



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE IBUPROFENO A
PARTIR DE NANOCÁPSULAS Y NANOESFERAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO DE
EMULSIÓN-DIFUSIÓN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

MAURICIO HERNÁNDEZ SALGADO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS

VOCAL: MARIA EUGENIA IVETTE GOMEZ SANCHEZ

SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

1er. SUPLENTE: CESAR SALVADOR ESCAMILLA FLORES

2° SUPLENTE: YARELI ROJAS AGUIRRE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA,
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

SUSTENTANTE:

MAURICIO HERNÁNDEZ SALGADO

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS.....	9
1.0 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Nanopartículas	10
1.11 Nanoesferas	13
1.12 Nanocápsulas	13
1.2 Fenómenos involucrados en la liberación de fármacos a través de nanopartículas poliméricas	14
1.3 Factores involucrados en la liberación de fármacos a partir de nanocápsulas y nanoesferas	17
1.4 Mecanismos de liberación de fármacos a partir de nanoacarreadores	19
1.41 Liberación controlada por difusión	21
1.42 Liberación controlada por el disolvente.....	21
1.43 Liberación controlada por degradación.....	22
1.44 Liberación controlada por estímulos	22
1.5 Métodos de liberación <i>in vitro</i>	24
1.51 Métodos de muestreo y separación (MS)	26
1.52 Métodos de flujo continuo (FC).....	28
1.53 Métodos de diálisis (MD)	29
1.6 Modelos matemáticos para caracterizar la liberación de fármacos a partir de nanopartículas	31
1.61 Cinética de orden cero.....	32
1.62 Cinética de primer orden.....	33
1.63 Modelo de Higuchi	34
1.64 Modelo de Korsmeyer-Peppas	35
1.7 Preparación de nanopartículas poliméricas	37
1.71 Método de emulsión-difusión	37
1.8 Caracterización de nanopartículas.....	41
1.81 Dispersión dinámica de luz	41
1.82 Potencial zeta (ζ)	42

1.83 Centrifugación isopícnica	44
2.0 JUSTIFICACIÓN	46
3.0 HIPÓTESIS	47
4.0 OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo general	48
4.2 Objetivos particulares.....	48
5.0 MATERIALES Y EQUIPOS	50
5.1 Materiales	50
5.2 Equipos e instrumentos.....	51
6.0 METODOLOGÍA.....	52
6.1 Obtención de nanopartículas	53
6.11 Formulación	53
6.12 Determinación de la solubilidad máxima de ibuprofeno en aceite	53
6.13 Influencia de los componentes de la formulación en la talla de partícula	53
6.14 Preparación de las nanopartículas.....	54
6.2 Determinación del tamaño de partícula.....	55
6.3 Determinación del potencial zeta (ζ)	55
6.4 Determinación del porcentaje de entrapamiento/encapsulación	55
6.5 Determinación de la densidad.....	56
6.6 Pruebas previas a la validación del método analítico para la cuantificación de ibuprofeno en los perfiles de liberación.....	57
6.61 Determinación de la lambda máxima de absorción de ibuprofeno y especificidad	57
6.62 Linealidad del sistema	57
6.63 Precisión	57
6.64 Repetibilidad	58
6.65 Precisión intermedia	58
6.7 Evaluación de membrana de diálisis.....	58
6.8 Evaluación de los perfiles de liberación de ibuprofeno	59
7.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	60
7.1 Formulación	60
7.2 Solubilidad máxima de ibuprofeno en aceite.....	61
7.3 Influencia de la proporción de componentes en el tamaño de partícula	62

7.4 Porcentaje de encapsulación	66
7.5 Densidad de las nanopartículas	67
7.6 Pruebas previas a la validación del método analítico.....	69
7.7 Evaluación de membrana de diálisis	73
7.8 Evaluación de los perfiles de liberación de ibuprofeno	76
8.0 CONCLUSIONES.....	82
9.0 PERSPECTIVAS.....	84
10.0 BIBLIOGRAFÍA	85
11.0 ANEXO.....	92
11.1 Propiedades y características de los componentes de formulación.....	92
11.2 Resultados de los perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de nanocápsulas y nanoesferas.	95
11.3 Resultados del análisis estadístico, mediante prueba de <i>t de Student</i> , de los perfiles de liberación de NEs y NCs a diferentes tiempos de muestreo, obtenidos mediante el software <i>Statgraphics XVII</i>	97

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
FO	Fase orgánica
FA	Fase acuosa
IBP	Ibuprofeno
IP	Índice de polidispersión
mg	Miligramo
mL	Mililitro
NP, NPs	Nanopartículas
NC, NCs	Nanocápsulas
NE, NEs	Nanoesferas
PCS	Espectroscopía de correlación de fotones
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PCL	Policaprolactona
PGLA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PMNL	Peso molecular nominal límite
PVA	Alcohol polivinílico
p/v	Peso/volumen
R²	Coeficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
v/v	Volumen/volumen
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ζ	Potencial zeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los sistemas nanoparticulados como acarreadores de fármacos (Letchford & Burt, 2007).	11
Figura 2. Tipos de nanopartículas poliméricas.	12
Figura 3. Algunos polímeros utilizados para la formulación de NPs.....	13
Figura 4. Mecanismos de liberación de fármacos utilizados en nanoacarreadores (Lee y Yeo, 2014).	20
Figura 5. Método de flujo continuo con configuración de bucle cerrado (D'Souza, 2014).	29
Figura 6. Procedimiento general de los diferentes métodos para la preparación de nanocápsulas (Mora-Huertas et al. 2010).	38
Figura 7. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la formación de nanocápsulas por el método de emulsión-difusión, A) antes de la difusión; y B) durante la difusión.	40
Figura 8. Diagrama esquemático de un aparato de PCS (Pecora, 2000).	42
Figura 9. Potencial zeta (Kaszuba et al., 2010).	43
Figura 10. Centrifugación isopícnica. A. Mezcla de la muestra y gradiente de densidad. B. Muestra tras la aplicación de una fuerza centrífuga.	45
Figura 11. Diagrama general de la metodología seguida para el estudio comparativo de perfiles de liberación en NPs.	52
Figura 12. Preparación de nanopartículas por el método de emulsión-difusión.	54
Figura 13. Dispositivo empleado para las pruebas de liberación por el método de membrana de diálisis.	60
Figura 14. Estructura química del polímero Eudragit E100.	64
Figura 15. Representación esquemática de la determinación de densidad de los sistemas nanoparticulados preparados.	67
Figura 16. Análisis para la determinación de la densidad de nanocápsulas. A) Relación de la altura de los marcadores en función de la densidad B) Regresión de dobles recíprocos.	69

Figura 17. $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción de IBP en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.6 \pm 0.1).....	70
Figura 18. Prueba de especificidad. Ibuprofeno (línea roja), acetato de etilo (línea verde), alcohol polivinílico (línea azul), solución amortiguadora de fosfatos (línea negra).....	71
Figura 19. Comparación del perfil de difusión de ibuprofeno a través de la membrana de diálisis y de los perfiles de liberación promedio de nanoesferas y nanocápsulas.	75
Figura 20. Análisis de los perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de nanocápsulas mediante los modelos matemáticos de A) orden cero; B) primer orden; C) Higuchi; y D) Korsmeyer-Peppas.	78
Figura 21. Análisis de los perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de nanoesferas mediante los modelos matemáticos de A) orden cero; B) primer orden; C) Higuchi; y D) Korsmeyer-Peppas.	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las nanopartículas (Parveen et al., 2012).	12
Tabla 2. Ejemplos de liberación controlada por estímulos en nanoacarreadores.	23
Tabla 2. Ejemplos de liberación controlada por estímulos en nanoacarreadores (continuación).....	24
Tabla 3. Modelos empíricos para la descripción de perfiles de liberación.....	32
Tabla 4. Interpretación del mecanismo difusional de liberación.	36
Tabla 5. Composición sugerida para la preparación de nanocápsulas por el método de emulsión-difusión (Mora-Huertas et al., 2010).....	39
Tabla 6. Formulación seleccionada para la preparación de las nanopartículas (400mL).....	61
Tabla 7. Solubilidad máxima de ibuprofeno en diferentes aceites.....	62
Tabla 8. Resultados de la proporción de componentes en el tamaño de partícula y potencial ζ	64
Tabla 9. Porcentaje de entrapamiento/encapsulamiento de nanopartículas.	66
Tabla 10. Resultados del estudio de linealidad.	72
Tabla 11. Resultados del estudio de precisión.....	72
Tabla 12. Resultados de repetibilidad del método analítico.	73
Tabla 13. Resultados del estudio de precisión intermedia.	73

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Nanopartículas

Las nanopartículas, para propósitos farmacéuticos, son definidas en la *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Kreuter, 1994) y en la *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Kreuter, 2004) como partículas sólidas coloidales que varían en tamaño de 1 a 1000 nm (1 μ) que constan de materiales macromoleculares en donde el principio activo (fármaco o sustancia activa) está disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o ligado.

Una amplia variedad de nanopartículas compuestas de una gama de materiales, incluyendo los lípidos, polímeros y materiales inorgánicos se han desarrollado, lo que resulta en sistemas de liberación que varían en sus propiedades fisicoquímicas y por lo tanto en sus aplicaciones (Fig. 1).

Muchos tipos de nanopartículas pueden ser utilizados como sistemas farmacéuticos, formulados a partir de diversos materiales con características únicas y servir como un posible vehículo de liberación de fármacos para el tratamiento de una enfermedad específica. Debido a su tamaño, las nanopartículas pueden penetrar eficientemente a través de barreras hacia células individuales, permitiendo así la acumulación eficaz del fármaco en el sitio de acción. Por lo tanto, los efectos secundarios no deseados y la toxicidad del agente terapéutico se reducen y la eficacia terapéutica aumenta (Parveen et al. 2012). Las diversas ventajas de las nanopartículas se resumen en la tabla 1.

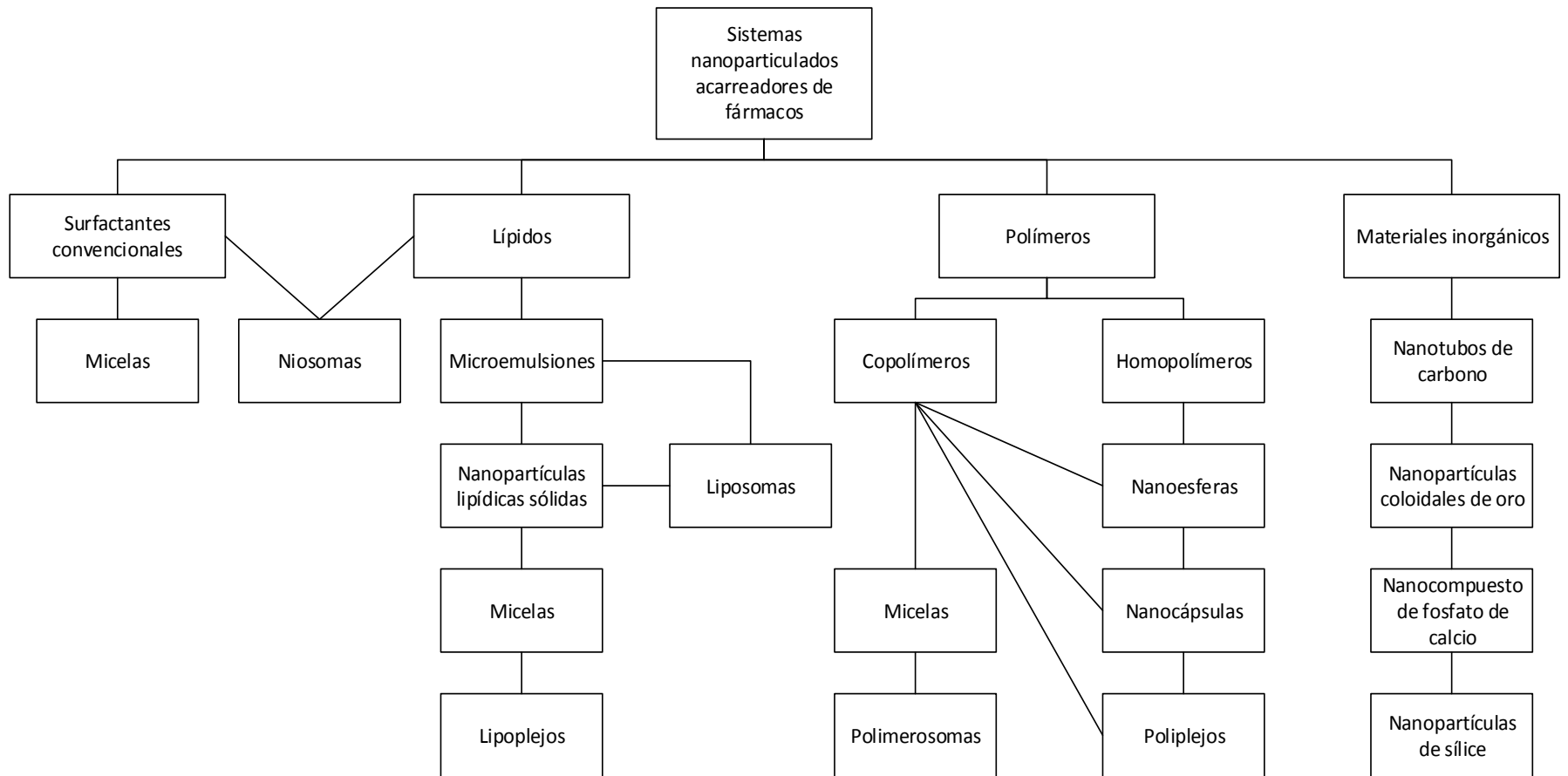


Figura 1. Clasificación de los sistemas nanoparticulados como acarreadores de fármacos (Letchford & Burt, 2007).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las nanopartículas (Parveen et al., 2012).

Ventajas	Desventajas
Incrementan la solubilidad acuosa. Protegen al fármaco de la degradación Producen una liberación prolongada Mejoran la biodisponibilidad. Proveen una liberación dirigida (vectorización). Disminuyen los efectos tóxicos del fármaco. Constituyen una forma adecuada para todas las rutas de administración.	Su pequeño tamaño y gran superficie pueden conducir a la agregación de partículas. La manipulación física es difícil en formas líquidas y secas. Carga limitada de fármaco.

El término *nanopartícula polimérica* es un término colectivo dado para cualquier tipo de nanopartícula constituida de polímero, pero específicamente para nanoesferas y nanocápsulas (Fig. 2).

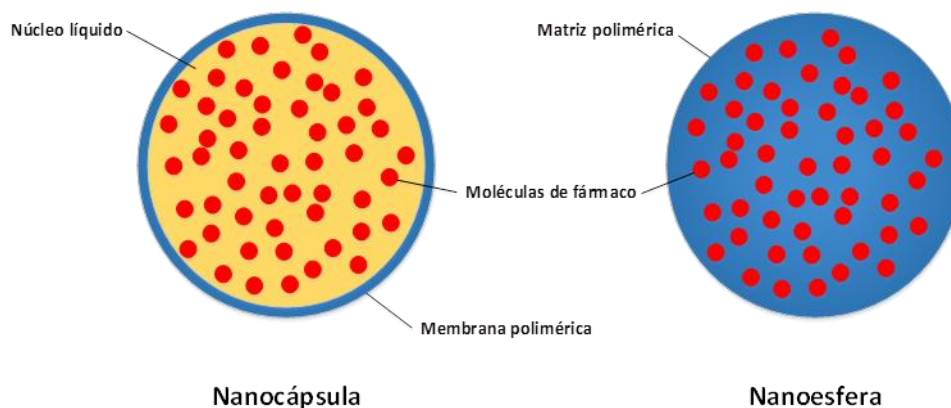


Figura 2. Tipos de nanopartículas poliméricas.

La mayoría de las nanopartículas poliméricas son biodegradables y biocompatibles. Por otra parte, también exhiben un buen potencial para la modificación de su superficie y funcionalización con diferentes ligandos, proporcionan un excelente control farmacocinético y son adecuadas para

encapsular y acarrear una gran cantidad de agentes terapéuticos (Parveen et al., 2012). Las estructuras químicas de diversos polímeros que se pueden utilizar para la formulación de nanopartículas poliméricas se presentan en la figura 3.

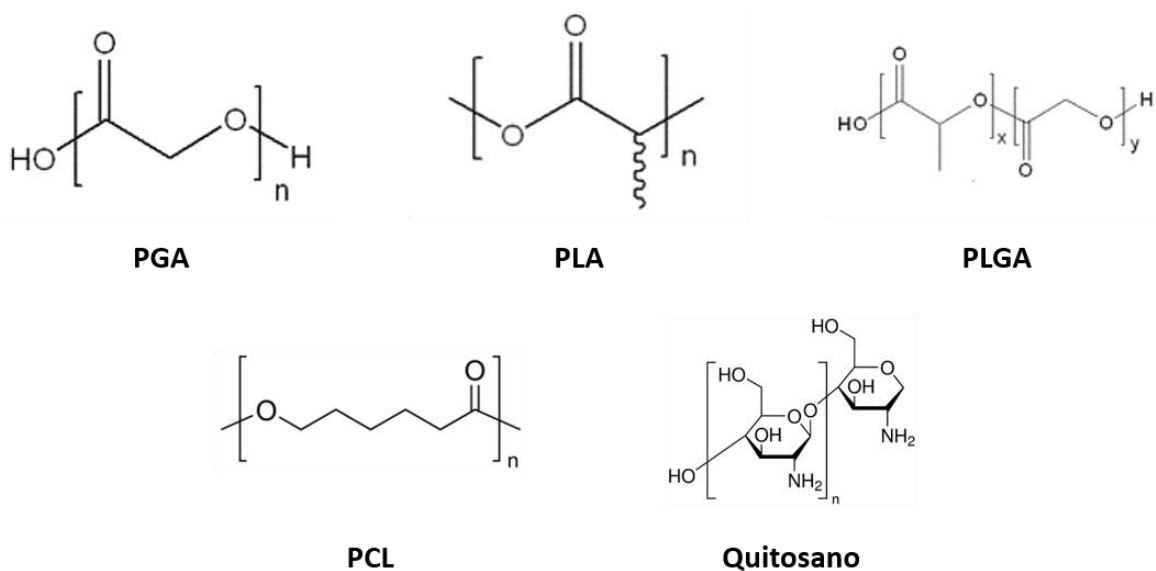


Figura 3. Algunos polímeros utilizados para la formulación de NPs.

1.11 Nanoesferas

Una nanoesfera polimérica puede ser definida como una partícula sólida coloidal del tipo matricial donde los fármacos están disueltos, atrapados, encapsulados, químicamente enlazados o adsorbidos al constituyente polimérico de la matriz. Estas partículas son por lo general más grandes que las micelas, tienen diámetros superiores a 100 nm y pueden mostrar considerablemente una mayor polidispersión (Letchford y Burt, 2007).

1.12 Nanocápsulas

Las nanocápsulas son sistemas vesiculares que actúan como una especie de reservorio, en el que las sustancias atrapadas se limitan a una cavidad que consta

de un núcleo líquido (aceite o agua) rodeado por una membrana de material sólido (Rao y Geckeler, 2011). Con frecuencia, el polímero circundante forma una sola capa. Estos sistemas han encontrado utilidad en la encapsulación y liberación de fármacos hidrofóbicos (Letchford y Burt, 2007).

