



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ENCAPSULACIÓN DE UN FÁRMACO EN UNA
NANOEMULSIÓN UTILIZANDO UNA PLATAFORMA
MICROFLUÍDICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA

MIGUEL ANGEL DEL MORAL PEREA



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

20 de marzo de 2020

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MA GUADALUPE LEMUS BARAJAS
VOCAL: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD
SECRETARIO: LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS
1er. Suplente: CARLOS JUAREZ OSORNIO
2do. Suplente: GERARDO LEYVA GOMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Edificio F. Laboratorios 302, 304 y 326 de Bio-fisicoquímica

Edificio F. Laboratorio 324 de Microfluídica

Edificio F. Laboratorio 118, 120 y 121 de la Dra. María Josefa Bernad

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

SUSTENTANTE: MIGUEL ANGEL DEL MORAL PEREA _____

ASESOR DEL PROYECTO: Dr. LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. ERICK DANIEL NIEVES ARANDA _____

Agradecimientos

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, clave: IT203318) por la beca otorgada para la realización de esta tesis y financiamiento para la adquisición de equipos y materiales. Al programa de Apoyo a la investigación y al Posgrado de la Facultad de Química (PAIP 5000-9023) por el financiamiento para materiales. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt proyecto: 284240) por el financiamiento para la reparación y mantenimiento del equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS Zetasizer Nano ZS).

Índice general

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	4
3.1. Praziquantel	4
3.1.1. Características fisicoquímicas y parámetros farmacocinéticos	5
3.1.2. Formas farmacéuticas	7
3.2. Emulsiones	9
3.3. Nanoemulsiones	9
3.3.1. Mecanismo de formación	10
3.3.2. Métodos de fabricación	13
3.4. Microfluídica	14
4. Objetivos	19
5. Hipótesis	20
6. Metodología	21
Metodología	21
6.1. Preparación de soluciones	21
6.1.1. Span 80 - Monooleato de sorbitán.	21
6.1.2. Tween 80 - Monooleato de polioxietilen (20) sorbitano	21
6.1.3. Tween 20 - Monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano	21
6.1.4. Polietilenglicol 1500	22

6.1.5.	Pluronic F-127 - Polietilen-propilen glicol.	22
6.1.6.	Fluido intestinal simulado	23
6.1.6.1.	Solución de NaOH 0.2 N	23
6.1.7.	Fluido gástrico simulado	23
6.2.	Fabricación de microchips	24
6.2.1.	Diseño de la fotomáscara	24
6.2.2.	Fabricación del molde maestro por fotolitografía	25
6.2.3.	Fabricación de réplicas de PDMS por litografía suave	27
6.3.	Montaje experimental y operación del microchip	29
6.3.1.	Bombas y arreglos experimentales para fabricación de nanoemulsiones	30
6.4.	Dispersión dinámica de luz	32
6.5.	Curva de calibración de praziquantel	32
6.6.	Cinética de liberación de la nanoemulsión de praziquantel	33
6.7.	Pruebas biológicas	36
6.7.1.	Muestreo.	36
6.7.2.	Extracción de muestras plasmáticas.	37
6.7.3.	Análisis de muestras por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	37
7.	Resultados y discusión	39
7.1.	Fabricación de nanoemulsión sin PZQ	39
7.2.	Elección de la fase oleosa	41
7.3.	Nanoemulsiones con PZQ y estabilidad cinética	42
7.4.	Perfil de liberación del fármaco	54
7.5.	Pruebas biológicas	62
8.	Conclusiones	64

Lista de acrónimos

HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance (Balance Hidrofílico-Lipofílico).
NE	Nanoemulsión.
PZQ	Praziquantel.
Ta	Tensoactivo.
s/Ta	Sin tensoactivo.
T80	Tween 80.
T20	Tween 20.
S80	Span 80.
PF127	Pluronic F-127.
PEG	Polietilenglicol.
PDMS	Polidimetil siloxano.
PTFE	Politetrafluoroetileno.
CPmax	Concentración plasmática máxima.
AUC	Área bajo la curva (Area under the curve)
$t_{1/2}$	tiempo de vida media.
tmax	tiempo máximo.

Capítulo 1

Resumen

El praziquantel es un fármaco antihelmíntico poco soluble en agua y de biodisponibilidad variable debido a su efecto de primer paso. En este trabajo se formuló una nanoemulsión del tipo aceite en agua que contenía praziquantel, en gotas menores a 150 nm y que fue cinéticamente estable por más de dos meses. Para encontrar una formulación con estas características, se utilizó una plataforma microfluídica la cual permitió realizar muchos ensayos en corto tiempo, utilizar pocos reactivos, generar menos residuos y ahorrar tiempo de experimentación. La plataforma microfluídica está constituida por un microchip de polidimetilsiloxano, unido a una placa de vidrio junto con un piezoeléctrico tipo Langevin que genera ondas ultrasónicas, las cuales producen fuerzas disruptivas que mezclan el aceite y el agua, obteniendo gotas dispersas muy pequeñas de tamaño nanométrico. Con el microdispositivo se formularon diversas nanoemulsiones, donde se varió sistemáticamente proporciones de agua, aceite con el fármaco, tensoactivo y copolímeros estabilizantes. Se produjeron 11 formulaciones distintas cuyo tamaño de partícula e índice de polidispersidad fueron menores a 200 nm y menores a 0.2, respectivamente. Tomando como criterio de selección la estabilidad de las nanoemulsiones hasta por 85 días, se fabricó a mayor escala una de las formulaciones para su caracterización y pruebas posteriores *in vitro* e *in vivo*. Los resultados más notables indicaron que la liberación del fármaco se ajusta al modelo de Peppas-Sahlin y que la biodisponibilidad del fármaco supera en un 42% a la del fármaco en suspensión.

Capítulo 2

Introducción

A través de la historia, una gran cantidad de fármacos han sido descubiertos y producidos a partir de materia prima de origen natural, otros tantos han sido de origen sintético, o han ido teniendo modificaciones estructurales para mejorar su efecto terapéutico. Cada fármaco posee diferentes características biológicas, químicas y físicas, y esto es un hecho que indiscutiblemente se relaciona con el tipo de excipientes que lo contendrán en una forma farmacéutica.

Actualmente se sabe que la liberación oral es por mucho, la forma más común usada para la administración de fármacos. Las dosis predeterminadas y la simplicidad que ofrece la autoadministración por parte del paciente son las principales ventajas que representan la vía oral gracias a las tabletas o a las cápsulas [1]. No obstante, la dificultad en la elaboración de medicamentos reside en el hecho de que cada principio activo posee características diferentes, por lo que su fabricación implica resolver obstáculos relacionados con la forma farmacéutica, el proceso de manufactura y las propiedades del fármaco.

La necesidad por aumentar la productividad en el desarrollo de nuevos medicamentos y la tendencia por miniaturizar y automatizar los procesos condujeron a las industrias farmacéuticas a buscar y adoptar nuevas tecnologías que reunieran dichas ventajas. Recientemente, la popularidad de la tecnología microfluídica ha ido creciendo por la facilidad de uso que brinda al operador, por el abaratamiento de costos que implica su implementación y por las bajas cantidades de muestra o reactivos que se requieren para su operación.

