



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SISTEMAS POLÍMERICOS SENSIBLES A LA
PRESIÓN PARA LA LIBERACIÓN DE
DORZOLAMIDA**

TESIS

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

PRESENTA

EUNICE HERNÁNDEZ CAMARENA



Ciudad universitariam CDMX

2017



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: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

VOCAL: LORENA GARCIA GONZALEZ

SECRETARIO: CARLOS JUAREZ OSORNIO

1er. SUPLENTE: LUZ ANTONIA BORJA CALDERON

2° SUPLENTE: LUZ XOCHIQUETZALLI VASQUEZ BOCHM

**ESTE TEMA SE DESARROLLO EN LA FACULTAD DE QUÍMICA,
EDIFICIO F, CUBÍCULO 001, LABORATORIOS 002 Y 003.**

ASESOR DEL TEMA:

MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUSTENTANTE (S):

EUNICE HERNÁNDEZ CAMARENA

I. Índice	
II. Resumen	2
III. Introducción	4
IV. Antecedentes	6
4.1. Sistemas de liberación modificada	6
4.1.1. Sistemas estímulo sensibles	9
4.1.1.1. Presión hidrostática, hidrodinámica, osmótica	13
4.1.2. Películas	16
4.1.2.1. Películas estímulo sensibles	18
4.1.3. Nanopartículas	20
4.1.3.1. Nanopartículas estímulo sensibles	22
4.2. Glaucoma	24
4.3. Dorzolamida	27
4.4. Nanopartículas de dorzolamida	28
V. Hipótesis	32
VI. Objetivos	32
VII. Metodología	33
7.1. Materiales	33
7.2. Elaboración de películas	33
7.3. Caracterización de películas	34
7.4. Elaboración de nanopartículas	36
7.5. Caracterización de nanopartículas	37
7.6. Estudios de liberación de dorzolamida	38
VIII. Resultados y discusión	39
IX. Conclusiones	68
X. Perspectivas	68
XI. Referencias	69

II. Resumen

El glaucoma hace referencia a un grupo de enfermedades que tienen en común una neuropatía óptica típica que se asocia a pérdida visual. En la mayoría de los tipos de glaucoma, el sistema de drenaje del ojo se tapa y el fluido intraocular no puede drenar. Al acumularse, causa un aumento de presión en el interior del ojo que daña al nervio óptico, el cual es muy sensible, llevando a la pérdida de la visión. En la presente tesis se utilizó el aumento de presión, como estímulo, para diseñar una nueva forma farmacéutica para el tratamiento de esta patología.

Se desarrollaron dos sistemas poliméricos; Películas y nanopartículas de celulosa y/o poliortoesteres.

Las películas poliméricas se desarrollaron por el método de "film casting", utilizando como polímeros: PLGA (ácido poliláctico-glicólico) y etilcelulosa, en diferentes proporciones, cada película se caracterizó mediante las pruebas de; captación de agua, ángulo de contacto, módulo de Young, degradación, velocidad de flujo y liberación del fármaco.

La película 3 fue la que presentó mejores características, la cual estaba constituida en un 90%PLGA-10%Etilcelulosa. Su captación de agua fue constante y no aumentó significativamente con el tiempo, el ángulo de contacto obtenido fue de $68.37^{\circ} \pm 1.02^{\circ}$ lo cual muestra su capacidad de humectarse. Respecto al módulo de Young, este fue de 67.43 MPa por lo que se puede decir que es muy elástica, su degradación es homogénea y proporcional a la cantidad de PLGA que contiene. La velocidad de flujo y la liberación del fármaco fue proporcional a la presión ejercida, lo cual muestra que la película responde al estímulo de la presión.

Considerando la composición de la película 3, se fabricaron nanopartículas con la misma proporción de polímeros por el método de doble emulsión-evaporación y se caracterizaron mediante las pruebas de; tamaño de partícula, morfología (SEM), % de encapsulación y liberación del fármaco.

La doble emulsión fue estable por lo que posterior a la evaporación se obtuvieron las nanopartículas, con un tamaño de partícula menor a 295.3 nm en el 90 % de la población; siendo estas dimensiones aptas para la administración ocular. Además presentó una morfología esférica sólida. El % de encapsulación de dorzolamida fue de $86.94 \pm 5.22\%$, el cuál es un porcentaje alto para el tipo de método utilizado. El estudio de liberación del fármaco mostró un incremento de la liberación del fármaco conforme aumentaba la presión, por lo que muestra el efecto de la presión hidrostática en el sistema.

Por lo que se logró obtener dos sistemas de talla macro y nano que responden al cambio de presión. Siendo alternativas para la administración de dorzolamida de manera controlada en tratamientos contra el glaucoma.

III. Introducción

En los últimos tiempos, la tecnología farmacéutica ha dedicado sus esfuerzos a diseñar medicamentos con cierto grado de inteligencia, de tal manera que se pueda decidir desde la concepción del preparado como se dará la liberación del principio activo. En este tenor han tenido gran auge los sistemas estímulo sensibles, es decir aquellos capaces de liberar preferentemente bajo ciertas condiciones preponderantes en la enfermedad a tratar, o bien bajo estímulos externos. Probablemente el caso más estudiado sea el pH como interruptor en la liberación de fármacos antineoplásicos. Sin embargo, ésta no es la única circunstancia que puede aprovecharse para lograr una plataforma de liberación con un comportamiento “trigger” o “on/off”.

Una película está basada en capas continuas de polímeros (naturales, semi-sintéticos o sintéticos) producidas por diferentes técnicas y son ampliamente utilizadas en diferentes industrias como la alimenticia hasta la petroquímica.¹

Las nanopartículas son partículas coloidales las cuales tienen un tamaño de entre los 10 y 1000nm. Están hechas a base de materiales macromoleculares en el cual el fármaco está disuelto, atrapado o encapsulado.² Este material debe ser preferentemente biodegradable.

Por otra parte el término glaucoma designa a un grupo de enfermedades que tienen en común una neuropatía óptica típica que se asocia a pérdida visual. En la mayoría de los tipos de glaucoma, el sistema de drenaje del ojo se tapa y el fluido intraocular no puede drenar. Al acumularse, causa un aumento de presión en el interior del ojo que daña al nervio óptico, el cual es muy sensible, llevando a la pérdida de la visión.³ El tratamiento depende del tipo y del avance del glaucoma, así como la respuesta al mismo. Las gotas oftálmicas son la forma más común para tratar el glaucoma. Estos medicamentos reducen la presión del ojo de dos maneras: 1. disminuyendo la producción de humor acuoso; o 2. mejorando el flujo a través del ángulo de drenaje. Los medicamentos

utilizados para el tratamiento del glaucoma son, en primer lugar, los análogos de prostaglandinas (bimatoprost, latanoprost, travoprost) y los beta-bloqueadores (maleato de timolol), también se pueden utilizar inhibidores tópicos de la anhidrasa carbónica (brinzolamida y dorzolamida) y alfa-2-agonistas (brimonidina).⁴ La cirugía se reserva para los casos que no responden al tratamiento médico en la forma requerida, para aquellos pacientes que presenten una presión intraocular muy elevada inicialmente y en los casos con daño muy avanzado.

Según la OMS (2009), esta enfermedad es la segunda causa más común de ceguera y cerca de 4.5 millones de personas lo padecen en la actualidad, con proyecciones de 11 millones de afectados para el 2020.^{5,6}

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se desarrollaron dos sistemas poliméricos de tamaño micro y nano que respondieran al cambio de presión para la administración del fármaco.

IV. Antecedentes

4.1. Sistemas de liberación modificada

Durante muchas décadas el tratamiento para algún padecimiento o enfermedad crónica, ha consistido en el empleo de diferentes formas farmacéuticas como; tabletas, cápsulas, píldoras, supositorios, cremas, ungüentos, aerosoles, inyectables, entre otros. Sin embargo, recientemente se han hecho diferentes avances, que han desembocado en la obtención de vehículos para la liberación de fármacos. Estas técnicas son capaces de controlar la velocidad de liberación, prolongar la duración del efecto terapéutico y dirigir la liberación del fármaco hacia cierto tejido, creando así nuevos sistemas de liberación que pueden cambiar el método de medicación y presentar numerosos beneficios.⁷

Se considera como sistema de liberación, a toda aquella formulación o a un dispositivo que permite la entrada de un agente terapéutico en el cuerpo con el fin de mejorar la eficacia y seguridad controlando la velocidad, el tiempo y el sitio de la liberación del fármaco.⁸

Existen diferentes clasificaciones para los sistemas de liberación modificada, dependiendo de las características de la formulación, en la Tabla 1 se observa la correspondiente a Chien, probablemente la clasificación más aceptada, y se ilustra en la (Fig.1).

Tabla 1. Clasificación de los sistemas de liberación modificada.

Liberación con velocidad pre-programada

Liberación modulada por activación

Liberación regulada por retroalimentación

Liberación dirigida

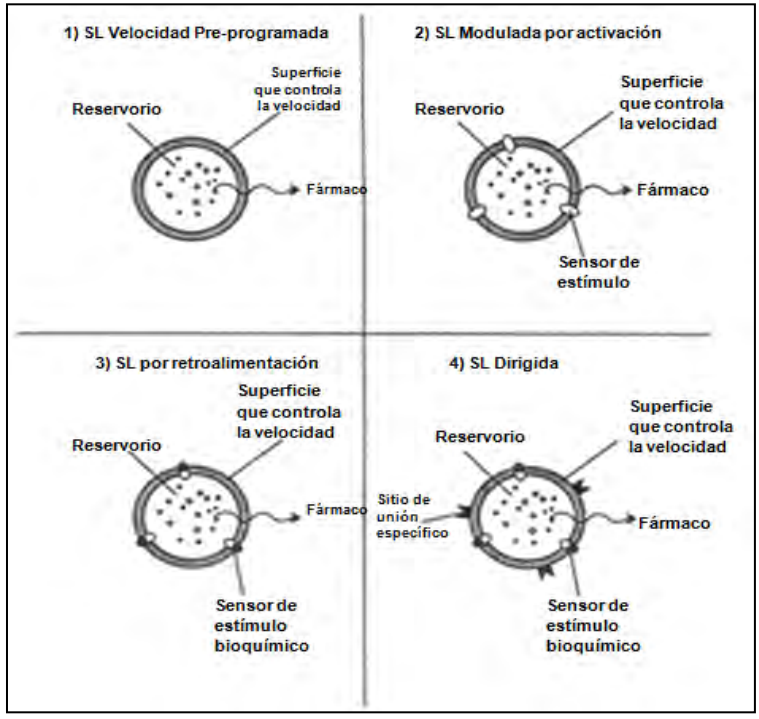


Figura 1. Clasificación de los sistemas de liberación modificada.

[CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2º Edición Informa Medical p.4 (Imagen 3)]

Liberación con velocidad pre-programada

En este tipo de sistemas la velocidad de liberación del fármaco es pre-programada específicamente. Esta velocidad se controla mediante los siguientes sistemas:

- Permeación a través de membranas poliméricas: El fármaco es total o parcialmente encapsulado en un compartimiento tipo reservorio. La superficie está cubierta por una membrana polimérica con una permeabilidad específica, que controla la liberación.
- Difusión a través de una matriz polimérica: El fármaco es dispersado homogéneamente en una matriz polimérica, ya sea hidrofílica o hidrofóbica, que controla la liberación.

- Microreservorio: El reservorio del fármaco se fabrica por microdispersión de una suspensión acuosa del fármaco en un polímero biocompatible.

Liberación modulada por activación

En esta modalidad la liberación del fármaco se presenta, cuando el sistema es estimulado a través de factores físicos, químicos o bioquímicos y/o por la energía aplicada al sistema desde el exterior. Más adelante se desglosarán cada uno de estos estímulos.

Liberación regulada por retroalimentación

La liberación del fármaco se pone en marcha gracias a la participación de un agente que puede ser una sustancia bioquímica, de la cual también su concentración regula la liberación a través del mecanismo de retroalimentación. Algunos de los sistemas que pertenecen a esta categoría son:

- Sistema regulado por bioerosión: Consiste en una matriz bioerosionable que contiene al fármaco disperso y el sustrato de una enzima, el cual es degradado o bien la matriz puede contener la enzima y reaccionar con su sustrato en el cuerpo, lo cual puede desencadenar en algún cambio en el ambiente que permita la degradación del polímero.
- Sistema regulado por una biorespuesta: El reservorio que contiene el fármaco se encuentra contenido en un dispositivo recubierto por una membrana polimérica, la cual tiene una permeabilidad que es controlada por la concentración de un agente bioquímico, proveniente del tejido donde se administró el sistema.
- Sistema autorregulado: Depende de un mecanismo de unión reversible y competitivo, que regula y activa la liberación del fármaco.

Liberación dirigida

Este sistema contiene un agente o sitio de unión específico a cierta característica del tejido enfermo, que lo direccionará al sitio de acción específico, para que libere el fármaco.

4.1.1. Sistemas de liberación estímulo sensibles

Como ya se mencionó anteriormente, los sistemas de liberación estímulo sensibles, se dividen en función de la naturaleza del agente estimulante en físicos, químicos y bioquímicos.

Sistemas activados a través de estímulos físicos:

- Activados por presión osmótica: El reservorio del fármaco, ya sea una solución o una formulación sólida, se encuentra contenida en un sistema semipermeable. El reservorio del fármaco es activado para que permita la liberación del fármaco a una velocidad constante a través de un orificio especial, la velocidad de liberación es modulada mediante el control del gradiente de presión osmótica.
- Activados por presión hidrodinámica: El reservorio es un contenedor impermeable y colapsable que contiene la formulación líquida del fármaco, este reservorio se encuentra dentro de un contenedor no deformable y con aberturas anulares, entre ambos contenedores se encuentra una capa de un polímero absorbente e hinchable (Fig.2). El fluido entra por los orificios anulares y el polímero lo absorbe, generando así una presión hidrodinámica en el sistema, esta presión reduce en volumen al reservorio, lo que provoca la liberación del fármaco a una velocidad dependiente de la permeabilidad del fluido, la pared con aberturas anulares y el gradiente de presión hidrodinámica.

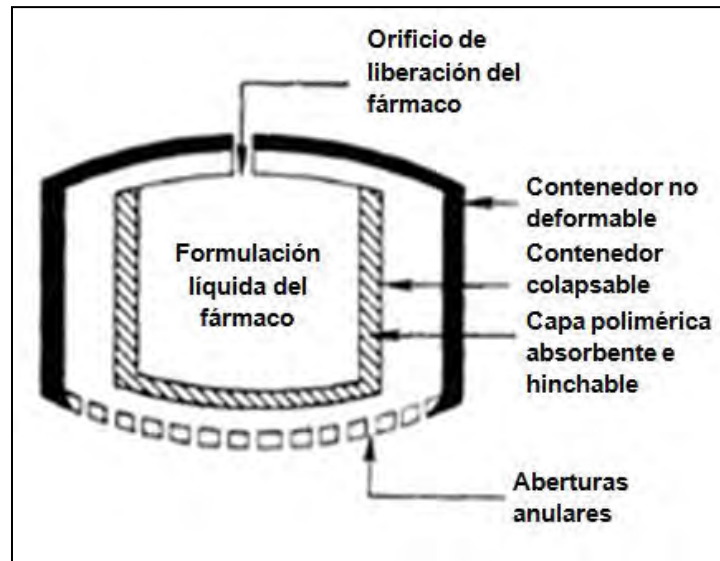


Figura 2. Sistema de liberación activado por presión.

[CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2ª Edición Informa Medical p.22 (Imagen 19)]

- Activados por presión de vapor: La formulación del fármaco se encuentra de forma líquida en el reservorio, el cual se encuentra en el compartimiento de infusión, este se encuentra físicamente separado del compartimiento de bombeo, el cual contiene un fluido de fluorocarbono que se evapora a la temperatura corporal y crea una presión de vapor. Esta presión aplica una fuerza al compartimiento de infusión, lo cual provoca la liberación del fármaco por medio de una cánula reguladora del flujo.
- Activados mecánicamente: La formulación del fármaco se encuentra en solución en el reservorio, y a su vez este se encuentra en un contenedor equipado con un sistema de bombeo que se activa mecánicamente. Así una cantidad del fármaco es liberado cuando se activa mecánicamente, un ejemplo de este tipo de sistema sería un nebulizador.
- Activados magnéticamente: El reservorio del fármaco es una dispersión de un péptido o una proteína en una matriz polimérica, en la que el fármaco puede ser liberado solamente a una baja velocidad. Esta baja velocidad puede ser mejorada incorporando un mecanismo de vibración

electromagnética en el sistema polimérico. Esto se realiza colocando nanopartículas magnéticas en el centro de la dispersión (Fig.3).

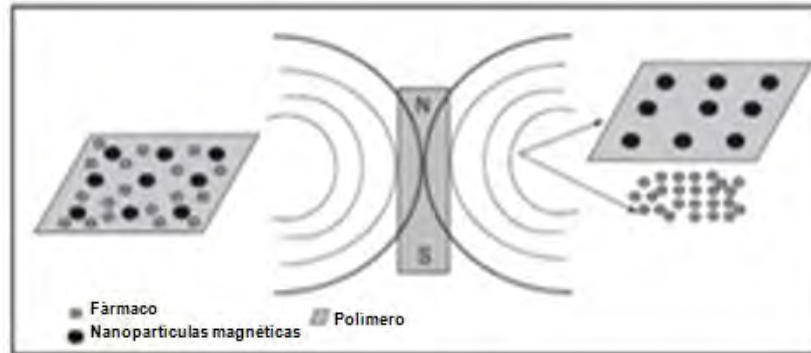


Figura 3. Sistema de liberación activado por magnetismo

[Bajpai., et al., (2010) *Stimuli Responsive Drug Delivery Systems: From Introduction to application.*

iSmithers, p.145 (figura 4.2)]

- Activados por sonoforesis: Utiliza energía ultrasónica para activar la liberación del fármaco, del dispositivo donde se encuentra. Además, este estímulo aumenta el paso de moléculas a través de una membrana biológica, como la piel.⁹
- Activados por iontoforesis: Usa corriente eléctrica para activar y modular la difusión de una molécula cargada a través de una membrana biológica, como la piel, esto ocurre de manera similar a la difusión pasiva por gradiente de concentración.
- Activado por hidratación: Es dependiente del proceso de hinchamiento debido a la hidratación. El reservorio del fármaco es dispersado homogéneamente en una matriz polimérica hinchable, fabricada con un polímero hidrofílico. La velocidad de liberación del fármaco es controlada por la velocidad de hinchamiento de la matriz polimérica.