1.2 Fenómenos involucrados en la liberación de fármacos a través de nanopartículas poliméricas

Existen diversos factores que influyen en la liberación de fármacos los cuáles se presentan a continuación:

1. *Permeación*: Es el proceso donde el fármaco es transportado a través de una o más membranas poliméricas correspondientes al material de recubrimiento que actúa como una barrera a la difusión del fármaco. La permeación depende de la cristalinidad, naturaleza del polímero, grado de polimerización, presencia de excipientes y plastificantes, propiedades matriciales como espesor, porosidad, tortuosidad, capa de difusión, etc.
2. *Difusión*: Es el movimiento del fármaco a través de un gradiente de concentración. Está gobernada por la primera ley de Fick, donde el flujo está dado por la siguiente ecuación:

$$J = \frac{dM}{dt} = -DA \frac{dC}{dx}$$

Donde dM es la masa del fármaco que difunde en el tiempo dt ; D es el coeficiente de difusión; A es el área de difusión; dx es el espesor de la capa

de difusión; C es la concentración y dC/dx es el gradiente de concentración. La pendiente negativa indica el movimiento de menor a mayor concentración. Aquí D y C se consideran constantes. Pero cuando C varía respecto a la distancia de difusión y el tiempo, la ecuación está dada por la segunda ley de Fick:

$$J = \left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = D \left(\frac{d^2 c}{dx^2}\right)_t$$

Tras la integración tenemos:

$$\left(\frac{dc}{dt}\right) = D \left[\frac{d^2 C}{dx^2} + \frac{d^2 C}{dy^2} + \frac{d^2 C}{dz^2} \right] = DV^{-2}C$$

Esto implica que la velocidad de cambio en la concentración del elemento de volumen es proporcional a la velocidad de cambio de gradiente de concentración en esa región del campo. El coeficiente de difusión (D) es una medida de la velocidad del movimiento del fármaco.

El coeficiente de difusión depende de varios factores como (i) la temperatura (Ecuación de Arrhenius); (ii) el peso molecular; (iii) el radio (para moléculas pequeñas, eléctricamente neutras, esféricas); (iv) concentración de plastificante; (v) posición del fármaco en la nanoesfera; y (vi) la interacción entre el polímero y el fármaco.

Con respecto a la difusión del fármaco a través de nanocápsulas, el transporte del fármaco implica la disolución del fármaco en el polímero y la difusión a través de la membrana; así

$$J = \frac{DKA\Delta C}{l_m}$$

Donde ΔC es la diferencia de concentración en ambos lados de la membrana; l_m es el espesor de la membrana; y K es el coeficiente de partición del fármaco hacia el polímero. A menudo, DK es el coeficiente de permeabilidad y DK/l_m es la permeabilidad cuando l_m no se conoce; D/l_m es la constante de permeabilidad.

3. *Erosión.* La erosión de las matrices de polímero ocurre cuando los componentes del medio de liberación, especialmente el agua, atacan los enlaces covalentes de la matriz polimérica. Para enlaces hidrolíticamente lábiles, la disponibilidad de agua es determinante en la velocidad de erosión local. La hidrólisis de los enlaces puede ser catalizada por ácidos o bases.

La erosión masiva ocurre cuando el agua invade al polímero más rápido que la hidrólisis que pueda experimentar. En este caso, el agua establece su presencia en toda la matriz, y los procesos de escisión de las cadenas poliméricas inician en todas partes. La hidrólisis puede inicialmente ser muy lenta especialmente si las cadenas de polímero son largas. Por otra parte, las escisiones iniciales pueden dotar a las cadenas de movilidad permitiendo que migren o adquieran conformaciones cristalinas, que son menos susceptibles a la hidrólisis.

La erosión superficial ocurre ya sea cuando la invasión de agua a las cadenas es lenta o la hidrólisis es rápida. Por ejemplo, los polianhídridos son excepcionalmente hidrófobos, y los enlaces anhídrido hidrolíticamente lábiles están protegidos de la exposición al agua en el interior de la matriz

polimérica. Por lo tanto, la hidrólisis con el acompañamiento de la liberación del fármaco sólo se produce en o cerca de la superficie (Siegel y Rathbone, 2012).

1.3 Factores involucrados en la liberación de fármacos a partir de nanocápsulas y nanoesferas

1. *Coefficiente de partición.* El coeficiente de partición entre los disolventes se conoce como $K_{o/w}$. Cuando el valor de K se vuelve muy grande, el flujo tiende a ser controlado por la difusión. El valor de K puede variar si la concentración del fármaco varía continuamente (por ejemplo, ácidos o bases débiles) en condiciones de pH cambiante o cuando el fármaco se une con otro componente, y en este caso, la ley de Fick podría no seguirse.
2. *Solubilidad del fármaco.* Como la difusión depende del gradiente de concentración, la solubilidad del fármaco toma relevancia y la liberación se vuelve dependiente de la disolución para fármacos escasamente solubles. Esto puede ser expresado de varias maneras:

A. Ecuación De Noyes-Whitney

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C)$$

Donde dC/dt es la cantidad de fármaco liberado por unidad de tiempo; k es la constante de velocidad de disolución; C_s es la solubilidad en el disolvente; C la concentración en el disolvente al tiempo t ; y

$$k = \frac{D_s A}{V l_b}$$

Donde D_s es el coeficiente de difusión del disolvente; V es el volumen de la disolución; A es el área de difusión y l_b es el espesor de la capa límite. Por sustitución del valor de k en la ecuación de Noyes-Withney, tenemos

$$\left[\frac{dC}{dt}\right] = \frac{D_s A}{V l_b} (C_s - C)$$

Por tanto, los fármacos solubles en agua se liberarán más rápido que aquellos fármacos hidrófobos.

B. Si-Nang y Carlier (1973) modificaron esta ecuación para la liberación de fármacos desde microcápsulas.

$$\left(\frac{dC}{dt}\right) = \frac{D_s A' K'}{V l_m}$$

Donde A' es el área superficial interna de la membrana K' incluye los términos porosidad y tortuosidad.

C. Khanna et al. (1969) modificaron la ecuación de Noyes Whitney y la aplicaron para la disolución de cloranfenicol de resinas epóxicas.

$$W_0^{\frac{1}{3}} - W_t^{\frac{1}{3}} = kat$$

Donde W_0 es el peso inicial de partículas; W_t es el peso al tiempo t ; y a es el peso de la fracción superficial al tiempo t . En este caso, el gráfico de $W_t^{1/3}$ contra t da una línea recta y el valor de k puede obtenerse de la pendiente.

D. Para fármacos débilmente ácidos o básicos, la influencia del pH en la solubilidad está dada por la ecuación de Hendersson-Hasselbach:

$$\text{Para ácidos débiles, } pH = pKa + \log\left(\frac{S - S_0}{S_0}\right)$$

$$\text{Para bases débiles, } pH = pKa + \log\left(\frac{S_0}{S - S_0}\right)$$

Donde S es la solubilidad de saturación del soluto; S_0 es la solubilidad intrínseca del soluto.

3. *Área superficial de la nanocápsula y espesor de la membrana.* El flujo es proporcional al área. Por lo tanto, cuando el tamaño disminuye, la liberación del fármaco aumenta.

Además, el flujo $\propto 1/l$; así, cuando el espesor disminuye, el flujo también aumenta debido a la menor longitud de la trayectoria de difusión. Otros factores incluyen el tipo y la cantidad de material matricial, tamaño y densidad de la nanopartícula, presencia de aditivos o adyuvantes, grado de polimerización, desnaturalización, entrecruzamiento o endurecimiento, temperatura de difusión, medio de difusión, su polaridad, presencia de enzimas, etc. (Murthy, 2009).

1.4 Mecanismos de liberación de fármacos a partir de nanoacarreadores

De acuerdo al mecanismo por el cual un fármaco escapa de un acarreador, la liberación se puede clasificar en cuatro categorías (liberación controlada por difusión, por disolvente, por reacción química, y por estímulos) las cuáles se resumen en la figura 4.

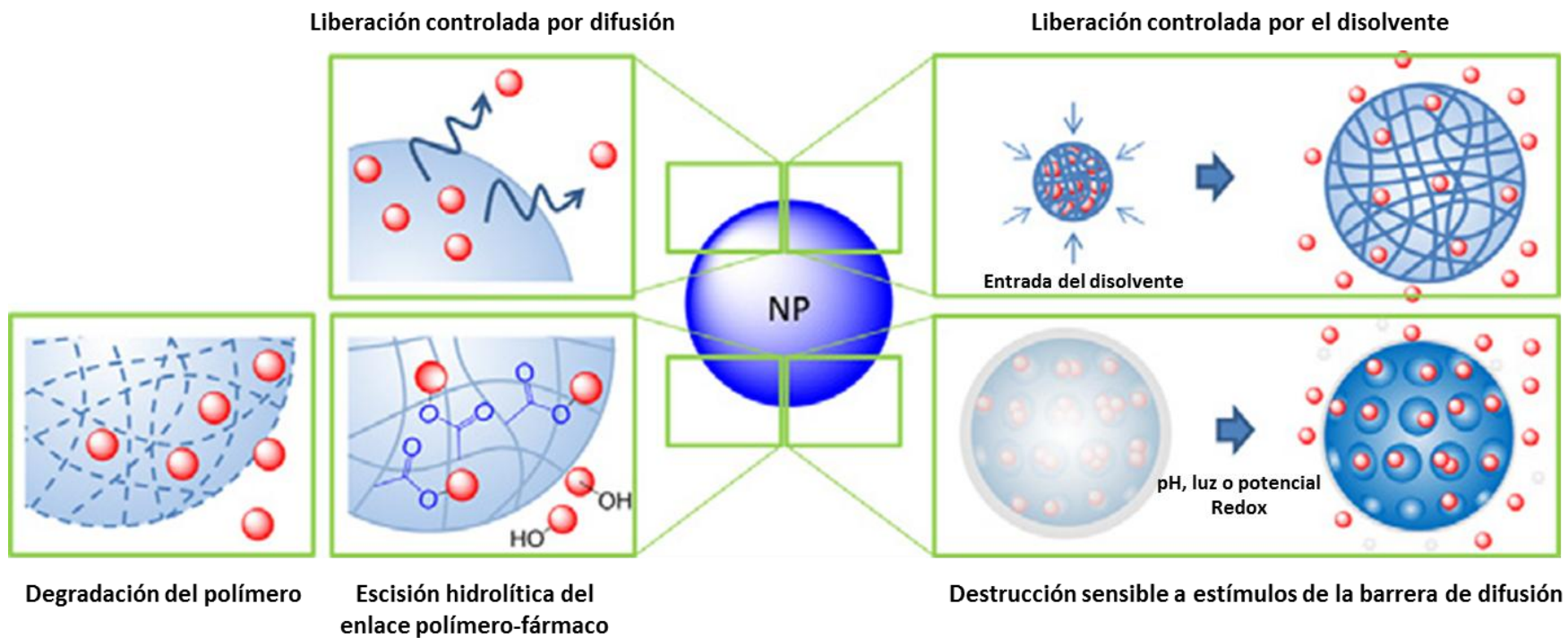


Figura 4. Mecanismos de liberación de fármacos utilizados en nanoacarreadores (Lee y Yeo, 2014).

1.41 Liberación controlada por difusión

La liberación controlada por difusión se presenta en sistemas reservorio del tipo cápsula, en donde el fármaco está disuelto o dispersado en un núcleo rodeado por una membrana polimérica (Cauchetier et al. 2003). La difusión del fármaco se lleva a cabo por la diferencia en su concentración de un lado al otro de la membrana. Aquí, el fármaco se disuelve primero en el núcleo para después difundir a través de la membrana. Las nanoesferas del tipo matricial, donde las moléculas de fármaco están dispersas en toda la matriz polimérica, también muestran una liberación controlada por difusión. En los sistemas del tipo matricial, no hay una membrana que funcione como una barrera a la difusión, por lo tanto, este sistema generalmente muestra una alta liberación inicial seguida por una disminución en la velocidad de liberación con el incremento en la distancia de difusión para las moléculas localizadas en el centro del acarreador (Lee y Yeo, 2014).

1.42 Liberación controlada por el disolvente

El transporte del disolvente hacia el interior de un acarreador puede influir en el comportamiento de la liberación del fármaco. La liberación controlada por el disolvente incluye a los procesos de ósmosis e hinchamiento (Langer y Peppas, 1983). La primera ocurre en un acarreador cubierto con una membrana polimérica semipermeable a través de la cual el agua puede fluir desde fuera del acarreador (con una baja concentración de fármaco) hacia el núcleo (con una alta concentración de fármaco). Este mecanismo resulta en una liberación de orden

cero siempre que se mantenga un gradiente de concentración constante a través de la membrana (Herrlich et al. 2012).

Cuando los sistemas poliméricos hidrofílicos vítreos son colocados en una solución acuosa, incluidos fluidos corporales, el agua difunde dentro del sistema. El aumento de agua da como resultado el hinchamiento de las partículas poliméricas seguido por una liberación de fármaco (liberación controlada por hinchamiento). La velocidad de liberación está determinada por la velocidad de difusión del agua y la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas (Peppas et al. 2000).

1.43 Liberación controlada por degradación

Los acarreadores que contienen polímeros biodegradables como poliésteres, poliamidas, polipéptidos y polisacáridos liberan fármacos vía degradación hidrolítica y/o enzimática de los enlaces éster, amida e hidrazona de sus cadenas principales (Prabaharan et al. 2009; Yoo y Park, 2001).

La cinética de liberación está determinada por la velocidad de degradación de los polímeros, que depende de sus pesos moleculares, grupos terminales, composición de los monómeros y cristalinidad (Lee y Yeo, 2014).

1.44 Liberación controlada por estímulos

Este tipo de liberación está controlada por estímulos internos y externos como temperatura, pH, fuerza iónica, sonido y campos eléctricos o magnéticos. Como es posible localizar estos estímulos, estos acarreadores se han estudiado para la

liberación específica de fármacos al sitio de acción. Ejemplos de este tipo de liberación se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de liberación controlada por estímulos en nanoacarreadores.

Estímulo	Ejemplo (Referencia)	Fundamento
pH	Nanopartículas magnéticas a base de <i>N</i> -naftil- <i>O</i> -dimetilmalonil quitosano (<i>N</i> -nap- <i>O</i> -MalCS) (Lim et al., 2013).	La exposición al medio ácido induce la hidrólisis del grupo malonil, lo cual causa la pérdida de la anfifilicidad y desestabilización de la estructura micelar.
Temperatura	Liposomas termosensibles de dipalmitoilfosfatidilcolina cargados con doxorubicina (Tagami, Ernsting y Li, 2011).	La dipalmitoilfosfatidilcolina experimenta una transición de fase a 41.5 °C lo que causa un cambio estructural en el acarreador liberando la doxorubicina cargada.
Hipoxia	Nanopartículas de un conjugado de carboximetil dextrano (hidrófilo) y 2-nitroimidazol (hidrófobo) cargadas con doxorubicina (Thambi et al., 2014).	Bajo condiciones de hipoxia, el 2-nitroimidazol sufre una serie de bio reducciones para formar 2-aminoimidazol (más hidrófilo), desestabilizando la estructura de la NP y liberando la doxorubicina cargada.
Ultrasonido	Liposomas cargados con luciferina (Graham et al., 2014).	Cuando se aplica ultrasonido en presencia de microburbujas estabilizadas por fosfolípidos, los liposomas se desestabilizan y liberan luciferina por un fenómeno conocido como cavitación inercial.
Potencial redox	Nanopartículas de sílice mesoporosa conjugadas con colágeno vía enlace disulfuro cargadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Luo et al., 2011).	En un ambiente relativamente reductor, el enlace disulfuro del conjugado que compone las nanopartículas se escinde provocando la liberación del FITC.

Tabla 3. Ejemplos de liberación controlada por estímulos en nanoacarreadores (continuación).

Luz	Nanocompuesto de etilcelulosa que contiene nanocápsulas de oro y nanogeles termosensibles de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) como barrera de difusión. (Timko et al., 2014).	Cuando se disparan por un láser NIR (808 nm), las nanocápsulas de oro generan calor más allá de una temperatura crítica de nanogeles, haciendo que se encojan y dejando poros, a través de los cuales el fármaco encapsulado puede ser liberado.
Campo magnético	Nanopartículas de magnetita paramagnética y nanogeles termosensibles de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) (Hoare et al., 2009).	Las NPs de magnetita generan calor bajo un campo magnético oscilante que induce la contracción del nanogel y la difusión del fármaco desde el dispositivo.

1.5 Métodos de liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* generalmente se llevan a cabo para cumplir con alguno de los siguientes objetivos:

- 1) Como una medida indirecta de la biodisponibilidad del fármaco, especialmente en las etapas preliminares de desarrollo de productos.
- 2) Control de Calidad para la liberación de lotes y apoyo para cumplir con las especificaciones demostrado ser clínicamente y biológicamente efectivos.
- 3) Evaluar los factores de formulación y métodos de fabricación que puedan influir en la biodisponibilidad.
- 4) Justificación a demandas a la etiqueta del producto.
- 5) Como requisito o requerimiento.

Los métodos de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) son por lo general usados para evaluar perfiles de liberación de fármacos de sistemas convencionales y novedosos de tamaño macro utilizando alguno de los aparatos de disolución recomendados. En el caso de los sistemas micro y nanoparticulados, estos aparatos no se utilizan debido a las siguientes razones:

- A. Dificultad para lograr condiciones *sink* con nanopartículas que tienen una alta área superficial utilizando los métodos USP existentes.
- B. Dificultad para separar al fármaco disuelto de las partículas sin disolver durante la toma de muestras.
- C. Necesidad de utilizar enzimas específicas para la liberación de fármacos desde partículas poliméricas biodegradables.
- D. Necesidad de establecer condiciones no convencionales de pH o temperatura para nanopartículas especializadas (nanopartículas sensibles al pH/temperatura).

Adicionalmente, el propósito de llevar a cabo estudios de liberación de fármacos desde micro/nanopartículas es, generalmente, para entender la velocidad y mecanismo de la liberación en vez de un método rutinario de control de calidad como se usa en el caso de formas farmacéuticas convencionales. Por lo tanto, los métodos para el estudio de la liberación de fármacos desde micro/nanopartículas son altamente individualistas (Murthy, 2009).

Los métodos para evaluar la liberación de fármacos a partir de formas de dosificación de tamaño nanométrico pueden ser agrupados en tres amplias categorías, llamadas de muestreo y separación (MS), flujo continuo (FC) y membrana de diálisis (MD) (D'Souza, 2014).

1.51 Métodos de muestreo y separación (MS)

Las nanopartículas cargadas con fármaco se introducen en un recipiente que contiene medio de liberación mantenido a una temperatura constante. La liberación del fármaco se evalúa mediante el muestreo del medio de liberación (filtrado o el sobrenadante) o de las nanopartículas. La selección del medio se basa en la solubilidad del fármaco y la estabilidad durante el estudio de liberación.

Las modificaciones de la técnica básica para estudiar la liberación del fármaco incluyen el tamaño de envase, el modo de la agitación y los métodos de muestreo.

La selección del tamaño del contenedor depende del volumen del medio de disolución necesario para mantener las condiciones *sink* sin comprometer la sensibilidad del ensayo para la actividad que está siendo estudiada. Así, se ocupan tubos o viales cuando el volumen del medio de liberación es pequeño y vasos o matraces cuando se requiere de volúmenes de medio de liberación más grandes.

Para formas de dosificación como las nanopartículas, la agitación del medio de liberación es crítica en el proceso de liberación *in vitro* ya que reduce el potencial de agregación de las nanopartículas y mejora su humectación (Heng et al., 2008). Mientras que la agitación del medio de liberación se logra fácilmente a través de los aparatos I o II de la USP, el medio contenido en viales debe ser agitado con el

uso de técnicas alternativas, como a partir de agitadores magnéticos, agitadores incubadora o baños de agua con agitación.

La liberación del fármaco se monitorea mediante la separación física de las nanopartículas del medio de liberación, seguido del análisis de alguno de estos componentes (Cetin et al., 2010). La filtración de las muestras de liberación se realiza utilizando filtros de membrana que tienen un tamaño adecuado para filtrar fragmentos de polímero seguido por análisis del sobrenadante. La centrifugación de las muestras también se usa ampliamente y puede ser seguido por el análisis del sobrenadante o del fármaco restante en las nanopartículas (técnica destructiva) (Sanna et al., 2012). El volumen de sobrenadante retirado depende de la solubilidad del fármaco y su estabilidad, la sensibilidad del ensayo y el mantenimiento de las condiciones *sink*. Para mantener estas condiciones durante el estudio de liberación *in vitro* se puede añadir una cantidad igual de medio de liberación de reciente preparación o solución amortiguadora.