Uno de los principales problemas en la búsqueda de estrategias para optimizar el efecto terapéutico de los fármacos, ha sido optar por el uso de formas farmacéuticas alternas que resuelvan problemas asociados a la baja solubilidad del principio activo en agua, o protegerlo de la degradación química o enzimática, entre otros obstáculos que impiden una absorción adecuada o una mayor biodisponibilidad. El laboratorio 326 de la Facultad de Química se enfoca en la fabricación de nanoemulsiones, cuyos sistemas son capaces de solucionar dichas problemáticas. Aprovechando las ventajas que la microfluídica ofrece, se decidió implementar un método que permitiera encontrar una nanoemulsión cinéticamente estable de praziquantel, cuyas características favorables sirvieran como guía para la producción del mismo producto a mayor escala.

A continuación, se sientan las bases científicas que sustentan la investigación y el desarrollo de este proyecto, y se enuncian datos relevantes sobre el principio activo en cuestión, además se describen conceptos y técnicas convencionales para la fabricación y caracterización de nanoemulsiones. Finalmente se concluye en esta sección con la microfluídica, una de las técnicas más recientes y prometedoras para la elaboración de este tipo de formas farmacéuticas.

Capítulo 3

Antecedentes

3.1. Praziquantel

Para tener una visión más clara respecto al tipo de organismos contra los que praziquantel actúa, es necesario recordar que los parásitos de los humanos se clasifican principalmente en seis divisiones, los cuales incluyen a los protozoos (amebas, flagelados, ciliados, esporozoos, coccidios, microsporidios), los nematodos o lombrices intestinales, los platelmintos (cestodos, trematodos), los pentastómidos o gusanos de la lengua (pueden agruparse con los artrópodos), los acantocéfalos o gusanos de cabeza espinosa y artrópodos (p. ej., insectos, arañas, ácaros, garrapatas). Aunque a menudo suele haber confusiones y frecuentemente se proponen nuevas clasificaciones, este tipo de clasificación sirve como un panorama general para ayudar a comprender mejor en qué categoría se encuentra cada parásito. Además, es importante recalcar que no todos los organismos hallados e incluidos en dicha clasificación son considerados clínicamente relevantes en el contexto de la parasitología humana [2]. En 1972, el praziquantel fue identificado a partir de un grupo de pirazino-isoquinolonas heterocíclicas, y junto al hallazgo se encontró que tal molécula tenía una amplia actividad antihelmíntica [3]. Además, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, aunque no hay relación estructural entre el praziquantel y otras moléculas para el mismo tratamiento, es sumamente activo contra una amplia gama de trematodos, como algunas especies de esquistosomas patógenos para el hombre, y también es activo frente a cestodos en su etapa adulta y larvaria [4]. En general, praziquantel es un fármaco activo contra algunos tipos de helmintos, principalmente cestodos y trematodos, quienes son responsables de infecciones intestinales y cisticercosis.

El mecanismo molecular de acción de praziquantel a través del cual ejerce su efecto en las infecciones parasitarias no ha sido detallado completamente, pero se sabe que causa rápidamente daño sobre el tegumento del parásito, que corresponde al tejido orgánico que cubre su cuerpo, y por otra parte, les produce contracciones paralíticas musculares. Esto podría deberse a una interacción con la glutatión S-transferasa del parásito y los niveles de calcio intracelular, ya que se estimula una rápida absorción de Ca^{2+} [5][6]. También se ha relacionado el daño con una parálisis espástica del parásito y la destrucción de su escólex, correspondiente a su porción cefálica, en cuya región hay extremidades semejantes a ganchos que lo ayudan a mantenerse anclado en las mucosas intestinales, en el caso de los cestodos [7]. Adicionalmente, otros autores han concluido que la naturaleza lipofílica de praziquantel le permite penetrar rápidamente la superficie membranal del gusano, y frente a una exposición in vitro de gusanos macho adultos con el fármaco se favorece una mayor exposición de los antígenos del parásito [8].

3.1.1. Características fisicoquímicas y parámetros farmacocinéticos

Praziquantel está clasificado en el grupo II dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, lo que significa que es un fármaco con baja solubilidad y alta permeabilidad [9]. En la figura 3.1 se muestra su estructura química.

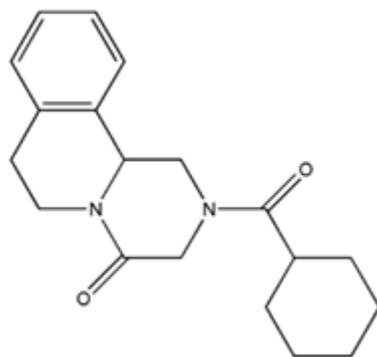


Figura 3.1: Estructura molecular de praziquantel [10].

Los medicamentos poco solubles en agua como praziquantel tienen baja biodisponibilidad. El hecho de que tenga una baja solubilidad puede conducir a una velocidad de disolución lenta en el tracto gastrointestinal, lo que a su vez limitaría la velocidad de absorción, y en conjunto con el

metabolismo de primer paso contribuiría a una baja biodisponibilidad [9].

Antes de comenzar con la farmacocinética del principio activo, se muestra a continuación en la tabla 3.1 algunas de las características fisicoquímicas de praziquantel.

Tabla 3.1: Características fisicoquímicas [10].

Peso molecular	312.4 g/mol
Descripción física	Sólido blanco
Punto de fusión	136°C
Solubilidad en agua	400 mg/mL
Log P (octanol/agua)	2.5

En un estudio realizado en Sudán en voluntarios sanos y voluntarios infectados con esquistosomiasis se determinó la farmacocinética de praziquantel. En dicha investigación se determinó que el fármaco es rápidamente hidroxilado (metabolismo de primer paso) a productos mono- y dihidroxilado en hombre. La vida media de eliminación plasmática ($t_{1/2}$) varió entre 1.18 ± 0.09 a 1.75 ± 0.14 h; la concentración plasmática máxima (CP_{max}) osciló entre 45 ± 13 a 1088 ± 36 ng/ml (para dosis de 5 a 50 mg/kg) y t_{max} de 2.75 ± 0.34 h a 1.88 ± 0.36 h [11].

Cuando es administrado oralmente, praziquantel es absorbido por difusión pasiva y es distribuido en el cuerpo, atraviesa la barrera hematoencefálica, y pasa a través de las paredes intestinales. En humanos, y animales como ratas, monos y perros, se alcanza una rápida y eficaz absorción en el intestino del 75 % al 100 % de la dosis administrada, aunque su disponibilidad es variable. Además, la excreción renal también es rápida, con el 80 % de la dosis total excretada como metabolitos a través de la orina para el cuarto día, y un 90 % correspondiente al valor anterior es alcanzado durante las primeras 24 horas. En otro estudio realizado en humanos, los niveles plasmáticos máximos del fármaco inalterado de 1 ug/ml se lograron sistémicamente 1 a 2 horas después de la administración, y esto solo reflejó del 5 % al 7 % del fármaco ingerido [11] [12].

La biodisponibilidad de praziquantel se ve comprometida cuando es administrado vía oral. Sin embargo, se encontró que cuando este es coadministrado con comida o más específicamente con

una dieta alta en lípidos o carbohidratos, la biodisponibilidad incrementa. Por tal motivo se realizó un estudio en el que se determinó la diferencia entre una administración del fármaco en ayunas, otra con una dieta alta en lípidos y otra con una dieta alta en carbohidratos, como se muestra graficado en la figura 3.2, la biodisponibilidad de praziquantel es mayor en presencia de carbohidratos, seguido de la administración con lípidos, respecto al praziquantel tomado en ayuno [13].