- Activados por temperatura: Utiliza polímeros sensibles a la temperatura, los cuales a cierta temperatura pasan a través de una fase de transición, donde cambian su conformación, solubilidad y su equilibrio hidrofílico-hidrofóbico, lo cual controla su liberación.¹⁰

Sistemas activados por estímulos químicos se encuentran:

- Activados por pH: Permite dirigir la liberación hacia cierta región que tiene un pH determinado. Esto se realiza recubriendo el reservorio del fármaco con un polímero sensible a pH (Fig. 4).

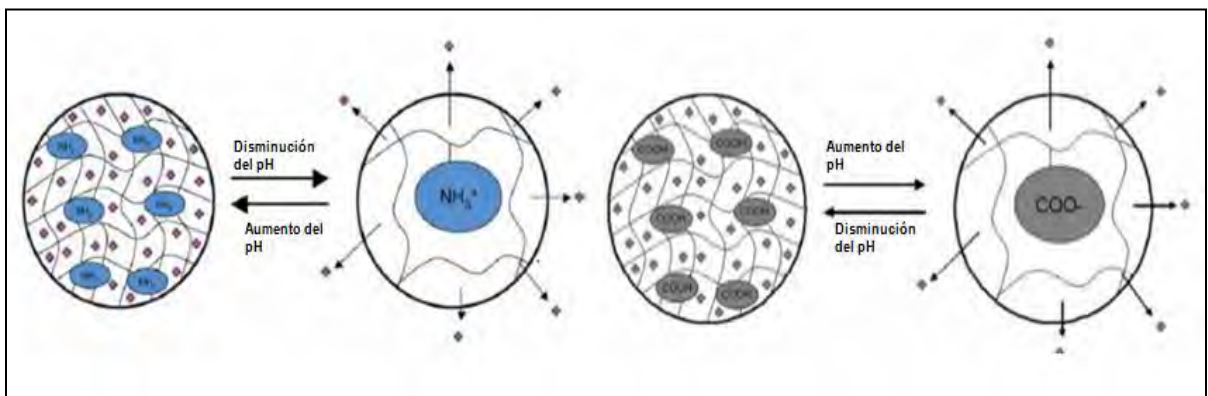


Figura 4. Sistema de liberación activado por pH.

[Almeida,H., et al., (2012) *Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug deliver*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (06); 2012: 01-10 (figura 4 y 5)]

- Activado por iones: Este sistema se prepara complejando un fármaco iónico con una resina de intercambio iónico que contenga un contra-ión. Los gránulos del complejo de fármaco-resina, se recubren con un lubricante, para disminuir el hinchamiento en el ambiente acuoso y con un polímero insoluble, pero permeable en agua. Esta membrana sirve para controlar la entrada de iones y la liberación del fármaco. En un medio iónico, como el fluido gástrico, los iones difunden en el sistema, reaccionan con el complejo de fármaco-resina y desencadenando así la liberación del fármaco.

- Activado por hidrólisis: El reservorio del fármaco es encapsulado en microcápsulas u homogéneamente dispersado en microesferas o nanopartículas por inyección. La liberación del fármaco de la matriz polimérica se da por la hidrólisis y degradación de las cadenas poliméricas, y se controla por la velocidad de degradación del polímero.

Entre los activados por estímulos bioquímicos se encuentran:

- Activado por enzimas: Depende del proceso enzimático para activar la liberación del fármaco. El reservorio del fármaco se encuentra como microesferas recubiertas, con cadenas poliméricas de biopolímeros, como albúmina o polipéptidos. La liberación del fármaco es activada por la hidrólisis enzimática de los biopolímeros, por la enzima específica en el tejido destinado.

4.1.1.1. Presión hidrostática, hidrodinámica, osmótica.

Presión hidrostática

La acción de una fuerza ejercida sobre una superficie plana, da como resultado una presión, que en el caso de un líquido, determina la existencia de numerosas fuerzas distribuidas normalmente sobre la superficie que se encuentra en contacto con el líquido. Desde el punto de vista de análisis estático, es conveniente reemplazar éstas fuerzas, por una fuerza resultante única equivalente.¹¹ Esta fuerza que ejerce el líquido contra una superficie se le conoce como presión hidrostática.

La presión hidrostática está relacionada con el Principio de Pascal, el cual menciona: “Los cambios de presión en un fluido incompresible (líquido) en equilibrio dentro de un recipiente de paredes indeformables se transmite sin alteración a todo el fluido”.¹² Lo que este principio nos da a entender es que si se ejerce una presión externa sobre una parte de la frontera de un fluido confinado compresible o incompresible, esta presión, una vez que cualquier movimiento del

fluido ha cesado, actuará sin disminución alguna en todo el fluido.¹³ En la Figura 5 se puede observar un líquido confinado en un recipiente inerte, al cual se le aplica una presión, la presión en la superficie del líquido es la misma que la presión en el fondo del líquido.

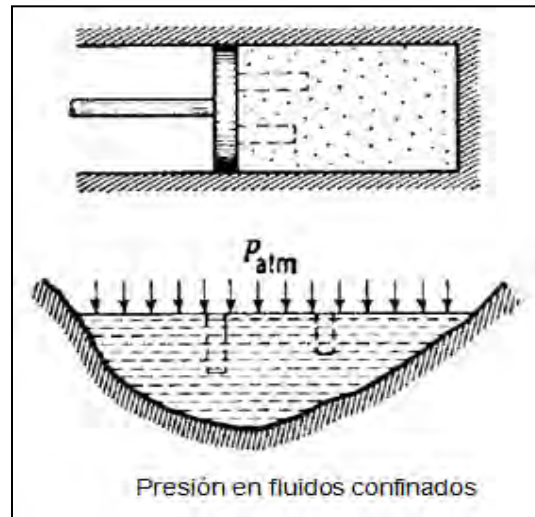


Figura 5. Presión ejercida sobre un fluido confinado.

[Shames, I., (1995) *Mecánica de Fluidos*. 3ª Edición. McGraw-Hill, p. 61 (figura 3.5)]

Presión hidrodinámica

La presión hidrodinámica se puede definir como la presión de un líquido mientras está en movimiento. Esta presión también se le conoce como la presión debida a la velocidad del fluido, el valor de la presión dinámica depende de la velocidad que tiene el fluido.¹³

La presión hidrodinámica está relacionada con el Principio de Bernoulli, el cual se puede enunciar de la siguiente manera: “En dos puntos de la misma línea corriente de un fluido en movimiento, bajo la acción de la gravedad, se verifica que la diferencia de las presiones hidrodinámicas es igual al peso de una columna de fluido que tiene por base la unidad de superficie y por altura la diferencia de alturas entre los dos puntos.”¹⁴ En la Figura 6 se observa como la presión de un fluido en movimiento dependerá del área y la altura por la que el líquido se

encuentre fluyendo, a mayor sea el área la presión será menor, y entre menor sea el área la presión será mayor. Teniendo en cuenta este principio se puede llamar a la presión hidrodinámica, a la suma de la presión estática y la energía cinética de la unidad de volumen.

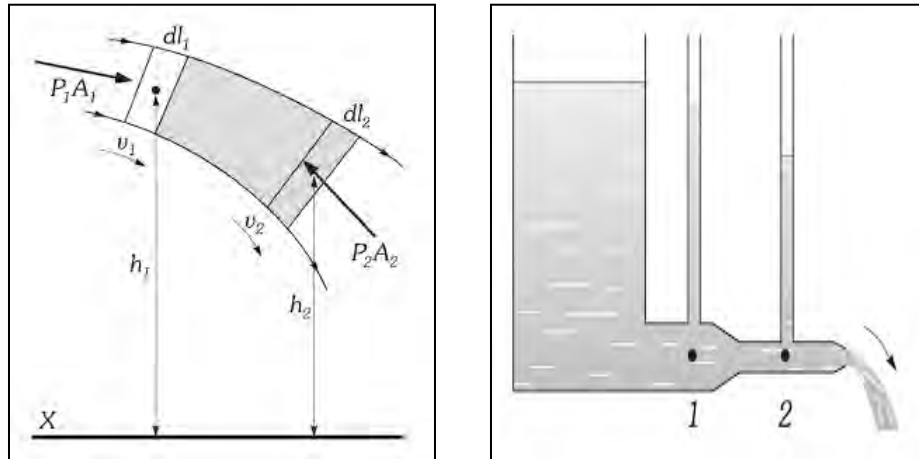


Figura 6. Teorema de Bernoulli

[Burbano de Ercilla, S., et al., (2003) *Física General*. 32ª Edición. Tébar, p. 273 (figura XII-46 y 47)]

Presión Osmótica

Muchos procesos químicos y biológicos dependen de la ósmosis, es decir el paso selectivo de moléculas del disolvente a través de una membrana porosa desde una disolución diluida hacia una de mayor concentración.

La presión osmótica (π) de una disolución es la presión que se requiere para detener la ósmosis.¹⁵

La fuerza motriz de la ósmosis se debe a que la presión de vapor de la disolución de menor concentración es mayor que la presión de vapor de la disolución de mayor concentración, hay una transferencia neta de disolvente desde la solución de menor concentración hacia la de mayor concentración.

La presión aplicada en la rama izquierda del aparato detiene el movimiento neto del disolvente desde el lado derecho de la membrana semipermeable, esta presión aplicada es a la que se le llama presión osmótica (Fig.7).

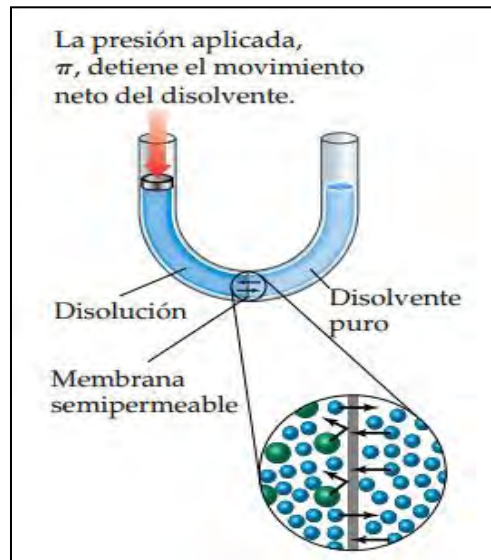


Figura 7. Presión Osmótica

[Brown, T., et al., (2004) *Química. La ciencia central*. 9ª Edición. Pearson, p. 508 (figura 13.24)]

4.1.2. Películas

Se puede definir a una película como una capa delgada y flexible, compuesta por 1 o más sustancias, la cual puede o no contener plastificante.

Las películas son matrices poliméricas que cumplen con los requerimientos para usarse como plataformas para la liberación de un fármaco. Las películas son excelentes para ser utilizadas como sistemas sensibles a estímulos específicos, han mostrado la capacidad de mejorar la acción del fármaco, reducir la frecuencia de administración, mejorar la eficacia del fármaco, reducir los efectos adversos y presentan gran aceptación por parte del paciente debido a su fácil administración.

Para su utilización como sistemas de administración deben de presentar características como; suficiente capacidad para contener al fármaco, velocidad de

disolución rápida o bien largo tiempo de retención en el sitio de administración, estabilidad, no tóxica, biocompatible y biodegradable.

Existen diferentes tipos de películas de administración oral, entre las que se encuentran; películas, películas solubles, tiras de obleas, películas orodispersables, películas bucales, películas mucoadhesivas, películas oftálmicas. Mientras que algunas películas son diseñadas para su rápida disolución en la cavidad oral (orales, orodispersables) y así se absorba el fármaco en la cavidad gastrointestinal, otras son diseñadas para liberar el fármaco en el sitio de administración (bucales, sublinguales y oftálmicas). Por ejemplo, en el caso de las películas oftálmicas son desarrolladas para superar las barreras oculares y así prevenir la pérdida del fármaco a través del sistema de drenaje lagrimal. Las películas oftálmicas se formulan en forma de insertos, algunos de los desarrollados son: insertos de maleato de timolol, indometacina, tartrato de brimonidina e incluso de aciclovir para tratar algunas infecciones oculares ¹⁶.

Entre los polímeros más comunes para la elaboración de películas se encuentran; hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG), pululano, pectina, chitosan, alginato de sodio, carragenano, gelatina, entre otros.

Los métodos más utilizados para su elaboración son, solvent-casting y hot-melt extrusion (HME), aunque en los últimos años se han estado desarrollando tecnologías de impresión por inyección y flexografía (Fig.8).

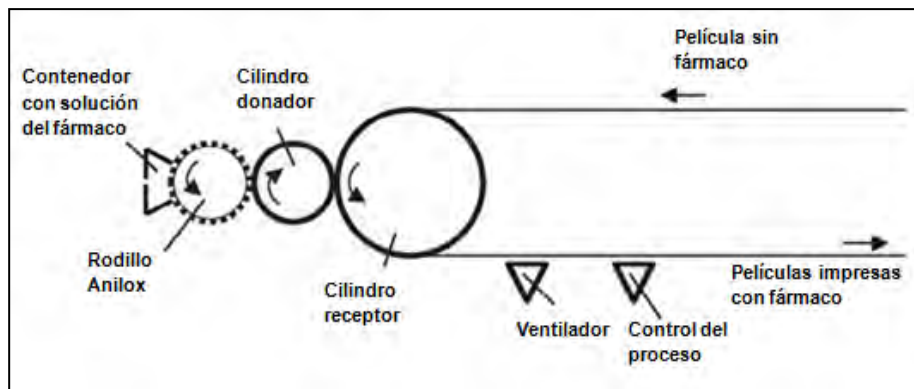


Figura 8. Impresión por flexografía

[Sandeep,K., et al., (2016) *Thin films as an emerging platform for drug delivery*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 11 (2016); 559-574 (figura 4)]

Para que una película pueda ser utilizada en un sistema de liberación modificado, debe de cumplir con ciertas características fisicoquímicas, de flexibilidad, suavidad y elasticidad, según la aplicación. La caracterización de una película es un requisito para su manufactura, esta caracterización debe incluir ensayos mecánicos, de hidratación, liberación *in vitro* y morfología.¹⁷

4.1.2.1. Películas estímulo sensibles

Estos sistemas, están conformados por polímeros sensibles a algún tipo de estímulos.

La respuesta de los polímeros sintéticos se da cuando se aplica un estímulo externo, ya sea energético (luz, temperatura, campo magnético) o químico (pH, moléculas orgánicas o biomoléculas). El cambio en la estructura o propiedades del polímero permiten la liberación del agente terapéutico.¹⁸ La ventaja de las películas realizadas con estos polímeros es que responden rápidamente y cambian sus propiedades al aplicarles algún estímulo.

Los polímeros sensibles a la temperatura son los más extensamente utilizados en los sistemas sensibles a estímulos. Estos polímeros presentan una temperatura crítica de solubilidad inferior (LCST), sí el polímero pasa de un estado soluble a

uno insoluble al aumentar la temperatura y una temperatura superior de disolución crítica (UCST), si el polímero pasa de un estado insoluble a uno soluble al aumentar la temperatura, es decir, pasan por una transición de fase reversible inducido por la temperatura. El polímero más utilizado para este tipo de estímulo es el poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAM) (Fig.9).

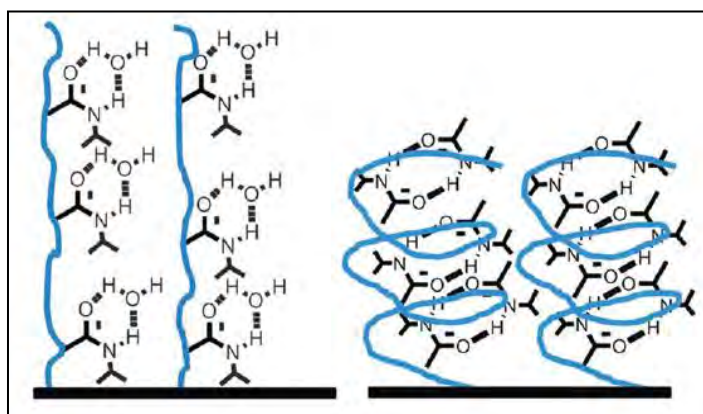


Figura 9. Esquematización de los estados hidrofílicos e hidrofóbicos del PNIPAAM por debajo y por arriba de su LCST.

[Zhai,L., (2013) *Stimuli-responsive polymer films*. The Royal Society of Chemistry 42 (17); 7148-60 (figura 2a)]

Los polímeros sensibles a pH o a un cambio iónico, comúnmente contiene grupos funcionales carboxilos o piridinas. A pH ácido los grupos carboxilo se encuentran protonados y las interacciones hidrofóbicas dominan, por lo que el polímero se encuentra contraído, a pH alcalino los grupos carboxilos se disocian en iones carboxilato, lo que ocasiona una alta densidad de carga provocando el hinchamiento del polímero. En el caso de los polímeros que contienen piridinas pasa lo contrario, ya que esta responde a pH ácidos. En general los polímeros sensibles a estímulos funcionan de esa manera. Algunos ejemplos de estos son el ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, polivinil imidazol, entre otros.

Los polímeros sensibles a campos magnéticos, responden a cambios en el campo magnético, están compuestos de elastómeros con pequeñas partículas magnéticas. Cuando un campo magnético es aplicado, todas las fuerzas que

actúan en las partículas magnéticas son transmitidas al elastómero, cambiando la forma de este. Entre los polímeros más utilizados para este tipo de estímulo se encuentran el ácido poliláctico, policaprolactona, entre otros y como partículas magnéticas el óxido de hierro (III), polvos de níquel, partículas de neodimio.¹⁹

La respuesta de los polímeros a la presión hidrostática y/o hidrodinámica se encuentra muy poco estudiada.

