 10, existe una diferencia significativa entre el valor del Lote 3 en comparación con los otros dos lotes, esta variación entre los datos se explica a continuación.

En general, se considera que un valor absoluto superior a 30 mV indica una buena estabilidad en las NP's (Weiss-Angeli V, Poletto FS; ZAncan L, Baldasso R, Pohlmann AR, Guterres SS. 2008), esto significa que las partículas coloidales no van a tender a formar agregados debido a la repulsión provocada entre ellas gracias a la carga eléctrica en su superficie, fenómeno mencionado por Weiss-Angeli V y cols (2008). De acuerdo con los datos, el lote 3 es el que presenta una diferencia significativa con un potencial ζ menor que en los otros dos casos. Esto puede ser un indicativo de que las partículas dispersas

necesitan de un cierto lapso de tiempo para alcanzar una mayor estabilidad en el medio de dispersión, las posibles razones detrás de dicha afirmación se describen a continuación.

A nivel nanométrico, el movimiento Browniano juega un papel importante dentro de la colisión aleatoria de las partículas. Esta propiedad particular de los coloides depende principalmente de dos factores: aumenta a mayor velocidad de las partículas y menor tamaño de las mismas (Fanum M. 2010); resulta de particular utilidad para entender la razón detrás de los cambios de estabilidad de las NC's obtenidas a través del tiempo.

La floculación depende en gran medida de la frecuencia de colisiones causada por el movimiento interactivo de las partículas gracias al movimiento Browniano, gradiente de velocidad y turbulencia. La floculación causada por el movimiento Browniano se denomina pericinética (Droppo IG, Leppard GG, Liss SN, Milligan TG. 2005).

La agregación se produce mediante la colisión entre partículas desestabilizadas, en las cuales partículas más pequeñas aumentan su tamaño (Hubbard AT. 2002). Para lograr la inestabilidad de las partículas en un medio estable, se considera útil añadir electrolitos para eliminar la barrera repulsiva formada por el potencial ζ (Ives KJ. 1978). Si las partículas en un principio son inestables, se puede inferir que van a tender a colisionar aún con el efecto repulsivo del potencial ζ . Al aumentar la superficie de las partículas mediante la colisión y agregación de las mismas, aumenta el potencial ζ lo que a su vez va a tender a estabilizar el sistema y evitar una agregación posterior.

La explicación anterior pretende manifestar la razón detrás de las variaciones de potencial ζ , sin embargo, no se profundiza en las razones detrás del valor inicial de esta variable que presenta la muestra, aún la preparada el mismo día de la evaluación. En la siguiente sección se describen los posibles motivos detrás de este fenómeno.

Aún no se ha elucidado la razón exacta del porqué ciertos polímeros, a pesar de no tener grupos ionizables, pueden generar partículas con potencial ζ (Kirby BJ, Hasselbrink EF. 2004). En los resultados presentados por aquellos investigadores, una gran parte de los polímeros estudiados han demostrado tener un potencial ζ en un rango de 20 a 30 mV (valor absoluto) entre pH de 6 a 10. Lo anterior concuerda con lo encontrado en el caso de las NP's de interés para este trabajo en particular.

Las partículas coloidales en suspensión acuosa tienden a adquirir una carga eléctrica en la superficie la cual se puede deber a la ionización de grupos funcionales en la superficie de la partícula o bien mediante la adsorción de electrolitos iónicos en la interfase (Somasundaran P. 2006). El polímero en cuestión, Ethocel, no tiene grupos funcionales que se puedan ionizar con facilidad (Murtaza G. 2012), por lo que la otra opción que se presenta es mediante adsorción de cargas en la superficie.

Las macromoléculas de Ethocel poseen grupos hidroxilo en su estructura, los cuales no son ionizables pero es posible que formen puentes de hidrógeno con los iones formados mediante el equilibrio de disociación del agua. Marinova, K y cols. (1996) contemplan la posibilidad de adsorción espontánea de iones a la interfase agua-aceite de una ME con surfactantes no-iónicos, aunque no exista algún motivo aparente para dicho fenómeno. Ellos concluyen que se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de la fase oleosa y los iones del agua forzosamente presentes por el equilibrio de disociación del medio.

La cuestión a determinar es el tipo de carga que las NC's adsorben. EL potencial ζ negativo indica que se adsorbieron iones positivos en la superficie de la partícula, cargándola de forma positiva, por lo que la doble capa difusa, formada alrededor de las partículas, se

encuentra compuesta por los contra-iones negativos (Gregory J. 2006). Se sabe que la capa difusa específica para estas partículas se compone por este tipo de iones de acuerdo al tipo de migración detectada dentro del equipo Malvern ZS-2, el cual utiliza electroforesis acoplada a un detector láser; y lo que provoca es mover a las partículas en el medio de dispersión mediante un campo eléctrico definido (Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. 2008) que atrae o repele las partículas coloidales dependiendo de la carga de éstas, que para esta situación en particular, son cargas negativas.

7.5 Densidad

La intención de esta prueba experimental es determinar si existen diferencias entre las densidades de la ME base y de las NC's formadas con la finalidad de establecer diferencias en la estructura de ambos sistemas.

Se siguió la metodología anteriormente planteada en la sección 6.5 Densidad y se consideraron los valores de densidades de los marcadores, los datos de distancia entre el fondo del tubo y la densidad para cada marcador se presentan en la tabla 11. La distancia que se consideró para todos los análisis de los datos es el valor medido entre el fondo del tubo de centrifugación hacia la banda coloreada del marcador y se graficó en relación a los valores de densidad provistos por el fabricante en la figura 13.

| Marcadores (g/mL) | Distancia (mm) | Marcadores (g/mL) | Distancia (mm) |
|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| 1.018 | 47 | 1.087 | 15.25 |
| 1.035 | 36.05 | 1.102 | 14.6 |
| 1.052 | 27.1 | 1.119 | 13.25 |
| 1.065 | 21.95 | 1.138 | 12.3 |
| 1.075 | 20.2 | | |

Tabla 11. Migración de los marcadores de densidad medida desde el menisco del tubo hasta cada una de las bandas de los marcadores de densidad.

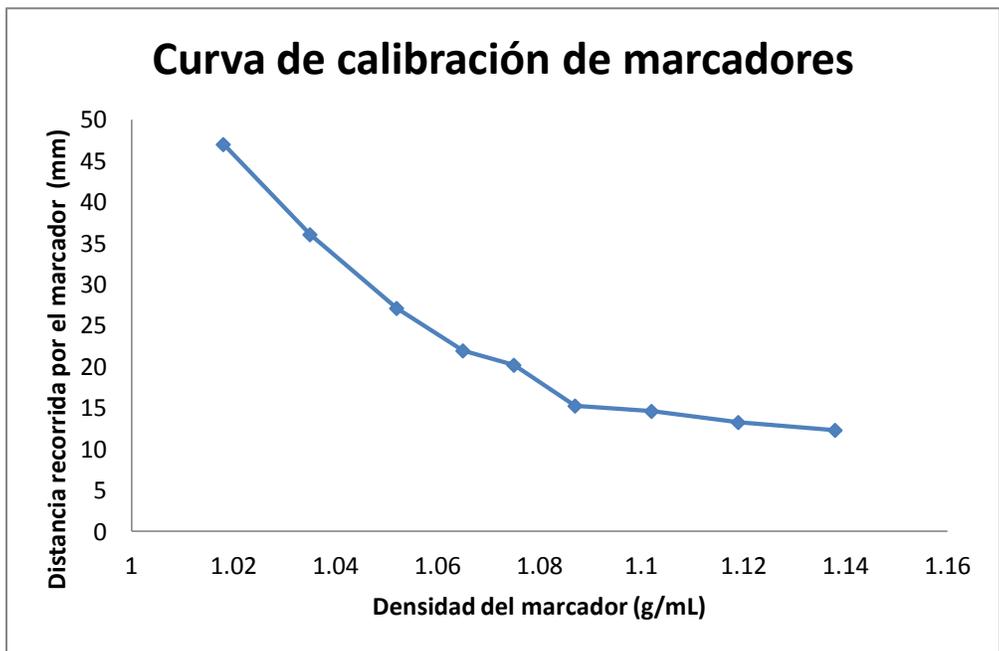


Figura 13. Curva de calibración para los marcadores de densidad en Percoll al 45% en NaCl 0.15 M.