Estas técnicas proporcionan una evaluación directa y razonablemente precisa de la liberación *in vitro*. Sin embargo, la agregación de las nanopartículas es una preocupación importante y puede llevar a velocidades de liberación bajas. El muestreo representa un importante reto, sobre todo cuando se utiliza la filtración o centrifugación. La pérdida en el volumen debido a la filtración durante el muestreo y sustitución de medio es una preocupación cuando la cantidad de medio de liberación es pequeña. El muestreo por filtración no se puede utilizar con fármacos que se adsorben al filtro. La centrifugación seguida por el análisis del sobrenadante es una alternativa a la filtración. Sin embargo, el tiempo para

sedimentar aumenta a medida que las partículas comienzan a degradarse. Además, la redispersión de las partículas degradadas es difícil (D'Souza, 2014).

1.52 Métodos de flujo continuo (FC)

En el método de FC, la liberación del fármaco desde las nanopartículas se evalúa utilizando el aparato IV de la USP o una modificación del mismo. La liberación del fármaco se produce como resultado de la circulación constante del medio de liberación a través de una columna que contiene a las nanopartículas inmovilizadas y se monitorea mediante la recolección de eluyente a intervalos periódicos (Fig. 5). Al igual que con la técnica de MS, la selección de los medios de liberación se basa en la solubilidad del fármaco y la estabilidad durante el estudio de liberación.

El método FC intenta simular el ambiente *in vivo* mediante la constante circulación de un pequeño volumen de medio de disolución para hidratar las partículas y causar la disolución y la difusión del fármaco. Las desventajas con este procedimiento incluyen la variación en la velocidad de flujo debido a la obstrucción del filtro que conduce al aumento de la presión en el sistema. Por último, la rápida sustitución del medio de disolución es difícil de lograr en la práctica (D'Souza, 2014).

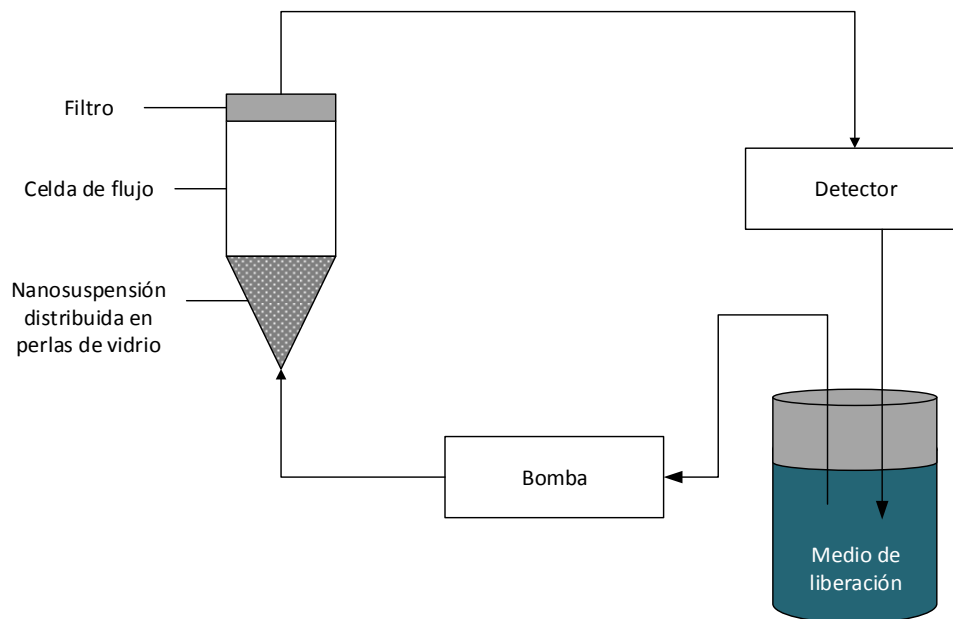


Figura 5. Método de flujo continuo con configuración de bucle cerrado (D'Souza, 2014).

1.53 Métodos de diálisis (MD)

En estos métodos, las nanopartículas cargadas con fármaco son separadas físicamente del medio de disolución por una membrana de diálisis lo que facilita el muestreo a intervalos periódicos. El método más citado es la bolsa de diálisis donde una suspensión de nanopartículas se introduce en una bolsa que es sellada y colocada en un recipiente que contiene medio de disolución. En general, el volumen encerrado en una bolsa de diálisis es significativamente menor que el medio de liberación externo. Así, el tamaño del contenedor dependerá del volumen total del medio de disolución requerido para el estudio de liberación *in vitro*. En este método, el fármaco liberado a partir de las nanopartículas difunde a través de la membrana de diálisis al compartimento exterior desde donde se toman muestras para el análisis (Kumar et al., 2011; Muthu y Singh, 2009).

Por otra parte, con el método de diálisis reversa, las nanopartículas son colocadas en el compartimento exterior y la liberación del fármaco es muestreada a partir del compartimento interior (Calvo et al., 1996; Levy y Benita, 1990). Otras adaptaciones incluyen la diálisis lado a lado (donde las celdas donadora y receptora, que contienen volúmenes iguales de medio de disolución bajo agitación, están separadas por una membrana de diálisis y el muestreo se realiza a partir de la celda receptora), y la celda de difusión de Franz.

Al igual que otros métodos, la solubilidad del fármaco en el medio de liberación es esencial para su transporte a través de la membrana de diálisis. Además del medio de liberación, no se puede pasar por alto la selección de un apropiado peso molecular nominal límite (PMNL) para la membrana de diálisis. De hecho, la premisa básica del método de diálisis es que el fármaco que se libera de la forma de dosificación difundirá rápidamente de un compartimento, a través de la membrana, y entrará en el segundo compartimento desde donde se tomarán muestras para el análisis. Por lo tanto, las membranas con un nivel suficientemente alto de PMNL son a menudo seleccionadas para estudios de liberación *in vitro* por lo que el transporte del fármaco no es un factor limitante (D'Souza, 2014).

1.6 Modelos matemáticos para caracterizar la liberación de fármacos a partir de nanopartículas

Los modelos matemáticos se pueden dividir en dos categorías: modelos empíricos/semi-empíricos y matemáticos mecanicistas. Los modelos empíricos/semi-empíricos son descripciones puramente matemáticas que no están basados en ningún fenómeno químico, físico o biológico real. Estos no proporcionan ninguna información sobre cuáles son los factores que controlan la liberación del fármaco y su poder predictivo es bajo. Por otra parte, los modelos matemáticos mecanicistas se basan en fenómenos reales, tales como difusión, degradación y erosión, y son herramientas útiles en la comprensión mecanicista del proceso de liberación (Fredenberg et al. 2011).

El uso de modelos matemáticos para la evaluación de los procesos fisicoquímicos que rigen la liberación del fármaco permite explicar y predecir el proceso de liberación. Si el modelo se ajusta a los datos experimentales, y en particular si su poder de predicción se puede demostrar, es muy probable que las conclusiones extraídas sean exactas. Otra ventaja es que es posible realizar predicciones cuantitativas de liberación del fármaco. La desventaja es que otras posibles explicaciones no pueden ser completamente excluidas. Algunos de los modelos empíricos más relevantes y utilizados para la descripción de los perfiles de liberación de fármacos se muestran en la tabla 3.

Tabla 4. Modelos empíricos para la descripción de perfiles de liberación.

Nombre	Ecuación	Parámetro	Referencias ¹
Baker-Lonsdale	$(3/2)\{1 - [-1(M_t/M_\infty)]^{2/3}\} - (M_t/M_\infty) = kt$	k	1, 2
Biexponencial	$M_t/M_0 = 1 - (A \times e^{-at} + B \times e^{-bt})$	a y b	3
Primer orden	$\ln M_t = \ln M_0 + kt$	k	2, 4
Gopertz	$M_t = Ae^{-e^{-k(t-y)}}$	k	2
Higuchi	$M_t = kt^{1/2}$	k	2, 4, 5
Hixson-Crowell	$M_0^{1/3} - M_t^{1/3} = k_s t$	k	2, 3, 4, 6
Hopfenberg	$M_t/M_0 = 1 - [1 - k_0 t/c_0 a_0]^n$	n	2
Peppas	$M_t/M_0 = kt^n$	k y n	2, 4, 7
Logístico	$M_t = A/[1 + e^{-k(t-y)}]$	k	2
Noyes-Whitney	$M_t = A(1 - e^{-kt})$	k	8
Cuadrático	$M_t = 100(k_1 t^2 + k_2 t)$	k_1 y k_2	2
Weibull	$\log\{-\ln[1 - (M_t/M_\infty)]\} = b \times \log t - \log a$	a y b	2, 4
Orden cero	$M_t = M_0 + kt$	k	2, 4

1.61 Cinética de orden cero

La disolución de fármacos a partir de formas farmacéuticas que no se disgregan y liberan de manera lenta (asumiendo que el área no cambia y no se obtienen condiciones de equilibrio) puede ser representada con la siguiente ecuación:

$$W_0 - W_t = kt$$

Donde W_0 es la cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica, W_t es la cantidad de fármaco en la forma farmacéutica al tiempo t y k es una constante de proporcionalidad. Dividiendo esta ecuación entre W_0 y simplificando:

$$f_t = k_0 t$$

¹ **1** (Baker y Lonsdale, 1974); **2** (P. Costa y Sousa Lobo, 2001); **3** (Washington, 1996); **4** (F. O. Costa et al. 2003); **5** (Higuchi, 1963); **6** (Hixson y Crowell, 1931); **7** (Peppas, 1985); **8** (Macheras y Dokoumetzidis, 2000).

Donde $f_t = 1 - (W_t/W_0)$ y f_t representa la fracción de fármaco disuelta al tiempo t y k_0 la constante de velocidad de disolución aparente o constante de orden cero. De esta manera, una gráfica de la fracción disuelta del fármaco contra el tiempo será lineal si se cumplieran las condiciones previamente establecidas. Las formas farmacéuticas que siguen este perfil liberan la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo y es el método de liberación ideal a fin de lograr una acción farmacológica prolongada. La siguiente relación puede expresar este modelo:

$$M_t = M_0 + k_0 t$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t , M_0 es la cantidad inicial del fármaco en disolución (la mayoría de la veces $M_0=0$) y k_0 es la constante de liberación de orden cero.

1.62 Cinética de primer orden

La aplicación de este modelo para estudios de disolución de fármacos fue propuesta por primera vez por Gibaldi y Feldman (1967) y más tarde por Wagner (1969). Este modelo también se ha utilizado para describir la absorción y/o eliminación de algunos fármacos (Gibaldi y Perrier, 1982).

La liberación de fármacos que sigue la cinética de primer orden puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$\ln M_t = \ln M_0 + k_1 t$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco liberada al tiempo t , M_0 es la cantidad inicial de fármaco en disolución y k_1 es la constante de liberación de primer orden. De esta manera un gráfico del logaritmo natural de la cantidad liberada de fármaco contra

el tiempo será lineal. Las formas farmacéuticas que siguen este perfil de disolución, como aquellas que contienen fármacos solubles en agua en matrices porosas (Mulye y Turco, 1995), liberan el fármaco de manera proporcional a la cantidad de fármaco remanente en su interior, por lo que la cantidad de fármaco liberado por unidad de tiempo disminuye.

1.63 Modelo de Higuchi

El primer ejemplo de un modelo matemático que tuviera por objetivo describir la liberación de un fármaco desde un sistema matricial fue propuesto por Higuchi en 1963. Concebido inicialmente para sistemas planos, se extendió a diferentes geometrías y sistemas porosos (Grassi y Grassi, 2005). Este modelo se basa en las hipótesis de que (i) la concentración inicial en la matriz es mucho mayor a la solubilidad del fármaco; (ii) la difusión del fármaco toma lugar en una sola dimensión; (iii) las partículas de fármaco son mucho más pequeñas que el grosor del sistema; (iv) el hinchamiento y la disolución de la matriz son despreciables; (v) la difusividad del fármaco es constante; y (vi) siempre se alcanzan condiciones *sink* perfectas en el medio de la liberación.

Esta relación es válida durante todo tiempo, excepto cuando se logra el agotamiento total del fármaco en el sistema. Para estudiar la disolución a partir de un sistema de matriz heterogénea plana, donde la concentración del fármaco en la matriz es inferior a su solubilidad y la liberación se produce a través de poros en la matriz, la expresión se da por la ecuación:

$$f_t = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau} (2C - \varepsilon C_s) C_s t}$$

Donde C es la concentración inicial del fármaco, ε es la porosidad de la matriz, τ es el factor de tortuosidad, C_s es la solubilidad del fármaco y D es la constante de difusión.

De forma general es posible resumir el modelo de Higuchi a la siguiente ecuación (conocida como modelo simplificado de Higuchi):

$$f_t = K_H t^{1/2}$$

Donde K_H es la constante de disolución de Higuchi. Higuchi describe la liberación de fármacos como un proceso de difusión basado en la ley de Fick, dependiente de la raíz cuadrada del tiempo. Esta relación se puede utilizar para describir la disolución del fármaco a partir de varios tipos de formas farmacéuticas de liberación modificada.

1.64 Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer et al. (1983) desarrollaron un modelo semi-empírico simple, relacionando exponencialmente la liberación del fármaco al tiempo transcurrido (t):

$$f_t = at^n$$

Donde a es una constante que relaciona características estructurales y geométricas de la forma de dosificación, n es un exponente, indicativo del mecanismo de liberación, y la función de t es M_t/M_∞ (fracción del fármaco liberado).

Así, si la difusión es el principal mecanismo de liberación, una gráfica que represente la cantidad de fármaco liberado, en las condiciones previstas, contra la

raíz cuadrada del tiempo debe dar una línea recta. Bajo algunas situaciones experimentales el mecanismo de liberación se desvía de la ecuación de Fick, siguiendo un comportamiento anómalo (no Fickiano). Es estos casos se puede usar una ecuación más general:

$$\frac{M_t}{M_0} = at^n$$

Peppas (1985) utilizó este valor de n con el fin de caracterizar diferentes mecanismos de liberación, mostrados en la tabla 4. En el caso de un cilindro, $n=0.45$ en vez de 0.5 y 0.89 en vez de 1.0. La ecuación solo se puede utilizar en sistemas con un coeficiente de difusión independiente de la concentración. Para la determinación del coeficiente n solo debe usarse la porción de la curva de liberación donde $M_t/M_\infty < 0.6$. Este modelo se utiliza generalmente para analizar la liberación de formas farmacéuticas poliméricas, cuando el mecanismo de liberación no es bien conocido o cuando más de un tipo de fenómenos de liberación pudiera estar involucrado.

Tabla 5. Interpretación del mecanismo difusional de liberación.

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de liberación del fármaco	Velocidad como función del tiempo
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
Más de 1.0	Transporte Súper caso II	t^{n-1}

1.7 Preparación de nanopartículas poliméricas

En general, existen seis métodos clásicos para la preparación de nanocápsulas: nanoprecipitación, emulsión-difusión, doble emulsión, emulsión-coacervación, recubrimiento polimérico y capa por capa (figura 6).

La elección del método de preparación se realiza basada en un número de factores tales como el tipo de sistema polimérico, área de aplicación, requisito del tamaño, etc. Por ejemplo, un sistema polimérico que se desarrolla para una aplicación en los campos de la biomedicina o ambientales debe estar completamente libre de aditivos o reactivos tales como tensoactivos o trazas de disolventes orgánicos (Rao y Geckeler, 2011).

1.71 Método de emulsión-difusión

La preparación de nanocápsulas por el método de emulsión-difusión permite la nanoencapsulación tanto de sustancias activas lipófilas como hidrófilas. El procedimiento experimental para la preparación de nanocápsulas por este método requiere de tres fases: fase orgánica, fase acuosa y fase de dilución. Si se requiere la encapsulación de una sustancia lipófila, la fase orgánica contiene al polímero, a la sustancia activa, aceite y un disolvente orgánico parcialmente miscible en agua. La fase acuosa consta de una dispersión de un agente estabilizador que es preparada utilizando agua saturada con disolvente orgánico. La fase de dilución por lo general es agua (Quintanar-Guerrero et al., 1996).

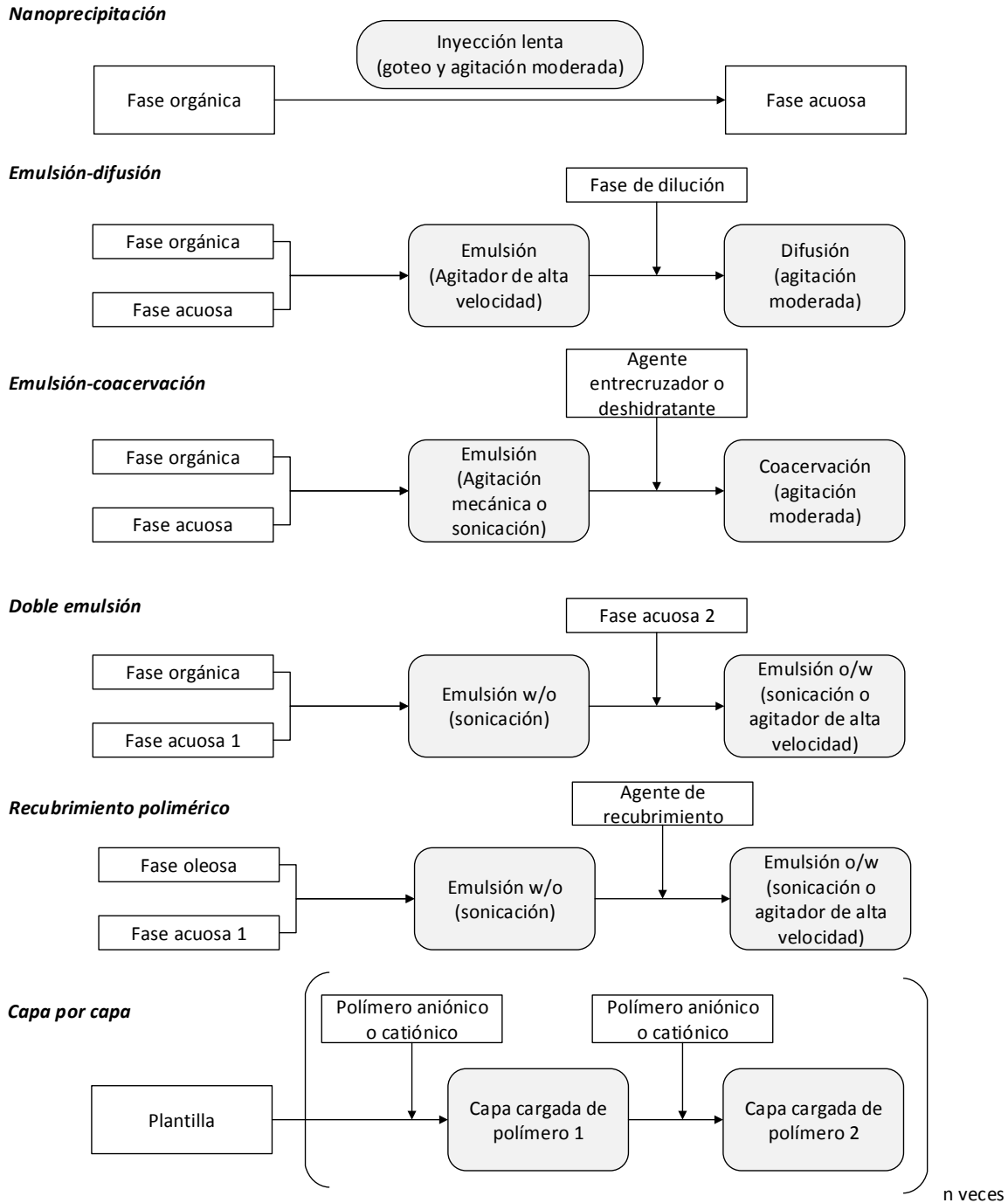


Figura 6. Procedimiento general de los diferentes métodos para la preparación de nanocápsulas (Mora-Huertas et al. 2010).

La tabla 5 muestra una composición prototipo para la preparación de nanocápsulas a partir del método de emulsión-difusión.