Existen estudios sobre cápsulas sensibles a la presión del tracto gastrointestinal, las cuales tienen como objetivo el colón, donde la respuesta al estímulo de la presión se debe a un recubrimiento de la cápsula con derivados de celulosa y en donde la sensibilidad a la presión dependía del grosor de la película que recubre la cápsula.^{20,21} En otro estudio se habla sobre el efecto de la presión hidrostática en la bicapa lipídica, constituida por cadenas fosfolipídicas de la misma longitud simétricas y asimétricas, encontrando que bajo una presión específica las cadenas de fosfolípidos empiezan a entrelazarse, pero no se habla de una aplicación de este estudio para un sistema de liberación sensible a la presión.²²

4.1.3 Nanopartículas

Las nanopartículas se definen como dispersiones particuladas o partículas sólidas con un tamaño entre 10-1000nm. El fármaco es disuelto, encapsulado o ligado a una matriz nanométrica. Dependiendo del método de manufactura se pueden obtener nanopartículas, nanocápsulas, nanoesferas. Las nanopartículas engloban a todas las partículas que tienen el tamaño antes mencionado, dentro de las nanopartículas se encuentran: las nanocápsulas que son sistemas en los que el fármaco está confinado en una cavidad, rodeado por una membrana polimérica y las nanoesferas que son sistemas matriciales en los que el fármaco se encuentra dispersado.

En los últimos años ha habido un gran auge en las nanopartículas poliméricas biodegradables, debido al tiempo de permanencia, localización dirigida en tejido y la transportación de DNA, proteínas, péptidos y genes.

Entre las ventajas que tienen las nanopartículas se encuentran:

- Características como la superficie y el tamaño de partícula se pueden modificar para lograr dirigir pasiva y activamente las nanopartículas, después de la administración.
- Pueden controlar y mantener la liberación del fármaco durante el transporte de la nanopartícula al tejido específico, alterando así la distribución del fármaco y subsecuentemente su depuración, logrando aumentar la eficacia terapéutica y disminuir los efectos adversos.
- La velocidad de liberación y la degradación de la partícula puede ser modulada por la modificación de los componentes de la matriz. Generalmente pueden cargarse a la partícula altas concentraciones del fármaco, sin necesidad de ninguna reacción química, esto es importante ya que así se preserva la actividad terapéutica del fármaco.
- Se puede lograr dirigir la partícula mediante la aplicación de ligandos específicos a la superficie de esta, o la aplicación de algún estímulo.
- El sistema puede ser usado para diferentes rutas de administración, incluyendo la vía oral, nasal, parenteral, intra-ocular, etc.

Las nanopartículas pueden realizarse de diferentes materiales, como proteínas, polisacáridos o polímeros sintéticos. La elección de los materiales va a depender de factores como; el tamaño de partícula requerido, las características y propiedades del fármaco, las características de la superficie (carga, permeabilidad, etc), el grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad, la velocidad de liberación deseada y la antigenicidad del producto.

Para la producción de nanopartículas generalmente se utilizan los métodos de dispersión de polímeros preformados, evaporación del disolvente, emulsificación

espontánea o difusión del disolvente, polimerización de monómeros, gelificación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos. Otros métodos se han desarrollado como la tecnología de fluido súper crítico y replicación de partículas en plantillas no humectantes (PRINT).

Dentro de las características más importantes a controlar en las nanopartículas se encuentran:

- El tamaño de partícula y su distribución, este parámetro determina la distribución *in vivo*, su acumulación en algún tejido, toxicidad, su habilidad de dirigirse a un sitio específico, así como la estabilidad de las nanopartículas y la liberación del fármaco.
- La superficie de la nanopartícula, ya que al administrarse pueden llegar a ser reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear, lo cual puede desencadenar una respuesta inmune, así como también favorecer su unión con proteínas como opsoninas, se ha reportado que la utilización de polietilenglicol (PEG), disminuye estos fenómenos. El potencial zeta es otra característica importante de la superficie, ya que, permite caracterizar la carga de la superficie de la partícula, lo que principalmente es importante para su estabilidad.
- La capacidad de carga de fármaco, idealmente una nanopartícula debería tener una alta capacidad para contener fármaco. El fármaco regularmente se incorpora al sistema en la producción o después de su formación.²³

4.1.3.1. Nanopartículas estímulo sensibles

El uso de sistemas nanoparticulados estímulo sensibles, ofrece una gran oportunidad para la liberación de un fármaco o un gen, donde el sistema de liberación se convierte en un participante activo en la optimización de la terapia.

Para obtener un sistema que responda a cierto estímulo, se debe de manipular su composición. El beneficio de este tipo de sistemas estímulo sensibles, es lograr que responda a un estímulo específico o característico de la enfermedad. De los

estímulos más comúnmente utilizados, se encuentran el pH, temperatura, respuesta a una molécula biológica, cambios redox en el ambiente.

En el caso del pH, este se ve afectado por ciertas enfermedades. Por ejemplo, en tumores sólidos el pH extracelular tiende a ser significativamente más ácido (6.5) que en la sangre (7.4), también los valores de pH de las vesículas endosomales y lisosomales dentro de las células es menor que en el citosol. Mediante la realización de las nanopartículas con el material correcto, es posible de crear un sistema que responda a estos cambios de pH y permita la liberación del fármaco en el sitio específico (Fig.10).

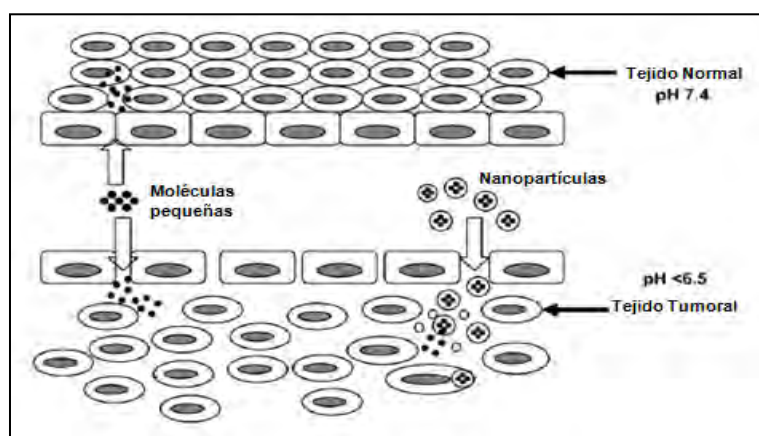


Figura 10. Nanopartículas sensibles a pH

[Ganta, S., et al., (2008) *A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery.* Journal of controlled release 126 (2008); 187-204 (figura 2)]

La temperatura es otra variable que puede ser utilizada como estímulo. Se puede desarrollar un sistema que libere al fármaco a una temperatura superior a los 37°C. Este sistema mantendrá al fármaco encapsulado en la circulación sistémica o en contacto con algún tejido que no sea el deseado, pero al aplicar un estímulo hipertérmico al área donde se requiere su acción, el fármaco será liberado en esta área localizada.

Un ejemplo del uso de una sustancia biológica es el glutatión (GSH), los niveles de esta sustancia en células tumorales es de 100 a 1000 veces mayor que en el

exterior de la célula. Este gradiente de concentración puede utilizarse como estímulo, utilizando un sistema con disulfuro (reacción redox) que liberará el fármaco.

Otros estímulos que pueden ser utilizados en estos tipos de sistemas son el magnetismo, ultrasonido, luz, calor, entre otros. El ultrasonido ha sido utilizado como estímulo para dirigir la liberación hacia un sitio específico mediante sonicación, además esta técnica permite una distribución uniforme del sistema en el tumor.²⁴

4.2. Glaucoma²

El glaucoma representa a un grupo de enfermedades caracterizadas por una neuropatía del nervio óptico, que consiste en la excavación y socavación de los elementos del tejido conectivo y neural del disco óptico, conllevando a una disfunción visual. Una característica importante de esta enfermedad es el aumento de la presión intraocular (IOP), este es el principal factor de riesgo.

El humor acuoso es formado mediante el proceso ciliar, puede ser por; secreción activa, ultrafiltración o simple difusión. La secreción activa requiere energía para mover sustancias en contra del gradiente electroquímico y es independiente de la presión, no se tiene conocimiento de cuáles son los iones que son transportados, pero el sodio, cloruro y bicarbonato están relacionados, este proceso se debe mayormente a la enzima anhidrasa carbónica II. La producción del humor acuoso se encuentra entre los 2.0-2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ en promedio (Fig. 11)

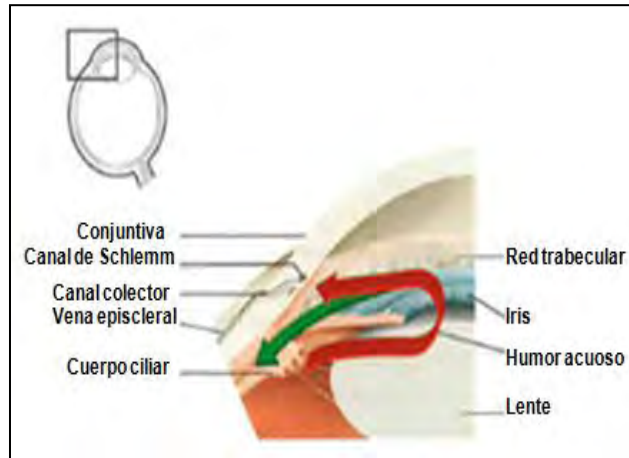


Figura 11. Flujo normal del humor acuoso

[Glaucoma, Basic and Clinical Science Course, Sección 10, 2014-2015, American Academy of Ophthalmology. p.3 (Figura 1-1)]

La presión intraocular (IOP) en un ojo sano se encuentra alrededor de los 15.5 mmHg, con una desviación estándar de 2.6 mmHg. Cuando una persona rebasa los 21 mmHg, se le considera una presión anormal y tienen que aplicarse una terapia hipotensora. Aunque esta no es una característica con la que se pueda diagnosticar si una persona tiene glaucoma o daño en el nervio óptico, todo depende del tipo de glaucoma que presente.

Los tipos de glaucoma que están relacionados con el aumento de presión intraocular son:

- Glaucoma de ángulo abierto: No está relacionado con ningún trastorno ocular o sistémico que cause el bloqueo de la salida del humor acuoso o el daño al nervio óptico (Fig.12).

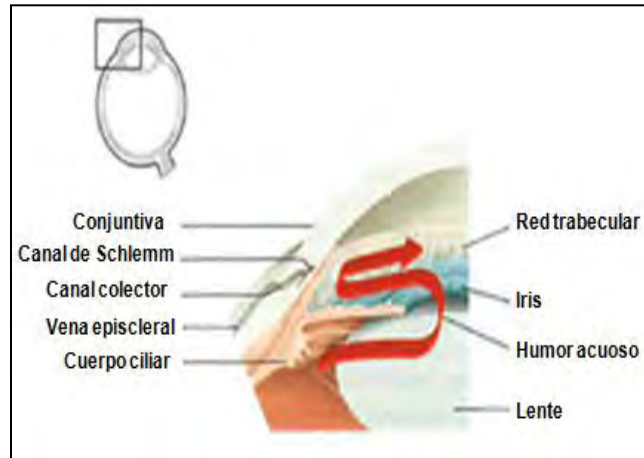


Figura 12. Glaucoma de ángulo abierto.

[Glaucoma, Basic and Clinical Science Course, Sección 10, 2014-2015, American Academy of Ophtalmology. p.6 (Figura 1-2)]

- Hipertensión ocular: Se presenta con un disco óptico y campo visual normal.
- Glaucoma de ángulo cerrado grave: Ocurre cuando la presión intraocular aumenta rápidamente como resultado de un repentino bloqueo de la red trabecular (Fig.13).

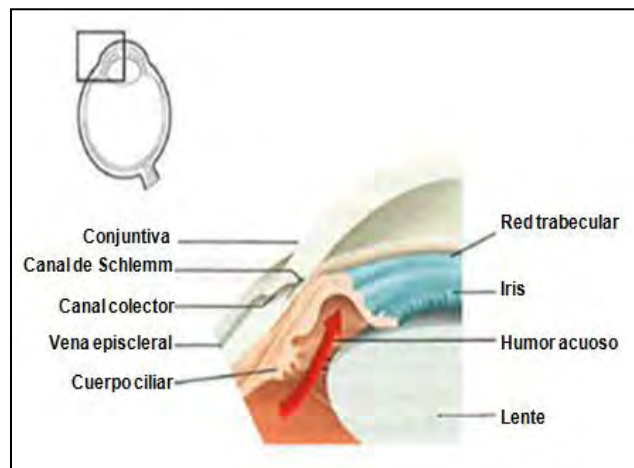


Figura 13. Glaucoma de ángulo cerrado

[Glaucoma, Basic and Clinical Science Course, Sección 10, 2014-2015, American Academy of Ophtalmology. p.6 (Figura 1-3)]

- Glaucoma con ángulo cerrado intermitente: Episodios breves de ángulo cerrado, con aumento de la presión intraocular, es un precedente para el glaucoma de ángulo cerrado grave.
- Glaucoma de ángulo cerrado crónico: Elevación de la presión intraocular debido a porciones de la cámara anterior del ojo, el ángulo se encuentra permanentemente cerrado.

En general no hay un valor de presión intraocular que pueda ser considerada normal o segura, se han presentado casos donde el ojo presenta daño a una presión intraocular de 18 mmHg o menos, mientras que en otros casos pueden tolerar presiones elevadas. Aun así la presión intraocular se considera un factor de riesgo para el daño al nervio óptico.

El tratamiento depende del tipo de glaucoma y el avance de la enfermedad, entre los agentes terapéuticos más utilizados se encuentran: los análogos de las prostaglandinas, antagonistas β -adrenérgicos, agonistas adrenérgicos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, agentes parasimpaticomiméticos y agentes hiperosmóticos.

4.3. Dorzolamida

La dorzolamida es un inhibidor de la anhidrasa carbónica. Es usada regularmente en soluciones oftálmicas para disminuir la presión intraocular (IOP) en glaucoma de ángulo abierto y en hipertensión ocular. ²⁵ (Fig.14).

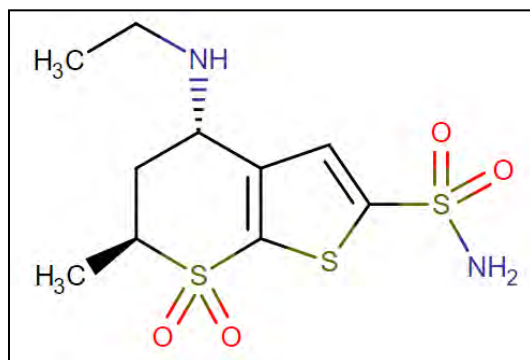


Figura 14. Dorzolamida

Indicación terapéutica: Para el tratamiento de presión intraocular elevada en pacientes con hipertensión ocular o glaucoma de ángulo abierto. La dosis recomendada es de 20 mg/mL.

Mecanismo de acción: La dorzolamida es una sulfonamida y un inhibidor altamente específico de la anhidrasa carbónica II (CA-II), la cual es la principal isoenzima relacionada con la secreción del humor acuoso. La inhibición de la CA-II en el proceso ciliar del ojo, disminuye la secreción de humor acuoso, presuntamente mediante la ralentización de la formación de iones bicarbonato, con la subsecuente reducción de sodio y transporte de fluido.

Efectos adversos: Mareos, dolor de cabeza, dificultad para respirar, asma, paro cardíaco.²⁶

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la dorzolamida	
Formula química	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄ S ₃
Peso Molecular	324.44 g/mol
Punto de fusión	283-285°C
Solubilidad en agua	0.699 mg/mL
log P	-1

4.4. Nanopartículas de dorzolamida

Se han realizado diferentes formulaciones de nanopartículas que contienen dorzolamida. La administración tópica de dorzolamida en la parte frontal del ojo, mediante gotas oculares resulta ineficiente, debido a que estas son diluidas rápidamente debido a las lágrimas y son desechadas por el conducto lacrimal, para evitar esto se han desarrollado diferentes formulaciones de nanopartículas.

En uno de estos estudios se realizaron nanopartículas de quitosán que contenían dorzolamida, con el objetivo de producir una eficiente formulación ocular para este fármaco y que así estas partículas fueran mucoadhesivas, aumentando la biodisponibilidad y prolongado el efecto farmacológico. Se realizaron estas

nanopartículas mediante el método de gelación iónica y se obtuvieron nanopartículas que presentaban propiedades mucoadhesivas, se observó una liberación sostenida en los estudios *in vitro*, por lo que esta formulación puede ser evaluada para una liberación ocular controlada.^{27, 28} Otro estudio fue la utilización de un derivado de quitosán (6-o-carboximetil-quitosán), dicha modificación se realizó para evitar la irritación del ojo por el polímero, logrando esto último y además una liberación prolongada.²⁹ Además de estos estudios existen otros en donde se desarrollaron nanopartículas a base de quitosán o sus derivados.³⁰

Además del quitosán, la utilización de ciclodextrinas para formar complejos ha sido requerida para desarrollar otra alternativa de formulación. Las ciclodextrinas son oligosacáridos naturales, que son capaces de disolver fármacos poco solubles en disoluciones acuosas, mediante la formación de complejos fármaco/ciclodextrina. Las ciclodextrinas son biocompatibles y en solución acuosa estas partículas se encuentran en equilibrio dinámico y se disocian cuando se diluyen, como es el caso cuando se aplican en el fluido lagrimal. Los complejos dorzolamida/ γ ciclodextrina presentaron propiedades mucoadhesivas y liberaron la dorzolamida en el fluido lacrimal por un extenso tiempo. Esta formulación fue probada en humanos mediante un ensayo clínico y se observó que sí se presentaba una disminución de la presión intraocular.³¹ Este estudio se realizó primero en conejos, se comparó entre estos complejos de dorzolamida/ γ ciclodextrina y el Trusopt, el cuál es una marca de dorzolamida en gotas oftálmicas. El estudio reveló que la administración de los complejos dorzolamida/ γ ciclodextrina una vez al día, mostraba el mismo efecto que el Trusopt, el cual se administra regularmente 3 veces al día, lo cual tiene como ventaja un mejor apego al tratamiento.³²

En otro estudio se observó que la utilización de vitamina E TPGS en la fabricación de nanopartículas de PLGA, permite mejorar tanto la encapsulación de la dorzolamida, como la permeación, dando como resultado un efecto sostenido de la disminución de la presión intraocular.³³

Estas formulaciones nanométricas tienen una mayor facilidad de permeación a través del ojo y una mejor biodisponibilidad. Por ejemplo, se han desarrollado niosomas que demostraron estas características.^{34, 35} Aunque existen otros estudios donde realizan nanopartículas con dorzolamida³⁶, ninguna tiene la característica de ser estímulo sensible a presión.