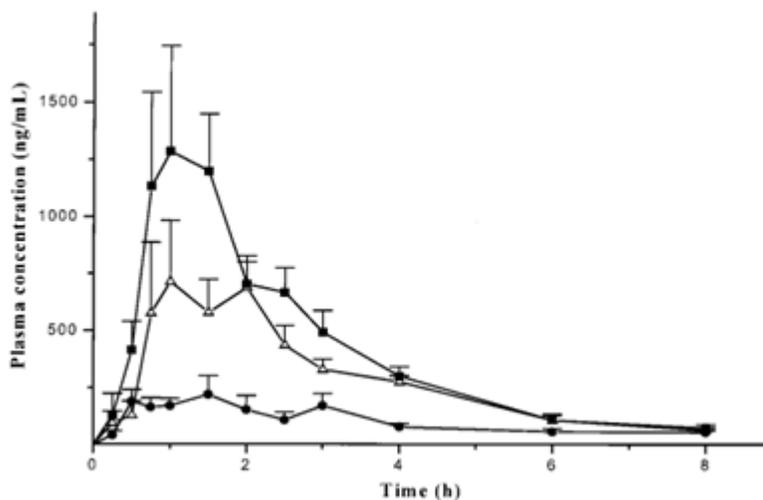


Figura 3.2: Concentración plasmática promedio (+ error estándar del promedio) de PZQ en voluntarios sanos tratados con una dosis oral única de 1800 mg (tres tabletas de 600 mg) en ayuno (círculos negros), o inmediatamente después de un desayuno alto en grasas (triángulos blancos) y después de un desayuno alto en carbohidratos (cuadros negros). [13]

Aunque se demostró que los alimentos aumentan significativamente la biodisponibilidad de praziquantel, aún queda por demostrar el mecanismo que describa tal proceso. No obstante, el efecto podría estar relacionado con la desintegración de la tableta, la mejor disolución del fármaco u otros factores, como los cambios en el flujo sanguíneo hepático o en el metabolismo del fármaco durante el primer paso a través del hígado [13].

3.1.2. Formas farmacéuticas

Actualmente y en un inicio, praziquantel fue comercializado por Bayer con el nombre de Biltricide para uso humano y como Droncit para uso veterinario (Fig. 3.3). Hoy en día, hay variedad de

medicamentos con el mismo principio activo, comercializados bajo distintos nombres. Generalmente, el fármaco se suministra en tabletas oblongas y de tamaño considerable que contienen 600 mg del principio activo, con dos o tres ranuras para facilitar la subdivisión en segmentos que contienen 200 o 150 mg, respectivamente [14].



Figura 3.3: Tabletas de praziquantel comercializadas por Bayer

En la actualidad existen más estrategias para aumentar la solubilidad de un fármaco poco soluble en agua y, en consecuencia, mejorar su biodisponibilidad, algunas estrategias son reducir el tamaño de partícula, el uso de tensoactivos, formación de sales, ajustes de pH, profármacos, complejación con ciclodextrinas, sistemas autoemulsificables, las emulsiones, y liposomas [9]. Algunas técnicas han sido estudiadas para mejorar la solubilidad del principio activo en cuestión, como la granulación por fusión y la congelación por pulverización ultrasónica [15]. Además se han utilizado otras técnicas como complejación con β ciclodextrina y mezclas en implantes o liposomas [16][17][18]. A pesar de que existen diversas técnicas para mejorar la biodisponibilidad de praziquantel, el desarrollo de dichos proyectos implica grandes costos, por lo que el tipo de técnica utilizada y la forma farmacéutica seleccionada llegan a ser un factor limitante en la fabricación del medicamento[9]. Como se mencionó anteriormente, otra de las alternativas utilizadas para aumentar la biodisponibilidad de los ingredientes activos poco solubles es formular emulsiones, pero más específicamente las nanoemulsiones, cuyas formulaciones no implican grandes costos.

3.2. Emulsiones

Generalmente, las emulsiones consisten en al menos dos fases líquidas inmiscibles entre sí con uno de los dos líquidos disperso en pequeñas gotas dentro de la otra fase. A una de las fases se le denomina continua y a la otra dispersada [19]. Aunque lo más común son las emulsiones del tipo aceite en agua u O/W, también existen las emulsiones del tipo agua en aceite o W/O, y otro tipo de emulsiones más complejas, conocidas como emulsiones dobles O/W/O o W/O/W [20]. Existen diferentes términos utilizados para describir los distintos tipos de emulsiones, como emulsiones convencionales, nanoemulsiones y microemulsiones. Cada tipo de emulsión se caracteriza por el diámetro de las partículas dispersas, sus propiedades ópticas y su estabilidad termodinámica. No obstante, por practicidad solo se profundizará en el tema concerniente a las emulsiones convencionales y posteriormente en las nanoemulsiones.

Normalmente, las emulsiones tienen gotitas con radios medios entre 100 nm y 100 μm y, son termodinámicamente inestables debido a la energía libre positiva relativamente grande (debido a la tensión interfacial, cuyo tema se aborda en la subsección 3.3.1) asociada con el contacto entre las fases de aceite y agua, por lo que conviene más considerar su estabilidad cinética, en donde lo que se busca es diferenciar el grado de cambio de la emulsión respecto al tiempo.

3.3. Nanoemulsiones

A partir de esta sección se referirá únicamente a las nanoemulsiones del tipo aceite en agua (O/W), puesto que son las que actualmente tienen el mayor potencial de aplicación en productos comerciales, como cosméticos, alimenticios y productos farmacéuticos [21][23].

Una nanoemulsión O/W, al igual que una emulsión convencional consiste en un sistema formado por pequeñas partículas compuestas de aceite y moléculas de tensoactivo dispersas en un medio acuoso, además, ambas son consideradas inestables termodinámicamente. Sin embargo, de acuerdo con algunos autores, se diferencian en el tamaño de partículas, ya que las gotas dispersas en las nanoemulsiones presentan un radio promedio de 10 a 100 nm, y por la misma razón pueden ser transparentes a ligeramente turbias [21]. Otros autores han considerado hasta un diámetro promedio de gota de 50 a 500 nm en nanoemulsiones para aplicaciones farmacéuticas [22].

Respecto a los productos farmacéuticos, las nanoemulsiones O/W son de especial interés, debido a su alta compatibilidad con compuestos hidrofóbicos, característica que vuelve a estos sistemas ideales para incorporar fármacos poco solubles en agua y que, además, los protege de la degradación química o enzimática y, favorecen una mejor biodisponibilidad, incluso, se han documentado mejoras sustanciales en la $C_{máx}$ y el área bajo la curva (AUC) cuando se administraron fármacos poco solubles mediante nanoemulsiones por vía oral [22]. Este tipo de formas farmacéuticas pueden formularse como sistemas de administración de medicamentos a través de diversas rutas, incluidas las vías oral, parenteral, transdérmica, intranasal y ocular [22].

La razón de que este tipo de sistemas hayan tenido gran auge en los últimos años, se debe a su tamaño de gota y la presencia de tensoactivos y estabilizantes, los cuales favorecen el movimiento browniano de las gotas y además, ayudan a evitar efectos implicados en la desestabilización de la dispersión coloidal, tales como el cremado, la sedimentación, la coalescencia y el envejecimiento de Ostwald durante el almacenamiento, teniendo como resultado una mayor vida útil del producto. Asimismo, las nanoemulsiones a diferencia de las microemulsiones se pueden preparar utilizando una baja concentración de tensoactivo, por ejemplo, para una nanoemulsión O/W al 20 %, una concentración de tensoactivo entre 5 y 10 % resulta ser suficiente. Por otro lado, estos sistemas pueden llegar a sustituir a los liposomas y las vesículas, cuya estabilidad resulta ser menor [23].