En primera instancia es notorio en la figura 13 el hecho de que no existe una correlación lineal entre los valores de densidad y la distancia recorrida por los marcadores, por lo que es importante ajustar los datos matemáticamente para obtener una relación lineal que permita interpolar el valor de densidad de las NP de prueba. A fin de conseguir este objetivo se aplicó el tratamiento de dobles recíprocos a los valores de la curva de calibración (figura 14).

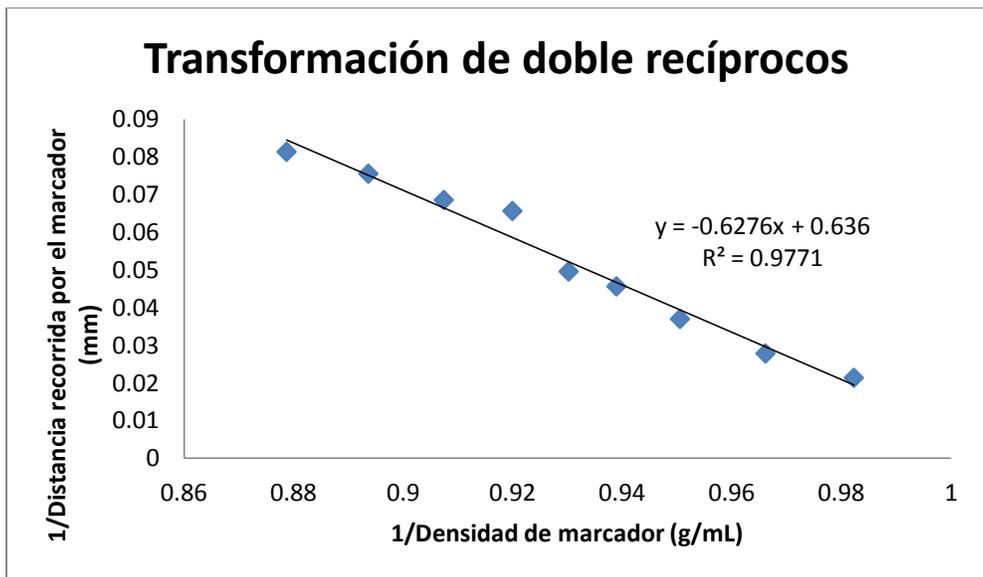


Figura 14. Transformación de dobles recíprocos de los valores de migración para los marcadores y la densidad.

El modelo matemático para determinar los valores de la muestra queda entonces de la siguiente manera:

$$\rho \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{(-0.676)(M)}{1-(M)(0.636)} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde M corresponde al valor de distancia para cada banda de la muestra y ρ es la densidad.

Para el análisis de muestras se decidió comparar a las NC's obtenidas con la ME que sirve como base para las mismas, ambas muestras cargadas con fármaco para que la única diferencia entre éstas fuera la presencia y omisión del polímero. Al finalizar el procedimiento experimental con ambas muestras fue interesante notar la existencia de varias bandas, lo que habla de una población heterogénea de partículas.

En el caso de la ME, hay dos bandas distintivas, una a mayor distancia del fondo del tubo y otra más próxima, lo cual contradice lo esperado al colocar sólo una muestra. Es altamente probable que la banda superior corresponda a los glóbulos de la ME ya que sus componentes, fase oleosa y tensoactivo principalmente, son menos densos que el fármaco (U.S. Pharmacopeia. 2007), el cual es el único otro componente que podría explicar la presencia de la otra banda.

Por otro lado, en el caso de la muestra de NC's, en el tubo de la muestra se distinguen claramente tres agrupaciones diferentes de partículas cuando sólo se esperaban las correspondientes a la ME y a las NC's. Dos de estas bandas se encuentran más retiradas del fondo del tubo, mientras que la última tuvo un avance mayor en el medio líquido.

En base al modelo seleccionado, el correspondiente a los dobles recíprocos y la ecuación 1, se procedió a la extrapolación de los valores de distancia obtenidos para la muestra de la ME y de las NC's, ambas muestras cargadas con fármaco, dando como resultado los siguientes valores en la tabla 12:

| Distancia NC's (mm) | Densidad (g/mL) | Distancia ME (mm) | Densidad (g/mL) |
|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| 54.15 | 1.016 | 59.9 | 1.013 |
| 41.1 | 1.026 | 20.3 | 1.070 |
| 20 | 1.071 | | |

Tabla 12. Valores de densidad de las bandas observadas en las muestras

Las bandas de ambas muestras se encuentran representadas en la figura 15, de acuerdo a los valores calculados mediante la ecuación 1:

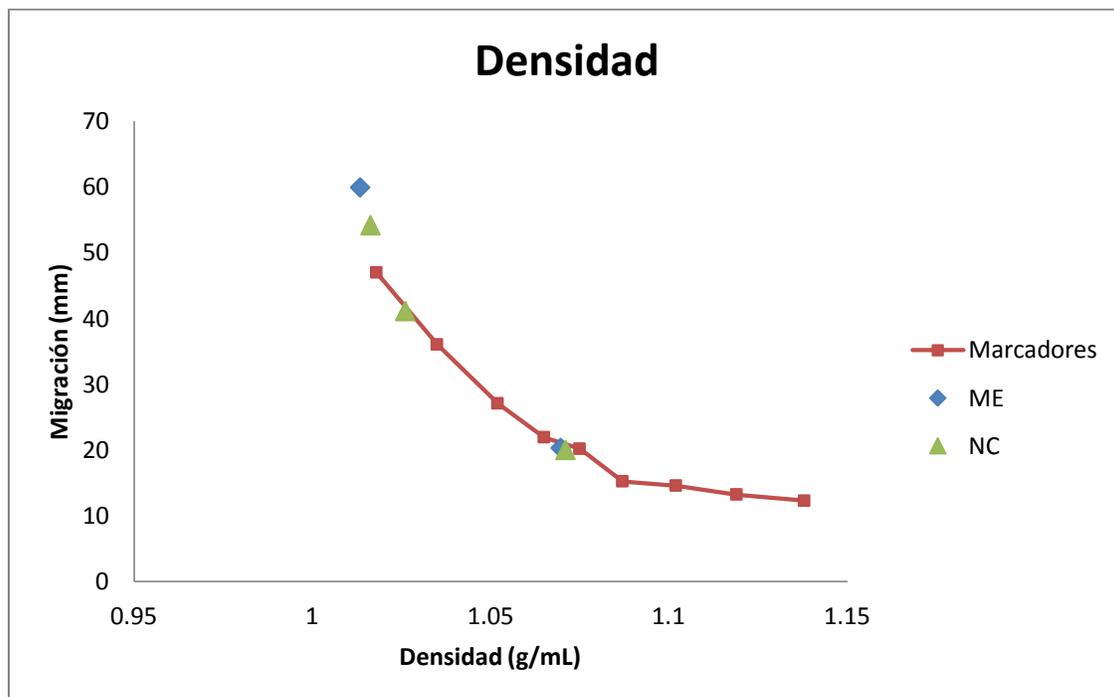


Figura 15. Densidad correspondiente a las bandas de los marcadores, la ME y las NC's.

Con apoyo de la representación gráfica, es reconocible el hecho de que aparentemente hay una banda que aparece en ambas muestras con una densidad muy similar. Esto lleva a la

especulación de que dicha banda corresponda a un componente presente en ambas muestras: el fármaco no encapsulado. La razón detrás de tal afirmación es que en ambos casos, al momento de realizar la dispersión del concentrado, hay cierta cantidad de fármaco que no es encapsulado o atrapado por la ME o las NC's. Esto a su vez origina agregados de fármaco, ya que es altamente insoluble en agua, lo cual puede explicar la presencia de la misma banda o por lo menos una altamente similar en ambas muestras.

Por otro lado, la otra población de partículas observada en la ME corresponde a los glóbulos de fase oleosa, por lo que, en el caso de las NC's, la banda más externa correspondería de igual manera con la ME sin capa polimérica de la dispersión de NC's. Efectivamente, la banda superior de la muestra de NC's exhibe una densidad similar a la de la muestra de la ME, mientras que la banda intermedia se encuentra claramente definida y separada del resto.