Tabla 6. Composición sugerida para la preparación de nanocápsulas por el método de emulsión-difusión (Mora-Huertas et al., 2010).

Material	Composición sugerida
Sustancia activa	10-50 mg
Polímero	1.0-2.0% del disolvente de la fase interna
Aceite	2.5-5.0% del disolvente de la fase interna
Disolvente de la fase interna	10 mL
Agente estabilizador	2.0-5.0% del disolvente de la fase externa
Disolvente de la fase externa	40 mL
Fase de dilución	200 mL

El mecanismo sugerido para la formación de nanocápsulas está basado en la teoría de que cada gota de emulsión produce varias nanopartículas y que estas se forman por la combinación de la precipitación del polímero y fenómenos interfaciales durante la difusión del disolvente (figura 7). En consecuencia, la difusión del disolvente desde los glóbulos acarrea moléculas hacia la fase acuosa formando regiones locales de sobresaturación de los cuales se forman nuevos glóbulos o agregados de polímero (no totalmente desolvatados) que son estabilizados por un agente que impide su coalescencia y la formación de aglomerados. Entonces, si el estabilizador se mantiene en la interfaz líquido-líquido durante el proceso de difusión y si su efecto protector es adecuado, se formará las nanopartículas después de la difusión completa del disolvente (Quintanar-Guerrero et al. 1998).

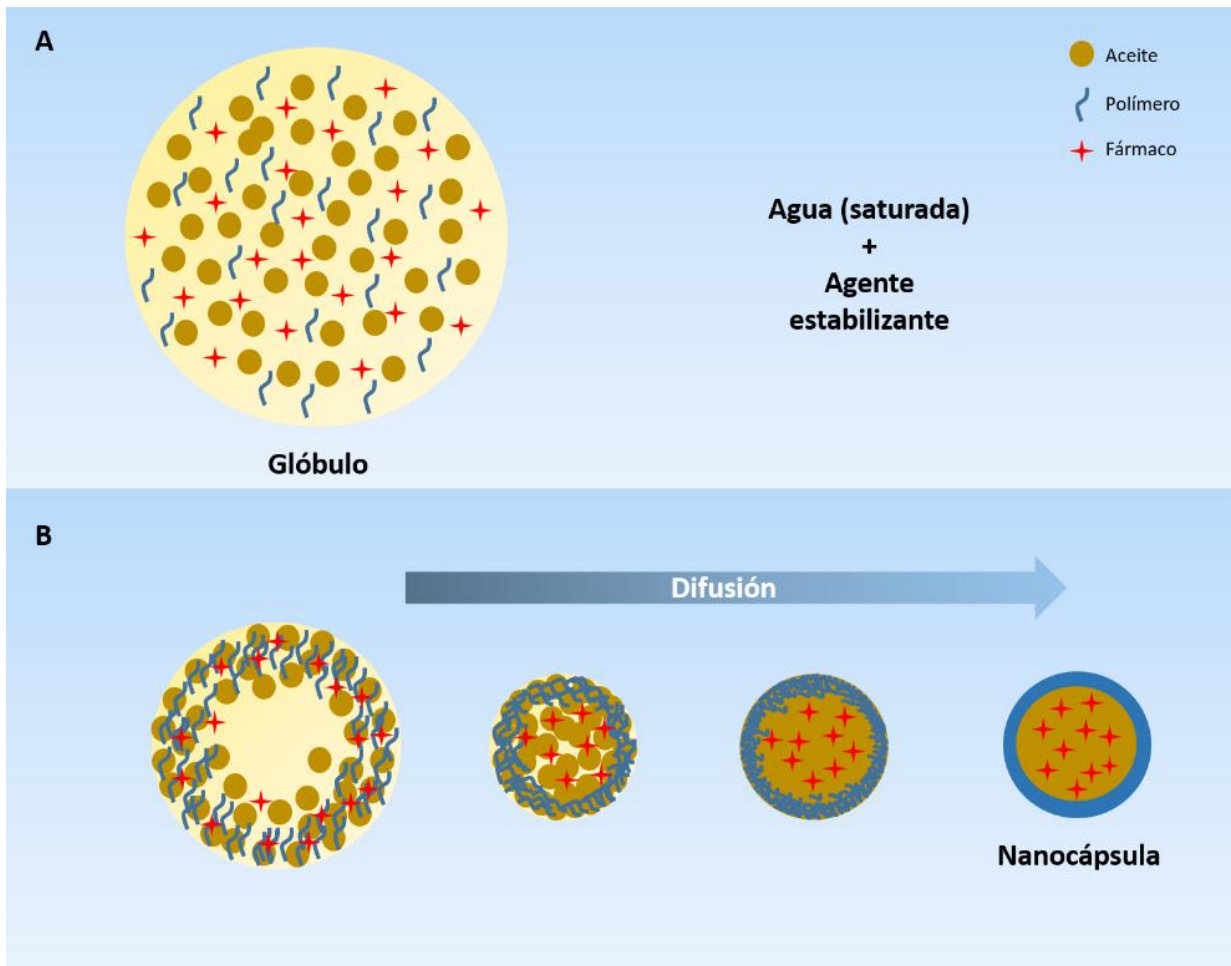


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la formación de nanocápsulas por el método de emulsión-difusión, A) antes de la difusión; y B) durante la difusión.

1.8 Caracterización de nanopartículas

1.81 Dispersión dinámica de luz

La espectroscopía de correlación de fotones (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), una técnica basada en la dispersión dinámica de luz (láser), es ampliamente utilizada para la determinación del tamaño de nanopartículas.

La PCS mide la variación en la intensidad (debido al movimiento Browniano de las nanopartículas) de la luz dispersada y la relaciona al tamaño de partícula con la ayuda de una función de correlación. Como resultado, se obtiene un radio hidrodinámico (la PCS supone que todas las partículas son esféricas). Si la población de nanopartículas no es monodispersa, los datos pueden ser procesados adicionalmente con ayuda de algoritmos para dar distribuciones de tamaño de partícula.

La figura 8 muestra un esquema de un aparato de PCS. La luz de un láser se enfoca en una muestra y la luz dispersada es recogida por un detector de ley cuadrática, un fotomultiplicador como se muestra en la figura. La señal de salida del fotomultiplicador es entonces digitalizada por un sistema de conteo de fotones y enviada a un autocorrelacionador (Pecora, 2000).

Esta técnica es rápida, sensible a partículas de escala nanométrica y proporciona información acerca de toda la población de partículas.

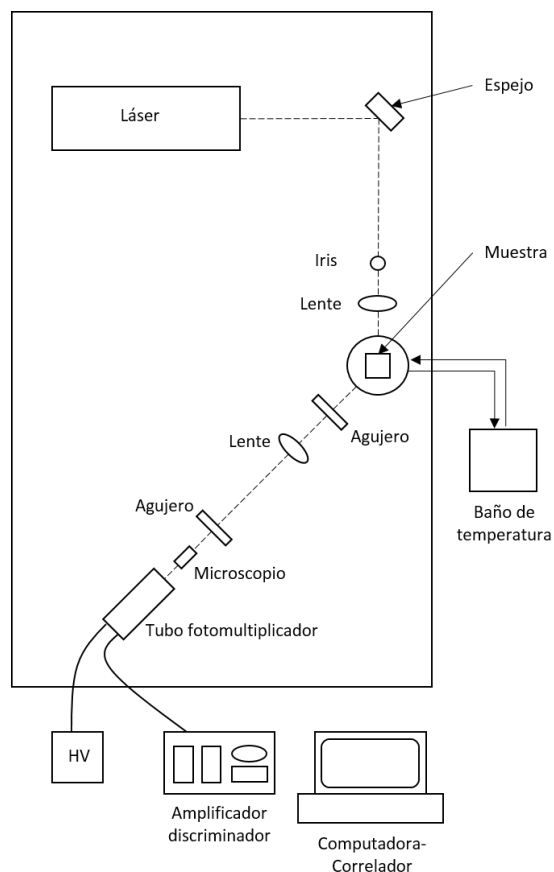


Figura 8. Diagrama esquemático de un aparato de PCS (Pecora, 2000).

1.82 Potencial zeta (ζ)

El potencial zeta es el potencial eléctrico del plano de corte, generado en la doble capa eléctrica que rodea una partícula en un medio acuoso (figura 9). Este potencial es un parámetro clave ampliamente utilizado para predecir la estabilidad de la suspensión. Cuanto mayor sea el potencial zeta, más estable es la suspensión (Kaszuba et al. 2010).

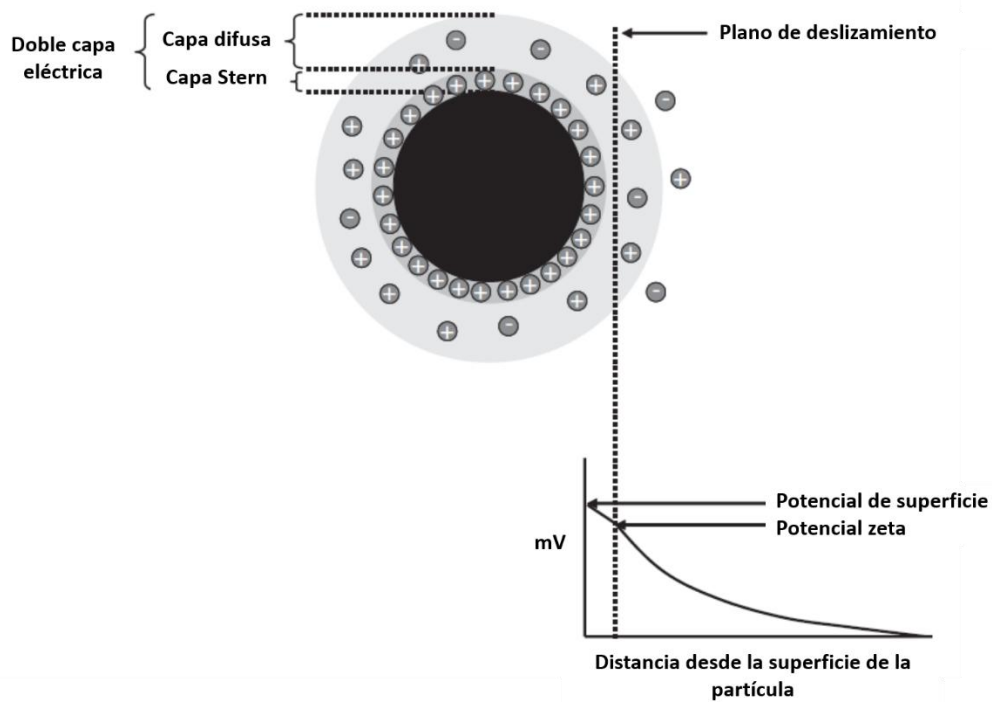


Figura 9. Potencial zeta (Kaszuba et al., 2010).

La electroforesis Doppler con láser es usada comúnmente para la medición del potencial zeta. Esta técnica mide los pequeños cambios de frecuencia de la luz dispersada que surgen debido al movimiento de las partículas en un campo eléctrico aplicado.

Es una regla general que un valor absoluto de potencial zeta por encima de 60 mV produce una excelente estabilidad, mientras que valores de 30, 20 y menos de 5 mV generalmente resultan en una buena estabilidad, estabilidad a corto plazo aceptable y agregación rápida de partículas, respectivamente. Esta regla es válida sólo para la estabilización electrostática pura o en combinación con agentes tensoactivos de bajo peso molecular, y no es válida cuando estabilizadores de alto peso molecular están presentes (Wu et al. 2011).

1.83 Centrifugación isopícnica

En la centrifugación isopícnica, también llamada centrifugación de equilibrio o boyante, las partículas se separan únicamente con base en su densidad. En presencia de una fuerza centrífuga, tal como se describe por la ecuación extendida de Stokes, las partículas dispersas migran a través del gradiente hasta que llegan a una zona de densidad igual a la de ellas, donde la velocidad de sedimentación, s_v , es igual a cero (figura 10). Por lo tanto, las partículas que alcanzan un área de densidad igual a su densidad boyante se concentrarán dentro de una zona precisa del gradiente independientemente de su tamaño:

$$s_v = (\rho'_p - \rho_m)d^2\omega^2r/18\eta$$

Donde ρ'_p es la densidad boyante de la partícula, ρ_m es la densidad del medio circundante, d es el diámetro de la partícula o esfera equivalente, ω es la velocidad angular de la partícula en la zona de sedimentación, r es el radio en el cual se determina la velocidad de sedimentación y η es la viscosidad del medio circundante.

La ecuación de Stokes es válida para partículas esféricas de tamaño menor a 50 μm que sedimentan dentro de un medio continuo por lo que puede ser aplicado a nanopartículas poliméricas acarreadoras de fármacos (Vauthier et al. 1999).

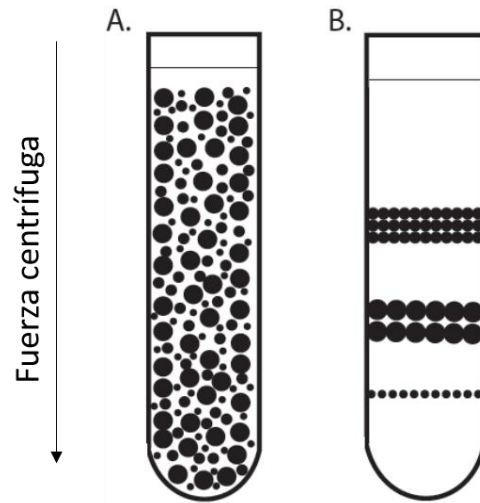


Figura 10. Centrifugación isopícnica. A. Mezcla de la muestra y gradiente de densidad. B. Muestra tras la aplicación de una fuerza centrífuga.

2.0 JUSTIFICACIÓN

Considerando las ventajas que proporcionan las nanopartículas poliméricas para su uso farmacéutico en la liberación controlada, se propone este trabajo experimental mediante el cual se evalúan las diferencias en los perfiles de liberación de nanocápsulas y nanoesferas preparadas mediante el método de emulsión-difusión, para demostrar los diferentes mecanismos de liberación involucrados y su relación con las características estructurales de estos sistemas. Al ser preparados bajo la misma formulación, mismo método y misma dosis, este estudio representa una comparación directa de estos diferentes sistemas farmacéuticos nanoparticulados. La caracterización incluye la determinación de tamaños de partícula por dispersión de luz, densidad mediante centrifugación isopícnica y potencial ζ .

3.0 HIPÓTESIS

Debido a sus diferencias estructurales, las nanocápsulas poliméricas fabricadas bajo un mismo método de preparación presentarán un distinto perfil de liberación, y por lo tanto, un mecanismo de liberación del fármaco modelo (ibuprofeno) diferente al de las nanoesferas poliméricas.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar los perfiles de liberación *in vitro* de ibuprofeno a partir de nanocápsulas y nanoesferas poliméricas utilizando el método de membrana de diálisis con la finalidad de asociar un mecanismo de liberación a cada sistema y confirmar sus diferencias estructurales.

4.2 Objetivos particulares

- Proponer una formulación capaz de producir NEs y NCs a través del método de emulsión-difusión.
- Seleccionar la cantidad óptima de ibuprofeno a encapsular a través de ensayos de solubilidad máxima en el aceite de la formulación.
- Determinar la influencia de la proporción del agente estabilizante, polímero y la cantidad de aceite en el tamaño de partícula e índice de polidispersión.
- Preparar nanopartículas poliméricas cargadas con ibuprofeno por el método de emulsión-difusión.
- Caracterizar las nanopartículas preparadas mediante la determinación de la talla de partícula por dispersión de luz, la densidad a través de centrifugación isopícnica y la estabilidad a través del potencial ζ .
- Realizar pruebas previas a la validación del método de cuantificación de ibuprofeno por espectrofotometría UV considerando los parámetros de linealidad, repetibilidad, precisión y precisión intermedia del sistema.
- Llevar a cabo la evaluación de la membrana de diálisis para considerar su uso adecuado en las pruebas de liberación *in vitro*.

- Realizar el perfil de liberación de nanocápsulas y nanoesferas a través del método de membrana de diálisis y evaluar sus diferencias mediante métodos estadístico y dependiente de modelo.

5.0 MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 Materiales

- Aceite de ricino; Cosmopolita, México. Lote: GDMJB151600089.
- Acetato de etilo ACS; Fermont, México. Lote: 014132.
- Ácido oleico puro; Cosmopolita, México. Lote: 150105.
- Alcohol polivinílico, Mowiol® 4-88, Aldrich Chemistry, Alemania. Lote: BCBH5854V.
- Agua purificada obtenida de un sistema Elix® Millipore®.
- Cierres para membranas de diálisis, 132736; Spectrum Medical Industries, EE. UU.
- Eudragit® E100; Röhm Pharma, Alemania. Lote: 8360801021.
- Ibuprofeno, base; Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., China. Lote: 12043287.
- Kit de perlas marcadoras de densidad; Pharmacia Biotech, Suecia. Lote: 253059.
- Membranas de diálisis de celulosa en tubo (43 mm), peso molecular nominal límite 14,000 Da; Sigma Aldrich, EE. UU. Lote: 3110.
- Monoleato de glicerol, Peceol; Gattefossé, Francia. Lote: 113845.
- Triglicérido de cadena media, Captex 355; Watson Phillips, México. Lote: 100730UT13.
- Sílice coloidal, Percoll®; Sigma, EE. UU. Lote: SLBJ0976V.

5.2 Equipos e instrumentos

- Agitador Ultra-Turrax T18; IKA, Alemania.
- Balanza analítica BBC32; Boeco, Alemania.
- Disolutor DT1; Optimal Control Inc., EE. UU.
- Espectrofotómetro UV-Visible Cary® 50 Conc; Varian, Australia.
- Nanosizer N4 plus; Coulter Corporation, EE. UU.
- Parrilla eléctrica con agitación magnética Nouva™; Thermo Scientific, EE. UU.
- Rotavapor Laborota 4000; Heidolph, Alemania.
- Ultracentrífuga preparativa Optima™ LE-80K; Beckman EE. UU.
- Zetasizer ZEN3600; Malvern Instruments, Reino Unido.

6.0 METODOLOGÍA

La figura 11 resume la metodología y secuencia para el estudio comparativo de los perfiles de liberación de un fármaco modelo, ibuprofeno, a partir de NCs y NEs preparadas por el método de emulsión difusión.