3.3.1. Mecanismo de formación

Debido a que las nanoemulsiones son termodinámicamente inestables, su proceso de fabricación involucra siempre una aplicación externa de energía para obtener la dispersión coloidal a partir de los componentes separados. Este hecho, de acuerdo con un modelo matemático que considera el cambio de energía libre de formación ($\Delta G_{formacion}$) de la nanoemulsión a partir de los componentes por separado, dicta que tal cambio involucra una energía libre interfacial (primer término del lado derecho de la ecuación) y un término de entropía de configuración (segundo término del lado derecho de la ecuación), tal y como se muestra en la ecuación 1 [24],

$$\Delta G_{formacion} = \Delta G_{interfacial} - (T\Delta S) \text{ (ec. 1)}$$

donde el término de energía libre interfacial a temperatura constante, presión y potencial químico

co, corresponde al aumento en el área de contacto entre la fase oleosa y acuosa (ΔA) multiplicado por la tensión interfacial (γ) en la interfaz aceite-agua como se muestra en la ecuación 2, [24]

$$\Delta G_{interfacial} = \Delta A(\gamma) \text{ (ec. 2)}$$

y siempre resulta ser positivo por el aumento en el área de contacto y la tensión interfacial, por lo tanto, este término va en contra de la formación de la dispersión coloidal. Sustituyendo $\Delta G_{interfacial}$ en la ecuación 1, la expresión matemática resultaría como la ecuación 3.

$$\Delta G_{formacion} = \Delta A(\gamma) - (T\Delta S) \text{ (ec. 3)}$$

La entropía de configuración ($-T\Delta S$) depende del número de formas distintas en que la fase oleosa puede organizarse en el sistema, y es negativo porque el número de disposiciones accesibles para la fase oleosa emulsionada es mucho mayor que en un estado no emulsionado y, por lo tanto, siempre favorece la formación de dispersiones coloidales [21][23][24].

Al disminuir el tamaño de partícula, más positiva se vuelve la energía libre interfacial, por el aumento en el área de contacto, volviendo más difícil la formación de la dispersión coloidal, mientras que el mismo decremento del tamaño de partícula vuelve cada vez más negativa la energía libre de configuración, hecho que resulta favorable en la dispersión de la fase oleosa debido al aumento en la cantidad de formas diferentes en que se pueden organizar las gotitas. Sin embargo, el hecho de reducir el tamaño de partícula hace que el término de energía libre interfacial predomine sobre el término de entropía de configuración, por lo que la energía libre global será positiva. Esto sugiere que la formación de una nanoemulsión con diámetros de gota cada vez más pequeños será termodinámicamente más desfavorable, tratándose entonces de un proceso no espontáneo, y que requiere la aplicación de energía externa, por ende, para lograr la dispersión del aceite en agua, la energía aplicada debe superar la energía libre positiva [24].

Aunque un sistema siempre tenderá a volver al estado de menor energía libre, la reversión del sistema de aceite disperso en agua al estado donde las fases están separadas puede evitarse manteniendo al sistema en un estado metaestable o cinéticamente estable por un tiempo considerable, solo si existen barreras energéticas suficientemente amplias que separen y hagan más lenta la conversión de dichos estados. Esto se consigue controlando la distribución del tamaño de partícula, seleccionando adecuadamente el tipo de aceite, cuya solubilidad en agua sea muy baja e incorporando sustancias conocidas como tensoactivos, estabilizadores, o modificadores de

texturas. El papel de los tensoactivos es muy importante ya que se adsorben fuertemente en la interfase aceite/agua, reduciendo la tensión interfacial y el trabajo necesario para romper una gota y generar más de ellas con radios menores, además, ayudan a evitar la coalescencia de las gotas recién formadas debido a una repulsión estérica [23][24].

Se ha reportado que algunas mezclas de tensoactivos específicos disminuyen la tensión interfacial aún más que cuando se utiliza un solo tensoactivo en la dispersión. El uso y la mezcla de tensoactivos poliméricos pueden mostrar cierta actividad superficial sinérgica. Aunque actualmente los tensoactivos son comercializados y clasificados como catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos y no iónicos, aquellos que son del tipo iónico, son sensibles en cuestiones de estabilidad y debido a que pueden llegar a ser tóxicos, generalmente no son utilizados. De manera opuesta, los tensoactivos no iónicos pueden producir formas farmacéuticas más seguras y con un riesgo mucho menor de toxicidad [22][25].

La regla de Bancroft, establece que la fase en la que el tensoactivo es más soluble forma la fase continua. Por lo tanto, los tensoactivos con un $HLB > 7$ tienden a formar emulsiones O/W y tensoactivos con $HLB < 7$ tienden a formar emulsiones W/O [23]. Esto se relaciona con la estructura del tensoactivo, es decir, aunque estructuralmente poseen una región polar y no polar, en la mayoría de los casos solo una de esas porciones predomina sobre la otra, de tal manera que la molécula se asemeja a un cono, lo cual se refleja directamente en el tipo de empaquetamiento que adoptarán estas moléculas en la interfase.

Otro factor no menos importante para considerar en el proceso de emulsificación es la fracción de volumen de fase dispersa. Un aumento en tal fase conduce a un aumento en la colisión de gotas y, por lo tanto, a la coalescencia durante la emulsificación. Además, con el aumento en la fracción oleosa la viscosidad de la emulsión aumenta y cambia el flujo turbulento a laminar, conduciendo a la formación de gotas más grandes [23].

Entre los parámetros más importantes para caracterizar una nanoemulsión está la medición del tamaño de partícula, el cual puede obtenerse a través de la técnica de dispersión dinámica de luz; que se basa en la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada por las gotas a medida que

experimentan el movimiento browniano. Aunado a este parámetro, el índice de polidispersidad o PDI por sus siglas en inglés, es el cuadrado de la polidispersidad de dispersión de luz, y nos indica que tan amplia puede llegar a ser la distribución de tamaños de partícula presentes en el sistema. Para una muestra perfectamente uniforme, el PDI sería 0 [23][25].

Adicionalmente, es posible medir el potencial Z, cuyo parámetro nos permite saber si las cargas eléctricas en las partículas podrían estar influyendo en la tasa de floculación y en la biodisponibilidad. La naturaleza negativa, positiva o neutral depende del tipo de excipientes o incluso del fármaco, por lo que un potencial Zeta cercano a +30 mV o a -30 mV se considera aceptable, pero en el caso de formulaciones con tensoactivos no iónicos, se esperaría un valor cercano pero no igual a los 0 mV [25].

Finalmente, con base en la NOM-177-SSA1-1998 un perfil de liberación corresponde a la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas. A pesar de que esta norma establece los criterios necesarios para determinar la intercambiabilidad de dos medicamentos, nos ayuda a obtener información a partir de los perfiles construidos, ya que a partir de ellos es posible predecir el mecanismo físico de liberación del fármaco desde la forma farmacéutica que lo contiene y a través de una membrana artificial, mediante modelos matemáticos ya descritos. El propósito de estos estudios es optimizar la cinética de liberación, realizando ajustes en la formulación, de tal forma que se pueda mejorar la eficacia terapéutica y la seguridad del fármaco [26][27].