Es interesante notar que para esta última banda descrita, era fácil observar cierto gradiente de poblaciones de partículas con una tendencia central, mientras que para todas las otras bandas observadas, una sola población era evidente. Esto se puede explicar si se considera que no precisamente todas las NC's tienen el mismo tamaño, hay una dispersión asociada al proceso de fabricación que puede dar como resultado poblaciones con ligeras variaciones de talla, ejemplificado aquí con todas las bandas más delgadas agrupadas alrededor de una banda central y más gruesa, que corresponde a la talla de la mayoría de las NC's, como se puede apreciar en la figura 16.

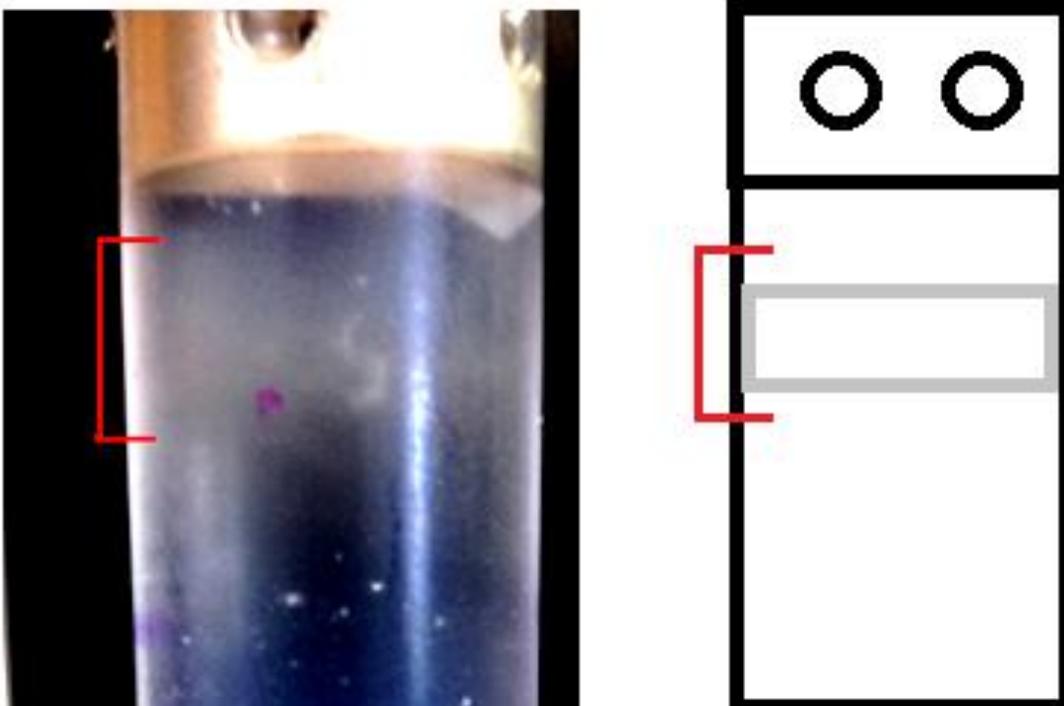


Figura 16. (a) Fotografía de las bandas presentes posterior a la centrifugación se nota una banda central rodeada de bandas más delgadas (b) Representación gráfica de la misma imagen.

La distancia recorrida por la banda identificada como NC's se encuentra todavía cercana a la banda de la ME, lo que se puede atribuir al hecho de que, aunque las NC's posean una membrana polimérica lo cual puede aumentar su densidad, siguen siendo partículas formadas por el núcleo oleoso, el cual es menos denso que el medio líquido.

7.6 Validación de métodos analíticos de cuantificación

El medio de disolución que se utiliza para el KTZ en las pruebas de liberación es HCl a una concentración 0.1 N de acuerdo a la monografía de la USP correspondiente a las tabletas de KTZ (U.S. Pharmacopeia, 2006). Aunque no es la misma forma farmacéutica, se decidió utilizar dicho medio de disolución ya que es un medio en el cual el principio activo es altamente soluble (Mitu MA, Radulescu FS, Hirjau M, Lupuleasa D, Dumitrescu I, Mirondalia S. 2011).

Especificidad y determinación de la lambda máxima de absorción:

La longitud de onda reportada para la cuantificación del KTZ en HCl por medio de espectrofotometría UV es de 270nm (Córdoba-Díaz D, Córdoba-Díaz M, Awad S, Córdoba-Borrego M. 2001) pero se realizó un barrido para corroborar este valor bajo las condiciones de trabajo. El pico de absorción así encontrado fue de 270 nm.

Linealidad del sistema:

Se construyó por triplicado una curva patrón de 5 puntos. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada punto, la pendiente de la curva y el coeficiente de correlación de los datos, como se observa en la tabla 13 y la figura 17.

| [KTZ] ($\mu\text{g/mL}$) | ABS | ABS | ABS | ABS X | DE | CV |
|----------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 200 | 0.514 | 0.514 | 0.514 | 0.5140 | 0.0001 | 0.0225 |
| 160 | 0.410 | 0.409 | 0.409 | 0.4099 | 0.0002 | 0.0423 |
| 120 | 0.308 | 0.308 | 0.308 | 0.3080 | 0.0001 | 0.0187 |
| 80 | 0.205 | 0.205 | 0.205 | 0.2051 | 0.0001 | 0.0488 |
| 40 | 0.101 | 0.102 | 0.102 | 0.1015 | 0.0003 | 0.2607 |

Tabla 13. Datos para la curva patrón de KTZ en HCl 0.1 N con la desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para cada punto.

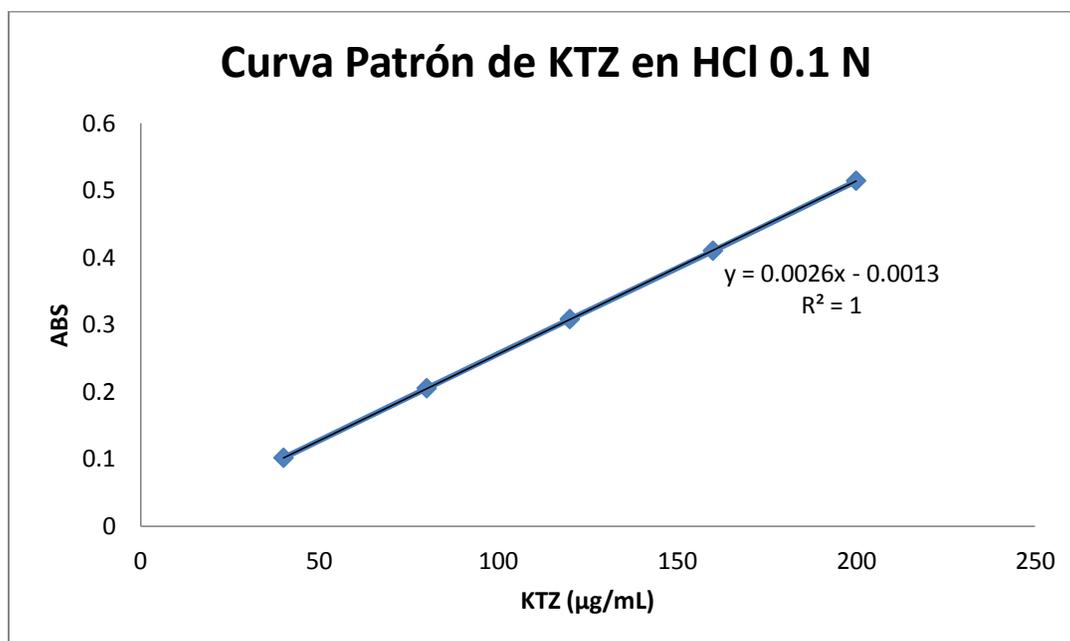


Figura 17. Representación gráfica de la curva patrón de KTZ en HCl 0.1 N.

La tabla 13 corresponde a las mediciones obtenidas para la absorbancia correspondiente con la curva patrón de KTZ, se utilizó este intervalo de concentraciones en base a un estimado general de lo que usualmente se llega a cuantificar en la prueba de liberación realizadas en el laboratorio. Los datos obtenidos se representan en la figura 17 con un coeficiente de correlación de 1, lo que es un claro indicio de la linealidad de los datos en el rango de concentraciones analizado. Por otro lado, para cada punto se calculó el CV con el propósito de verificar que no existiera una gran variación en los datos, lo que se comprueba con los resultados obtenidos, los cuales están por debajo del 3% que usualmente se considera como límite de aceptabilidad para los CV. Con los parámetros previamente mencionados, es válido afirmar que el método cumple con la prueba de linealidad.