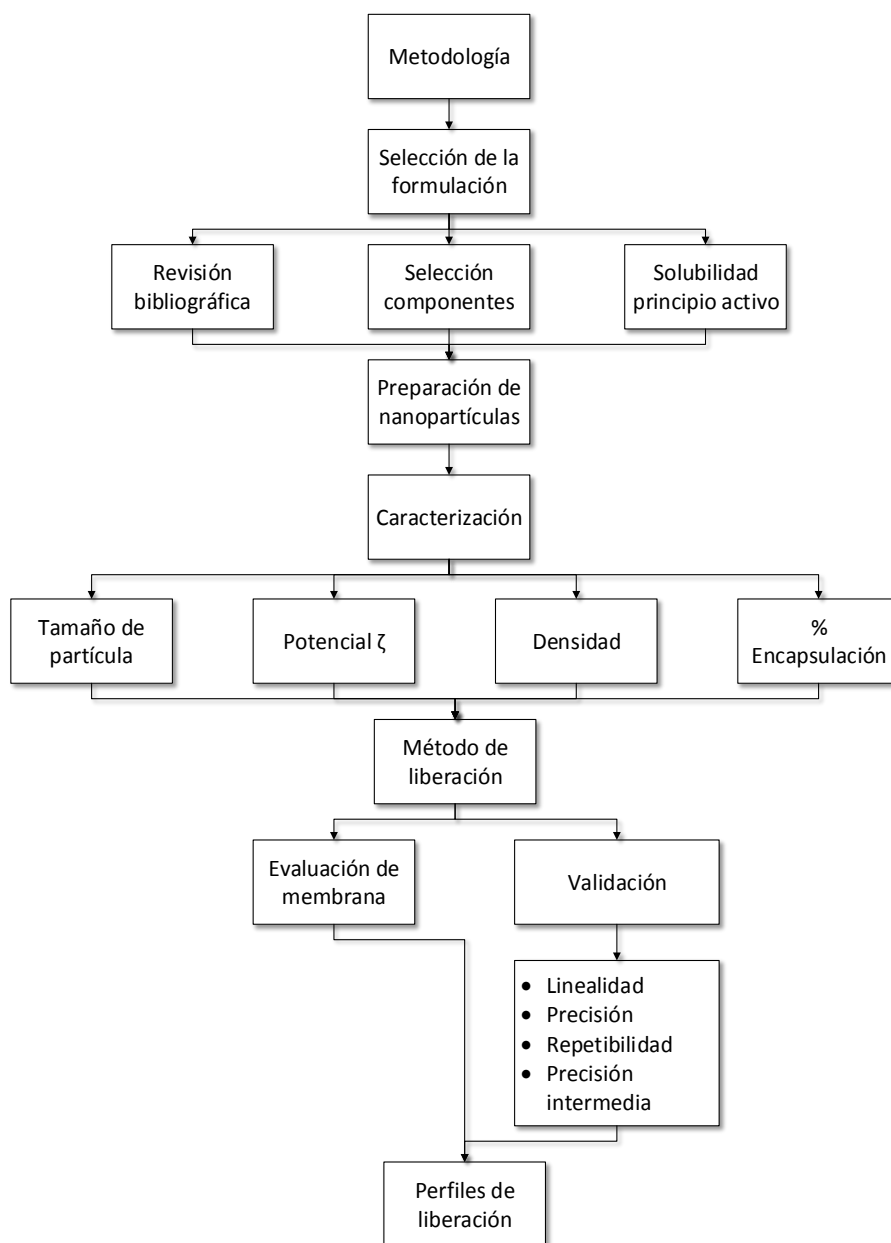


Figura 11. Diagrama general de la metodología seguida para el estudio comparativo de perfiles de liberación en NPs.

6.1 Obtención de nanopartículas

6.11 Formulación

Se realizó una revisión bibliográfica de formulaciones de nanopartículas preparadas por el método de emulsión-difusión. La selección de la formulación responde a la disposición de los materiales en el laboratorio en cantidades suficientes y a las proporciones sugeridas en las formulaciones revisadas.

6.12 Determinación de la solubilidad máxima de ibuprofeno en aceite

Con ayuda de agitación magnética se prepararon disoluciones sobresaturadas de ibuprofeno en cada uno de los aceites de prueba, agitándose durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente cada una de las disoluciones fue centrifugada en tubos *Eppendorf* a 13000 rpm por 10 minutos. De los correspondientes sobrenadantes se realizó la cuantificación de ibuprofeno mediante su adecuada dilución en alcohol etílico absoluto y su medición en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 265 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Anteriormente se prepararon curvas patrón de ibuprofeno en alcohol etílico absoluto por triplicado.

6.13 Influencia de los componentes de la formulación en la talla de partícula

Para la selección de la formulación empleada para la evaluación de los perfiles de liberación se determinó la influencia de tres de los componentes a tres distintos porcentajes cada uno: polímero (1.0%, 1.5% y 2.0% p/v FO); agente estabilizante (2.0%, 3.0% y 5.0% p/v FA); y aceite (2.5%, 3.5% y 5.0% v/v FO).

6.14 Preparación de las nanopartículas

Los disolventes de las fases interna y externa [Acetato de etilo (AcOEt) y agua purificada, respectivamente] se saturaron por un minuto antes de su uso, a fin de asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. Una vez separadas las fases, fueron disueltas las cantidades de polímero y aceite correspondientes a cada lote en 20 mL de AcOEt saturado con agua. Esta solución orgánica fue emulsionada con 80 mL de una solución acuosa del agente estabilizador, saturada con AcOEt, usando un agitador de alta velocidad (Ultra-Turrax T18, IKA) a 15500 rpm durante 6 minutos. Posteriormente se añadieron a la emulsión 300 mL de agua purificada bajo agitación moderada, para inducir la difusión del AcOEt hacia la fase continua dando lugar a la formación de las nanopartículas. La preparación de las nanoesferas siguió el mismo procedimiento con la excepción de que no se añadió aceite a la formulación (figura 12).

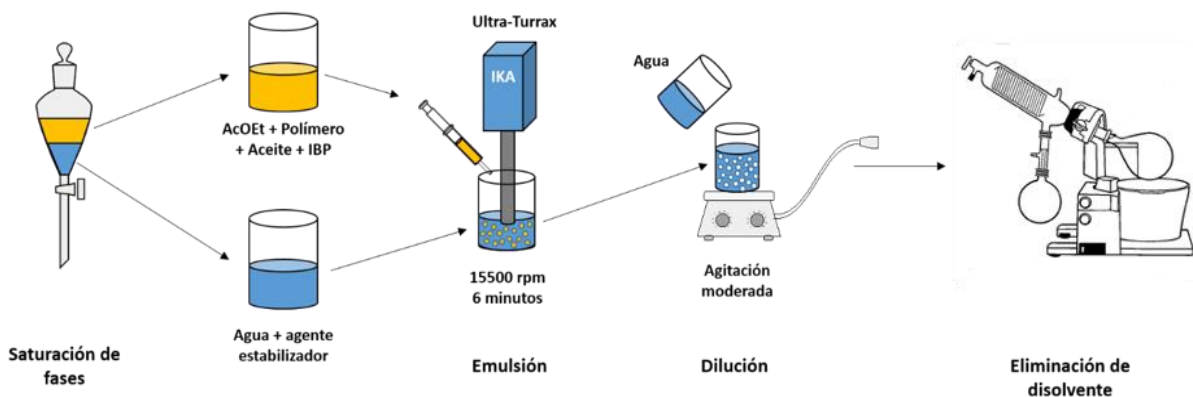


Figura 12. Preparación de nanopartículas por el método de emulsión-difusión.

6.2 Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula promedio y el índice de polidispersión de las suspensiones de nanopartículas preparadas se determinó utilizando un equipo Nanosizer (N4 plus, Coulter). Las muestras se prepararon por dilución con agua purificada hasta obtener una intensidad adecuada. Las mediciones se realizaron por triplicado a una temperatura de 20 °C y con un ángulo de dispersión de 90°.

6.3 Determinación del potencial zeta (ζ)

El potencial zeta de las suspensiones de nanopartículas preparadas fue determinada usando un equipo zetasizer (ZEN3600, Malvern). Las muestras se diluyeron con agua destilada y las determinaciones se realizaron por triplicado a una temperatura de 25 °C.

6.4 Determinación del porcentaje de entrapamiento/encapsulación

Se prepararon suspensiones de nanocápsulas y nanoesferas con la misma composición seleccionada a partir de la optimización del método de preparación. La cantidad de ibuprofeno utilizada para la preparación de ambas suspensiones fue seleccionada a partir de los resultados obtenidos de la determinación de la solubilidad máxima de ibuprofeno en aceite. Estas suspensiones fueron concentradas y separadas del disolvente orgánico con ayuda de un rotavapor (Laborota 4000, Heidolph). Posteriormente, con el propósito de separar las nanopartículas de su fase continua, las suspensiones se centrifugaron con ayuda de una ultracentrífuga preparativa (Optima™ LE-80K, Beckman) a 30 000 rpm por 3 horas a 10°C en un rotor tipo 50.2 Ti (ángulo 24°). La cantidad de ibuprofeno no atrapado/encapsulado fue determinada a partir de la medición de la absorbancia

del sobrenadante en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary® 50 Conc, Varian). El porcentaje de entrapamiento/encapsulación fue calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$\%Encapsulación = \frac{IBP_{inicio} (mg) - IBP_{sobrenadante} (mg)}{IBP_{inicio} (mg)}$$

6.5 Determinación de la densidad

Con el propósito de evaluar la densidad en función del sistema de nanopartículas preparado se utilizó la técnica de centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sílice coloidal (Percoll®). Se prepararon tres suspensiones diferentes, cada una correspondiente a alguno de los sistemas nanoparticulados (nanocápsulas, nanoesferas y nanoemulsión). Estas suspensiones fueron concentradas con ayuda de un rotavapor (Laborota 4000, Heidolph). Para cada suspensión, 50 µl de concentrado se añadieron a 7 mL de una suspensión de Percoll al 45% v/v en NaCl 0.15 M. La centrifugación, para la generación de los gradientes de densidad, se realizó a 15 000 rpm por 3 horas a 5°C en un rotor tipo 90 Ti (ángulo 25°) en una ultracentrífuga preparativa (Optima™ LE-80K, Beckman). La altura de cada banda fue medida, con ayuda de un calibrador Vernier, a partir del fondo del tubo y hasta el centro de la banda. Adicionalmente se colocó un cuarto tubo a la corrida conteniendo 30 µL de cada uno de las perlas coloreadas marcadores de densidad (Pharmacia Biotech). La densidad de las muestras fue calculada a partir de la curva obtenida al graficar el recíproco de la altura contra el recíproco de la densidad de los marcadores.

6.6 Pruebas previas a la validación del método analítico para la cuantificación de ibuprofeno en los perfiles de liberación

La validación del método analítico para la cuantificación de ibuprofeno se realizó para un equipo espectrofotómetro UV-visible (Cary 50 Conc; Varian) en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.6 ± 0.1 .

6.61 Determinación de la lambda máxima de absorción de ibuprofeno y especificidad

Se realizó un barrido en un rango de 200 a 400 nm de una disolución de ibuprofeno con una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente se realizaron barridos en un rango de 200 a 400 nm de cada uno de los componentes de la formulación solubles en solución amortiguadora de fosfatos y se comparó su contribución a la absorbancia en la cuantificación de ibuprofeno.

6.62 Linealidad del sistema

Una vez obtenida la lambda máxima de absorción, por triplicado se construyó una curva patrón de cinco puntos con las siguientes concentraciones: 80, 150, 300, 450 y 600 $\mu\text{g/mL}$. Se calculó el coeficiente de correlación de cada curva así como el coeficiente de la curva promedio.

6.63 Precisión

Se prepararon 3 muestras por sextuplicado a la concentración media de la curva de calibración (300 $\mu\text{g/mL}$) por diluciones. Se calculó el CV de las concentraciones calculadas para las muestras.

6.64 Repetibilidad

Por triplicado se prepararon disoluciones correspondientes al 50%, 100% y 150% de la concentración del analito (300 µg/mL). Se determinó el CV de cada serie.

6.65 Precisión intermedia

Se prepararon muestras por triplicado a la concentración del analito (300 µg/mL) por dos distintos analistas en días diferentes. Se calculó el CV de las seis muestras preparadas.

6.7 Evaluación de membrana de diálisis

Las pruebas de liberación de ibuprofeno se realizaron por un método de membrana de diálisis mediante el dispositivo mostrado en la figura 13. Este dispositivo consta de un equipo disolutor (DT1, Optimal Control) y el vástago metálico utilizado para el aparato 1 de la USP (canastillas); membranas de diálisis en tubo (Celulosa, 14000 Da, Sigma Aldrich) que contienen 25mL de una suspensión de nanopartículas, selladas por un extremo con ayuda de un cierre (132736; Spectrum Medical Industries) y por el otro extremo con hilo nylon, el cual a su vez fija la bolsa de diálisis al vástago metálico; y un vaso que contiene el medio de liberación seleccionado (solución amortiguadora de fosfatos pH 7.6 ± 0.1 , $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$) (figura 12).

Para la evaluación de la membrana de diálisis como barrera limitante a la difusión, se preparó una disolución de ibuprofeno en solución amortiguadora de fosfatos con una concentración equivalente al contenido teórico de las NPs. En una bolsa de diálisis de 12 cm, previamente hidratada durante 24 horas, se añadieron 25 mL de la disolución de ibuprofeno y se colocó en un medio de liberación con un

volumen de 400 mL, bajo agitación a 100 rpm y una temperatura de 37 ± 0.5 °C. El volumen de muestra fue de 3 mL y se realizó a los 20, 40, 60, 80 y 120 minutos sin reposición de medio.

6.8 Evaluación de los perfiles de liberación de ibuprofeno

Las suspensiones de nanoesferas y nanocápsulas se prepararon con un día de anticipación a la prueba de liberación correspondiente. La eliminación del AcOEt de la suspensión y posterior concentración se realizó con ayuda de un rotavapor. A cada bolsa de diálisis se le añadieron 25 mL de suspensión de nanopartículas. El medio de liberación empleado fue solución amortiguadora de fosfatos pH 7.6 ± 0.1 (400 mL). La liberación se realizó bajo agitación a 100 rpm y una temperatura de 37 ± 0.5 °C. El volumen de muestra fue de 3 mL y se realizó sin reposición de medio. Las pruebas para cada sistema de nanopartículas se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos de la liberación *in vitro* se evaluaron por dos métodos para comparar perfiles de liberación: método estadístico con prueba de *t* y método dependiente de modelo (orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas).

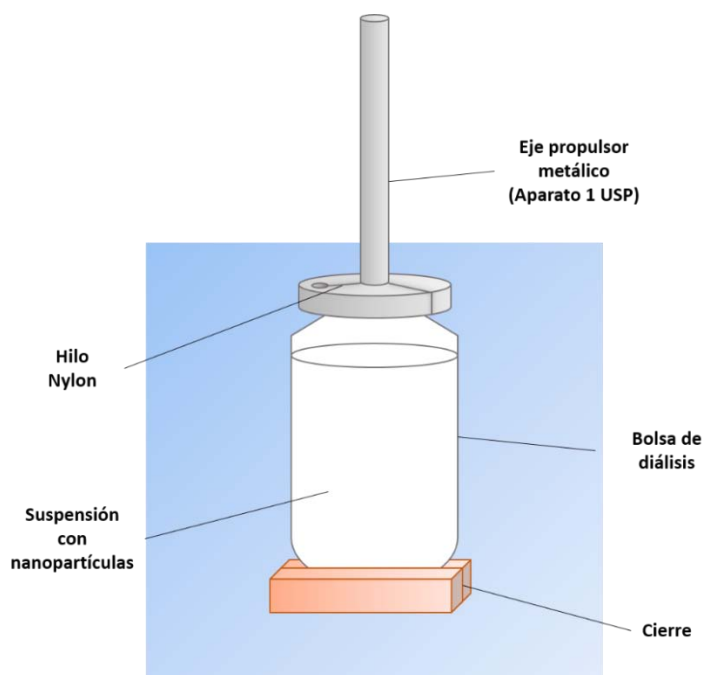


Figura 13. Dispositivo empleado para las pruebas de liberación por el método de membrana de diálisis.

7.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 Formulación

La tabla 6 muestra la formulación seleccionada para la preparación de las nanopartículas por el método de emulsión-difusión. La selección de los materiales está basada en una revisión bibliográfica con formulaciones preparadas por el mismo método, a la disposición de esos materiales en el laboratorio y a las proporciones sugeridas por Mora-Huertas et al. (2010) mostradas en la tabla 5. El polímero y el agente estabilizante se seleccionaron considerando una formulación preparada para la encapsulación del colorante hidrófobo sudan III (Quintanar-Guerrero et al. 1998) La elección del acetato de etilo (AcOEt) como disolvente de

la fase orgánica se debe a su relativo bajo punto de ebullición que facilita su eliminación, por destilación a presión reducida, una vez obtenidas las nanopartículas. La selección de ácido oleico y la cantidad de ibuprofeno se debe a la determinación de la solubilidad de este principio activo en diversos aceites, resultado que se muestra más adelante.

Tabla 7. Formulación seleccionada para la preparación de las nanopartículas (400mL).

Componente	Función	Proporción
Ibuprofeno	Principio activo	250 mg
Eudragit® E 100	Polímero	1.0-2.0 % (p/v) del disolvente de la fase interna
Ácido oleico	Aceite	2.5-5.0 % (v/v) del disolvente de la fase interna
Alcohol polivinílico (PVA) Mowiol® 4-88	Agente estabilizante	2.0-5.0 % (p/v) del disolvente fase externa
Acetato de Etilo (AcOEt)	Disolvente fase interna (orgánica)	20 mL
Agua purificada	Disolvente fase externa (acuosa)	80 mL
Agua purificada	Fase de dilución	300 mL

7.2 Solubilidad máxima de ibuprofeno en aceite

La tabla 7 muestra los resultados de la determinación de la solubilidad de ibuprofeno en distintos aceites seleccionados. La selección de ácido oleico como núcleo de aceite para la preparación de nanocápsulas responde a la necesidad de encapsular una mayor cantidad de ibuprofeno, con la finalidad de facilitar la cuantificación del fármaco durante las pruebas de perfil de liberación, mediante el método analítico validado.

Tabla 8. Solubilidad máxima de ibuprofeno en diferentes aceites.

Aceite	Solubilidad \pm DE (mg/mL)
Aceite de ricino	175.0 \pm 3.4
Ácido oleico	233.2 \pm 9.6
Triglicéridos de cadena media Captex® 355	106.1 \pm 1.4
Monooleato de glicerilo Peceol™	159.9 \pm 2.5

7.3 Influencia de la proporción de componentes en el tamaño de partícula

Con la finalidad de que la única variable a evaluar sea la diferencia estructural entre NCs y NEs se decidió establecer la formulación base considerando únicamente a las nanocápsulas puesto que su eficacia de encapsulación depende de la solubilidad del principio activo en la fase oleosa.

Para la elección de la formulación necesaria para el estudio comparativo de los perfiles de liberación, se evaluó el tamaño de partícula y el índice de polidispersión en función de las proporciones de los componentes seleccionados. Estos resultados son mostrados en la tabla 8. Para todas las formulaciones preparadas se obtuvieron dispersiones con un tamaño de partícula promedio a escala nanométrica.

Entre las formulaciones 1, 2 y 3 se observa que al aumentar el porcentaje de agente estabilizante en la fase acuosa o continua de la formulación, el diámetro promedio de las nanocápsulas disminuye. Esta diferencia significativa ($p < 0.05$) se debe al efecto del estabilizante en suspensión que se adsorbe en la interfase o/w y evita la coalescencia de los glóbulos formados durante la emulsión.

Por otra parte, entre las formulaciones 2, 4 y 5 se observa una relación en la que al aumentar la concentración de aceite en la fase orgánica el tamaño de partícula promedio aumenta ($p < 0.05$).

Sin embargo, no se observa una relación entre el porcentaje de polímero en la fase orgánica y el tamaño de partícula entre las formulaciones 2, 6 y 7. Esto puede indicar que a las concentraciones de polímero evaluadas, el tamaño de partícula está determinado principalmente por la cantidad de aceite encapsulado y el porcentaje de agente estabilizador. A mayores porcentajes de polímero se puede favorecer la agregación del polímero mientras que menores cantidades de polímero desolvatado pueden ser insuficientes para la encapsulación del todo el aceite.

Las dispersiones de nanopartículas son a menudo polidispersas; es decir, puede haber partículas con una distribución de tamaños y formas muy variable en lugar de partículas de un solo tamaño y forma (Pecora, 2000). El índice de polidispersión (IP) es un parámetro importante que gobierna la estabilidad física de nanosuspensiones cuyo valor debe ser lo más bajo posible para una estabilidad a largo plazo. La tabla 8 muestra los resultados de IP para las suspensiones de NPs preparadas, obtenidos por PCS. Estos valores se encuentran entre 0.097 y 0.249. Un valor de IP de 0.1-0.25 indica una distribución de tamaño bastante estrecho, mientras que un valor de IP superior a 0.5 indica una distribución muy amplia (Patravale et al. 2004).

Tabla 9. Resultados de la proporción de componentes en el tamaño de partícula y potencial ζ .