3.3.2. Métodos de fabricación

La investigación involucrada en la fabricación de nanoemulsiones se ha llevado a cabo a través de varios métodos, cuya clasificación se divide en dos principales categorías: métodos de alta energía y de baja energía. Los métodos de alta energía consumen entre 10^8 y 10^{10} W/Kg y utilizan dispositivos mecánicos que generan fuerzas disruptivas intensas que son capaces de mezclar el aceite y las fases acuosas en pequeñas gotas de aceite, por ejemplo, homogeneizadores de alta presión, microfluidizadores y métodos de sonicación. Actualmente los métodos de alta energía son los más usados en la fabricación de nanoemulsiones a nivel industrial pues su utilización en la producción

de emulsiones convencionales ya está estandarizada y eso ha permitido producir nanoemulsiones a partir de diversos componentes a gran escala. Por otro lado, los métodos de baja energía se basan en una formación espontánea de pequeñas gotas de aceite en un medio acuoso cuando se altera la solución o las condiciones ambientales, pero sin consumir una gran cantidad de energía (10^3 W/kg). Dos ejemplos de ellos son la temperatura de inversión de fase (PIT) y el punto de inversión de emulsión (EIP). El tamaño mínimo de partícula que se puede producir utilizando cualquiera de los dos métodos dependerá de muchos factores, por lo tanto, el tamaño de gota obtenido variará en función de la técnica utilizada, aun si se considera una formulación con las mismas cantidades de cada componente [28][29].

Sin importar el método que se requiera para fabricar una nanoemulsión, ambos enfoques tienen una característica en común, la cual recae en la necesidad de diseñar y caracterizar en primer lugar una formulación, y una vez que se ha monitoreado muy bien su comportamiento y se han registrado algunos de los parámetros más importantes, como los mencionados en la sección anterior, es posible repetir dicha formulación a gran escala. Como es evidente, tal proceso requerirá de múltiples ensayos hasta llegar a obtener las características deseadas de la nanoemulsión, y esto se verá reflejado en grandes cantidades de reactivos usados, y residuos generados, que además, tomará mucho tiempo. En conclusión, estas tres razones se traducen en pérdidas de dinero. Sin embargo, en la actualidad se ha desarrollado la microfluídica, una técnica distinta que promete reducir significativamente la cantidad de reactivos utilizados, y la cantidad de residuos que se producen en cada ensayo, pero sobre todo, es capaz de permitirle al formulador realizar más de un ensayo en una sola sesión experimental.

3.4. Microfluídica

La microfluídica es la ciencia y tecnología que se dedica al estudio, procesamiento y manipulación de pequeñas cantidades de fluido, oscilando entre los 10^{-6} a 10^{-18} litros, confinando pequeños volúmenes en canales con dimensiones desde decenas hasta cientos de micrómetros. Los campos donde más recientemente ha sido explotado este sistema son en química, biología molecular, medicina y ciencias físicas [30][31].

Un sistema o dispositivo microfluídico esta conformado por una serie de componentes básicos, los cuales deben contemplar los métodos involucrados en la introducción de reactivos o muestras, un mecanismo para mover y mezclar los fluidos a través del chip que constituye al microdispositivo y posiblemente el acoplamiento con alguna herramienta de detección o de purificación de productos [30].

Uno de los procedimientos que ha facilitado la fabricación de los microdispositivos es la técnica de litografía suave que consiste en generar un molde de polidimetilsilxano (PDMS) a partir de una estructura maestra microfabricada, compuesta por un relieve negativo del sistema final de canales deseado. Tal como se muestra en la figura 3.4, con el cuidado necesario el molde maestro puede ser usado múltiples veces para crear réplicas de PDMS que posteriormente se unen a un sustrato como a un portaobjetos de vidrio, por ejemplo [31][32][33][34]. La ventaja de utilizar PDMS para la fabricación de las réplicas radica en que es un material flexible, ópticamente transparente, y puede llegar a ser permeable a ciertos disolventes o gases [32].

En los últimos años la industria farmacéutica ha adoptado la tecnología microfluídica, pues las aplicaciones analíticas dieron paso a la producción y uso de productos biofarmacéuticos o el desarrollo de ensayos basados en células humanas primarias que podrían predecir el rendimiento en ensayos clínicos en humanos, considerando que el uso de esta tecnología para cualquiera de los casos no represente un reto muy grande para el sujeto que lo va a manipular [30].

El presente proyecto se enfoca en producir y optimizar la fabricación de una nanoemulsión O/W de praziquantel utilizando un dispositivo microfluídico acoplado a un transductor piezoeléctrico tipo Langevin. Este transductor es capaz de convertir la energía eléctrica en vibraciones mecánicas con frecuencias en el rango del ultrasonido (20-100 kHz), la cual es necesaria para producir fuerzas disruptivas intensas que mezclan el aceite en la fase acuosa, obteniendo gotas dispersadas muy pequeñas. Además, debido a la capacidad de manipular más de un flujo con base en el diseño del microchip, es posible controlar la composición de la nanoemulsión ya que cada uno de los componentes se introduce bajo un flujo continuo, hecho que permite llevar a cabo un ensayo tras otro, donde lo que se desea es encontrar una formulación óptima, en función de su estabilidad cinética.

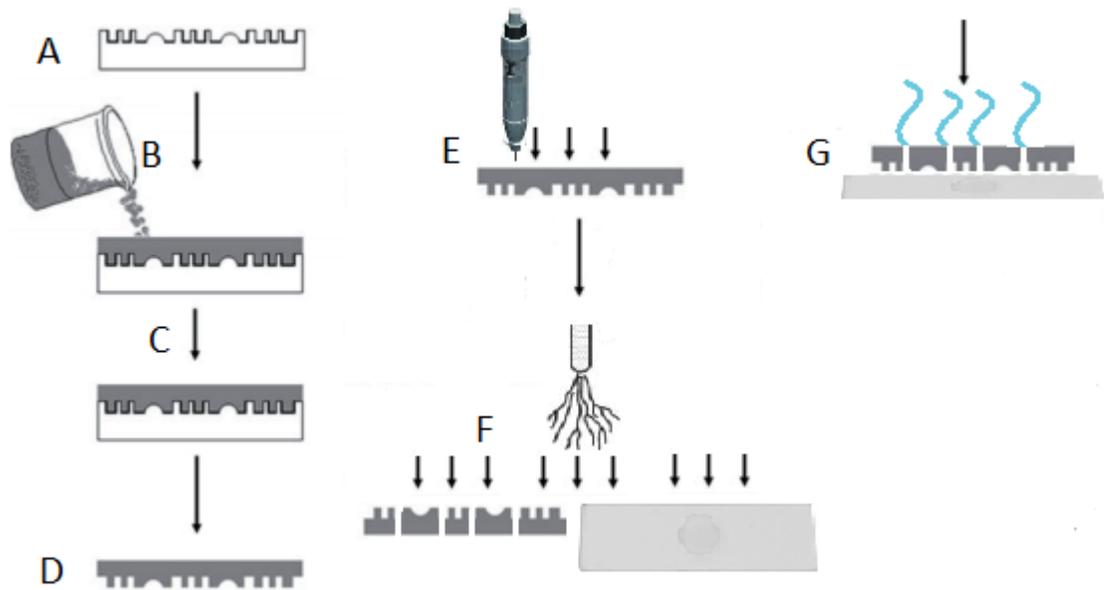


Figura 3.4: Diagrama de fabricación de réplicas de PDMS. A) Molde maestro. B) Aplicación de PDMS con agente entrecruzante antes de solidificar. C) Tras 4 horas transcurridas a 65°C. D) Réplica de PDMS sólida. E) Perforación de réplica de PDMS con punzón de biopsia. F) Aplicación de plasma sobre superficies de contacto entre réplica de PDMS y portaobjetos de vidrio para favorecer su sellado. G) Inserción de tubería de politetrafluoroetileno para posterior introducción de líquidos. [34]

Como se describió antes, el ultrasonido forma parte de los métodos de alta energía para acelerar y e intensificar el proceso de mezclado entre líquidos inmiscibles a partir de la cavitación, (cuyo fenómeno es responsable de la emulsificación y se explica más adelante) y puede ser originado a través de un transductor piezoeléctrico, por lo que, una vez que se ha montado junto con la plataforma microfluídica y se han determinado las composiciones de cada formulación a caracterizar, se da inicio al proceso de emulsificación. Dicho proceso empieza con una inestabilidad interfacial primaria que comienza a generar una ruptura de la fase oleosa en la fase acuosa. Posteriormente la cavitación promueve la formación de ondas de choque de alta presión que dan como resultado la formación de gotas de aceite más pequeñas dispersadas en la fase continua [35].