Algo importante a considerar es la vía de administración, las rutas de administración en el ojo son: tópica, sistémica, transcleral/periocular e intravitreal. La administración tópica presenta diferentes barreras que impiden la difusión del fármaco en el segmento posterior. La administración sistémica permite el paso del fármaco al segmento posterior, pero se necesitan altas dosis para lograr el efecto terapéutico. La administración transcleral/periocular tiene la ventaja de poder utilizar el tejido escleral, el cual tiene una extensa superficie. La administración intravitreal es la mejor ruta de administración para fármacos que tienen como blanco los tejidos del segmento posterior, además mediante esta ruta se logra alcanzar alta biodisponibilidad del fármaco.³⁷ (Fig. 15).

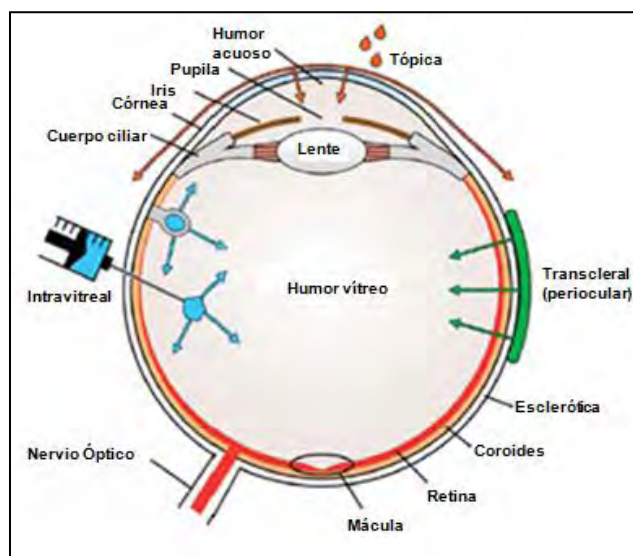


Figura 15. Vías de administración oculares

[Kang-Mieler, J., et al., (2014) *Advances in ocular drug delivery: emphasis on the posterior segment*. Expert Opinion Drug Delivery 11 (10); 1647-60 (figura 1)]

En el caso de la formulación diseñada para el macrosistema está pensada para una administración tópica en forma de implante, y en el caso del nanosistema está pensado para una administración intravítreal.

V. Hipótesis

Si se logran desarrollar películas de polímeros celulósicos y/o poliortoesteres presión sensibles, éstas podrán usarse para fabricar nanopartículas que lograrán el suministro inteligente de la dorzolamida.

VI. Objetivos

Objetivo general

Diseñar y caracterizar sistemas sensibles a la presión para la liberación de dorzolamida.

Objetivos particulares

- Desarrollar películas de polímeros celulósicos y/o poliortoesteres por la técnica de “film casting”.
- Caracterizarlas mediante estudios mecánicos, ángulo de contacto, captación de agua, paso del agua a una presión aplicada y estudios de degradación.
- Estudiar el paso del fármaco a través de las películas en función de la presión ejercida.
- Obtener una película que cumpla con las características adecuadas para la liberación de dorzolamida bajo un estímulo de presión, y a partir de esta formulación realizar nanopartículas.
- Desarrollar nanopartículas por el método de doble emulsión.
- Caracterizarlas mediante estudios de tamaño de partícula, morfología, % de encapsulamiento y liberación del fármaco.

VII. Metodología

7.1. Materiales

- Etilcelulosa: Ethocel 10FP Premium, colorcon, lote: 1D98896
- PLGA: P2192-5G, sigma (50:50), lote: 039k1587
- THF: Tetrahidrofurano JT Baker, Lote: X15B24
- Diclorometano: JT Baker, Lote: C43B28
- Florfenicol: Megafarma, Lote: 20021202
- Clorhidrato de dorzolamida, donado amablemente por laboratorio Santgar
- Pluronic F-68: Sigma, Lote: 049K0044
- Fosfatidilcolina: Sigma, Lote: 103K5212

7.2. Elaboración de películas

Para la elaboración de las películas se pesaron las cantidades registradas en la Tabla 3 y se disolvieron en 30 mL de diclorometano. Se utilizaron como moldes cajas Petri de vidrio y moldes de teflón, para contener a la disolución. Las películas 2-4 se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Las películas 1 y 5 se secaron en la desecadora a una temperatura de 25°C, en condiciones de vacío (40 cmHg), por 24 horas.

Tabla 3. Proporciones pesadas de los polímeros en las diferentes películas.

Películas (Relación PLGA/EC)	PLGA(mg)	EC(mg)
1 (50%-50%)	150	150
2 (80%- 20%)	240	60
3 (90%-10%)	270	30
4 (100%-0%)	300	0
5 (0%-100%)	0	300

7.3. Caracterización de las películas

➤ Captación de agua

Se pesaron muestras de película de alrededor de 20 mg. Se registró su masa inicial (m_0), y posteriormente se colocaron en viales con 25 mL de agua. Se mantuvo en condiciones estables, es decir en un ambiente sin movimiento y luz, a temperatura ambiente. Se registró la masa de las muestras cada 24 h, durante 96 h (m_t).

Para la obtención del porcentaje de captación de agua (%C), se obtuvo la masa de agua absorbida (m_{abs}), (ecuaciones 1 y 2):

$$m_{abs} = m_t - m_0 \text{ (Ecuación 1)}$$

$$\%C = \frac{m_{abs} * 100}{m_0} \text{ (Ecuación 2)}$$

➤ Determinación del ángulo de contacto

Se recortó una muestra de cada película y se colocó una gota de agua destilada encima de la película, con una jeringa de insulina con aguja. Se tomó una fotografía de la película con la gota, mediante una cámara fotográfica Nikon, lente 30x Wide Full HD. Y posteriormente con el programa ImageJ se procesó la imagen, obteniendo el ángulo de contacto.

➤ Obtención del Módulo de Young (E)

Se utilizó un texturómetro marca Mecmesin: Multitest modelo1-i con celda de carga de 50 N; y software Emperor, para la obtención de los datos. Para las determinaciones se utilizaron muestras de película de 2 por 4 cm, las cuales fueron sujetadas al equipo mediante mordazas. Las condiciones del equipo empleadas para la prueba fueron: velocidad de 5 mm/min, deformación inicial (γ_0) de 20 mm, deformación máxima ($\gamma_{m\acute{a}x}$) de 60 mm, carga de 40 N y tiempo de duración de 5 min. Mediante el software empleado se obtuvo la deformación ingenieril (γ_{ing}) para cada fuerza aplicada; permitiendo conocer la fuerza de corte (F_c) para las muestras. Para la determinación del módulo de Young (E): se

requiere la obtención de la deformación verdadera (γ_v), así como el esfuerzo verdadero (σ_v) la cual a su vez requiere del esfuerzo ingenieril (σ_{ing}), (ecuaciones 3,4 y5):

$$\gamma_v = \ln(1 + \gamma_{ing}) \text{ (Ecuacion 3)}$$

$$\sigma_{ing} = \frac{F}{A} \text{ (Ecuacion 4)}$$

$$\sigma_v = \gamma_v (\sigma_{ing} + 1) \text{ (Ecuacion 5)}$$

Por último se obtiene la ecuación lineal que describe el comportamiento entre γ_v (como variable dependiente) y σ_v (como variable independiente); la pendiente obtenida es E (ecuación 6).

$$\sigma_v = E * \gamma_v \text{ (Ecuacion 6)}$$

Las unidades manejadas son N para la fuerza; m para la deformación (γ_{ing} y γ_v) y Pa para los esfuerzos (σ_{ing} y σ_v).

➤ **Estudios de degradación**

Se colocaron 10 mg aproximadamente de cada película en un vial con 10 mL de agua, se registraron los pesos y se tomaron fotos durante los primeros 4 días y después cada semana, hasta finalizar los 3 meses del estudio, durante este tiempo los viales con las películas se mantuvieron en condiciones estables, es decir en un ambiente sin movimiento y sin luz, a temperatura ambiente. En cada medición se secaron las películas a temperatura de 50 °C y presión atmosférica durante 3 h. Se observaron al microscopio marca Lieder binocular MC-300, en un aumento de 100x.

➤ **Evaluación de paso de agua a través de la película ante una presión aplicada**

Se realizó un modelo de simulación de presión intraocular, que abarca intervalos de presión normales e hiperbáricas tipo glaucoma, basándose en el principio físico de la presión hidrostática (P) que indica que (ecuación 7):

$$P = \rho gh \text{ (Ecuacion 7)}$$

Donde ρ es la densidad del fluido, g es la gravedad (9.81 m/s^2) y h es la altura del fluido. De acuerdo con esta ecuación al variar las alturas de agua destilada, se pudieron obtener las presiones que se querían trabajar, estas fueron: presiones normales de 15 y 20 mmHg, y presiones hiperbáricas de 25 30, 35 y 40 mmHg. Para convertir los mmHg a cm de agua destilada, para así obtener las alturas de los tubos del sistema, se utilizó la ecuación 8:

$$1\text{mmHg} = 1.33\text{cm H}_2\text{O} \text{ (Ecuacion 8)}$$

Se colocaron tubos según la altura necesaria para la presión ejercida y en el extremo inferior se le colocó un fragmento de película. Se adicionó la cantidad de agua destilada para llegar a la altura requerida, se midió la cantidad de agua que pasa a través de la película cada 15 min, durante 2 horas, la presión se mantuvo al mantener el volumen constante, es decir a la altura requerida.

➤ **Liberación de florfenicol a diferentes presiones**

Se realizó esta prueba con el mismo sistema empleado en la prueba de la evaluación de paso de agua a través de la película a una presión aplicada, con la variante de que el tubo fue introducido en un vaso que contenía agua destilada y estaba en contacto con la película, tratando de simular un sistema de difusión del fármaco a través de la película (Fig. 28). Se realizó la prueba a las mismas presiones que en la prueba anterior y se midió por el mismo tiempo. A diferencia de la prueba anterior, los tubos para esta prueba se llenaron con una solución de florfenicol a una concentración de 0.14 M. Se tomo una alícuota de 2 mL cada 15 min durante 2 horas, y posteriormente se leyó al espectro UV, a la máxima longitud de onda del florfenicol, 225 nm.³⁸

7.4. Elaboración de nanopartículas

Las nanopartículas se elaboraron por el método de doble emulsión-evaporación. Se utilizó una proporción de 90% (PLGA)-10%(etilcelulosa). La primera emulsión w/o se formó utilizando como fase oleosa, 20 mL de diclorometano en donde se disolvieron los polímeros; 450 mg de PLGA y 50 mg de etilcelulosa, utilizando como tensoactivo lecitina al 0.5%. Esta disolución se homogenizó mediante un Ultra Turrax T18 basic. En esta misma solución se agregó como fase acuosa; 2 mL de agua que tenía una concentración del fármaco (dorzolamida) en un 3.6%, esta es la máxima solubilidad del fármaco. Una vez dispersada esta primera emulsión, se agregó a 55 mL de agua que contenía como tensoactivo Pluronic-F68 a una concentración al 3% y se volvió a homogenizar mediante Ultra turrax a 4000 rpm durante 5 minutos, formando así la emulsión w/o/w. Para evaporar la fase oleosa, se mantuvo la emulsión en agitación magnética a 600 rpm, a temperatura de 35 °C, por 12 horas.

7.5. Caracterización de Nanopartículas

➤ Tamaño de partícula

Para medir el tamaño de partícula se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, el cual se basa en la dispersión dinámica de luz. Se utilizó 2 mL de muestra y se colocaron en una celda de vidrio. Se utilizó como índice de refracción 1.46 y una absorción de 0.00³⁹. El equipo mide a un ángulo fijo de 173° con un laser rojo a 633nm. Se midió por triplicado y cada medición fue el promedio de 15 medidas.

➤ Morfología

Para la morfología de las nanopartículas se realizó una microscopía electrónica de barrido (SEM). La muestra fue recubierta con una capa de carbono y se le aplicó un voltaje de 10 kV.

➤ % de encapsulación

Para realizar esta determinación se filtraron 5 mL de la emulsión con un filtro de 0.022 μm , el filtrado obtenido se midió al espectro UV a la longitud de onda de la dorzolamida, 250 nm⁴⁰, y mediante la ecuación 9 se determinó el % de encapsulación (ecuación 9).

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{\text{Cantidad de fármaco en la solución}}{\text{Cantidad de fármaco inicial}} \times 100 \text{ (Ecuación 9)}$$

7.6. Estudios de liberación de dorzolamida

Para los estudios de liberación en las nanopartículas, se utilizó un equipo en el cuál, mediante un barómetro se podía controlar la presión, ejercida por nitrógeno gaseoso (Fig. 16), se realizó la prueba durante 24 h y se muestreo cada hora, durante las primeras 8 h.

El estudio se realizó a diferentes presiones: 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mmHg, la presión se mantuvo constante durante el estudio, a excepción de cuando se tomaban las alícuotas, donde se cerraban las llaves del sistema, lo cual permitía destapar el matraz y extraer las alícuotas. Las alícuotas tomadas fueron de 5 mL, estas se filtraron y posteriormente se midieron en el espectro UV, a una longitud de onda de 250 nm.

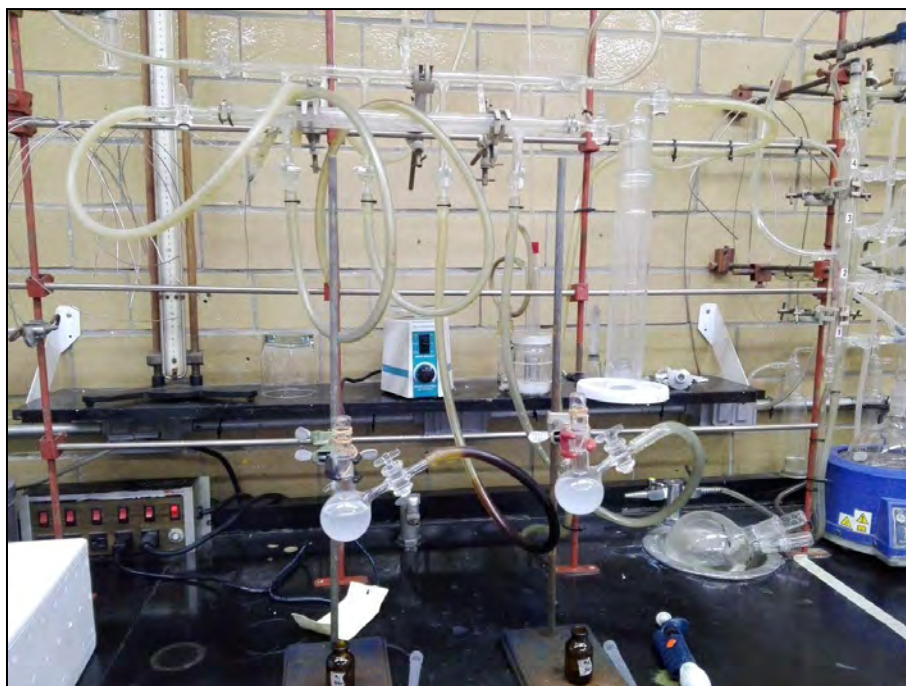


Figura 16. Equipo utilizado para realizar los estudios de liberación.

VIII. Resultados y Discusión.

➤ Elaboración de las películas

Para disolver los polímeros y formar las películas en un inicio se utilizó como disolvente THF (Tetrahidrofurano), pero con este disolvente no se lograba obtener las películas, resultaban en películas muy delgadas, de apariencia opaca, no se podían obtener íntegras y se observaba una separación entre los polímeros, como se puede apreciar en la Figura 17. En el caso de la película 5, no se logró despegar del recipiente de teflón. A estas películas no se les realizó ninguna caracterización.



Figura 17. Películas 1-5 realizadas con tetrahidrofurano

Por lo tanto, se optó por cambiar de disolvente, a diclorometano, con este disolvente se pudieron obtener de manera íntegra las películas, es decir transparentes, lisas y aparentemente homogéneas.

Una vez obtenidas las películas íntegras se procedió a caracterizarlas.

Una posible causa de los defectos en las películas realizadas con THF, puede ser la solubilidad del PLGA en este disolvente, ya que, aunque es soluble, presenta una mejor solubilidad con el diclorometano, se sabe que el PLGA que contiene el

50% o menos unidades de ácido glicólico es soluble en la mayoría de disolventes halogenados ⁴¹. Es sabido que el disolvente usado afecta a las propiedades de la película formada, por ejemplo su porosidad, lo cual puede depender del grado de disociación del polímero en ese medio, así como la volatilidad y la velocidad de desolvatación de la película. También la interacción del disolvente con las cadenas poliméricas puede afectar la cohesión polímero-polímero.⁴² Otra posible causa puede ser el fenómeno llamado “breath figures”.

La estructura de películas poliméricas, preparadas de soluciones poliméricas, dependen de la composición, el disolvente y de la humedad relativa del aire (RH). El RH es un factor importante debido a que controla la formación de cavidades porosas en la superficie, el fenómeno llamado “breath figures”, el cual se basa en la condensación de las gotas de agua en soluciones poliméricas durante la formación de la película. Por ejemplo, en el caso de la formación de películas en recubrimientos, durante el proceso el solvente orgánico volátil se evapora, enfriando la región a su alrededor y cercana a la superficie, favoreciendo así la condensación del vapor de agua en forma de gotas en la superficie de la solución, y como la mayoría de los polímeros sintéticos son insolubles en agua, estos se segregan de las gotas de agua, posteriormente las gotas de agua se evaporan, dejando libre el volumen que ocupaban, generando así los poros o cavidades en la superficie. Por lo tanto, valores de humedad relativa altos, conducirán a la formación de cavidades, y con esto a una película más gruesa debido al desplazamiento del polímero y viceversa valores bajos, conducirán a que no se formen cavidades. Entre más hidrofílicos y viscoso sea el medio, mayor será el contacto con las gotas de agua.⁴³ Con esto podemos decir que sería importante controlar este factor al realizar las películas, ya que como se mencionó las condiciones de humedad en el ambiente pueden afectar a la formación de las películas.

Además, dado que los polímeros presentan una temperatura mínima de formación de película, y que cada composición fue distinta, son lógicos los resultados

obtenidos. Se necesita trabajar a diferentes temperaturas para poder lograr la coalescencia total de las cadenas poliméricas. Hay que considerar que la evaporación y la viscosidad dependen de la temperatura, para preparaciones más viscosas se necesita más energía.⁴⁴

➤ **Captación de agua**

Los resultados de esta prueba se observan en la tabla 4 y en la tabla 5 se muestra los datos obtenidos al utilizar las ecuaciones 1 y 2, es decir el % de captación de agua para cada película. Los resultados se observan gráficamente en la Figura 18.