Precisión:

Se prepararon 3 muestras por sextuplicado a la concentración del analito a partir de diluciones y el CV debe ser menor o igual al 3%. Se determinó el % de recobro, parámetro para el cual se tomó el mismo criterio de aceptación que para la validación en etanol al 96 % v/v (97% - 103%).

| Repetición | Muestra | Muestra 2 | Muestra 3 |
|---------------|---------|-----------|-----------|
| 1 | 102.2 | 101.4 | 102.0 |
| 2 | 102.1 | 101.4 | 101.9 |
| 3 | 102.2 | 101.4 | 102.0 |
| 4 | 102.2 | 101.4 | 102.0 |
| 5 | 102.2 | 101.4 | 102.0 |
| 6 | 102.3 | 101.4 | 102.1 |
| Conc. Analito | 100 | Promedio | 101.9 |
| % Recobro | 101.9 | DE | 0.4 |
| | | CV | 0.3 |

Tabla 14. Resultados para la determinación de precisión del método analítico en HCl 0.1 N

En esta sección de la validación del método, se puede verificar que el procedimiento es altamente preciso, ya que se obtuvo un valor de 0.3% para el CV de las muestras como se indica en la tabla 14, el cual cumple con la especificación planteada. Por otro lado, el porcentaje de recobro indica que se recupera una cantidad aceptable para el análisis con este método, ya que el dato obtenido se encuentra dentro del rango de valores para esta prueba.

Exactitud / Repetibilidad

Utilizando diluciones se prepararon por triplicado muestras equivalentes al 80%, 100% y 120% del analito. Se determinó el CV y el criterio de aceptación indica que los datos deben tener un coeficiente de variación menor o igual al 3% para ser aceptados.

| % del analito | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Promedio | DE | CV |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----|-----|
| 80% | 61.6 | 61.4 | 60.8 | 61.2 | 0.4 | 0.7 |
| 100% | 101.1 | 103.4 | 102.1 | 102.2 | 1.2 | 1.2 |
| 120% | 141.0 | 142.1 | 141.2 | 141.4 | 0.6 | 0.4 |

Tabla 15. Resultados para la determinación de exactitud del método analítico en HCl 0.1 N

De acuerdo con los criterios de aceptación de la prueba, el CV para cada una de las muestras no puede exceder el 3%, y como se puede apreciar en la tabla 15, efectivamente ninguno de los valores obtenidos sobrepasa dicha especificación, por lo que se considera que el método tiene una buena exactitud.

Precisión intermedia:

Dos analistas diferentes, en dos días diferentes prepararon una muestra por triplicado a la concentración del analito. El criterio de aceptación indica que los datos deben tener un coeficiente de variación menor o igual a 3% para aceptados.

| Muestra | Analista 1 | Analista 2 |
|---------|------------|------------|
| 1 | 100.8 | 103.2 |
| 2 | 100.8 | 103.2 |
| 3 | 100.7 | 103.3 |
| | Media | 102.0 |
| | DE | 1.4 |
| | CV | 1.3 |

Tabla 16. Resultados para la determinación de la precisión intermedia del método analítico en HCl 0.1 N

Finalmente, se realizó la evaluación de la precisión intermedia con los datos conseguidos por dos analistas diferentes bajo las mismas condiciones de análisis. El CV para esta prueba resultó ser de 1.3% (tabla 16), el cual se encuentra por debajo del criterio máximo de aceptación. En base a ello, es correcto afirmar que el método cumple no sólo con este parámetro sino que, conforme se ha analizado previamente, todas las etapas de la validación indican que el método es apropiado para su propósito, el cual es la cuantificación del KTZ en HCl 0.1 N.

7.7 Liberación de KTZ

7.7.1 Evaluación de la membrana

Se evaluó la liberación del fármaco a través de la membrana de diálisis hasta que se logró una liberación de aproximadamente 20 mg de principio activo, lo cual se alcanzó a 1h y 30 min. Las condiciones del experimento se siguieron de acuerdo a lo planteado en la metodología en 5 vasos del disolutor. En la figura 18 se presentan los valores obtenidos:

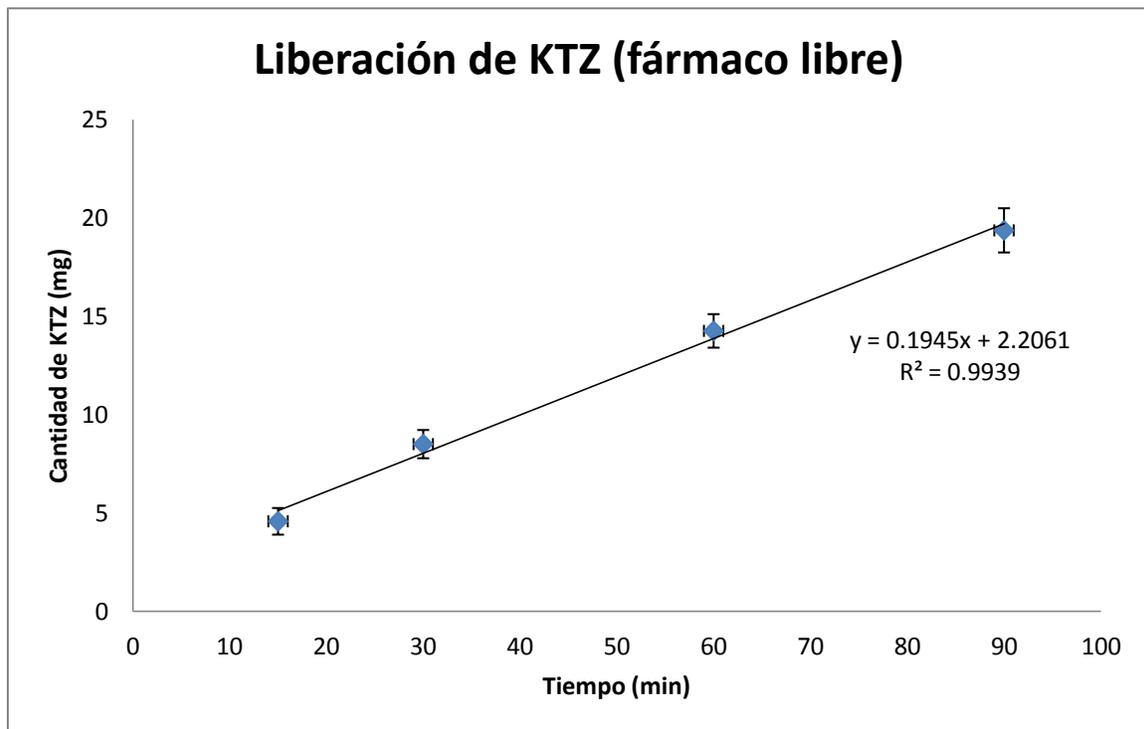


Figura 18. Representación gráfica de los valores obtenidos para la liberación del KTZ a través de la membrana de diálisis en relación al tiempo

De acuerdo con Zambito y cols. (2012), la aparición del principio activo en el medio de disolución, en referencia a NP's, depende de dos factores importantes:

- 1) La liberación del fármaco de la NP's al medio de dispersión (fase donadora de la diálisis).
- 2) Permeación del fármaco a través de la membrana de diálisis.

Es fundamental determinar la influencia que podría tener la membrana de diálisis sobre el proceso de liberación del fármaco, por lo cual inicialmente se evaluó la liberación del principio activo a través de la membrana si alguna interferencia de otros componentes. En la figura 18 se presentan los valores obtenidos para una liberación aproximada de 20 mg de KTZ, una cantidad ligeramente mayor a la que se agregó en las NC's. Se obtuvo la liberación de la cantidad deseada en 90 minutos, y como se puede observar en la gráfica, existe una tendencia lineal de los datos, lo que indica que aplica un modelo de difusión de orden cero.