Nanocápsulas						
#	% Polímero	% Aceite	% Agente estabilizante	Diámetro promedio \pm DE (nm)	IP \pm DE	ζ promedio \pm DE (mV)
1	1	5	2	241.2 \pm 2.5	0.138 \pm 0.175	38.1 \pm 1.5
2	1	5	3	228.3 \pm 0.4	0.183 \pm 0.094	37.0 \pm 3.3
3	1	5	5	219.0 \pm 2.1	0.249 \pm 0.090	39.2 \pm 1.6
4	1	2.5	3	196.6 \pm 6.6	0.097 \pm 0.049	37.6 \pm 3.8
5	1	3.5	3	205.5 \pm 3.1	0.214 \pm 0.145	39.2 \pm 2.3
6	1.5	5	3	228.0 \pm 1.6	0.171 \pm 0.030	35.7 \pm 3.1
7	2	5	3	221.4 \pm 4.1	0.178 \pm 0.019	36.3 \pm 2.8
Nanoesferas						
% Polímero	% Agente estabilizante	Diámetro promedio \pm DE (nm)	IP \pm DE	ζ promedio \pm DE (mV)		
2	3	183.4 \pm 3.7	0.144 \pm 0.065	20.9 \pm 4.4		

El valor positivo del potencial promedio de los lotes de nanopartículas preparados se debe a la carga positiva de las cadenas poliméricas de Eudragit, copolímero catiónico basado en metacrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo, y al uso de un agente estabilizador no iónico (Wu et al., 2011). La estructura química de este polímero se muestra en la figura 14.

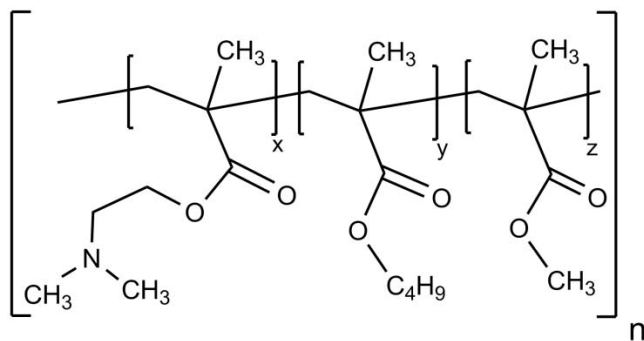


Figura 14. Estructura química del polímero Eudragit E100.

Los valores de potencial ζ para las 7 formulaciones evaluadas se encuentran en el rango de 35.7 a 39.2 mV, lo que resultan en una buena estabilidad para estas suspensiones (Wu et al., 2011).

En la comparación entre los sistemas nanoparticulados, se observa que el diámetro promedio de las nanoesferas es menor al de las nanocápsulas preparadas bajo la misma formulación. Estas diferencias en tamaño coinciden con los resultados obtenidos por Schaffazick et al. (2003) para nanocápsulas y nanoesferas obtenidas a partir de Eudragit S90, y a los tamaños generalmente obtenidos para ambos sistemas, descritos en la literatura, debido a sus diferencias estructurales (Letchford y Burt, 2007).

Por otra parte, el valor absoluto de potencial ζ de las nanoesferas es menor respecto al valor observado en nanocápsulas con la misma formulación. Esta diferencia se puede deber a una mayor interacción del PVA con el Eudragit en la superficie de las nanoesferas formando una capa firmemente unida que provoca la disminución en la movilidad electroforética, conduciendo a la disminución del potencial ζ en la nanoesferas (Quintanar-Guerrero, et al. 1998).

Debido a la buena estabilidad de los lotes preparados de nanocápsulas, para las pruebas de liberación se seleccionó la formulación número 7 (2% polímero, 5% aceite, 3% agente estabilizante) porque es aquella que contiene los mayores porcentajes de aceite y polímero (entre los evaluados) capaces de disolver y encapsular una mayor cantidad de ibuprofeno.

7.4 Porcentaje de encapsulación

En la tabla 9 se muestra el resultado promedio del porcentaje de encapsulación de ibuprofeno en nanoesferas. Este porcentaje en nanoesferas depende, entre otras variables, de las concentraciones de polímero y fármaco (Sharma et al., 2014). Se puede esperar que a mayor concentración de polímero haya un mayor porcentaje de encapsulación debido a una mayor cantidad de polímero disponible para el encapsulamiento. Por el contrario, una mayor cantidad de fármaco puede superar la capacidad de encapsulamiento del polímero. Además, según Barichello et al. (1999), cuando el fármaco tiene una baja afinidad para el polímero, tiende a difundirse desde la fase orgánica al medio acuoso externo durante el proceso de formación de nanoesferas, dando lugar a bajas capacidades de carga de fármaco.

Tabla 10. Porcentaje de entrapamiento/encapsulamiento de nanopartículas.

Sistema	% Entrapamiento/encapsulación \pm DE
Nanoesferas	43.2 \pm 0.9
Nanocápsulas	No determinado

El porcentaje de encapsulación de fármaco en nanocápsulas no pudo ser determinado debido a que el método de centrifugación empleado no permitió separar de manera adecuada el sobrenadante de las nanopartículas. En este sistema no se forma un sedimento a diferencia de las nanoesferas por lo que la separación por decantación no fue posible. Se espera que el porcentaje de encapsulación sea muy alto (>75%) de acuerdo a lo reportado para el método de emulsión-difusión (Mora-Huertas et al., 2010) y por lo tanto mayor al obtenido en nanoesferas debido a que el porcentaje de fármaco encapsulado en las

nanocápsulas se correlaciona con la solubilidad del fármaco en el núcleo de aceite (Teixeira et al., 2005).

7.5 Densidad de las nanopartículas

La figura 15 muestra las posiciones de las bandas obtenidas para los sistemas de nanopartículas evaluados en un gradiente de densidad. Cada una de las líneas corresponde a un marcador de densidad. Los valores de densidad que se muestran en la figura los provee el fabricante de las perlas marcadoras. El orden de estos marcadores está relacionado con su densidad en un gradiente de Percoll. Aquellos marcadores más densos presentan una mayor distancia recorrida a partir del menisco (menor altura respecto al fondo).

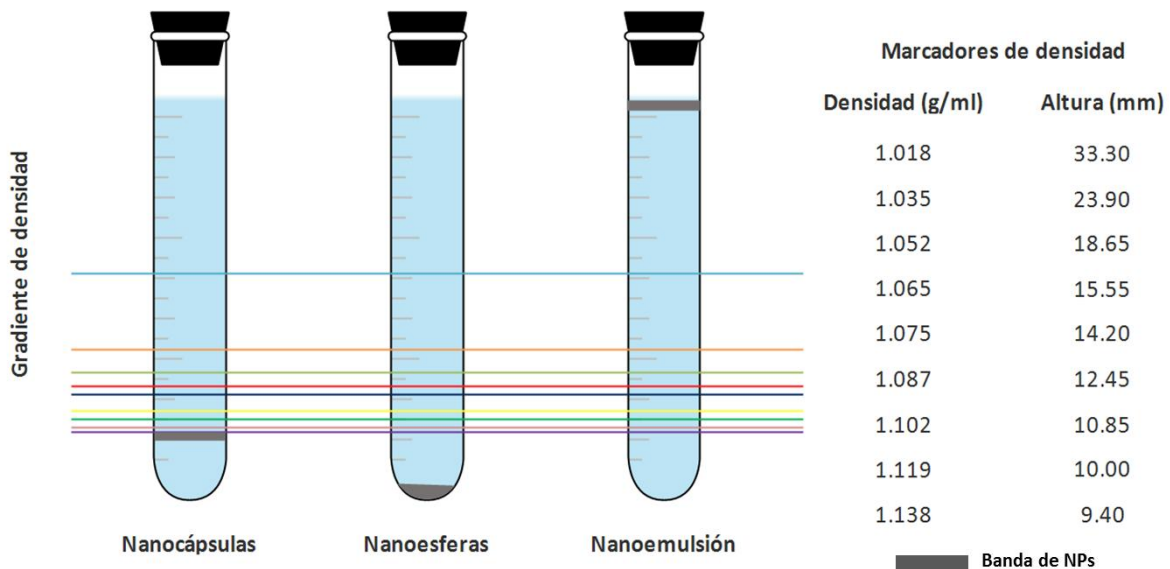


Figura 15. Representación esquemática de la determinación de densidad de los sistemas nanoparticulados preparados.

Se puede observar que la banda de densidad correspondiente a las nanocápsulas es intermedia a aquellas bandas de densidad que presentan las nanoesferas y la

nanoemulsión preparadas bajo las mismas condiciones. Para el sistema de nanoemulsión la banda permanece en el punto de aplicación mientras que para el sistema de nanoesferas se forma un sedimento. Esto sugiere que se lleva a cabo la adecuada formación de las nanocápsulas, las cuáles son menos densas que las nanoesferas debido al núcleo oleoso que encapsulan pero más densas que la emulsión debido a la membrana polimérica formada. La formación del sedimento en el tubo de nanoesferas se debe a la estructura compacta de este sistema compuesto únicamente de polímero y fármaco desolvatados. Además, este resultado indica que la densidad de las nanoesferas se encuentra más allá del gradiente de densidad formado durante la centrifugación por lo que no se puede obtener un valor confiable de densidad por extrapolación para este sistema. Por otra parte, la banda correspondiente a la nanoemulsión, compuesta por glóbulos de aceite en suspensión, no presentó migración a través del gradiente debido a la menor densidad del aceite respecto al gradiente de Percoll formado.

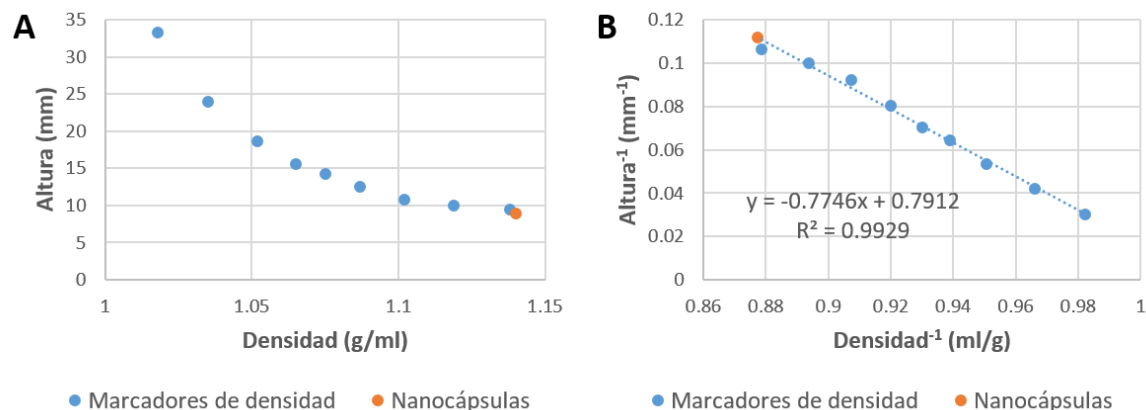


Figura 16. Análisis para la determinación de la densidad de nanocápsulas. A) Relación de la altura de los marcadores en función de la densidad B) Regresión de dobles recíprocos.

La densidad determinada, a partir del análisis con los marcadores coloreados de densidad, para el sistema de nanocápsulas fue de **1.140 g/mL** (figura 16). La presencia de una única banda de densidad indica un alto rendimiento en la formación de las nanocápsulas.

7.6 Pruebas previas a la validación del método analítico

Se realizó un barrido en un rango de 200 a 400 nm para determinar la lambda máxima de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) de ibuprofeno para su cuantificación en solución amortiguadora de fosfatos (figura 17). El pico de máxima absorción, a la concentración del analito (300 $\mu\text{g/ml}$) se encontró a 265.0 nm.

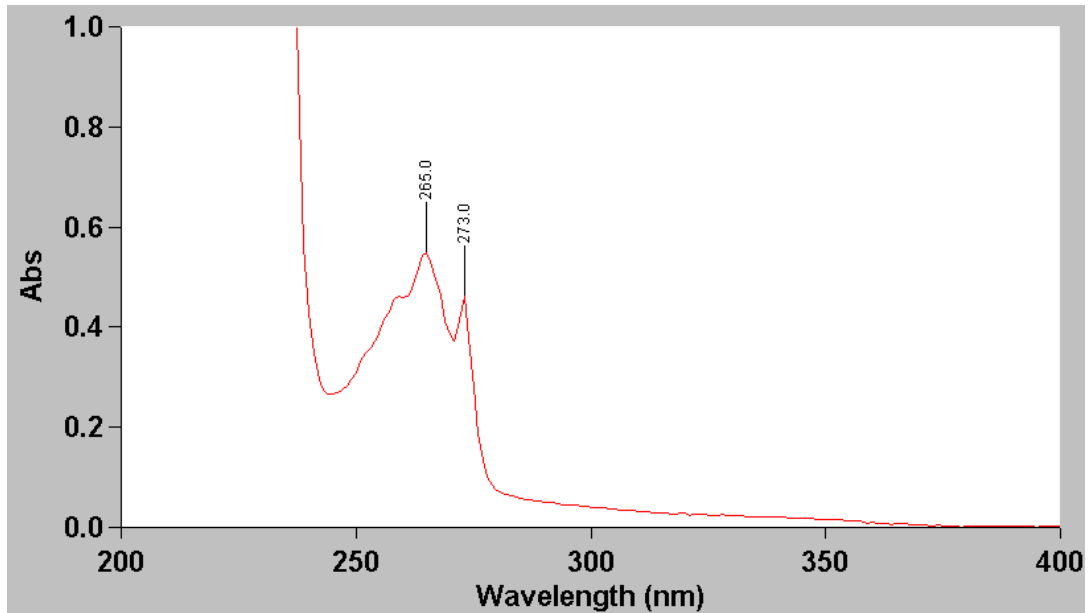


Figura 17. $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción de IBP en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.6 ± 0.1).

La figura 18 muestra la prueba de especificidad donde se verificó, por comparación, que el resto de los componentes solubles en el medio de liberación (solución amortiguadora de fosfatos) no interfieren en la cuantificación del ibuprofeno a la $\lambda_{\text{máx}}$ seleccionada.

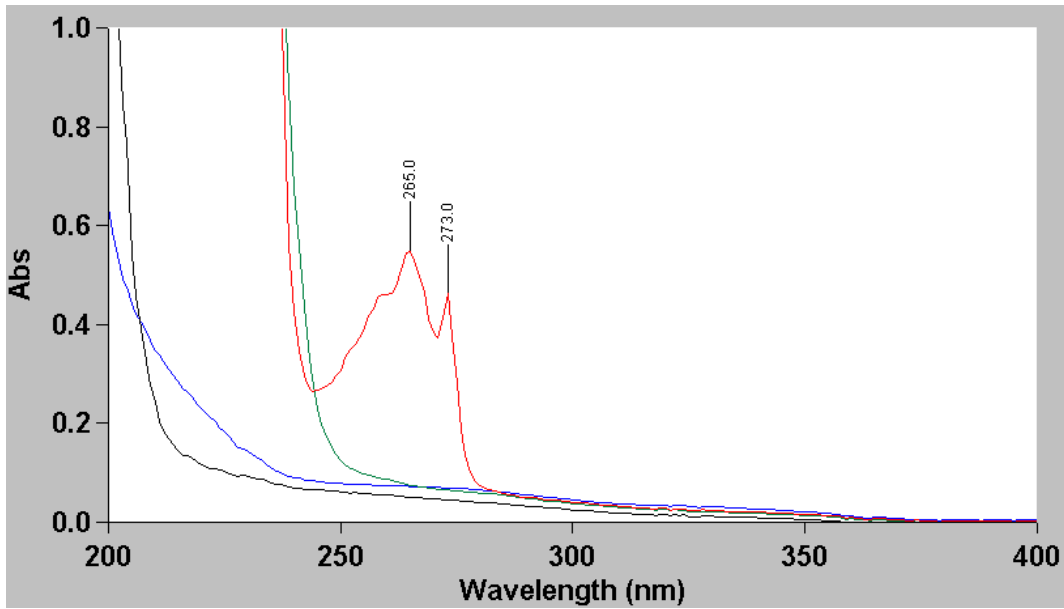


Figura 18. Prueba de especificidad. Ibuprofeno (línea roja), acetato de etilo (línea verde), alcohol polivinílico (línea azul), solución amortiguadora de fosfatos (línea negra).

La tabla 10 muestra el resultado del estudio de linealidad del sistema analítico. El criterio de aceptación establecido para este parámetro evaluado fue un coeficiente de correlación mayor que 0.99. Se observa que los coeficientes calculados para las tres curvas preparadas así como para el promedio cumplen con este criterio.

Tabla 11. Resultados del estudio de linealidad.

[IBP] µg/mL	Absorbancia a 265 nm		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
80	0.1134	0.1322	0.1267
150	0.2190	0.2423	0.2498
300	0.4535	0.4625	0.4912
450	0.6690	0.6836	0.7249
600	0.9064	0.9214	0.9659
Pendiente (m)	0.0015	0.0015	0.0016
Ordenada (b)	-0.0078	0.0121	0.0047
Coefficiente de correlación (r)	0.9999	0.9999	0.9999

Para el estudio de precisión se obtuvo un coeficiente de variación (%CV) de todas las mediciones realizadas a las tres muestras preparadas (tabla 11). Es criterio de aceptación establecido fue de un % CV menor a 3.0.

Tabla 12. Resultados del estudio de precisión.

Repetición	Muestra 1 (µg/mL)	Muestra 2 (µg/mL)	Muestra 3 (µg/mL)
1	288.87	287.21	297.45
2	289.41	288.83	297.95
3	288.31	294.14	295.12
4	291.07	283.90	294.08
5	287.18	286.15	293.69
6	292.32	284.17	296.12
Promedio	290.89		
Desviación Estándar	4.40		
%CV	1.51		

Para el estudio de repetibilidad se obtuvo un %CV para cada concentración de analito probado. La tabla 12 muestra estos coeficientes los cuáles cumplen con el criterio de aceptación establecido (%CV < 3.0).

Tabla 13. Resultados de repetibilidad del método analítico.

%	Concentración (µg/mL)			Promedio	DE	%CV
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3			
50	151.36	153.56	147.97	150.96	2.82	1.86
100	280.37	291.59	295.95	289.30	8.04	2.78
150	427.31	429.66	423.95	426.97	2.87	0.67

Con los resultados del estudio de precisión intermedia se obtuvo un solo % CV correspondiente a las mediciones de ambos analistas (tabla 13). Este coeficiente cumple con el criterio establecido ($\% CV < 3.0$).

Tabla 14. Resultados del estudio de precisión intermedia.

Muestra	Concentración (µg/mL)	
	Analista 1	Analista 2
1	290.88	289.45
2	291.59	291.44
3	290.53	291.03
Promedio	290.82	
Desviación Estándar	0.77	
%CV	0.27	

7.7 Evaluación de membrana de diálisis

Debido a las dos barreras difusionales que comprende el método de liberación *in vitro* empleado se evaluó el impacto de la membrana de diálisis en la cinética de liberación de ibuprofeno a partir de las nanopartículas preparadas. La figura 19 muestra el perfil de difusión del ibuprofeno en disolución a través de la membrana así como los perfiles de liberación promedio obtenidos de los sistemas evaluados. Se puede observar que no hay similitud en las tres curvas mostradas además que

la difusión del fármaco ya en disolución se presenta de manera más rápida (>70% en 2 horas) lo que sugiere que la membrana de diálisis no representa una resistencia significativa a la difusión del fármaco. La opinión generalizada es que mediante la demostración de que la difusión del fármaco libre a través de la membrana de diálisis se produce más rápidamente que el perfil de liberación medido del fármaco en los nanoacarreadores, las especificaciones de la membrana de diálisis son apropiadas para la prueba de liberación.

Moreno-Bautista y Tam (2011) demostraron que el método de membrana de diálisis usado para la medición *in vitro* de la liberación de fármacos a partir de partículas coloidales puede proporcionar una indicación general de si la liberación del fármaco de las partículas coloidales es rápida o lenta. También se puede usar para comparar dos o más formulaciones. Sin embargo, el perfil de liberación resultante no debe presentarse como el verdadero perfil de liberación *in vitro* a menos que se haya demostrado matemáticamente que la liberación del fármaco es suficientemente lenta para que su medición no se vea afectada por la membrana de diálisis.