Tabla 4. Registro del peso de las películas durante la prueba.					
Peso (mg)	Película 1	Película 2	Película 3	Película 4	Película 5
Inicial	25.4	23.3	30	20.1	18.5
24hrs	84.8	148.4	87.1	132.2	28.3
48hrs	89.8	194.4	105.7	159.8	35.3
72hrs	98.8	275.5	116.2	181.2	33.1
96hrs	120.1	146.9	93.2	227.2	42.5

Tabla 5. % de captación de agua de las películas.					
%Captación	Película 1	Película 2	Película 3	Película 4	Película 5
24hrs	233.8	536.9	190.3	557.7	52.9
48hrs	253.5	734.3	252.3	695	90.8
72hrs	288.9	1082.4	287.3	801.5	78.9
96hrs	372.8	530.5	210.7	1030.3	129.7

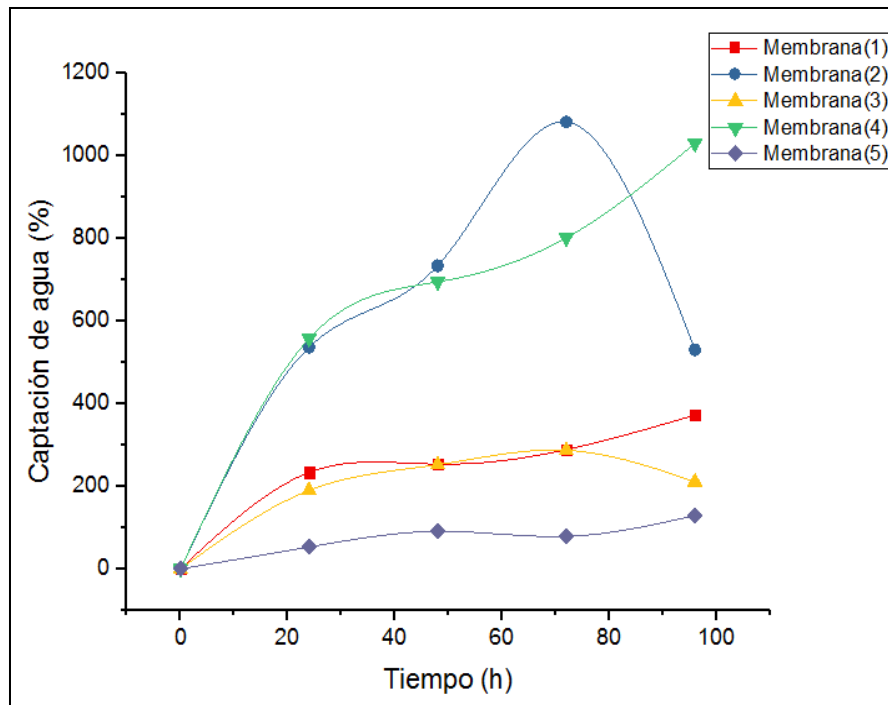


Figura 18. Relación de % de captación de agua de las diferentes películas, con el paso del tiempo.

Como se puede observar en el gráfico 18, las películas 2 y 4 presentaron una mayor captación de agua. Se sabe que el PLGA es un polímero biodegradable, que es amorfo y absorbe agua, pero no se disuelve en ella. La interacción inicial de las moléculas de agua con el polímero lleva a la hidratación de éste, pero después inicia el proceso de degradación. El agua inicia la hidrólisis de los grupos éster de la cadena polimérica, esta degradación aumenta la hidrofiliicidad del polímero, debido al aumento en el número de ácidos carboxílicos, esto a su vez aumenta la captación de agua y conlleva a la degradación de polímero.⁴⁵ Es por esto que la película 4 que está conformada por PLGA únicamente obtuvo una mayor captación de agua.

En el caso de la película 2 su composición es 80%PLGA- 20%ETC, pero su captación de agua puede deberse a que los polímeros no se integran completamente, y la hidratación que se presenta es debida al PLGA mayoritariamente, ya que en diferentes estudios que se han realizado de películas de etilcelulosa se ha observado que, aunque la absorción de moléculas de agua puede conllevar a una plastificación de la película induciendo una disminución en

los puntos de contacto de las cadenas poliméricas, aumentando así la penetración de las moléculas de agua, no presenta hidratación debido a que es un material hidrofóbico.⁴⁶ Esto se puede constatar con la película 5 la cual presento muy baja captación de agua debido a que estaba constituida únicamente de etilcelulosa.

Si bien es cierto que los efectos del agua en los polímeros pueden llevar a cambios en las propiedades fisicoquímicas de las películas, es importante también que la película pueda interaccionar con el agua, ya que mediante esta interacción se logrará la liberación del fármaco, es por esto que la película que presentó una mejor propiedad en este sentido fue la película 3, ya que tuvo una captación de agua constante, no hubo aumento con el tiempo, sino que tuvo una captación de agua inicial y se mantuvo así durante todo el estudio.

➤ **Determinación del ángulo de contacto**

Para esta prueba se tomaron al menos 2 fotos de cada sistema (película con gota) y se midió el ángulo de cada foto, con el programa ImageJ y la herramienta de análisis Drop Snake. Del programa se obtienen dos ángulos de contacto uno perteneciente a la izquierda y otro a la derecha, se realizó un promedio de ambos.

En la figura 19 se puede observar cómo se realizó la medición con el programa y en la tabla 6 se muestran los resultados.

Tabla 6. Ángulo de contacto de las diferentes películas					
Película	1	2	3	4	5
Ángulo de contacto	70.47°± 1.75°	57.47°± 2.88°	68.37°± 1.02°	55.62°± 1.98°	80.71°± 1.56°

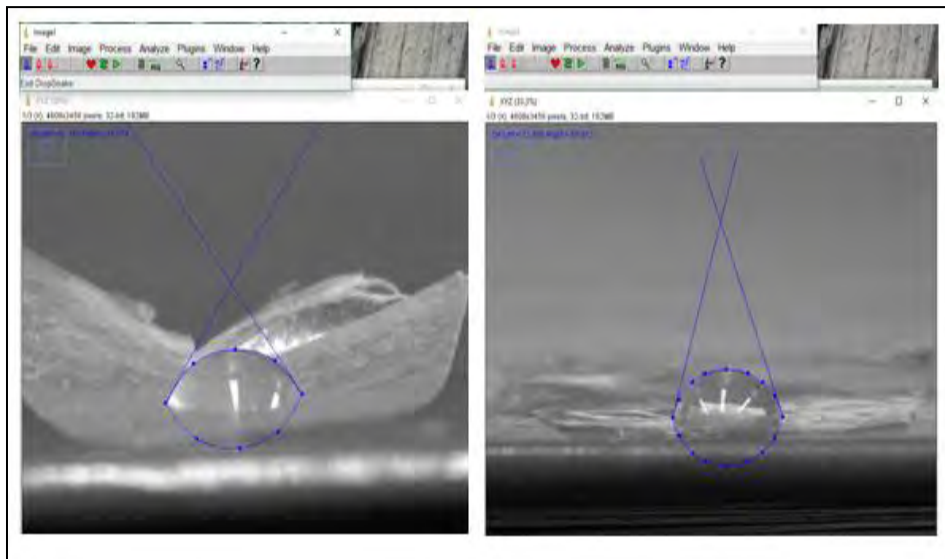


Figura 19. Obtención del ángulo de contacto mediante el programa Image J

Las mediciones del ángulo de contacto nos dicen la relación que existe con la prueba de captación de agua. Se sabe que a mayor ángulo de contacto ($>90^\circ$) el líquido no impregna al sólido y si el ángulo es menor ($<90^\circ$ y $>0^\circ$) el líquido impregna al sólido. Si comparamos los resultados obtenidos en ambas pruebas, podemos observar tanto en la Figura 18 y en la tabla 6, que existe una relación. Por ejemplo, en el caso de las películas 2 y 4, mostraron ángulos de contacto menores y a su vez tuvieron una mayor captación de agua, esto muestra que a menor ángulo de contacto, la película se impregna de agua y con esto capta más agua. En el caso de las películas 1 y 3 mostraron un ángulo de contacto similar y su captación de agua también fue similar. Por último, la película 5 tuvo un ángulo de contacto muy grande, es decir el agua no impregnó a la película debido a su hidrofobicidad y cumpliendo con la relación, su captación de agua no fue significativa.

Esto comprueba que el polímero más hidrofílico es el PLGA, y que conforme varía su composición en las películas, varía la hidrofilia de las mismas.

➤ **Determinación del módulo de Young (E)**

El módulo de Young (E) es un parámetro que indica la capacidad de deformación de un material cuando a éste se le aplica determinada tensión. Entre menor sea, significa mayor grado de elasticidad.

Tabla 7. Módulo de Young (E) para las diferentes películas			
Película	2	3	4
(E) MPa	108.18	67.43	55.9

Como se puede observar en la tabla 7, la película 4 presenta mayor elasticidad y resistencia, esto es congruente debido a que está compuesta únicamente por PLGA, incluso al realizar la prueba a esta película, no se rompió. Pero observando el resultado obtenido con la película 3, esta tiene una resistencia parecida a la película 4, y al igual que ésta, tampoco se rompió, esto debido a su alto contenido de PLGA. La película 2 tiene una menor resistencia y al realizar la prueba se rompió. Para las películas 1 y 5 no se pudo realizar la prueba ya que eran demasiado frágiles.

Con esto podemos asegurar que la resistencia y elasticidad las da el PLGA. Las propiedades mecánicas del PLGA dependen de la composición de ácido láctico-glicólico que tiene el polímero, la estereoquímica, el peso molecular y su cristalinidad. Y la etilcelulosa le proporciona rigidez a las películas, como ya se mencionó anteriormente, según algunos estudios realizados, los derivados de celulosa responden al estímulo de la presión.^{20,21}

Es importante en este caso que las películas presenten una buena elasticidad, ya que, para su aplicación y manejo, se necesita que sean maleables. Y debido a que se les pretende aplicar una presión deben tener cierto grado de elasticidad.

➤ Estudios de degradación

Esta prueba se realizó a lo largo de tres meses y cada una de las películas mostró diferente velocidad de degradación.

Durante el estudio se pudo observar cambios en la tonalidad de las películas que pueden ser explicadas por la composición de la misma, ya que podemos atribuir que las zonas claras correspondían a la etilcelulosa y las zonas oscuras al PLGA. Y conforme transcurría el tiempo se observó una mayor degradación de la película, ya que se incrementaba más la tonalidad de las zonas oscuras. La película 1 (Fig. 20) fue la que presentó una degradación lenta comparada con las demás películas debido a su composición de etilcelulosa, ya que está no facilitó la interacción del agua con el PLGA. La existencia de diferentes zonas en la película arrojó la falta de homogeneidad en la misma, por lo que no se puede tomar una muestra representativa de la película

En un estudio se demostró que existe una separación de fases debida a la evaporación del disolvente, esto sucede por una desestabilización isotérmica, donde el solvente se enfría, aumentando la viscosidad y con esto el transporte de masa se detiene, “congelando” la morfología en la película.⁴⁷ Probablemente este fenómeno se presentó durante la fabricación de las películas afectando la distribución de los polímeros.

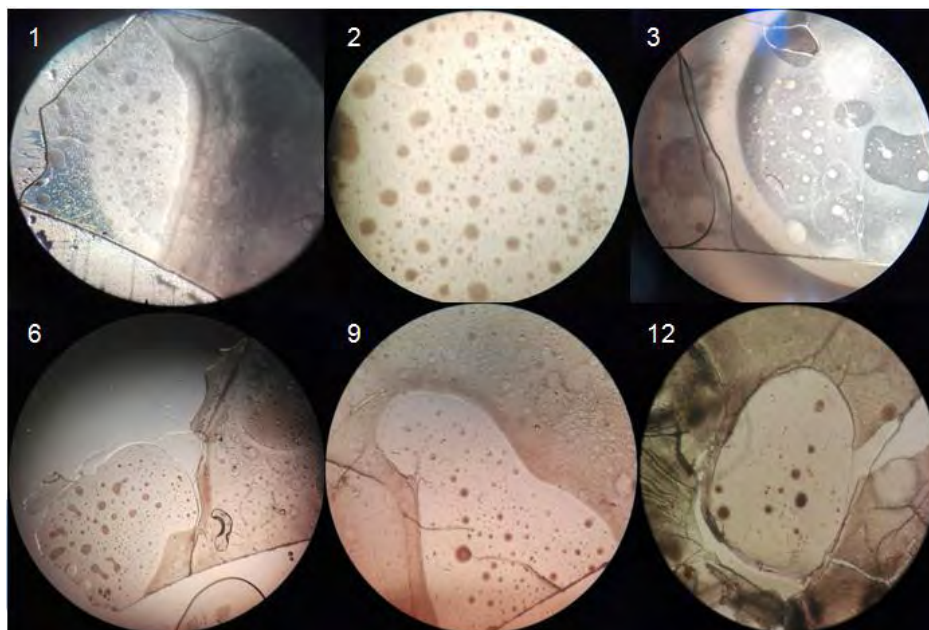


Figura 20. Degradación de la película 1 con el paso del tiempo, en cada imagen está indicada la semana (100x).

En el caso de la película 2 (Fig.21), se puede ver claramente la degradación de la película en la semana 1, el polímero empieza a hidratarse y a degradarse en algunas partes y conforme avanzan las semanas, la película ya no es transparente, se opaca y no permite el paso de la luz del microscopio.

También se puede observar que conforme pasa el tiempo las zonas de degradación se hacen mayores, estas zonas claras pueden corresponder tanto a la degradación del PLGA, como a la presencia en ciertas zonas de la etilcelulosa, en el caso del PLGA es debido a que la degradación del mismo lleva a el rompimiento de las cadenas poliméricas, y por ende al de la estructura, afectando así la apariencia externa de la película, por el rompimiento de la misma. En el caso de esta película se puede observar que sí hay una correcta integración de los polímeros, ya que no se observa la presencia de zonas diferentes entre sí.

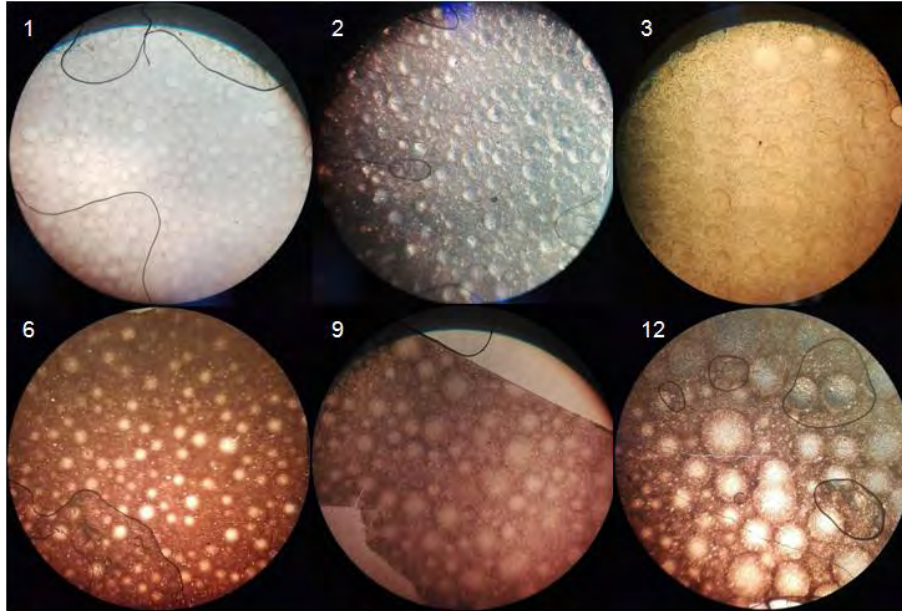


Figura 21. Degradación de la película 2 con el paso del tiempo, en cada imagen está indicada la semana (100x).

La degradación de la película 3 (Fig.22) se presentó de una manera similar a la de la película 2. Se observa claramente como las zonas de degradación van aumentando en la película con el paso del tiempo, y en este caso es más notable que la película se vuelve opaca, ya que comparando la semana 1, hasta la semana 12, la película ya no permite el paso de la luz del microscopio, y además ésta empieza a desintegrarse en la semana 12, ya que se pueden observar algunas fisuras en ella.

Esta película muestra una correcta homogenización de los polímeros. Ya que en esta la proporción de etilcelulosa es menor, la degradación es más rápida, debido a que mayoritariamente está constituida por PLGA.

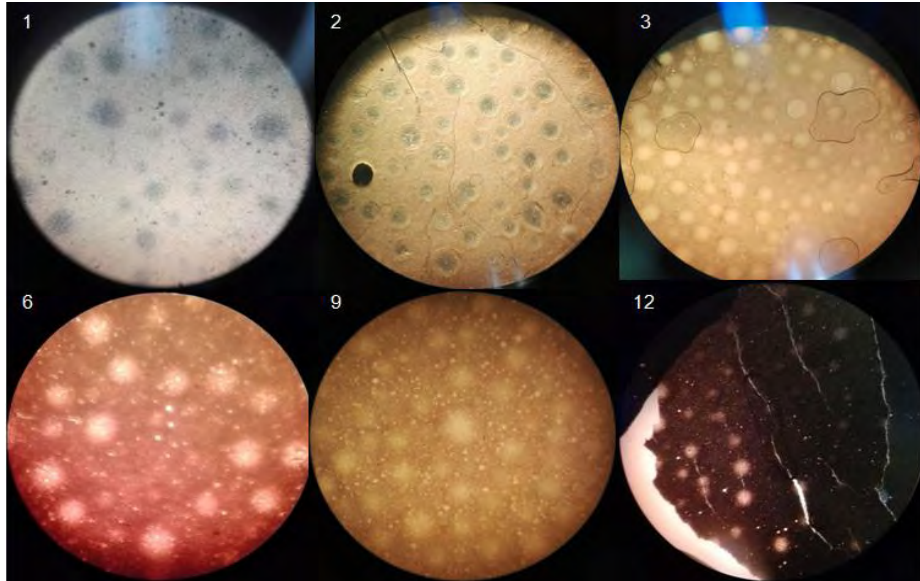


Figura 22. Degradación de la película 3 con el paso tiempo, en cada imagen está indicada la semana (100x).