En este modelo, se considera que la liberación del KTZ es independiente de la concentración (Gaonkar A, Vasisht N, Khare A, Sobel R. 2014), por lo que sólo depende de su capacidad de permeación a través de la membrana.

El modelo de orden cero se encuentra dado por la relación matemática indicada a continuación:

$$f_t = K_0 t \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde f_t es la cantidad de fármaco liberada, K_0 es constante de liberación de orden cero y t es el tiempo.

Es importante considerar que la liberación del fármaco a partir de la membrana de celulosa se ajusta al modelo de orden cero al momento de comparar este perfil con las liberaciones obtenidas a partir de las NC's cargadas de KTZ, ya que se espera que exista una liberación retardada del fármaco debido a que tiene que atravesar la membrana polimérica y después la membrana de diálisis. Se espera observar que el paso limitante del proceso es la difusión a través de las NP's al medio de disolución, ya que una de las razones detrás de este proyecto es la intención de lograr la liberación controlada del KTZ a partir de NP's para su uso en una forma farmacéutica tópica con la intención de mejorar su efecto terapéutico.

7.7.2 Liberación de KTZ

Para determinar el perfil de liberación del KTZ se siguió la metodología planteada en la sección correspondiente. Se prepararon 3 lotes diferentes y se evaluaron dando como resultado la figura 19:

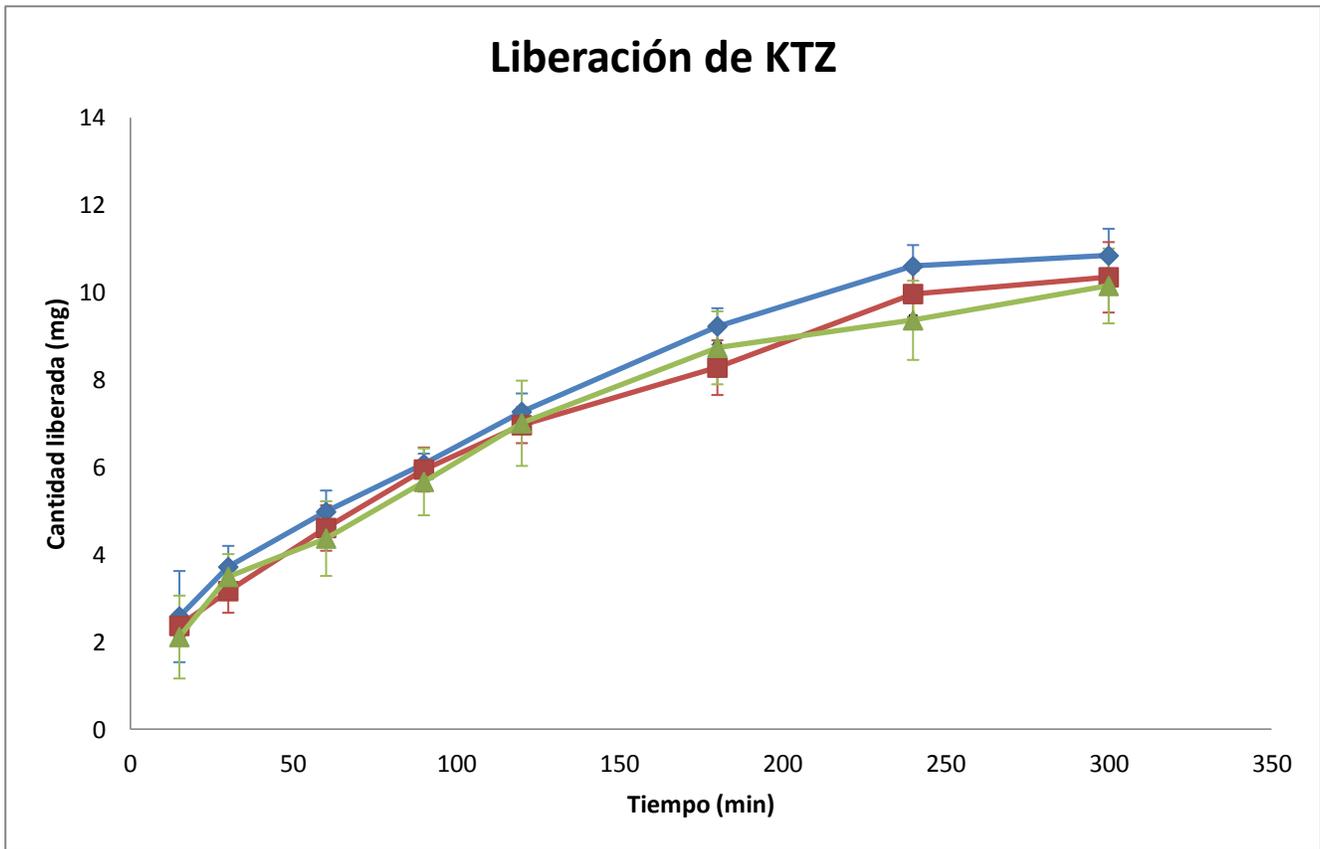


Figura 19. Perfiles de liberación para tres lotes diferentes evaluados en diferentes días

Los tres lotes aparentemente tienen un alto nivel de similitud entre sí, lo que puede resultar un fuerte indicativo de que, bajo las condiciones de fabricación, existe un alto nivel de reproducibilidad. Para confirmar esta suposición, se calculó el factor de similitud f_2 , el cual establece que mientras se el valor obtenido para este factor se acerque a 100, los perfiles de liberación serán más similares entre sí (Costa P, Sousa Lobo JM. 2001). La ecuación es la siguiente:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde n es el número de muestras, R_j y T_j son el porcentaje liberado del lote A y B a cada punto j .

Los valores de f_2 comparando los perfiles de liberación se muestran a continuación:

| Lote | f_2 |
|-------|-------|
| 1 y 2 | 69 |
| 1 y 3 | 69 |
| 2 y 3 | 70 |

Tabla 17. Valores de f_2 obtenidos para cada par de comparación entre lotes

De acuerdo con el criterio de aceptación, para valores de f_2 entre 50 y 100, se considera que los perfiles son similares. Los valores de f_2 mostrados en la tabla 17 indican que los tres lotes son equivalentes entre sí, ya que para cada comparación se obtuvo un valor superior a 50. Esto es un buen indicativo de la reproducibilidad del método tanto para la fabricación de las NC's como para su perfil de liberación.

Se efectuó el promedio de los tres lotes preparados y se aplicaron los siguientes modelos de cinética de liberación con la finalidad de determinar el mecanismo de liberación de las NC's: orden cero, primer orden, el modelo de Higuchi y el modelo de Korsmeyer-Peppas.

Los modelos que tuvieron una mejor correlación fueron los de Higuchi (figura 20) y Korsmeyer-Peppas (figura 21) con una R^2 de 0.9974 y 0.9963, respectivamente.

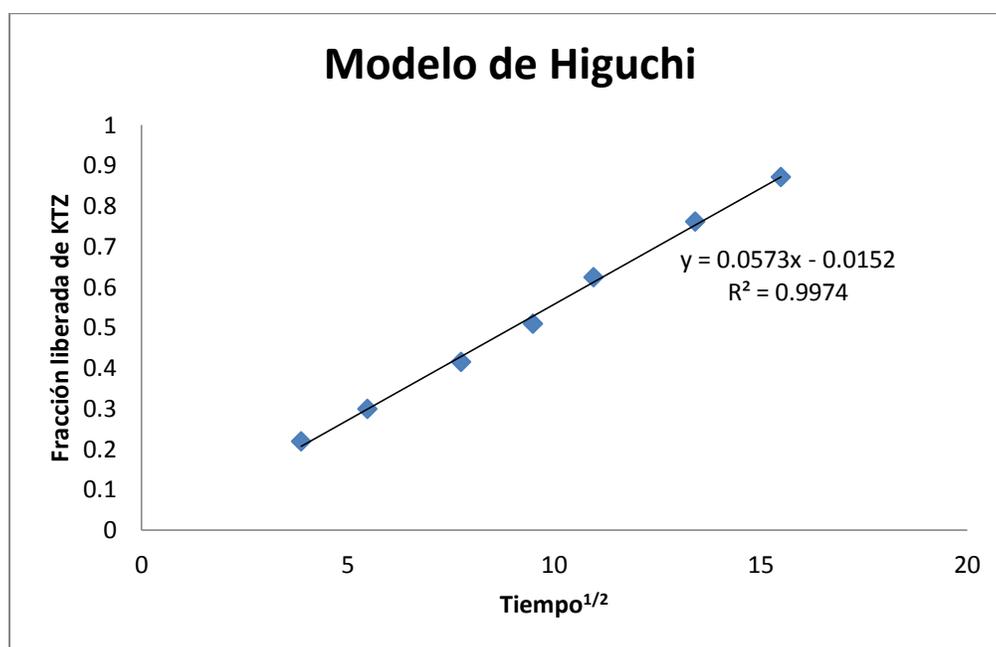


Figura 20. Modelo de Higuchi aplicado al promedio de los resultados de liberación obtenidos para los lotes de prueba