La cavitación puede dar como resultado densidades de energía muy altas del orden de $1 \text{ a } 10^{18} \text{ kW/m}^3$, ocurriendo a lo largo del canal del microchip y generando altas presiones y altas temperaturas. Este fenómeno ocurre cuando hay variaciones de presión altamente fluctuantes y cuando la formación de cavidades implosiona y genera ondas de choque intensas que se propagan en el fluido promoviendo deformaciones en las gotas cercanas. Hay reportes que indican que la cavitación acústica es más eficiente a frecuencias inferiores a 100 kHz, y que lo más probable es que el campo acústico propicie la formación de las burbujas de cavitación (altamente energéticas) a partir del gas disuelto en el líquido y de las imperfecciones en la superficie del canal de PDMS, [36][37][38].

Cuando se aplican ondas ultrasónicas en el proceso de emulsificación, algunos de los parámetros más importantes que deben ser considerados para obtener un buen tamaño de partícula son la temperatura, la volatilidad del aceite, y la potencia suministrada al piezoeléctrico. Se han visto tamaños de gota más pequeños y distribuciones de tamaños más estrechas cuando la sonicación se realiza en un proceso isotérmico. Además, un aumento en la potencia suministrada por encima del nivel óptimo da origen a un aumento en el tamaño de las gotas [35].

Finalmente, las principales ventajas de la microfluídica son la capacidad de usar cantidades muy pequeñas de muestras y reactivos, y realizar más de un ensayo a la vez en tiempos relativamente cortos, a través de una técnica que no representa altos costos. Además, otro gran punto a favor de la microfluídica se debe a la reducción en gran medida de la cantidad de residuos formados, generando un impacto positivo en el medio ambiente y permitiendo en un futuro un alto nivel de

automatización.

Capítulo 4

Objetivos

- Emplear una plataforma microfluídica para formular una nanoemulsión O/W de praziquantel cinéticamente estable y cuyo tamaño de partícula sea menor de los 200 nm.
- Con base en la formulación óptima hecha con el dispositivo microfluídico, generar un volumen mayor de nanoemulsión para estudiar su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, mediante perfiles de liberación y pruebas de biodisponibilidad en ratas, respectivamente.

Capítulo 5

Hipótesis

La capacidad de poder fabricar más de una nanoemulsión en cuestión de horas, volviendo al proceso más rápido y eficiente mediante la tecnología microfluídica, facilitará la búsqueda de aquella formulación, cuyos parámetros de estabilidad cinética como tamaño de partícula e índice de polidispersidad sirvan como base para poder reproducirla por otro método de ultrasonificación, permitiendo generar mayor volumen, con la finalidad de caracterizarla mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Las dificultades de los principios activos asociadas a su poca solubilidad en agua o susceptibilidad a la degradación enzimática como praziquantel, pueden ser resueltas por la incorporación del fármaco en nanoemulsiones, promoviendo una mejor absorción y mayor biodisponibilidad cuando se administra por vía oral.

Capítulo 6

Metodología

6.1. Preparación de soluciones

6.1.1. Span 80 - Monooleato de sorbitán.

En una balnza analítica se pesaron 0.50989 g del reactivo Span 80 (obtenido de Sigma Aldrich) y se completó con el aceite hasta un peso final de 5.1038 g. Se agitó suavemente, tratando de no formar burbujas hasta obtener una solución homogénea, cuya concentración final resultó ser de 9.9904 % m/m.

6.1.2. Tween 80 - Monooleato de polioxietilen (20) sorbitano

En una balnza analítica se pesaron 0.51948 g del reactivo Tween 80 (obtenido de Sigma Aldrich) y se completó con agua desionizada hasta un peso final de 5.2078 g. Se agitó suavemente, tratando de no formar burbujas hasta obtener una solución homogénea, cuya concentración final resultó ser de 9.9751 % m/m.

6.1.3. Tween 20 - Monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano

En una balnza analítica se pesaron 0.5150 g del reactivo Tween 20 (obtenido de Sigma Aldrich) y se completó con agua desionizada hasta un peso final de 5.1450 g. Se agitó suavemente, tratando de no formar burbujas hasta obtener una solución homogénea, cuya concentración final resultó ser de 10.0098 % m/m.

6.1.4. Polietilenglicol 1500

Se hizo una solución de PEG 1500 (Sigma Adrich) a una concentración al 9.9792 % m/m pesando 0.4304 g del polímero en su forma sólida y diluyéndolo en 4.3134 g de agua desionizada. Se agitó suavemente hasta su disolución evitando formar burbujas.

6.1.5. Pluronic F-127 - Polietilen-propilen glicol.

Con la finalidad de tener una distribución estrecha de tamaños de PF-127 y eliminar las cadenas de bajo peso molecular, se procedió a realizar una diálisis en una membrana de celulosa regenerada de 500 a 1000 daltons.

Se pesaron 4.081 g de PF-127 en un tubo falcon de 50 mL y se disolvieron en 12 mL de agua Milli Q, se agitó suavemente para prevenir la aparición de burbujas. La solución se continuó agitando en un cuarto refrigerado (5°C) hasta obtener una solución homogénea y viscosa. El contenido se dividió en dos partes y se introdujo en dos membranas de diálisis, las cuales se hidrataron un día antes con agua destilada.

Posteriormente, las membranas se introdujeron en un vaso de precipitados junto con 1 L de agua destilada, y se agitaron con una barra de agitación magnética durante 72 horas. Al finalizar, el contenido de las bolsas aumentó su volumen.

El volumen contenido en cada bolsa se dividió en partes iguales en cinco tubos falcon de 50 mL, después se colocaron en posición horizontal para aumentar el área superficial del líquido y facilitar posteriormente una liofilización. Los tubos se congelaron a -20°C por 24 horas.

Ya congeladas las muestras, se liofilizaron por 46 horas a una presión de 0.024 mBar y a -25°C. El resultado obtenido fueron pequeños cristales blancos. En algunos tubos el contenido no se liofilizó por completo, pues hubo líquido presente al fondo de los tubos. Sin embargo, se rescataron los cristales de PF-127 y en total se recolectaron 1.533 g, es decir, se obtuvo un 37.56 % de cadenas largas del polímero dializado.

La solución de PF-127 al 15 % m/m se llevó a cabo disolviendo 0.22502 g del liofilizado de

PF-127 en 1.51797 g de agua desionizada.

6.1.6. Fluido intestinal simulado

Se precisó de 6 L de fluido intestinal simulado, los cuales se prepararon en matraces volumétricos de 2 L.

Se preparon 2 L iniciales pesando 13.6041 g de cristales de fosfato monobásico de potasio, se disolvieron en 500 mL de agua desionizada, se agregaron 380 mL de solución de hidróxido de sodio (ver subsección 4.1.6.1.) 0.2 N y 800 mL de agua desionizada. Posteriormente se ajustó el pH hasta 7.5 con la solución de hidróxido de sodio 0.2 N. Finalmente se aforó a 2 L en un matrás volumétrico. Para los dos volúmenes restantes de 2 L cada uno, se pesaron 13.6035 g y 13.6252 g de fosfato monobásico de potasio, respectivamente, y se siguieron los pasos anteriores.