En la película 4 (Fig. 23) se puede observar claramente la degradación del PLGA, en la primera semana se puede observar que la película se hidrató y se volvió opaca, aunque hay algunos puntos transparentes, y conforme avanzan las semanas la película se vuelve más opaca y no permite el paso de la luz.

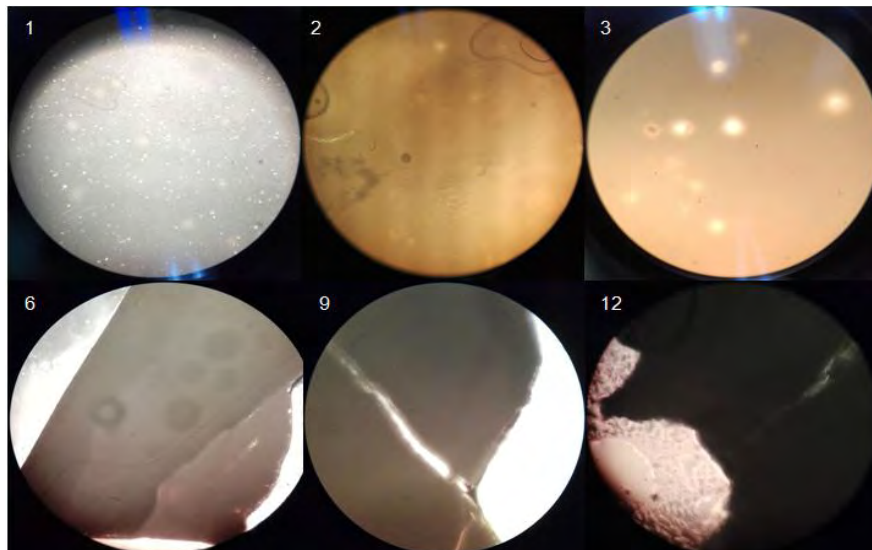


Figura 23. Degradación de la película 4 con el paso del tiempo, en cada imagen está indicada la semana (100x).

Como se puede observar la película 5 (Fig.24), conserva su transparencia, no hay cambio de color durante el tiempo del estudio. Debido a que su composición de etilcelulosa, la cual no es biodegradable.

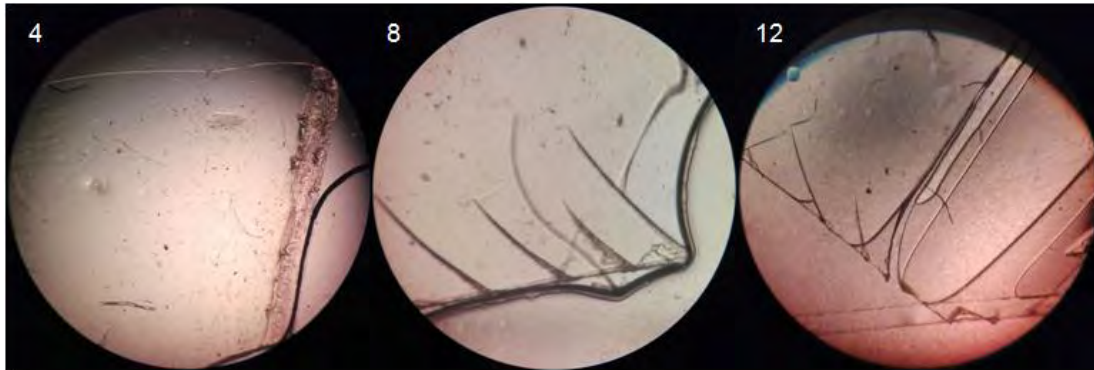


Figura 24. Degradación de la película 5 con el paso del tiempo, en cada imagen está indicada la semana (100x).

El PLGA se degrada por la hidrólisis de los grupos éster, a través de una erosión heterogénea en ambientes acuosos. La degradación del PLGA se puede resumir en cuatro pasos: (1) hidratación: el agua penetra en la región amorfa y rompe los puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals, causando así una disminución en la temperatura de transición vítrea; (2) degradación inicial: ruptura de los enlaces covalentes y disminución del peso molecular; (3) degradación constante: los grupos carboxílicos autocatalizan el proceso de degradación y se empieza a perder masa, debido a la ruptura de los enlaces covalentes del esqueleto del polímero, resultando en una pérdida de integridad; (4) solubilización: los fragmentos del polímero son rotos en moléculas que son solubles en agua. Después de la degradación los productos que resultan de esta son el ácido láctico, y el ácido glicólico.

La velocidad de degradación depende de diferentes parámetros como: (1) el peso molecular: se ha reportado que al aumentar el peso molecular del PLGA, la velocidad de degradación disminuye; (2) la proporción de ácido láctico y de ácido glicólico: a mayor contenido de ácido láctico el polímero es menos hidrofílico, por lo que absorbe menos agua y subsecuentemente se degrada más lentamente, el

polímero que presenta una degradación más rápida es el que presenta proporción 50:50; (3) estereoquímica: la mezcla de monómeros de ácido láctico D y L, es común, las regiones amorfas D y L, llevan a una degradación acelerada del PLGA.⁴⁸

➤ **Evaluación de paso de agua a través de la película ante una presión aplicada**

La prueba no se pudo realizar como se planteó en la metodología, ya que no se presentaba ningún flujo de agua si la película no estaba en contacto con agua por ambos lados, así que se midió indirectamente en la prueba de liberación. Se midió el flujo mediante la cantidad de agua agregada al tubo durante cada tiempo de medición, y son los resultados que se muestran en las siguientes gráficas. La prueba no se pudo realizar en la película 1 debido a su falta de uniformidad, ya que se rompía al colocarla en el tubo, y en la película 5 tampoco se pudo realizar debido a que era muy rígida y se rompía.

En la figura 25 se puede observar que la película 2 no presenta un flujo a presiones de 15 y 30 mmHg, sin embargo a presiones de 25 y 40 mmHg se puede observar que el flujo aumenta con el tiempo, es de esperar que el flujo aumente conforme aumenta la presión, pero en este caso podría variar debido a las propiedades de la película, como por ejemplo su elasticidad, al realizar la prueba de módulo de Young la película se rompió, y en este caso al realizar la prueba a 35 mmHg la película se rompió a los 75 min. Aunque es importante destacar que la película si responde al estímulo de la presión.

Es importante aclarar también que en cada presión se utilizaron muestras diferentes de película, así que, a pesar de lo observado al microscopio, puede que los polímeros en la película no se encontraran homogéneamente distribuidos, lo que causaría las variaciones observadas en la prueba.

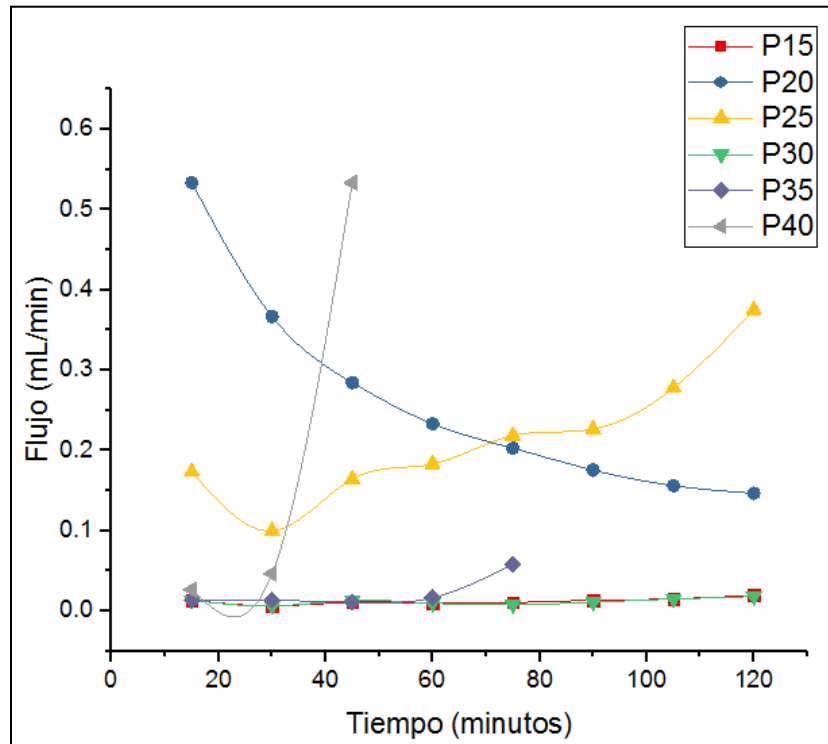


Figura 25. Flujo de la película 2

En la figura 26 se observa el flujo de la película 3, a presiones de 15, 20, 25 y 35 mmHg no hay un flujo de agua significativo, pero a presión de 30 mmHg se obtiene un flujo elevado, que posteriormente se mantiene, hasta que se rompe la película en los 60 minutos, esto se debe a la elasticidad de la película, que inicialmente permite el flujo de agua, pero posteriormente se va deformando lo que disminuye el flujo de agua, hasta que se rompe. En el caso de la presión de 40 mmHg el flujo fue aumentando, pero también se observó una deformación de esta a partir de los 60 minutos.

Pero al igual que la película 2, la película 3 responde al estímulo de la presión.

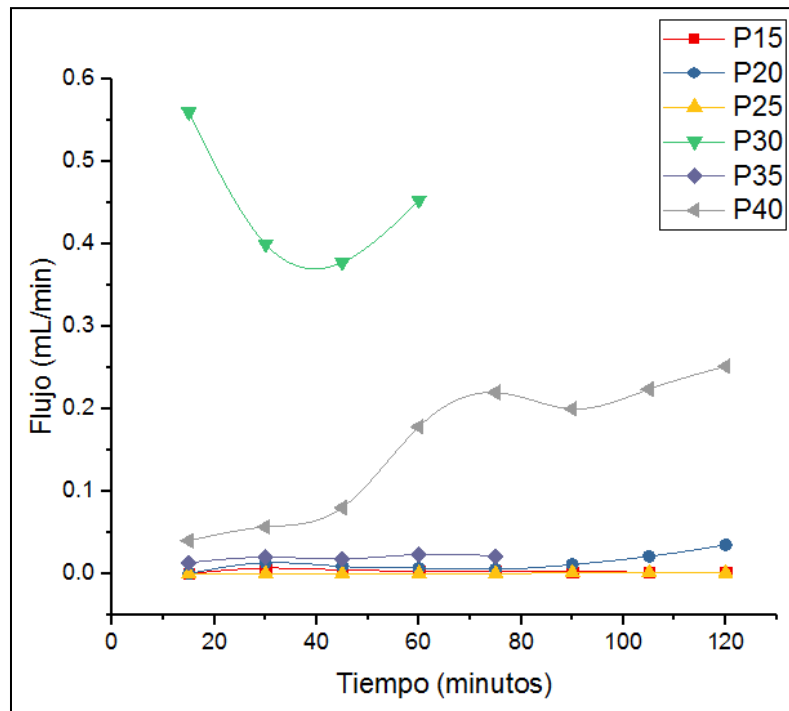


Figura 26. Flujo de la película 3

El comportamiento de la película 4, el cual se observa en la figura 27, fue diferente a las otras películas ya que esta mostró un flujo inicial elevado a una presión baja (15 mmHg), pero conforme pasaba el tiempo el flujo disminuye, se observando un comportamiento similar a una presión de 30 mmHg, esto se puede justificar mediante la composición de la película, la cual está constituida completamente por PLGA, y como observamos en las pruebas anteriores fue la que presentó un menor módulo de Young, es decir mayor elasticidad, por lo que conforme se fue desarrollando la prueba la película se fue deformando y esto disminuyó el flujo de agua que pasaba a través de ella. El comportamiento de esta película fue más errático, por lo que no podría decirse que realmente este respondiendo al estímulo de la presión.

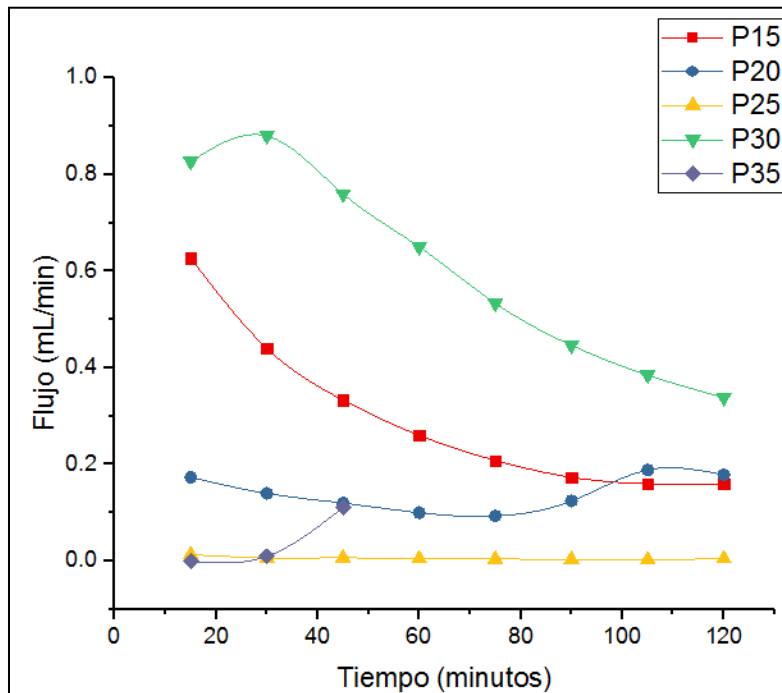


Figura 27. Flujo de la película 4

Para un sistema de liberación sensible a la presión es necesario que haya un flujo de agua, debido a que si se quiere utilizar el sistema para una patología como el glaucoma, la película debe responder al aumento de la presión hidrostática debida al humor acuoso, por lo que la película que presentó mejor característica en este aspecto es la película 3.

➤ **Liberación de florfenicol a diferentes presiones**

Se realizó la prueba de liberación con un fármaco similar en estructura, composición y peso molecular al fármaco para tratamiento de glaucoma (dorzolamida), la prueba se realizó como se describe en la metodología y como se muestra en la figura 28.



Figura 28. Sistema utilizado para la prueba de liberación de florfenicol

La película al estar en contacto con el agua mostraba un transporte de agua además de un transporte del fármaco. Por lo que el volumen de los tubos va disminuyendo y por ende la presión, para mantener una concentración constante dentro del tubo, conforme disminuía el volumen en el tubo, se mantenía la presión agregando más solución del fármaco en su concentración inicial. El experimento se mantuvo en constante agitación a temperatura ambiente.

En la figura 29 se puede observar que la película 2 a presiones de 15 mmHg y 35 mmHg liberó alrededor del 15-20% del fármaco a lo largo del estudio, mientras que a una presión de 40 mmHg se logró una liberación entre el 40-45% del fármaco en los primeros 45 minutos y posteriormente de esto la película se rompió. A pesar de que está respondiendo al estímulo de la presión, sólo lo hace a una presión muy alta, lo cuál no sería adecuado para el modelo que trata de desarrollarse.

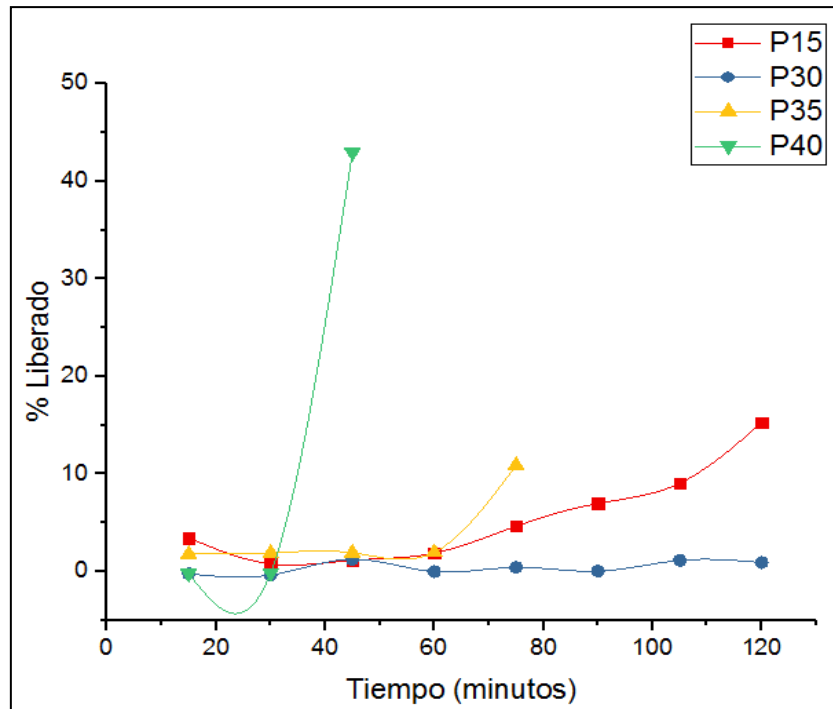


Figura 29. Liberación de la película 2 a diferentes presiones

La liberación de la película 3 se muestra en la figura 30, se puede observar en la gráfica a presiones de 15, 20 y 25 mmHg la liberación es casi nula. Mientras que a una presión de 30 mmHg se inicia con un porcentaje de liberación de 35% y a los 45 minutos se logra una liberación de alrededor de 85%. A presión de 40 mmHg se observa una liberación gradual conforme avanza el tiempo y se llega a una liberación del 60% del fármaco.

Esta película se apega más al modelo deseado, ya que a excepción de la presión de 35 mmHg, donde se rompió la película, la liberación va aumentando conforme aumenta la presión, y se alcanzan porcentajes de liberación altos en tiempos cortos, y si el modelo es utilizado para el glaucoma, es necesario que la liberación del fármaco se presente de manera rápida en cuanto aumenta la presión intraocular.