La forma simplificada del modelo de Higuchi es la siguiente:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde Q corresponde a la fracción de principio activo liberada, t al tiempo y K_H es la constante de disolución de Higuchi (Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. 2010), que engloba los parámetros correspondientes al principio activo: coeficiente de difusión, solubilidad en la fase oleosa, área de liberación, y concentración inicial (Gaonkar A, Vasisht N, Khare A, Sobel R. 2014). El modelo de Higuchi describe la liberación del fármaco como un proceso difusivo basado en las Leyes de Fick (Costa P, Sousa Lobo JM. 2001).

La difusión se define como el proceso de transferencia de masa de moléculas individuales de una sustancia mediante el movimiento aleatorio molecular y asociado al gradiente de concentración. El paso de materia a través de una barrera sólida se puede dar mediante permeación molecular o el movimiento a través de poros y canales en la membrana (Sinko PJ, Martin AN. 2006).

Las NC's poseen una membrana polimérica y en particular, las NC's estudiadas en el presente trabajo están formadas a partir de un polímero preformado; se considera que este tipo de membrana está compuesta por las cadenas del polímero sobrepuestas de tal manera que forman poros tortuosos por los cuales difunde el principio activo.

Al exponer a las NC's al medio de disolución, las moléculas del fármaco difunden hacia éste. Inicialmente esto sólo ocurre en la superficie de las NC's. Dado que la disolución del fármaco es un proceso rápido y que hay un exceso de principio activo, las moléculas que se separan del sistema son reemplazadas por otras partículas de fármaco contenidas dentro del núcleo oleoso. Debido a los gradientes de concentración, las moléculas liberadas al medio tenderán a difundir hacia el medio de disolución (Siepmann J, Peppas NA. 2011).

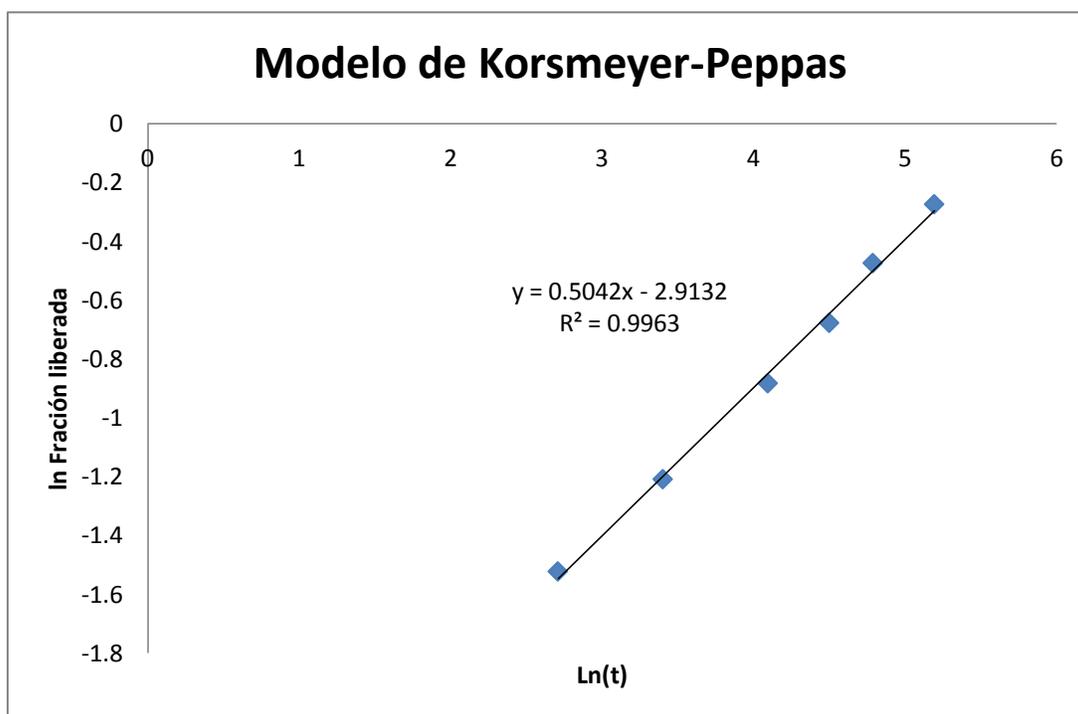


Figura 21. Modelo de Korsmeier-Peppas aplicado al promedio de los resultados de liberación obtenidos para los lotes de prueba

El modelo de Korsmeier-Peppas es complementario a los resultados obtenidos con el modelo de Higuchi. Este modelo semi-empírico se aplica cuando la difusión es el principal mecanismo de transporte y relaciona de forma exponencial la liberación del fármaco al tiempo transcurrido (Kalam MA, Humayum M, Parvez N, Yadav S, Garg A, Amin S, Sultana Y, Ali A. 2007). El modelo matemático es el siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde a es una constante que incorpora características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica, n es el exponente de liberación que indica el mecanismo de liberación, t es el tiempo y M_t/M_∞ corresponde a la fracción liberada del fármaco (Ritger PL, Peppas NA. 1987).

Se ha utilizado el valor de n para caracterizar varios mecanismos de liberación, de acuerdo a lo presentado en la tabla 18.

| Exponente de liberación (n) | Mecanismo de transporte del fármaco | En función del tiempo (t ⁿ) |
|-----------------------------|-------------------------------------|---|
| 0.5 | Difusión Fickiana | t ^{-0.5} |
| 0.5 < n < 1.0 | Transporte anómalo | t ⁿ⁻¹ |
| 1.0 | Transporte Caso II | Liberación de orden cero |
| >1.0 | Súper transporte caso II | t ⁿ⁻¹ |

Tabla 18. Mecanismos de liberación de acuerdo al resultado obtenido a partir del modelo de Korsmeyer-Peppas

Ya que el modelo es una función exponencial, éste se puede linealizar para facilitar su aplicación práctica:

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = n \ln t + \ln a \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde n corresponde a la pendiente de la gráfica. En la figura 20, el valor de la pendiente es de 0.5042, por lo que de acuerdo a lo establecido en la tabla 18, correspondería a un sistema con un mecanismo de transporte mediante difusión fickiana. Shu S y cols. (2010) elaboraron nanocápsulas de quitosán cargadas con proteína sérica bovina (BSA por sus siglas en ingles) y al estudiar la liberación de la proteína a partir de sus nanocápsulas, observaron que el mecanismo de liberación fue mediante difusión fickiana. Este resultado nos permite pensar que la estructura obtenida a través del proceso de fabricación desarrollado es de tipo capsular.

Lo anterior se correlaciona con los resultados obtenidos al aplicar los diversos modelos de liberación. Como ya se discutió previamente, el modelo con una mejor correlación es el de Higuchi, el cual a su vez establece un mecanismo de liberación difusivo. Esto se corrobora con lo obtenido en el modelo de Korsmeyer-Peppas, lo cual es concluyente para determinar el mecanismo difusivo de liberación del KTZ a partir de las NC's fabricadas.

Otra característica importante que se buscaba obtener con las NC's era verificar si se lograba una liberación controlada del KTZ. Esto se puede observar al efectuar una comparación entre

la prueba de liberación del KTZ a través de la membrana de celulosa y la los perfiles de liberación de las NC's.