6.1.6.1. Solución de NaOH 0.2 N

Fueron preparados 500 mL de solución de hidróxido de sodio 0.2 N pesando 3.9937 g de lentejas de hidróxido de sodio y llevándose al aforo en un matraz volumétrico

Debido a la preparación de dos soluciones extra de fluido intestinal simulado, se prepararon dos soluciones más de hidróxido de sodio, pesando 4.0036 g y 3.9988 g de lentejas de hidróxido de sodio en 500 mL de agua desionizada.

6.1.7. Fluido gástrico simulado

Al igual que el fluido intestinal, se necesitó preparar 6 L de fluido gástrico simulado.

Para la preparación de los primeros 2 L se pesaron 4.0007 g de cloruro de sodio, se disolvieron con suficiente agua desionizada y se agregaron 14 mL de ácido clorhídrico concentrado. El pH se ajustó hasta 1.2 con más ácido clorhídrico concentrado. Finalmente se aforó a 2 L en un matrás volumétrico. Las dos soluciones restantes de 2 L fueron preparadas siguiendo el mismo procedimiento

6.2. Fabricación de microchips

En este capítulo se describe la realización del diseño, la fabricación y el funcionamiento de la plataforma microfluídica, la cual permitió llevar a cabo la dispersión de las gotas de aceite en agua mediante el uso de tensoactivos y un estabilizante.

El procedimiento descrito a continuación aplica a cualquier diseño de microchip utilizado en este proyecto.

La fabricación del microchip consistió en tres partes:

- Diseño de la fotomáscara [39].
- Fabricación del molde maestro [39].
- Fabricación de réplicas de polidimetilsiloxano (PDMS) [39].

6.2.1. Diseño de la fotomáscara

Utilizando el software LIBRECAD se establecieron las medidas necesarias para la construcción de los canales que componen a los microchips. Los diseños se muestran en la figura 6.1 y están constituidos por canales rectangulares, tienen en común zonas de entrada localizadas en su parte superior, y una región de salida localizada en la parte inferior. Las entradas pueden converger al inicio con el trayecto de otra entrada, no obstante, en la región central de cada diseño, se intersecta el canal que conduce a los fluidos acuosos y el que conduce a los fluidos oleosos. En seguida del punto central de convergencia de los canales de entrada, se añadió un serpentín a través del cual, la emulsión formada avanzará continuamente hasta llegar al punto de salida.

Como se muestra en la figura 6.1, el diseño A consta de cuatro entradas, las cuales se separan de forma simétrica en un par a la izquierda, y otro a la derecha, con la finalidad de separar ambas fases de la emulsión. Con el mismo objetivo se diseñaron los microchips B y C, aunque no poseen simetría, el acomodo y la integración de nuevos canales se añadieron para incorporar más reactivos

como se explica más adelante en la sección de resultados en el capítulo 7.

Una vez diseñados los canales, se procedió a imprimirlos en una película de acetato en modo negativo para obtener la fotomáscara. Alrededor del diseño se dibujó un círculo, mediante el cual se realizó un corte para obtener una oblea del acetato con el diseño impreso.

A través de un microscopio se observaron los canales para verificar que no existiese algún defecto en la impresión.

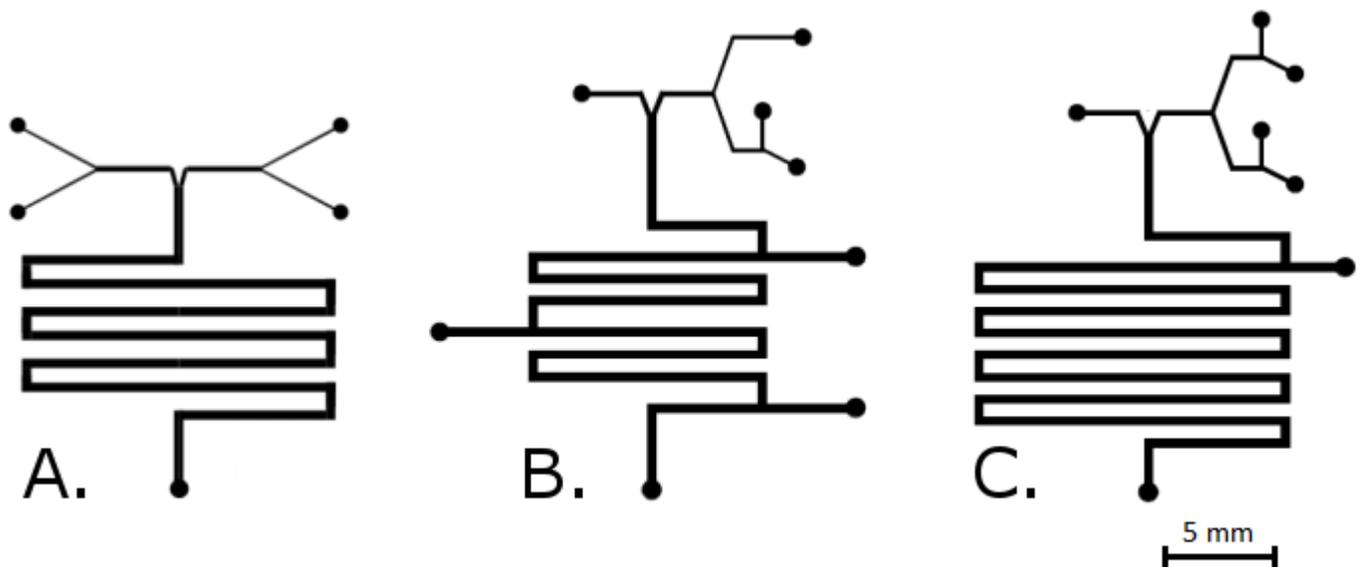


Figura 6.1: Diseños de microchips. El tamaño promedio del ancho de los canales de entrada van de 0.160 mm y aumentan a 0.200 mm hasta el punto central donde se intersectan todos los canales para formar el serpentín de los diseños A, B y C cuyo ancho es de 0.340 mm. La longitud total del serpentín desde el punto de intersección de las fases acuosa y oleosa hasta el punto de salida de los diseños A, B y C son 67.52 mm, 92.5 mm y 127.53 mm, respectivamente.

6.2.2. Fabricación del molde maestro por fotolitografía

La fabricación consistió en generar en una oblea de silicio una capa de 100 μm de espesor de la fotoresina SU-8 3035 (MicroChem), sobre la cual se imprimió el canal diseñado del microchip para poder generar réplicas de PDMS. Para dicho propósito, fue necesario trabajar en una instalación

limpia para prevenir la mayor cantidad de partículas no viables. Se requirió de aire comprimido y al menos una campana de extracción, además de papel celofán amarillo o naranja para cubrir las luces presentes y bloquear la luz ultravioleta para evitar la polimerización de la fororesina SU-8 3035.

La fabricación del molde maestro requirió una oblea de silicio de 76 mm de diámetro, pulido de un solo lado y con espesor de $381\mu\text{m}$, la cual se limpió cuidadosamente con isopropanol y se secó con aire a presión.

La luz UV (100W) se encendió 30 minutos antes de ser usada. En seguida se prepararon tres parrillas para calentamiento, la primera a 75°C , la segunda a 105°C y la tercera a 210°C , todas las parrillas se recubieron con una capa de papel aluminio para evitar futuras contaminaciones.