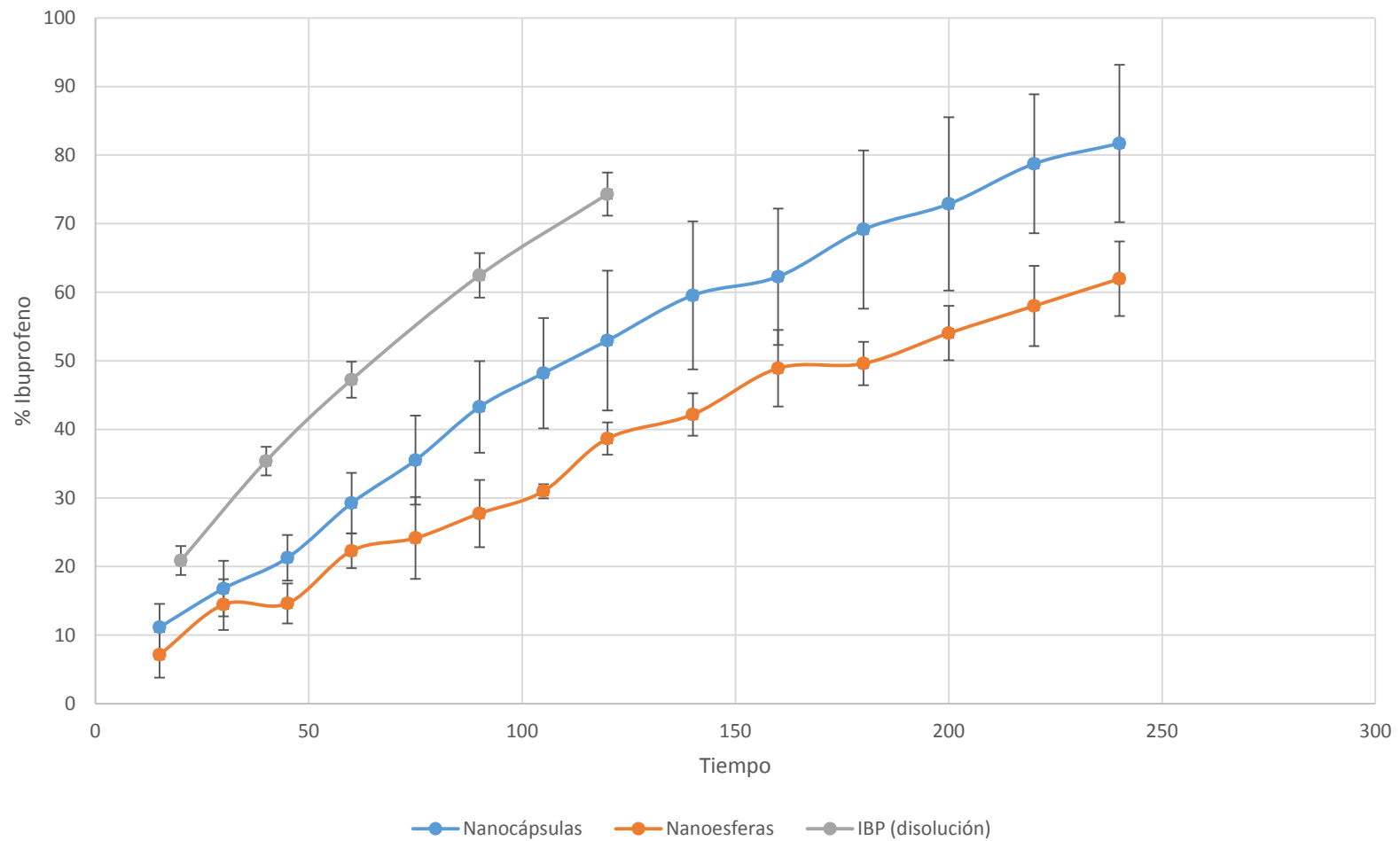


Figura 19. Comparación del perfil de difusión de ibuprofeno a través de la membrana de diálisis y de los perfiles de liberación promedio de nanoesferas y nanocapsulas.

7.8 Evaluación de los perfiles de liberación de ibuprofeno

En la figura 19 se muestran los perfiles de liberación promedio de los sistemas nanoparticulados preparados. El 100% de ibuprofeno corresponde a la cantidad total teórica contenida en cada bolsa de diálisis. El porcentaje de ibuprofeno liberado al finalizar 4 h de muestreo fue de $81.7\% \pm 11.5\%$ y $62.0\% \pm 5.4\%$ para las formulaciones de nanocápsulas y nanoesferas, respectivamente.

La evaluación estadística de los perfiles de liberación se realizó mediante prueba de *t de Student* a tres diferentes tiempos: 60, 105 y 220 minutos correspondientes al 25%, 50% y 75% de la cantidad teórica de ibuprofeno liberado, respectivamente, a partir de nanocápsulas. En el anexo II se muestran los resultados de este análisis estadístico. Se determinó que a los tres tiempos evaluados existe una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de ibuprofeno liberado entre nanocápsulas y nanoesferas siendo más rápida la liberación para el primer sistema. Estas diferencias en las velocidades de liberación se pueden deber a las diferencias estructurales de las nanopartículas, que en el caso de las NEs, el polímero que dispersa al fármaco en la matriz prolonga la liberación del fármaco debido al aumento en el tiempo de la distancia de difusión.

Por otra parte, se evaluaron las diferencias entre los perfiles de liberación de ibuprofeno en los sistemas nanoparticulados mediante el análisis con los modelos matemáticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

La figura 20 muestra el análisis del perfil de liberación promedio de ibuprofeno, a partir de nanocápsulas, mediante el método dependiente de modelo. Se puede observar que el modelo al que más se ajusta el perfil, de acuerdo al criterio establecido (coeficiente de correlación R^2 más cercano a 1), es el modelo de orden cero aunque los datos se ajustan adecuadamente al modelo de orden uno, esto puede deberse a la naturaleza del polímero utilizado y a que el mecanismo principal de liberación del fármaco es la difusión. El modelo de orden cero indica que la cantidad de fármaco liberada es independiente de la concentración pues libera la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo. Este tipo de cinética es ideal para lograr una acción farmacológica prolongada (Lee y Yeo, 2014). Este resultado coincide con lo esperado para este sistema nanoparticulado donde la membrana polimérica representa la barrera de difusión del fármaco desde el núcleo oleoso.

Para las nanocápsulas, la liberación del fármaco procede por partición desde el reservorio hacia la membrana polimérica, seguido por difusión a través de la membrana hacia el medio de liberación. En tanto que la saturación del fármaco se mantenga en el núcleo, habrá un gradiente de concentración a través de la membrana, y la liberación procederá a una velocidad constante.

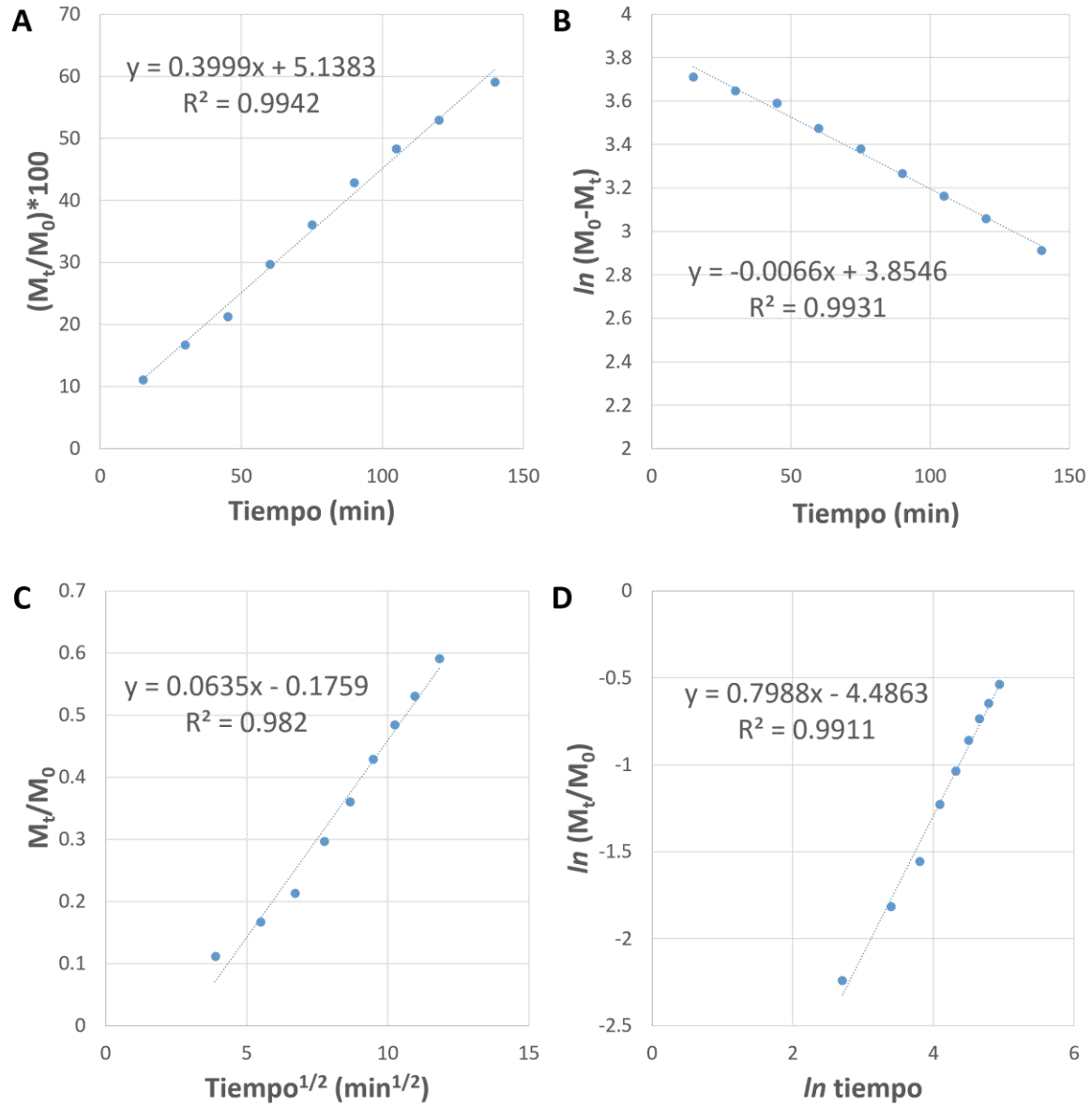


Figura 20. Análisis de los perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de nanocápsulas mediante los modelos matemáticos de A) orden cero; B) primer orden; C) Higuchi; y D) Korsmeyer-Peppas.

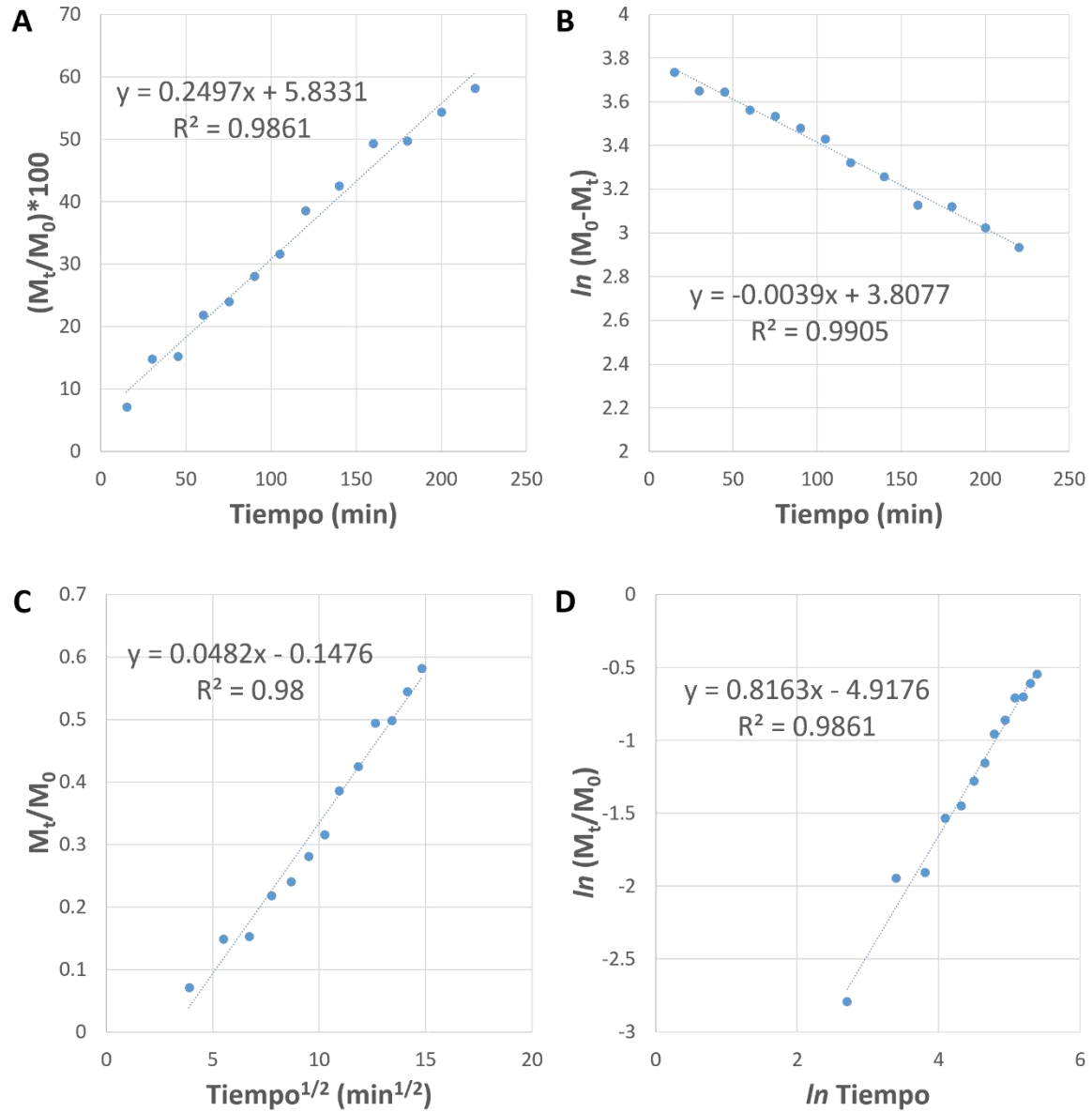


Figura 21. Análisis de los perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de nanoesferas mediante los modelos matemáticos de A) orden cero; B) primer orden; C) Higuchi; y D) Korsmeyer-Peppas.

Por otra parte, la figura 21 muestra el análisis del perfil de liberación de ibuprofeno a partir de nanoesferas donde el modelo al que más se ajustó la cinética de liberación es el modelo de primer orden. Esto indica que la cantidad de ibuprofeno liberado es proporcional a la cantidad de fármaco remanente en el interior de las partículas. De acuerdo a Mulye y Turco (1995), este modelo es seguido por matrices porosas con fármacos solubles en agua. Esto coincide con nuestro sistema si consideramos que el IBP es muy soluble en el medio debido a que se encuentra ionizado (pK_a 4.91) en el pH seleccionado (7.6).

Los valores del coeficiente de liberación (n) determinados mediante el modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas para NCs y NEs son 0.799 y 0.816, respectivamente. Estos valores son similares entre sí y coinciden con resultados reportados en la literatura con formulaciones que incluyen Eudragit E100 (Ritu y Meenakshi, 2013). Estos valores indican que los sistemas siguen un mecanismo de liberación por difusión anómala (no Fickiana) que se refiere a una liberación combinada controlada por los fenómenos de difusión del fármaco desde la matriz, así como el hinchamiento y erosión de la matriz (Tabla 5) (Peppas, 1985). Esto se puede explicar debido a las propiedades del polímero. El Eudragit E100 es un polímero soluble a valores de pH menores a 5 pero hinchable y permeable por encima de este pH (Anexo I). En el caso de las nanocápsulas, la disminución en el gradiente de concentración y el aumento en la distancia de difusión dan lugar a una disminución en la velocidad de transporte del fármaco que puede ser contrarrestado por el aumento de la porosidad resultante del hinchamiento y la erosión, lo que lleva a un aumento de la velocidad de transporte y da como

resultado una cinética de orden cero aparente. En el caso de las NEs, el polímero de la matriz donde el fármaco se encuentra disperso, debido a sus características de hinchamiento, forma una capa de gel que controla la penetración del agua y la difusión del fármaco. En los sistemas del tipo matricial, no hay una membrana que funcione como una barrera a la difusión, por lo tanto, en este sistema se muestra una alta liberación inicial seguida por una disminución en la velocidad de liberación con el incremento en la distancia de difusión para las moléculas localizadas en el centro del acarreador.

8.0 CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanocápsulas y nanoesferas poliméricas por el método de emulsión-difusión, con una formulación seleccionada para las pruebas de liberación con 2% p/v de polímero (Eudragit® E100), 5% v/v de aceite (ácido oleico), 3% p/v de agente estabilizador (PVA).

Todos los lotes preparados de NPs presentaron un tamaño de partícula a escala nanométrica con una distribución de tamaño bastante estrecha ($IP < 0.5$) y buena estabilidad ($\zeta > 30$ mV).

La densidad de las nanocápsulas preparadas fue de 1.140 g/mL siendo intermedia a las densidades de nanoesferas (mayor) y nanoemulsión (menor). Esto demostró las diferencias estructurales entre los sistemas nanoparticulados, su adecuada formación y alto rendimiento.

Las pruebas realizadas para la validación del método de cuantificación de ibuprofeno a partir de NPs cumplen con los criterios establecidos.

El método de membrana de diálisis para la evaluación *in vitro* de los sistemas preparados resultó ser adecuado para realizar el estudio comparativo debido a que no representa una resistencia a la difusión del fármaco hacia el medio de liberación.

Se demostró estadísticamente que existen diferencias significativas entre los perfiles de liberación de nanocápsulas y nanoesferas preparadas con la misma formulación, misma cantidad de ibuprofeno y mismo método de preparación, mediante prueba *t de Student*.

Las cinéticas de liberación de ambos sistemas se ajustan a diferentes modelos matemáticos evaluados. La cinética de liberación correspondiente a nanocápsulas sigue el modelo de orden cero mientras que para nanoesferas la cinética se ajustó al modelo de primer orden. Estas diferencias en las cinéticas de liberación se debieron a las diferencias estructurales entre ambos sistemas nanoparticulados.

El mecanismo difusional determinado para ambos sistemas de nanopartículas, de acuerdo al coeficiente n del modelo semi-empírico de Korsmeyer- Peppas fue de difusión anómala (no Fickiana) controlada por fenómenos de difusión del fármaco e hinchamiento del polímero al pH seleccionado. Esta similitud en los coeficientes se debe a la naturaleza del polímero y coinciden con resultados descritos en la literatura.

9.0 PERSPECTIVAS

Se propone la evaluación de los perfiles de liberación de nanopartículas preparadas a partir de otros polímeros como pueden ser la PCL o el PLA los cuales puedan exhibir diferentes cinéticas de liberación, y por lo tanto, diferentes mecanismos asociados a sus distintas propiedades físicas (solubilidad, temperatura de transición vítrea, etc.).

Proponer o desarrollar un método alternativo para la determinación del porcentaje de encapsulación y determinar la influencia de este parámetro en los perfiles de liberación.

Evaluar de los perfiles de liberación mediante diferentes métodos *in vitro* y determinar las ventajas y desventajas que proveen para los sistemas de nanopartículas preparados.