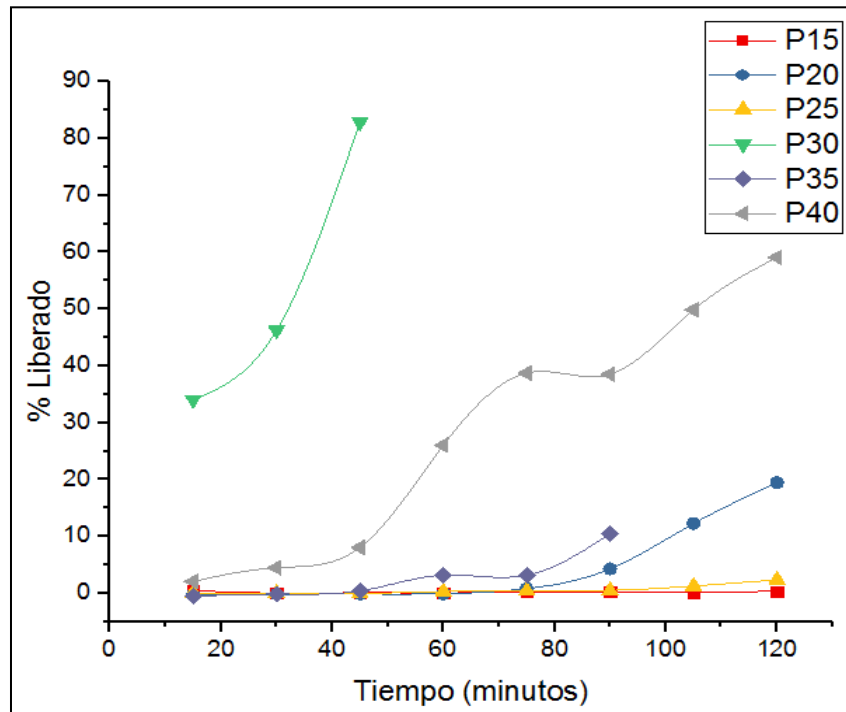


Figura 30. Liberación de la película 3 a diferentes presiones

La liberación de la película 4 se muestra en la figura 31, de acuerdo a lo observado en la prueba de evaluación del paso de agua a través de la película, esta película no controla la liberación conforme aumenta la presión, sino más bien desde presiones bajas como 15 mmHg el sistema alcanza el 100% de liberación del fármaco a los 90 minutos, y sin embargo a una presión de 25 mmHg la liberación es prácticamente nula. Por lo que la liberación de esta película no se ajusta al modelo requerido.

En esta película se observó la deformación de la misma conforme aumentaba la presión, como ya se mencionó en la prueba anterior. En la figura 32 se puede observar la ruptura de la película a una presión de 35 mmHg, en la imagen se puede notar claramente que debido a la elasticidad de la película ésta se deforma hasta romperse.

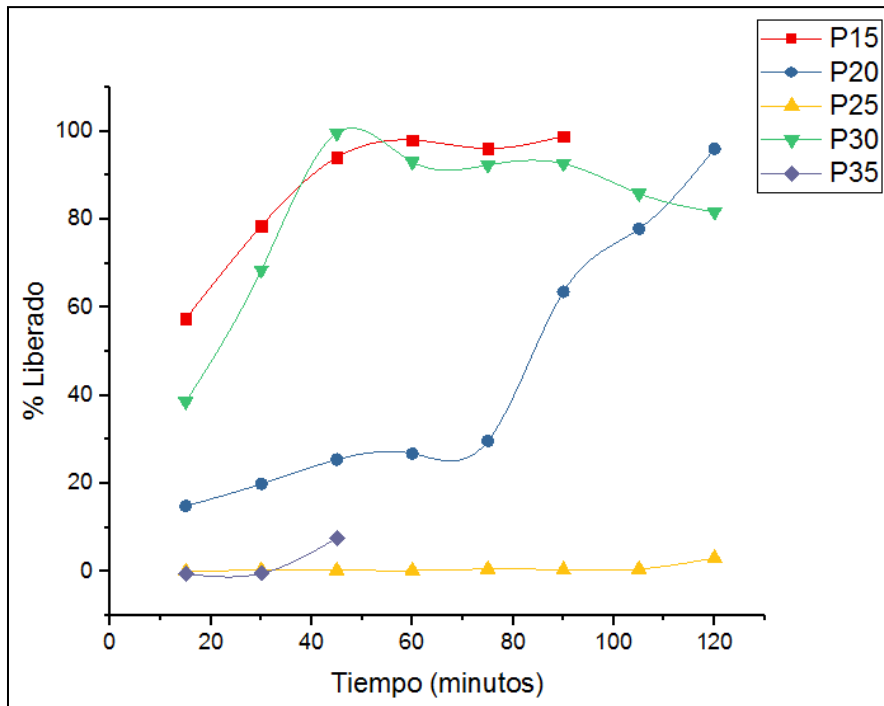


Figura 31. Liberación de la película 4 a diferentes presiones

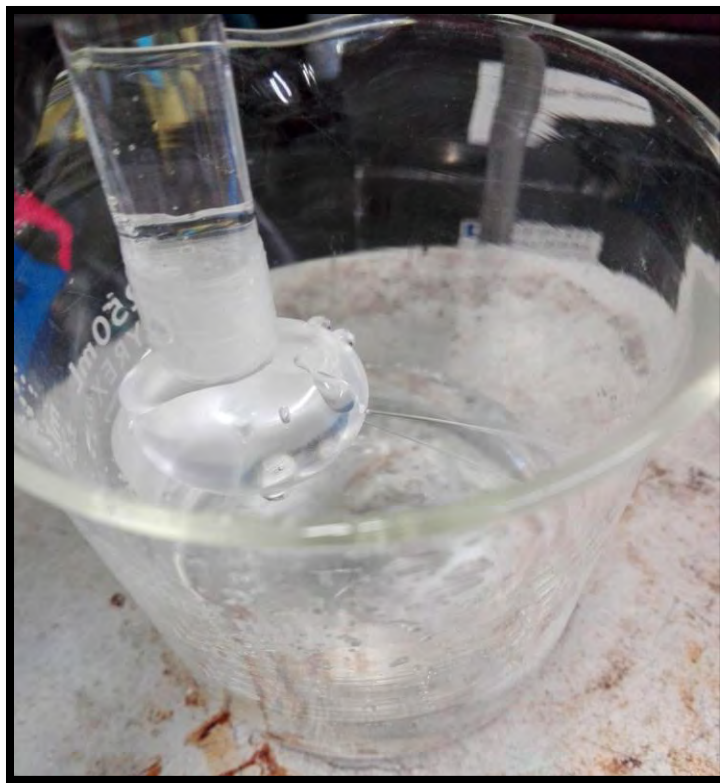


Figura 32. Ruptura de la película 4 a una presión de 35mmHg

Finalmente, para tener una comprensión más completa sobre las películas y su respuesta a la presión se realizaron gráficas de las diferentes películas a una sola presión.

Mediante la comparación de las diferentes películas, se logró obtener la película que se apegaba más al modelo requerido.

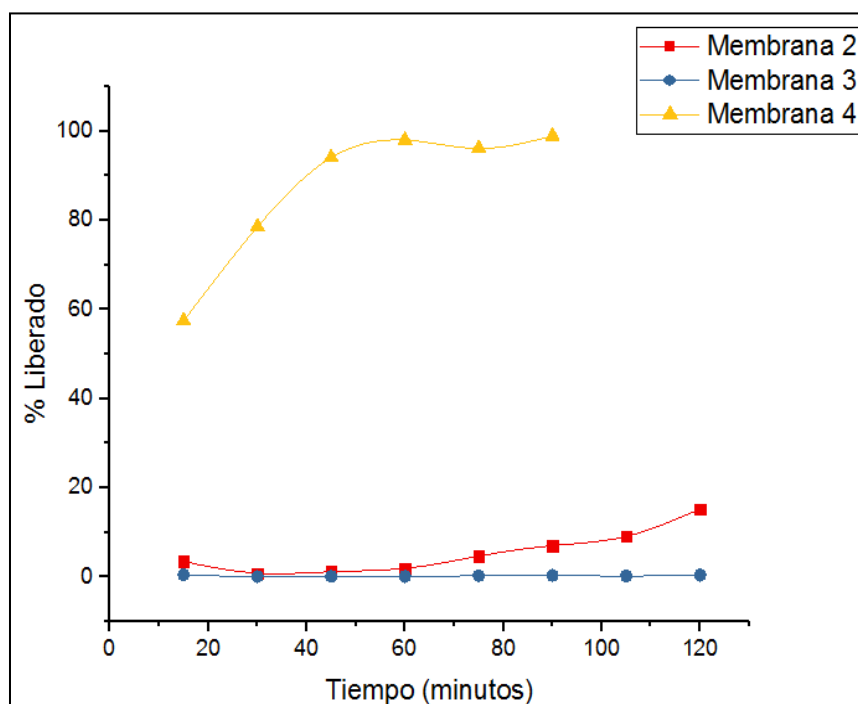


Figura 33. Las diferentes películas a presión de 15mmHg

A una presión de 15 mmHg, se necesita que la liberación del fármaco sea prácticamente nula, ya que es la presión normal del ojo, como se puede observar en la figura 33, la película 3 es la única que no libera a esta presión, la película 2 llega a una liberación entre el 15 al 20%, y la película 4 llega al 100% de la liberación del fármaco.

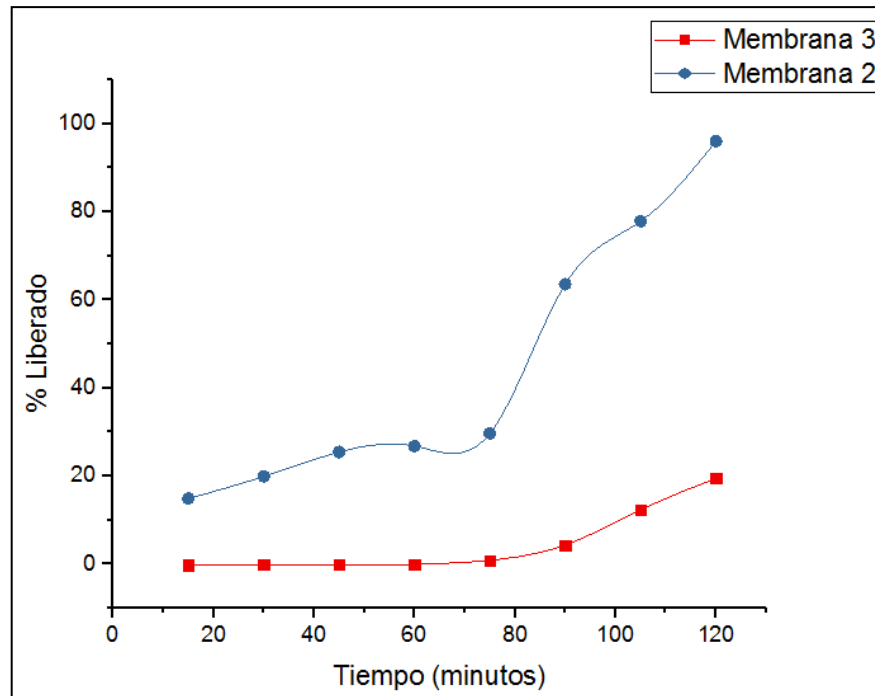


Figura 34. Las diferentes películas a una presión de 20mmHg

Como podemos observar en la figura 34, el porcentaje de liberación del fármaco es afectado por la presión de 20 mmHG, encontrándose que las películas 2 y 4 presentaron el 15 y 95% de fármaco liberado respectivamente. A una presión de 20 mmHg se empieza a considerar una presión hiperbárica para el ojo, aunque esto depende de las diferencias entre individuos.

Por lo que la película 3 responde al estímulo de la presión siguiendo el comportamiento deseado, es decir, al aumentar la presión incrementa la liberación del fármaco (aunque no de manera proporcional).

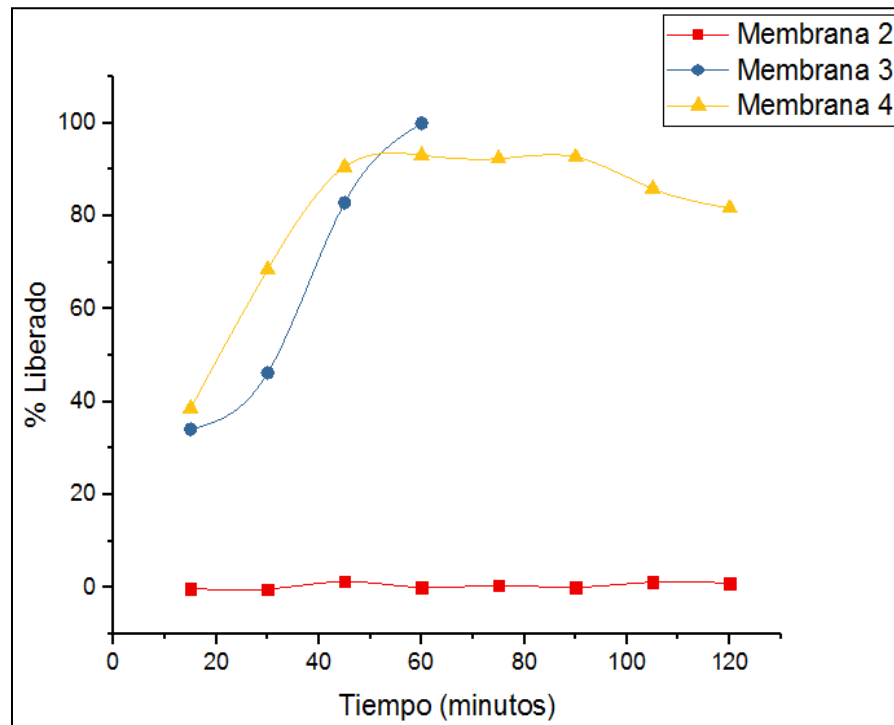


Figura 35. Las diferentes películas a una presión de 30mmHg

Por último, la figura 35 muestra que la película 3 alcanza el 100% de liberación a una presión de 30 mmHg en 60 minutos, mientras que la película 2 no libera al fármaco y la película 4 libera alrededor de un 90-95% del fármaco, pero le toma más tiempo.

Tomando en cuenta todas las pruebas realizadas, la película que es más apta para un sistema de liberación controlada sensible a la presión es la película 3, por lo que se procederá a realizar el nanosistema con la proporción de polímeros correspondiente a esta película.

➤ **Elaboración de las nanopartículas.**

El método de doble emulsión W/O/W, es el método más utilizado para encapsular fármaco solubles en agua, como péptidos, proteínas, vacunas, entre otros ⁽³⁴⁾. Debido a que la dorzolamida es soluble en agua, se utilizó este método para realizar las nanopartículas.

Para realizar las nanopartículas se utilizó como proporción de polímeros 90%PLGA-10%ETC, según los resultados obtenidos en las películas. Si se observa la figura 36, se observa la emulsión, en donde se puede apreciar las 3 fases que la constituyen, por lo que se pudo obtener exitosamente la emulsión. Macroscópicamente se observó que la emulsión presentaba una consistencia cremosa y no existió una separación de fases. Además se lograba posteriormente la correcta evaporación del disolvente, dando como resultado una dispersión coloidal. Para las condiciones y proporciones de tensoactivo a utilizar se consultó la bibliografía.⁵⁰

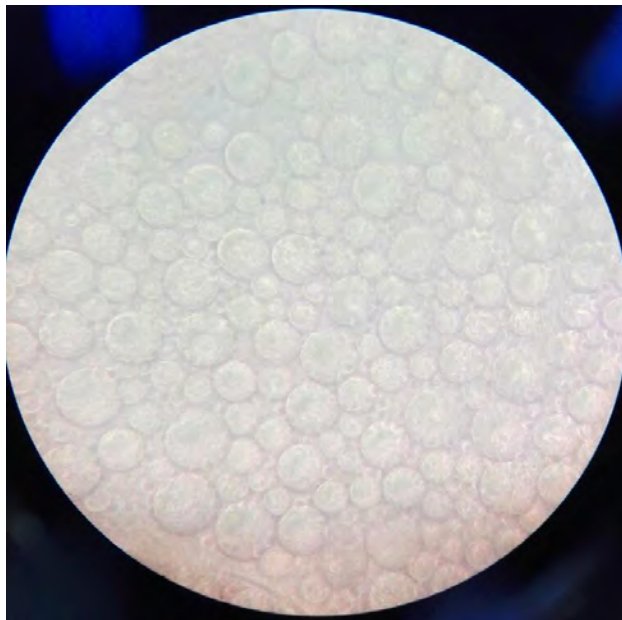


Figura 36. La emulsión al microscopio (100x)

➤ **Tamaño de partícula**

Se ha reportado que el tamaño de partícula deseable para nanosuspensiones administradas ocularmente está entre 200 y 600 nm.⁵¹ En la figura 37, se puede observar la distribución obtenida, los datos estadísticos nos dicen que el 90% de

las nanopartículas se encuentran con un tamaño igual o menor de 295.3 nm, por lo que son aptas para la administración ocular

Se ha demostrado que la biodisponibilidad de las nanopartículas depende de propiedades como el tamaño de partícula y sus características de la superficie. En un estudio realizado las nanopartículas de menor tamaño (20 nm) fueron rápidamente eliminadas de los tejido periorculares, mientras que partículas con un tamaño entre 200-2000 nm fueron retenidas en el sitio de administración por al menos dos meses⁵², por lo que se puede decir que el tamaño de partícula es un factor importante, para que no sean eliminadas de la cavidad ocular, y puedan utilizarse como un sistema de liberación modificado.

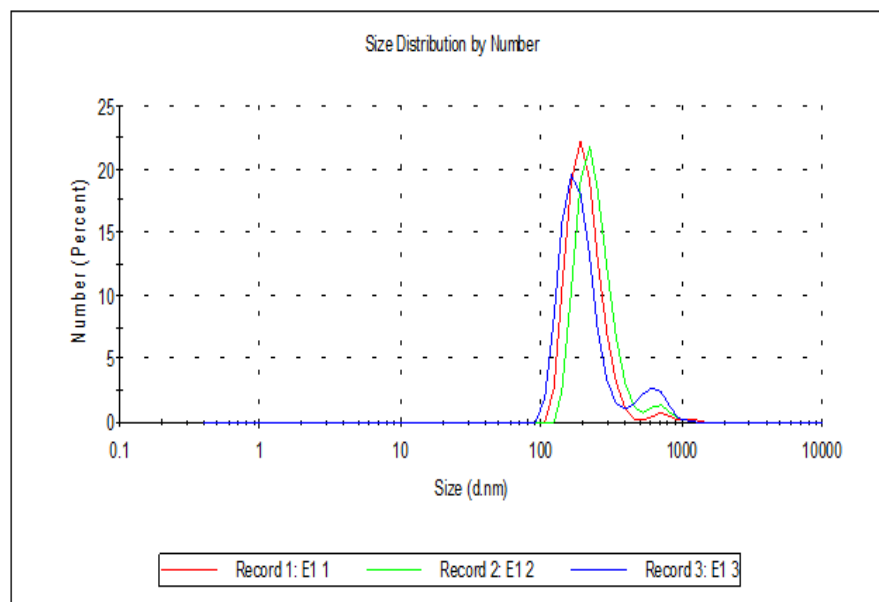


Figura 37. Gráfica tamaño de partícula $D_{90}= 295.3$ nm $D_{50}= 200.1$ nm

➤ Morfología

En la figura 38 se observan los resultados obtenidos de la microscopía, las nanopartículas muestran una estructura esférica, sólida y densa.