La liberación del fármaco a través de la membrana es un mecanismo de orden cero, independiente de la concentración, y para el KTZ en particular se tiene la siguiente ecuación:

$$f_t = 0.1945t + 2.2061 \quad \text{Ecuación 7}$$

Despejando t se obtiene:

$$\frac{f_t - 2.2061}{0.1945} = t \quad \text{Ecuación 8}$$

La cantidad de fármaco liberada al t_∞ para los tres perfiles de liberación de NC's fue de 12.3 mg de KTZ a las 24 horas (ecuación 6). Si se determina el tiempo que tomó esa misma cantidad de fármaco libre en atravesar la membrana de diálisis se obtiene un tiempo calculado de 52 minutos (ecuación 8).

8. Conclusiones

De todas las formulaciones propuestas, la formulación seleccionada (B1) está constituida por 40% de Maisine 35-1 como fase oleosa, 40% de Kolliphor EL como tensoactivo, 20% etanol al 96% v/v como cotensoactivo, Ethocel como polímero y finalmente ketoconazol como fármaco de prueba, ya que esta propuesta fue la que se ajustó a los parámetros de talla de partícula (menor a 250 nm) y estabilidad (resistencia a la dilución) requeridos.

La talla de partícula promedio para las NC's fue de 174.8 ± 4.4 nm con una densidad de 1.026 g/mL y un potencial ζ superior a los -30 mV, con un valor de -32.6 ± 2.9 mV. Se obtuvieron partículas definidas con una morfología esférica y superficie irregular.

Se validó un método adecuado de cuantificación de KTZ. Posteriormente, se evaluó la membrana de diálisis y se realizaron las pruebas correspondientes de liberación mediante las cuales se estableció que las NC's obtenidas presentan un mecanismo de liberación de tipo difusivo Fickiano bajo los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas ($n=0.5042$), con una liberación calculada de 12.3 mg de KTZ a 24 horas mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas.

Los resultados para todas las pruebas de liberación sugieren la repetibilidad del método de fabricación de NC's, con valores de f_2 mayor a 50.

Los resultados anteriores sugieren que es posible obtener nanocápsulas mediante el método de fabricación *in situ* basado en sistemas automicroemulsionables.

9. Perspectivas

Todavía queda un largo camino por recorrer con respecto a la aplicación de las nanopartículas como una forma farmacéutica alternativa, pero con este nuevo método desarrollado se espera poder visualizar a futuro la forma de escalar a nivel industrial la producción de las NC's.

Como se discutió a lo largo del trabajo, el desarrollo de esta metodología permite reducir los costos de manufactura de las nanopartículas en comparación con los métodos convencionales, ya que se elimina el uso de disolventes orgánicos, no es necesario un proceso de separación como centrifugación, ni tampoco de purificación, por ejemplo liofilización.

Por otro lado, no es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías de manufactura para el método propuesto, ya que es posible emplear tanques enchaquetados de mezclado o equipos comercialmente disponibles para fabricar emulsiones, por lo que la inversión inicial para escalar el método se reduce.

Se plantea continuar con el proyecto mediante el estudio de la permeación de las NC's a través de la piel (estudios *in vitro*), seleccionar un modelo adecuado para llevar a cabo estudios *in vivo* y el posterior desarrollo de una forma farmacéutica como un gel o una crema para la presentación final de un producto comercializable, todo ello con la intención de impulsar el estudio y desarrollo de nuevas tecnologías farmacéuticas para mejorar los tratamientos terapéuticos existentes.

10. Referencias

- Aher SB. Microemulsions. Sapkal College of Pharmacy India. 2014
- Archer WL. Hansen Solubility Parameters for selected cellulose ether derivatives and their use in the pharmaceutical industry. Dow Chemical USA. 1992
- Baroli B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? *J. Pharm. Sci.* 99(1) (2010) 21-50
- Bei D, Meng J, Youan BC. Engineering Nanomedicines for Improved Melanoma Therapy: Progress and Promises. *Nanomedicine* 5(9) (2010) 1385-1399
- Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 67-75
- Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123-133
- Córdoba-Díaz D, Córdoba-Díaz M, Awad S, Córdoba-Borrego M. Effect of pharmacotechnical design on the in vitro interaction of ketoconazole tablets with non-systemic antacids. *Int. J. Pharm.* 226 (2001) 61-68
- Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* 67(3) (2010) 217-223
- Date AA, Nagarsenker MS. Parenteral microemulsions: An overview. *Int. J. Pharm.* 355 (2008) 19-30
- Dow Corning. Dow Cellulosics: Ethocel Ethylcellulose Polymers Technical Handbook. USA: Dow Chemical Company. 2005. Print
- Droppo IG, Leppard GG, Liss SN, Milligan TG. (Eds). Flocculation in natural and engineered environmental systems. USA: CRC Press. 2005. Print

- Elias PM (Ed.), Feingold, KR (Ed.). Skin Barrier. USA: CRC Press. 2006. Print
- Elnaggar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and Optimization. *Int. J. Pharm.* 380 (2009) 133-141
- El-Samaligy MS, Rohdewald P, Mahmoud HA. Polyalkyl cyanoacrylate nanocapsules. *J. Pharm. Pharm.* 38(3) (1986) 216-218
- Elston D, Tyring S, High W, Feringer T. Clinical Management of Uncomplicated Skin and Skin-Structure Infections. USA: Professional Communications, Inc. 2007. Print
- Fanun, M. Colloids In Drug Delivery. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2010. Print
- Fery A, Weinkamer R. Mechanical properties of micro- and nanocapsules: Single-capsule measurements. *Polymer* 48 (2007) 7221-7235
- Filippov SK, Panek J, Stepanek P. Polymeric Nanoparticles Stabilized by Surfactants: Controlled Phase Separation Approach, Smart Nanoparticles Technology. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. Print
- Gaonkar A, Vasisht N, Khare A, Sobel R. (Eds.). Microencapsulation in the Food Industry: A practical implementation guide. USA: Academic Press. 2014. Print
- Gómez Ayala AE. Primeros Auxilios: Quemaduras, heridas y contusiones. *Farmacia Profesional* 23(5) (2009) 42-45
- Gregorí Valdés BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev. Cubana Farm.* 39(2) (2005)
- Gregory J. Particles in Water: Properties and Processes. USA: CRC Press. 2006. Print
- Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights* 2 (2007) 147-157

- Hubbard AT. (Ed.). Encyclopedia of Surface and Colloid Science. Volume 1. USA: Marcel Dekker. 2002. Print
- Ives KJ. The Scientific Basis of Flocculation. The Netherlands: Sijthoff & Noordhoff. 1978. Print
- Jain J, Fernandes C, Patravale V. Formulation Development of Parenteral Phospholipid-based Microemulsion of Etoposide. Pharm. Sci. Tech. 2(2) (2010) 826-831
- Kalam MA, Humayum M, Parvez N, Yadav S, Garg A, Amin S, Sultana Y, Ali A. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: a review. Cont. J. Pharm. Sci. 1 (2007) 30-35
- Kaszuba M, Corbett J, Mcneil Watson F, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. Phil. Trans. R. Soc. 368 (2010) 4439-4451
- Kirby BJ, Hasselbrink EF. Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. Electrophoresis 25 (2004) 203-213
- Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiß B, Schaefer UF, Lehr CM, Wepf R, Sterry W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. Eur. J. Pharm. Biopharm. 66 (2007) 159-164
- Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Adv. Drug Del. Rev. 45 (2008) 89-121
- Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur. J. Pharm. Biopharm. 65 (2007) 259-269

- Limayem I, Charcosset C, Fessi H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration diafiltration process. *Sep. Purif. Tech.* 38 (2004) 1-9
- López-Quintela M. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 8 (2003) 137-144
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance of azole antifungals. *Trends Mol. Med.* 2 (2002) 76-81
- Magaña García M. Guía de dermatología pediátrica. México: Editorial Panamericana, 1998. Impreso
- Marinova KG, Alargova RG, Denkov ND, Velev OD, Petsev DN, Ivanov IB, Borwankar RP. Charging of oil-water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions. *Langmuir* 12 (1996) 2045-2051
- Mendoza N, Noriega EK, Nava MG, Mendoza SE, Ganem A, Quintanar D. Preparation and in vitro evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast for ultrasound imaging. *Ultrasonics* 51 (2011) 839-845
- Mitu MA, Radulescu FS, Hirjau M, Lupuleasa D, Dumitrescu I, Mirondalia S. The lack of biological relevance of the official *in vitro* dissolution methodology for the immediate release solid oral dosage forms of ketoconazole. *Farmacia* 59(6) (2011) 853-859
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J Pharm.* 385 (2010) 113-142
- Mouri A, Diat O, Lerner DA, El Ghzaoui A, Ajovalasit A, Dorandeu C, Maurel JC, Devoisselle JM, Legrand P. Water solubilization capacity of pharmaceutical microemulsions based on Perceol®, lecithin and ethanol. *Int. J. Pharm.* 475(20) (2014) 324-334

- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *In Vitro* exposure using dynamic light scattering technique. *Tox. Sci.* 101(2) (2008) 239-253
- Murtaza G. Ethylcellulose microparticles: A review. *Acta Pol. Pharm.* 69(1) (2012) 11-22
- Nigade PM, Patil SL, Tiwari SS. Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS): A Review. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 2(2) (2012)
- O'Donnell PB, McGinity JW. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Del. Rev.* 28 (1997) 25-42
- Patel MR, Patel RB, Parikh JR, Solanki AB, Patel BG. Investigating effect of microemulsion components: In vitro permeation of ketoconazole. *Pharm. Dev. Tech.* 16(3) (2011) 250-258
- Peretta MD. Reingeniería Farmacéutica. Principios y protocolos de atención al paciente. 2º edición. Buenos Aires: Médica Paramericana. 2005. Impreso
- Pinto-Reis C, Neufeld RJ, Riveiro A, Veiga F. Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Biol. Med.* 2 (2006) 8-21
- Prow TW, Grice JE, Lin LL, Raye R, Butler M, Becker W, Wurm EMT, Yoong C, Robertson T, Soyer HP, Roberts MS. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 470-491
- Rao SVR, Shao J. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs I. Formulation development. *Int. J. Pharm.* 362 (2008) 2-9
- Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. 4th Edition. New Dehli, India: Blackwell Publishing, 2012. Print

- Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Controlled Rel.* 5(1) (1987) 23-36
- Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Int. J. Pharm.* 263 (2003) 85-94
- Rosenstein E. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. 59^o edición. México, DF: Ediciones PLM. 2013. Impreso
- Roy SK, Prabhakar B. Bioadhesive Polymeric Platforms for Transmucosal Drug Delivery Systems – A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 9(1) (2010) 91-104
- Shu S, Sun C, Zhang X, Wu Z, Wang Z, Li C. Hollow and degradable polyelectrolyte nanocapsules for protein drug delivery. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 210-217
- Siepmann J, Peppas NA. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *Int. J. Pharm.* 418 (2011) 6-12
- Sinko PJ, Martin AN. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. Print
- Skiba M, Skiba-Lahiani M, Marchais H, Duclos R, Arnaud P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *Int. J. Pharm.* 198 (2000) 1-6
- Somasundaran P. (Ed.). *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Volume 2. 2^a Edition. USA: CRC Press. 2006. Print
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Rel.* 70 (2001) 1-20
- U.S. Pharmacopoeia, 24th revision (USP 24/NF 19), 2000. Twinbrock Parkway, Rockville, MD 20852, USA, pp. 864–865

- U.S. Pharmacopoeia, 29th revision (USP 29/NF 24), 2006. Twinbrock Parkway, Rockville, MD 20852, USA, pp. 1217
- U.S. Pharmacopoeia. MSDS: Glyceryl Monolinoleate. USA: Twinbrock Parkway, Rockville. 2007
- Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* 26(5) (2009) 1025-1058
- Venier-Julienne MC, Benoît JP. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.* 71 (1996) 121-128
- Weiss-Angeli V, Poletto FS, Zancan L, Baldasso R, Pohlmann AR, Guterres SS. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate containing Quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. *J. Biomed. Nanotech.* 4(1) (2008) 80-89
- Wolff K et al. *Dermatología en medicina general*. 7ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009. Impreso
- Work TS, Work E. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 6. North-Holland Publishing Company, 1978. Print
- Xu F, Lu T. *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*. USA: Science Press Beijing. 2011. Print
- Ye Z, Squillante E. The development and scale-up of biodegradable polymeric nanoparticles loaded with ibuprofen. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 422 (2013) 75-80
- Zambito Y, Pedreschi E, Di Colo G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? – A case study. *Int. J. Pharm.* 434 (2012) 28-34

- Zhao Y, Wang C, Chow AHL, Ren K, Gong T, Zhang Z, Zheng Y. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. *Int. J. Pharm.* 383 (2010) 170-177

Anexo 1 – Marcadores de densidad

Valores de densidad para el juego de marcadores *Sigma Marker Density Beads*.

| Marcador | Densidad (g/mL) |
|----------|-----------------|
| 1 | 1.018 |
| 2 | 1.035 |
| 3 | 1.052 |
| 4 | 1.065 |
| 5 | 1.075 |
| 6 | 1.087 |
| 7 | 1.102 |
| 8 | 1.119 |
| 9 | 1.138 |

Tabla 19. Estándares de densidad para la prueba de densidad isopícnica

Anexo 2 – Diagrama de fases para el potencial ζ

La gráfica siguiente muestra los resultados obtenidos para el diagrama de fase de todas las muestras analizadas.

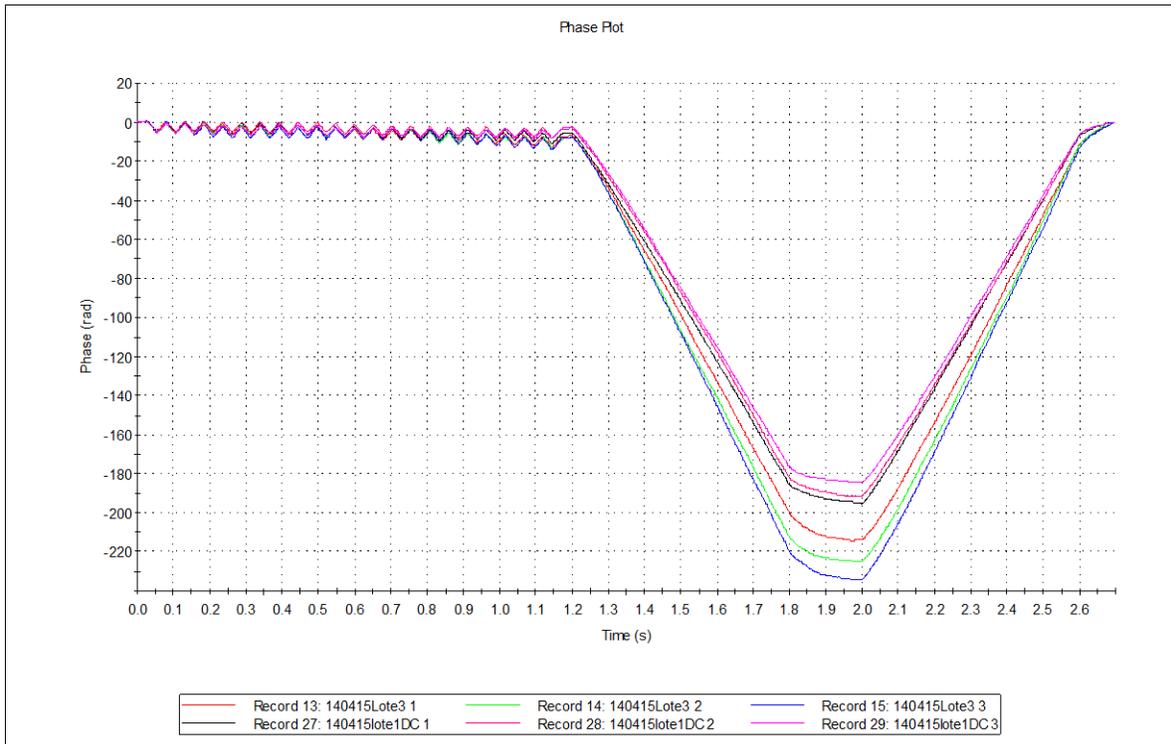


Figura 22. Gráficas de fase para cada muestra analizada

Dicha imagen no presenta ruido y muestra una gran uniformidad para cada muestra en particular, con la misma tendencia en todos los casos. Con ello, se asegura que los datos obtenidos para el potencial ζ son confiables y se puede proceder a su interpretación.