Concluir la validación del método analítico empleado para la cuantificación del fármaco modelo

Emplear un método más sensible y específico para la cuantificación de ibuprofeno u otro fármaco lipófilo, como puede ser la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

10.0 BIBLIOGRAFÍA

- Baker, R. W., & Lonsdale, H. S. (1974). Controlled release: mechanisms and rates. In A. C. Tanquary & R. E. Lacey (Eds.), *Controlled Release of Biologically Active Agents* (pp. 15–71). New York: Plenum Press.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(4), 471–6. <http://doi.org/10.1081/DDC-100102197>
- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(5), 530–6. <http://doi.org/10.1021/js950474+>
- Cauchetier, E., Deniau, M., Fessi, H., Astier, A., & Paul, M. (2003). Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1), 273–281. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00556-2](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00556-2)
- Cetin, M., Atila, A., & Kadioglu, Y. (2010). Formulation and in vitro characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1250–6. <http://doi.org/10.1208/s12249-010-9489-6>
- Costa, F. O., Sousa, J. J. S., Pais, A. A. C. C., & Formosinho, S. J. (2003). Comparison of dissolution profiles of Ibuprofen pellets. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 89(2), 199–212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711444>
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297896>
- D'Souza, S. (2014). A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2014/304757>
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., & Axelsson, A. (2011). The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1-2), 34–52. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>

- Gibaldi, M., & Feldman, S. (1967). Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(10), 1238–1242. <http://doi.org/10.1002/jps.2600561005>
- Gibaldi, M., & Perrier, D. (1982). *Pharmacokinetics* (2nd ed.). New York: Marcel Dekker.
- Graham, S. M., Carlisle, R., Choi, J. J., Stevenson, M., Shah, A. R., Myers, R. S., ... Coussios, C. C. (2014). Inertial cavitation to non-invasively trigger and monitor intratumoral release of drug from intravenously delivered liposomes. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 178, 101–7. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.016>
- Grassi, M., & Grassi, G. (2005). Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems. *Current Drug Delivery*, 2(1), 97–116. <http://doi.org/10.2174/1567201052772906>
- Heng, D., Cutler, D. J., Chan, H.-K., Yun, J., & Raper, J. A. (2008). What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? *Pharmaceutical Research*, 25(7), 1696–701. <http://doi.org/10.1007/s11095-008-9560-0>
- Herrlich, S., Spieth, S., Messner, S., & Zengerle, R. (2012). Osmotic micropumps for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14), 1617–27. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.02.003>
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of Sustained-Action Medication. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 1145–1149. <http://doi.org/10.1002/jps.2600521210>
- Hixson, A. W., & Crowell, J. H. (1931). Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation. *Industrial & Engineering Chemistry*, 23(8), 923–931. <http://doi.org/10.1021/ie50260a018>
- Hoare, T., Santamaria, J., Goya, G. F., Irusta, S., Lin, D., Lau, S., ... Kohane, D. S. (2009). A magnetically triggered composite membrane for on-demand drug delivery. *Nano Letters*, 9(10), 3651–7. <http://doi.org/10.1021/nl9018935>
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M., & Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1927), 4439–4451. <http://doi.org/10.1098/rsta.2010.0175>
- Khanna, S. C., Soliva, M., & Speiser, P. (1969). Epoxy resin beads as a

- pharmaceutical dosage form. II. Dissolution studies of epoxy-amine beads and release of drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(11), 1385–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5349755>
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](http://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- Kreuter, J. (1994). Nanoparticles. In J. Swarbrick & J. C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, vol. 10 (p. 165). New York: Marcel Dekker.
- Kreuter, J. (2004). Nanoparticles as drug delivery systems. In H. S. Nalwa (Ed.), *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 7 (pp. 161–180). Stevenson Ranch, U.S.A: American Scientific Publishers.
- Kumar, R., Nagarwal, R. C., Dhanawat, M., & Pandit, J. K. (2011). In-vitro and in-vivo study of indomethacin loaded gelatin nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(3), 325–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830472>
- Langer, R., & Peppas, N. (1983). Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 23(1), 61–126. <http://doi.org/10.1080/07366578308079439>
- Lee, J. H., & Yeo, Y. (2014). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, 125, 75–84. <http://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>
- Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 259–269. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>
- Levy, M. Y., & Benita, S. (1990). Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *International Journal of Pharmaceutics*, 66(1-3), 29–37. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90381-D](http://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90381-D)
- Lim, E.-K., Sajomsang, W., Choi, Y., Jang, E., Lee, H., Kang, B., ... Huh, Y.-M. (2013). Chitosan-based intelligent theragnosis nanocomposites enable pH-sensitive drug release with MR-guided imaging for cancer therapy. *Nanoscale*

Research Letters, 8(1), 467. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-8-467>

- Luo, Z., Cai, K., Hu, Y., Zhao, L., Liu, P., Duan, L., & Yang, W. (2011). Mesoporous silica nanoparticles end-capped with collagen: redox-responsive nanoreservoirs for targeted drug delivery. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 640–3. <http://doi.org/10.1002/anie.201005061>
- Macheras, P., & Dokoumetzidis, A. (2000). On the heterogeneity of drug dissolution and release. *Pharmaceutical Research*, 17(2), 108–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751023>
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113–142. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Moreno-Bautista, G., & Tam, K. C. (2011). Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389(1-3), 299–303. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.07.032>
- Mulye, N. V., & Turco, S. J. (1995). A Simple Model Based on First Order Kinetics to Explain Release of Highly Water Soluble Drugs from Porous Dicalcium Phosphate Dihydrate Matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21(8), 943–953. <http://doi.org/10.3109/03639049509026658>
- Murthy, R. S. R. (2009). In Vitro Evaluation of NPDDS. In Y. Pathak & D. Thassu (Eds.), *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization* (pp. 156–168). New York: Informa Healthcare.
- Muthu, M. S., & Singh, S. (2009). Poly (D, L-lactide) nanosuspensions of risperidone for parenteral delivery: formulation and in-vitro evaluation. *Current Drug Delivery*, 6(1), 62–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19418957>
- Parveen, S., Misra, R., & Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(2), 147–166. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
- Patravale, V. B., Date, A. a, & Kulkarni, R. M. (2004). Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(7), 827–840. <http://doi.org/10.1211/0022357023691>
- Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2, 123–131.

<http://doi.org/10.1023/A:1010067107182>

- Peppas, N. A. (1985). Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4), 110–1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4011621>
- Peppas, N. a., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 27–46. [http://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](http://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4)
- Prabaharan, M., Grailer, J. J., Pilla, S., Steeber, D. A., & Gong, S. (2009). Amphiphilic multi-arm-block copolymer conjugated with doxorubicin via pH-sensitive hydrazone bond for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 30(29), 5757–66. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.020>
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*. <http://doi.org/10.1023/a:1011934328471>
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. <http://doi.org/10.3109/03639049809108571>
- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., & Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 143(2), 133–141. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04697-2](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04697-2)
- Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D, L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *Journal of Microencapsulation*, 15(1), 107–119. <http://doi.org/10.3109/02652049809006840>
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Ritu, G., & Meenakshi, B. (2013). Influence of formulation parameters on tizanidine hydrochloride nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio*

Sciences, 4(2), 1056 – 1078.

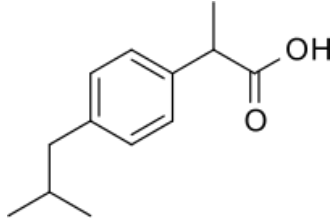
- Sanna, V., Roggio, A. M., Siliani, S., Piccinini, M., Marceddu, S., Mariani, A., & Sechi, M. (2012). Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5501–16. <http://doi.org/10.2147/IJN.S36684>
- Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Dalla-Costa, T., & Guterres, S. S. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(3), 501–505. [http://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00139-5](http://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00139-5)
- Sharma, D., Maheshwari, D., Philip, G., Rana, R., Bhatia, S., Singh, M., ... Dang, S. (2014). Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of Lorazepam using box-behnken design: in vitro and in vivo evaluation. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 156010. <http://doi.org/10.1155/2014/156010>
- Siegel, R. A., & Rathbone, M. (2012). Overview of Controlled Release Mechanisms. In J. Siepmann, R. Siegel, & M. Rathbone (Eds.), *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp. 38–39). New York: Springer.
- Si-Nang, L., Carlier, P. F., Delort, P., Gazzola, J., & Lafont, D. (1973). Determination of coating thickness of microcapsules and influence upon diffusion. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(3), 452–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4691706>
- Tagami, T., Ernsting, M. J., & Li, S.-D. (2011). Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 152(2), 303–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.009>
- Teixeira, M., Alonso, M. J., Pinto, M. M. M., & Barbosa, C. M. (2005). Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), 491–500. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.09.002>
- Thambi, T., Deepagan, V. G., Yoon, H. Y., Han, H. S., Kim, S.-H., Son, S., ... Park, J. H. (2014). Hypoxia-responsive polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 35(5), 1735–43.

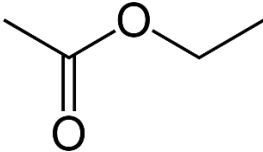
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.022>

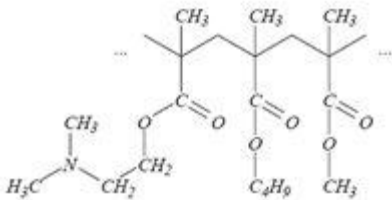
- Timko, B. P., Arruebo, M., Shankarappa, S. A., McAlvin, J. B., Okonkwo, O. S., Mizrahi, B., ... Kohane, D. S. (2014). Near-infrared-actuated devices for remotely controlled drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1349–54. <http://doi.org/10.1073/pnas.1322651111>
- Vauthier, C., Schmidt, C., & Couvreur, P. (1999). Measurement of the Density of Polymeric Nanoparticulate Drug Carriers by Isopycnic Centrifugation. *Journal of Nanoparticle Research*, 1(3), 411–418. <http://doi.org/10.1023/a:1010031605547>
- Wagner, J. G. (1969). Interpretation of percent dissolved-time plots derived from in vitro testing of conventional tablets and capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(10), 1253–1257. <http://doi.org/10.1002/jps.2600581021>
- Washington, C. (1996). Drug release from microparticulate systems. In S. Benita (Ed.), *Methods and Industrial* (pp. 155–181). New York: Marcel Dekker.
- Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 456–469. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>
- Yoo, H. S., & Park, T. G. (2001). Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 70(1-2), 63–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166408>

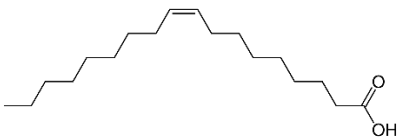
11.0 ANEXO

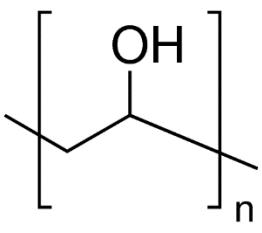
11.1 Propiedades y características de los componentes de formulación.

Ibuprofeno (C₁₃H₁₈O₂)	
El ibuprofeno es un derivado del ácido propiónico y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) con efectos antiinflamatorio, analgésico y antipirético. El ibuprofeno inhibe la actividad de la ciclooxigenasa I y II, resultando en una disminución de la formación de precursores de las prostaglandinas y tromboxanos.	
Nombre IUPAC	Ácido 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico
Peso molecular	206.28082 g/mol
Estructura química	
Disolución	Fácilmente soluble en la mayoría de disolventes orgánicos Solubilidad en agua: 21 mg/L (a 25 °C)
Punto de fusión	75-77 °C
log Kow	3.97
pKa	4.91

Acetato de etilo (C₄H₈O₂)	
El acetato de etilo es un líquido transparente e incoloro con un olor afrutado.	
Peso molecular	88.10512 g/mol
Estructura química	
Punto de ebullición	77°C
Solubilidad	Muy soluble en agua (64 g/L a 25 °C) Miscible con etanol, éter etílico; muy soluble en acetona, benceno
Densidad	0.9003 g/mL a 20 °C

Eudragit® E 100	
Eudragit E100 es un copolímero catiónico basado en metacrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo.	
Descripción física	Se compone de gránulos incoloros o teñidos de color amarillo con un olor característico similar a una amina.
Estructura química	
Disolución	Soluble en fluido gástrico hasta pH 5.0 Hinchables y permeables por encima de pH 5.0
Masa molar promedio	Aprox. 47.000 g / mol
Temperatura de transición vítrea (Tg):	45 ° C (± 5 ° C)

Ácido oleico (C₁₈H₃₄O₂)	
El ácido oleico es un ácido graso insaturado. Es el ácido graso más ampliamente distribuido y abundante en la naturaleza. Se utiliza comercialmente en la preparación de oleatos y lociones, y como disolvente farmacéutico.	
Nombre IUPAC	ácido (Z)-octadec-9-enoico
Peso molecular	282.46136 g/mol
Estructura química	
Descripción física	El ácido oleico es un líquido incoloro a amarillo pálido con un olor suave.
Solubilidad	Prácticamente insoluble en agua; soluble en cloroformo, éter, alcohol, benceno.
Punto de ebullición	286 ° C a 100 mm Hg
Densidad	0.895 a 25 ° C

Mowiol 4-88	
Alcohol polivinílico (PVA)	
Peso molecular	~31000
Aspecto	Forma cristalina, incoloro
Estructura química	
Punto de fusión	300 °C
Solubilidad	Soluble en agua

11.2 Resultados de los perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de nanocápsulas y nanoesferas.

Nanocápsulas

Tiempo (min)	%IBP liberado												Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
15	14.71	14.53	9.23	10.19	6.55	7.71	7.47	8.66	10.09	13.40	16.72	13.85	11.09	3.38
30	15.77	19.23	17.21	20.84	13.07	11.36	13.02	11.64	20.86	16.81	23.81	16.74	16.70	3.97
45	26.41	25.85	21.29	23.97	19.13	17.80	16.63	17.96	19.83	21.37	23.17	21.97	21.28	3.16
60	35.29	34.68	31.41	32.08	22.77	22.87	29.37	23.22	25.72	29.77	31.32	37.66	29.68	5.08
75	39.04	41.12	35.52	38.87	27.98	28.45	27.77	30.18	33.85	43.46	42.48	43.47	36.02	6.21
90	52.61	48.31	45.07	49.04	35.69	35.15	36.52	34.95	39.70	46.86	49.52	40.82	42.85	6.44
105	56.43	61.50	52.09	54.82	38.88	40.82	42.36	45.11	45.34	46.13	50.27	47.06	48.40	6.78
120	63.61	68.13	60.87	63.96	44.36	46.60	42.08	44.54	48.95	50.98	51.07	51.42	53.05	8.82
140	75.34	71.37	67.23	68.11	50.14	50.97	49.17	52.75	55.26	57.80	58.65	52.76	59.13	9.06
160	76.11	72.60	72.01	67.10	53.33	54.18	57.14	56.61	58.59	56.69	59.80	61.11	62.11	7.82
180	84.03	82.43	80.05	82.18	59.00	61.65	60.02	60.64	62.89	65.24	67.03	64.86	69.17	9.90
200	90.65	88.55	82.65	80.91	62.61	65.68	63.00	63.95	67.19	68.10	67.39	74.26	72.91	10.19
220	98.70	89.57	82.94	84.72	74.91	70.64	74.95	68.62	70.37	73.15	73.31	75.08	78.08	9.07
240	96.78	97.04	90.97	93.44	70.79	76.86	75.18	77.91	74.25	77.30	76.04	82.70	82.44	9.47

Nanoesferas

Tiempo (min)	%IBP liberado												Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
15	6.37	8.38	13.78	9.56	1.60	4.80	3.66	3.24	12.27	6.79	6.59	7.96	7.08	3.60
30	15.11	18.61	16.57	16.43	8.17	10.04	12.38	10.72	19.59	16.26	13.46	20.41	14.81	3.91
45	12.96	13.04	12.98	17.35	10.27	11.85	16.58	12.75	16.68	21.76	15.57	20.89	15.22	3.57
60	17.74	19.97	23.02	16.34	20.37	25.49	18.65	21.80	25.59	23.51	26.24	22.81	21.79	3.23
75	25.74	28.59	33.59	25.82	17.11	17.16	18.58	18.84	23.63	29.97	23.12	25.93	24.01	5.31
90	30.69	35.70	30.72	29.71	21.44	22.88	23.48	30.36	27.94	29.25	27.60	27.07	28.07	3.99
105	30.65	30.08	34.19	30.82	27.24	29.67	32.51	31.56	30.67	34.30	29.65	37.73	31.59	2.76
120	38.99	36.70	40.73	42.87	37.65	42.51	42.70	38.21	35.46	38.58	34.68	33.44	38.54	3.18
140	43.81	47.60	44.47	45.88	43.63	40.12	42.64	44.73	36.58	41.70	39.05	39.40	42.47	3.19
160	55.47	55.57	53.98	53.65	45.86	47.70	49.42	51.72	43.22	43.69	45.24	47.09	49.38	4.55
180	50.75	50.78	53.31	49.34	50.86	50.59	52.31	56.55	42.93	46.74	48.16	45.19	49.79	3.67
200	55.99	55.36	59.58	56.95	55.35	57.46	53.98	59.72	50.94	50.41	47.24	50.13	54.43	3.97
220	61.39	64.02	58.60	64.52	60.40	61.16	62.73	58.81	48.65	53.35	51.73	52.88	58.19	5.25
240	66.85	61.83	65.44	63.43	63.36	69.77	63.26	63.34	50.70	57.03	59.40	56.09	61.71	5.19
270	73.79	74.59	82.42	75.16	68.54	71.12	70.14	68.25	56.09	58.00	60.47	64.10	68.56	7.75
300	86.08	84.77	86.51	81.20	74.53	73.76	74.18	74.76	58.31	64.49	69.16	81.29	75.75	8.78
330	99.01	92.31	102.25	88.54	77.81	88.52	81.11	77.35	60.86	72.63	72.60	72.56	82.13	12.22

11.3 Resultados del análisis estadístico, mediante prueba de *t de Student*, de los perfiles de liberación de NEs y NCs a diferentes tiempos de muestreo, obtenidos mediante el software *Statgraphics XVII*.

Comparación de Medias (60 minutos)

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NCs (60): 29.68 +/- 3.22458 [26.4554, 32.9046]
 Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NEs (60): 21.7937 +/- 2.05231 [19.7414, 23.846]
 Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
 suponiendo varianzas iguales: 7.88636 +/- 3.60154 [4.28482, 11.4879]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = 4.54121 valor-P = 0.000160846

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Desviaciones Estándar (60 minutos)

	NCs	NEs
Desviación Estándar	5.0751	3.2301
Varianza	25.7567	10.4336
Gl	11	11

Razón de Varianzas= 2.46864

Intervalos de confianza del 95.0%

Desviación Estándar de NCs (60): [3.59518, 8.61691]

Desviación Estándar de NEs (60): [2.28819, 5.48432]

Razones de Varianzas: [0.710665, 8.5753]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: sigma1 = sigma2

Hipótesis Alt.: sigma1 <> sigma2

F = 2.46864 valor-P = 0.1494

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Medias (105 minutos)

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NCs: 48.401 +/- 4.30924 [44.0918, 52.7102]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NEs: 31.5893 +/- 1.75167 [29.8376, 33.3409]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

sin suponer varianzas iguales: 16.8117 +/- 4.51718 [12.2945, 21.3289]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

sin suponer varianzas iguales: t = 7.95468 valor-P = 0.00000113834

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Desviaciones Estándar (105 minutos)

	NCs	NEs
Desviación Estándar	6.78224	2.75692
Varianza	45.9988	7.60063
Gl	11	11

Razón de Varianzas= 6.05197

Intervalos de confianza del 95.0%

Desviación Estándar de NCs (105): [4.80451, 11.5154]

Desviación Estándar de NEs (105): [1.95299, 4.68092]

Razones de Varianzas: [1.74223, 21.0227]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.: $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 6.05197 valor-P = 0.00587191

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Medias (220 minutos)

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NCs (220): 78.0811 +/- 5.76312 [72.318, 83.8442]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NEs (220): 58.1876 +/- 3.33785 [54.8497, 61.5254]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

suponiendo varianzas iguales: 19.8935 +/- 6.27531 [13.6182, 26.1688]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis Alt.: $\mu_1 \neq \mu_2$

suponiendo varianzas iguales: t = 6.57445 valor-P = 0.0000013018

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Desviaciones Estándar (220 minutos)

	NCs	NEs
Desviación Estándar	9.07049	5.25338
Varianza	82.2737	27.598
Gl	11	11

Razón de Varianzas= 2.98115

Intervalos de confianza del 95.0%

Desviación Estándar de NCs (220): [6.42549, 15.4006]

Desviación Estándar de NEs (220): [3.72147, 8.9196]

Razones de Varianzas: [0.858205, 10.3556]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.: $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 2.98115 valor-P = 0.0835546

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.