En la Imagen se puede observar también la polidispersión de la nanosuspensión, debido a esta polidispersión y a los primeros resultados obtenidos en la prueba de tamaño de partícula, se modificaron algunos parámetros al realizar la emulsión, como el tiempo y la velocidad de agitación, con estas pruebas se llegó al tiempo óptimo, el cual se encuentra en la metodología. Sin embargo, siguen existiendo algunas discrepancias en el tamaño de partícula, por lo que sería recomendable filtrar, para mantener una población homogénea, o bien modificar otros parámetros en la realización de la emulsión.

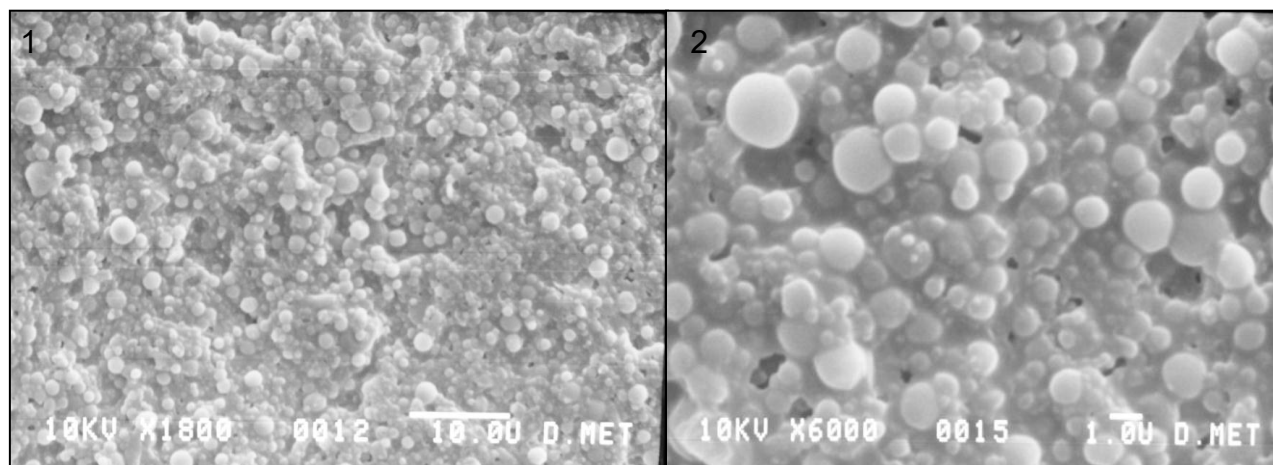


Figura 38. SEM de las nanopartículas. (1) Ax1800, (2) Ax6000

➤ **% de Encapsulación**

El % de encapsulamiento es un parámetro muy importante para la velocidad y duración de la liberación del fármaco. Las nanopartículas que tienen un mayor contenido de fármaco, muestran una mayor liberación inicial, que aquellas que tienen un menor contenido de fármaco. El % de encapsulación se ve afectado por diferentes factores: la proporción del PLGA que se utiliza, el disolvente, la posible interacción entre el PLGA y el fármaco, la miscibilidad del fármaco en el PLGA, la solubilidad y estabilidad del fármaco y el proceso de manufactura.⁵³

En promedio el porcentaje de encapsulación fue de $86.94 \pm 5.22\%$, valor superior al reportado en otros estudios ($59.8 \pm 6.1\%$)³³ Por lo que tanto el método de elaboración de las nanopartículas y la formulación es viable para encapsular altas cantidades de fármaco. En este caso el fármaco se encontraba en una concentración de 3.6%, es decir casi el doble de la dosis recomendada (2%), esto se hizo con el fin de encapsular la mayor cantidad de fármaco posible, ya que por los resultados reportados en otros estudios se preveía que el % de encapsulación iba a ser bajo, pero con los resultados obtenidos se puede disminuir la dosis a la recomendada.

Tabla 8. % de encapsulación del fármaco	
Suspensión de nanopartículas	% de encapsulación
1	91.62 %
2	87.90%
3	81.30%
Promedio	$86.94 \pm 5.22\%$

➤ **Estudios de liberación de dorzolamida**

El aumento de presión que se presenta en el glaucoma es debido a la presión hidrostática ejercida por el humor acuoso y de acuerdo al principio de Pascal, explicado anteriormente, la presión ejercida en la superficie del fluido, siempre y cuando no haya movimiento, será la misma en todo el fluido. Por lo que el sistema utilizado era adecuado para simular las condiciones de presión.

En la figura 39, se puede observar el % liberado de fármaco de las nanopartículas a diferentes presiones.

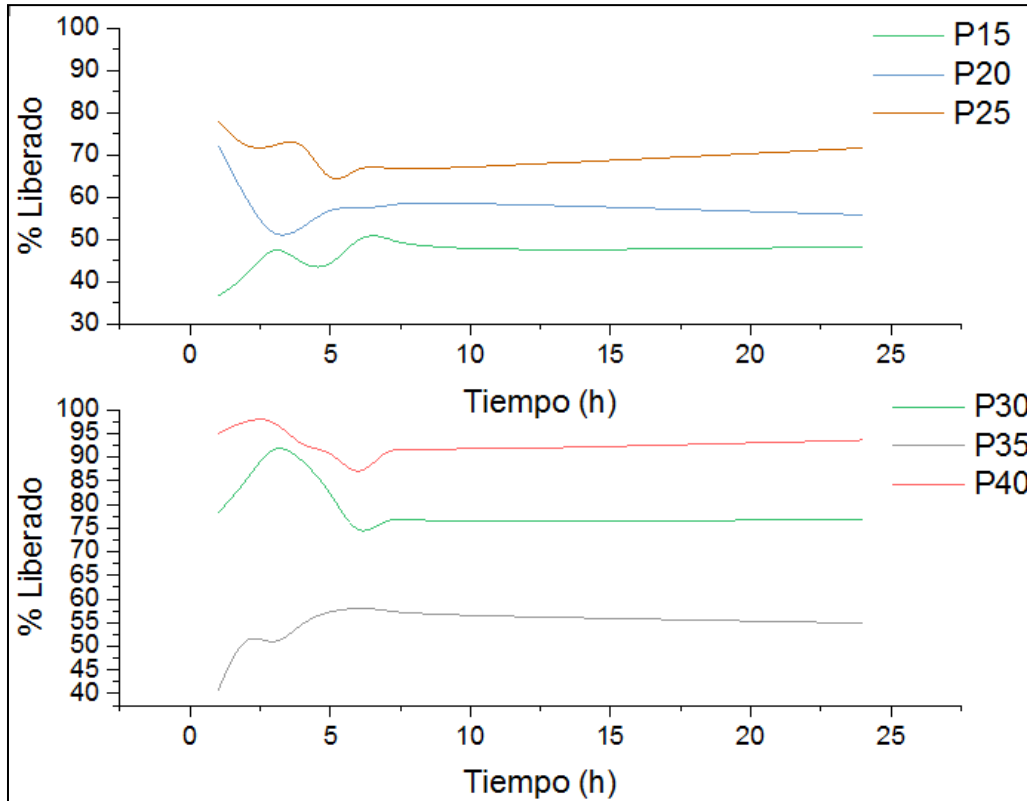


Figura 39. Liberación de las nanopartículas a diferentes presiones.

Podemos observar primeramente que el sistema responde al estímulo de la presión, hay un aumento en la liberación conforme incrementa la presión, con excepción de la presión de 35 mmHg.

Revisando los resultados obtenidos en las películas y en específico los de la película 3, la cual sirvió de base para realizar las nanopartículas, se observó que a una presión de 35 mmHg no se presentaba liberación del fármaco, sino que se rompía a los 75 minutos después de iniciar la prueba. En el caso de las nanopartículas se observa que hay liberación de un 55% del fármaco, pero no es proporcional con lo esperado para esta presión, esto puede deberse a un cambio en las propiedades mecánicas de la película, pero debido a que no se han desarrollado estudios similares, no se puede corroborar.

Las nanopartículas respondieron al estímulo de la presión, incluso con mejores resultados que los obtenidos en las películas, su respuesta fue proporcional al

aumento de la presión, puede deberse el área de contacto era mayor y con esto las nanopartículas fueron más sensibles a la presión que las películas.

IX. Conclusiones

- ❖ Se logró obtener un macrosistema a base de películas poliméricas sensibles a la presión, utilizando como polímeros Etilcelulosa y PLGA, de las cuales, la película que presento las mejores características fue la que tenía una composición de 90%PLGA-10%Etilcelulosa.
- ❖ A partir del macrosistema, se logró diseñar un nanosistema a base de nanopartículas sensibles a la presión que contenían encapsulada a la dorzolamida.
- ❖ Las nanopartículas presentaron las características adecuadas: tamaño de partícula (295.3 nm), morfología esférica, % de encapsulación ($86.94 \pm 5.22\%$) y aumento de la liberación del fármaco conforme incrementaba la presión, dando la posibilidad de utilizarse para un tratamiento alternativo en una patología donde se presente un aumento en la presión intraocular como es el glaucoma.

X. Perspectivas

Ambos sistemas pueden servir como base para un futuro tratamiento para una patología como el glaucoma. Aún se tienen que hacer modificaciones en la formulación para que la liberación del fármaco sea más acorde a las presiones que presenta el ojo. Además de probar su eficacia y seguridad en un modelo *in vivo*, y de esta manera poder obtener un nuevo sistema de liberación más eficiente y menos doloroso, que el tratamiento actual, el cual en algunos casos es cirugía.

XI. Referencias

1. Polymer encyclopedia [Russian], Vol. 1, A-K. Sovetskaya Entsikl., Publishers, Moscow, 1972. 1224 columns. 4.40 Rubles. DOI: 10.1002/pol.1974.130120711.
2. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, June 2006; 5 (1): 561-573
3. Glaucoma Research Foundation, <http://www.glaucoma.org/es/que-es-el-glaucoma.php> (2017)
4. Glaucoma, Basic and Clinical Science Course, Sección 10, 2014-2015, American Academy of Ophtalmology.
5. OMS, Glaucoma <http://www.who.int/bulletin/volumes/82/11/feature1104/en/> (2017).
6. Glaucoma Research Foundation, <http://www.glaucoma.org/glaucoma/facts-statistics/glaucoma-facts-and-stats.php> (2017)
7. Chien Y. Novel Drug Delivery Systems, Second Edition, Pág.1, 1991
8. Kewal K. Jain, Drug Delivery System, Second Edition, Jain PharmaBiotech, Basel, Switzerland, 2014, pág.1.
9. Lopes CM, Soares C (2015) Transdermal Drug Delivery Systems Activated by Physical stimuli: Techniques and Applications. Drug Des 4: e129. doi:10.4172/2169-0138.1000e129
10. Bajpai., et al., Stimuli Responsive Drug Delivery Systems: From Introduction to application. iSmithers, p.111, 2010.
11. Díaz J., Mecánica de los fluidos e hidráulica, Primera Edición, Programa editorial Universidad del Valle, Colombia, Pág.29 , 2006.
12. Hidrostática. Física-cbc. <http://oeste.fisicacbc.org/hidro03.pdf>
13. Gato F., Sistemas de aeronaves de turbina, tomo IV, NoBooks Editorial, Valencia, 2016, pág. 87.
14. Burbano de Ercilla, S., et al., (2003) Física General. 32ª Edición. Tébar, p. 274
15. Chang, R., et al., Química, Séptima Edición, McGraw-Hill, México, 2002, pág. 487 y 488.
16. Rathore, KS., et al., Timolol maleate a gold standard drug in glaucoma used as ocular films and inserts: an overview. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Volume 3, Issue 1, 2010, Article 005; 23-29.

17. Sandeep,K., et al., Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 (2016); 559-574
18. Zhai,L., (2013) Stimuli-responsive polymer films. *The Royal Society of Chemistry* 42 (17); 7148-60.
19. Chen, J., et al., (2014) Fabrications and Applications of Stimulus-Responsive Polymer Films and Patterns on Surfaces: A Review. *Materials* 7 (2), 805-875.
20. Wilde, L., et al., Development of a pressure-sensitive glyceryl tristearate capsule filled with a drug-containing hidrogel. *International Journal of Pharmaceutics* 461(2014) 296-300.
21. Wilde, L., et al., Development of pressure-sensitive dosage forms with a core liquefying at body temperatura. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 86(2014) 507-512.
22. Goto, M., et al., Effect of hydrostatic pressure on the bilayer phase behavior of symmetric and asymmetric phospholipids with the same total chain length. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(2008) 1067-1078.
23. Mohanraj, VJ. et al., (2006) Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (1): 561-573.
24. Ganta, S., et al., A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of controlled release* 126 (2008); 187-204
25. Balfour JA, Wilde MI: Dorzolamide. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 1997 May;10(5):384-403.
26. Martens-Lobenhoffer J, Banditt P: Clinical pharmacokinetics of dorzolamide. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(3):197-205.
27. Papadimitriou, S., et al., Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate polymers* 73 (2008), 44-54.
28. Katiyar, S., et al., In situ gelling dorzolamide loaded chitosan nanoparticles for the treatment of glaucoma. *Carbohydrate polymers* 102(2014) 117-124.
29. Shinde, U., et al., Development of Dorzolamide Loaded 6-o-carboxymethyl Chitosan Nanoparticles for Open Angle Glaucoma. *Journal of Drug Delivery*, Volume 2013, Article ID 562727, 15 pages.

30. Wadhwa, S., et al., Hyaluronic acid modified chitosan nanoparticles for effective management of glaucoma: development, characterization, and evaluation. *Journal of Drug Targeting*, Volume 18, 2010-Issue 4.
31. Gudmundsdottir, B., et al., (2014) γ -Cyclodextrin Nanoparticle Eye Drops with Dorzolamide: Effect on Intraocular Pressure in Man. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 30 (1), 35-41, DOI: 10.1089/jop.2013.0060
32. Jóhannesson, G., et al., Dorzolamide Cyclodextrin Nanoparticle Suspension Eye Drops and Trusopt in Rabbit. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, Volume 00, Number 00, 2014, Doi: 10.1089/jop.2013.0164.
33. Warsi, M., et al., (2014) Dorzolamide-loaded PLGA/vitamin E TPGS nanoparticles for glaucoma therapy: Pharmacoscintigraphy study and evaluation of extended ocular hypotensive effect in rabbits. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1 (122), 423-31, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.004.
34. Dehaghi, H., et al., Preparation and characterization of dorzolamide HCL loaded in niosome in order to study the amount of its realese. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2012:7(5).
35. Azza A. Hasan. Design and in vitro characterization of samall unilamellar niosomes as ophthalmic carrier of dorzolamide hydrochloride. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2014; 19(6): 748-754.
36. Azza A. Hasan. Formulation and evaluation of dorzolamide hydrochloride-loaded nanoparticles as controlled release drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics*, January-March 2012, Doi:10.4103/0973-8398.100148.
37. Kang-Mieler, J., et al., Advances in ocular drug delivery: emphasis on the posterior segment. *Expert Opinion Drug Delivery*, 2014 11(10):1647-60, doi: 10.1517/17425247.2014.935338.
38. Guo, L., et al., Simultaneous determination of Florfenicol and Diclazuril in compound poder by RP-HPLC-UV method. *Journal of Chemistry* Volume 2014 (2014), Article ID 580418, 5 pages.

39. Gang, Wu., et al., Comparing Microspheres with different internal phase of polyelectrolyte as local drug delivery system for bone tuberculosis therapy. *BioMed Research International* Volume 2014 (2014), Article ID 297808, 8 pages.
40. Erk, N., Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops with diode-array and UV detection. *Pharmazie* (2003) Jul; 58(7) : 491-3.
41. Avgoustakis, K., (2005) Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, DOI: 10.1081/E-EBBE-120013950.
42. Okor, R., et al., Casting solvent effects on the permeability of polymer films of differing quaternary ammonium (cation) content. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (1987) 39(7):547-8.
43. Blachecen, L.S., et al. Effect of humidity and solvent vapor phase on cellulose ester films. *Cellulose* (2012) 19: 442. doi: 10.1007/s10570-012-9654-z.
44. Felton, L., Mechanisms of polymeric film formation. *International Journal of Pharmaceutics* 457 (2013) 423-427.
45. Souza, S., et al. Effect of Hydration on Physicochemical Properties of End-Capped PLGA. *Advances in Biomaterials*, Volume 2014 (2014). Article ID 834942. 9 pages.
46. Romero-Bastida, C., et al. (2004) Effect of plasticizer, pH and hydration on the mechanical and barrier properties of zein and ethylcellulose films. *Cienc.Tecnol. Aliment.* Vol. 4, No.4, pp251-256, 2004.
47. Schaefer, C., et al., Structuring of Thin-Film Polymer Mixtures upon Solvent Evaporation. *Macromolecules* (2016) 49, 6858-6870, Doi: 10.1021/acs.macromol.6b00537.
48. Piergiorgio, G., et al. An overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, 15, 3640-3659; doi: 10.3390/ijms15033640.
49. Hirenkumar, K., Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397; doi: 10.3390/polym3031377.

50. Morán Roldán, E. (2006). Formulación de Casiopeína III la por medio de nanopartículas como un sistema de liberación modificada. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
51. Pawar, P., et al., (2012) Nanotechnology: a new approach for ocular drug delivery system. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 4, Issue 2, 105-112.
52. Patel, A., et al., Ocular drug delivery systems: An overview. World J Pharmacol. 2013; 2(2): 47-64.
53. Sah, E., et al., (2015) Recent Trends in Preparation of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles by Mixing Polymeric Organic Solution with Antisolvent. Journal of Nanomaterials, Volume 2015, Article ID 794601, 22pages.