La oblea se calentó durante 5 minutos en la parrilla a 210°C , después se centró en la parte giratoria del *Spin Coater* (equipo de revestimiento por rotación marca Laurel) con una herramienta de centrado y previamente se verificó con un nivel de burbuja que el equipo se mantuviera correctamente equilibrado. Una vez colocada adecuadamente la oblea se activó el vacío conectado al equipo para mantenerla estática y en su lugar. Debido a las especificaciones de la fotoresina SU-8 3035, para generar una capa de $100\mu\text{m}$, es necesario depositar una capa de $50\mu\text{m}$ de espesor sobre la oblea y después, repetir el proceso. El equipo se programó en dos pasos con las siguientes instrucciones:

- 1) 500 rpm durante 10 segundos con una aceleración de 100 rpm/s.
- 2) 2000 rpm durante 30 segundos con una aceleración de 300 rpm/s.

Para verificar que el equipo y la oblea se encuentran en las condiciones adecuadas, se inició la operación con las instrucciones programadas previamente sin añadir la capa de SU-8 3035. Hecho lo anterior, se agregó al centro de la oblea aproximadamente 3 mL de SU-8 3035 directamente de la botella, y desde la distancia más corta posible con el propósito de evitar la formación de burbujas. Se procedió a iniciar la operación programada del equipo, y al término se tomó la oblea desde un extremo con unas pinzas limpias para transferirla a la parrilla de 105°C por 15 minutos. Hasta este punto, la capa generada por el *Spin coater* fue de $50\mu\text{m}$, para llegar a las $100\mu\text{m}$ se agregaron 3 mL más de resina y se inició el programa del equipo con las mismas instrucciones.

Posteriormente la fotomascara se colocó justo encima de la oblea con la capa de $100\mu\text{m}$ de espesor de resina, y dos placas de vidrio fueron puestas una arriba y otra abajo, de tal manera que la oblea y la fotomascara quedaron en medio, con la finalidad de favorecer un contacto total entre estas dos; después se colocó debajo de la lámpara ultravioleta y se expuso ante la luz durante 45 segundos. En seguida se retiró la fotomáscara y se calentó la oblea durante un minuto en una de las parrillas recubiertas a 75°C , y para finalizar la reacción de polimerización de SU-8 3035, se transfirió la oblea a la parrilla de 105°C y se calentó durante 5 minutos.

Más adelante, se sumergió la oblea con ayuda de las pinzas en un cristalizador con el revelador 1-metoxi-2-acetato de propilo y se agitó suave y constantemente alrededor de 10 minutos. La oblea se retiró del resto del contenido y se enjuagó con alcohol isopropílico. En algunas ocasiones, al aplicar el enjuague se notó una película blanca escurriendo sobre la superficie, para tales casos, la oblea se sumergió en el cristalizador en revelador nuevo por 5 minutos o hasta la total desaparición de la película blanca. Finalmente la oblea con el diseño del microchip se escurrió y se secó con aire presurizado, para calentarse por 15 minutos a 200°C . Al termino, se dejó enfriar y se colocó en una caja petri a temperatura ambiente.

6.2.3. Fabricación de réplicas de PDMS por litografía suave

Para fabricar las réplicas de PDMS se requirió del siguiente material:

- Caja de petri de plástico (9 cm de diámetro)
- Polidimetilsiloxano (PDMS SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit, Trademark of the Dow Chemical Company).
- Vasos lisos y cucharas de plástico desechables
- Desecador de vacío
- Bisturí
- Balanza digital
- Horno de laboratorio (70°C .)

- Punzón de biopsia de 0,75 mm de diámetro
- Portaobjeto de 75 mm x 50 mm
- Corona Treater (BD-20AC, Electro Technic Products) de plasma de oxígeno
- Cinta Scotch Magic.

En un vaso de plástico desechable se pesaron 25 g de prepolímero de PDMS y se agregó 9 % en masa del agente entrecruzante. Con ayuda de la cuchara de plástico se mezcló vigorosamente por 3 minutos. A continuación se colocó la mezcla en un desecador conectado al vacío durante 2 horas para desaparecer las burbujas de aire presentes.

Cuando las burbujas desaparecieron se vertió la mezcla de PDMS con cuidado sobre el molde maestro contenido en la placa de Petri, y se introdujo en el horno precalentado a 70°C para curar durante 4 horas.

Con ayuda del bisturí se cortó una losa de PDMS alrededor del diseño de los canales. Dicha acción se realizó con mucho cuidado debido a la fragilidad de la oblea, y con cautela para no dañar los canales que constituyen al diseño, y con el propósito de fabricar más réplicas de PDMS. Posteriormente se despegó lentamente la losa de PDMS del molde.

Con el punzón de biopsia de 0,75 mm se generaron agujeros en las entradas y salidas de la réplica PDMS comenzando desde el lado con el diseño hasta la parte superior de la réplica. En caso de almacenar o transportar la réplica se recubrió con cinta Scotch Magic.

Antes de montar el microchip para su uso, se eliminó el polvo o las partículas de la réplica PDMS con un trozo de cinta Scotch Magic. Luego, se expuso el lado del PDMS que contiene los microcanales al plasma de aire durante 15 segundos. Inmediatamente se trató con plasma de aire la superficie de la placa de vidrio limpio y se puso en contacto ambas superficies tratadas. Con una presión suave aplicada a ambas superficies se eliminó cualquier burbuja de aire. Al finalizar, se almacenó el dispositivo en un horno a 70°C durante la noche.

6.3. Montaje experimental y operación del microchip

El equipo y los materiales necesarios fueron los siguientes:

- Piezoeléctrico tipo Langevine 61 kHz \pm 1 kHz de 30 mm x 32.5 mm. (Stemer Inc.)
- Osciloscopio digital UNI-T UTD2062CE
- Amplificador Trek modelo PZD350A.
- Generador de funciones UNI-T UTG9005C.

Con el diseño del microchip adherido a la superficie del vidrio, el paso siguiente es terminar de montar la plataforma microfluídica para generar las nanoemulsiones.

Se requirió de un transductor piezoeléctrico tipo Langevine de 61 kHz \pm 1 kHz, cuyas dimensiones fueron de 30 mm x 32.5 mm. Se colocó una capa delgada de resina epóxica sobre la base del piezoeléctrico, e inmediatamente se adhirió con presión a la placa de vidrio donde está el microchip. De esta manera el microchip y el piezoeléctrico quedaron en contacto sobre la misma superficie, de tal manera que las entradas de los canales estuvieran más cerca del transductor. Se dejó secar la resina epóxica.

Con el transductor y la réplica de PDMS adheridos en el portaobjetos, el siguiente paso consistió en insertar los segmentos necesarios de tubing PTFE #24, de aproximadamente 15 cm de largo cada uno sobre las entradas de los canales y con ayuda de pinzas de disección. Para resguardo y posterior uso de la plataforma microfluídica se cubrieron las entradas de las tuberías con cinta Scotch magic.

Hasta este punto, el microdispositivo (cualquiera que fuese el diseño requerido) quedó listo para realizar las nanoemulsiones. En la figura 6.2 se muestra una foto de la plataforma microfluídica, donde es posible apreciar sus dimensiones, y en la figura 6.3 se esquematiza el montaje de la plataforma microfluídica con el transductor piezoeléctrico y un generador de funciones UNIT-T UTG9005C para generar una señal sinusoidal que es amplificada con un equipo Trek, modelo PZD350A. La señal de corriente alterna amplificada se envió al transductor. La corriente y el voltaje de trabajo resultantes fueron monitoreados a través de un osciloscopio digital UNI-T UTD2062CE

incorporado en el amplificador.

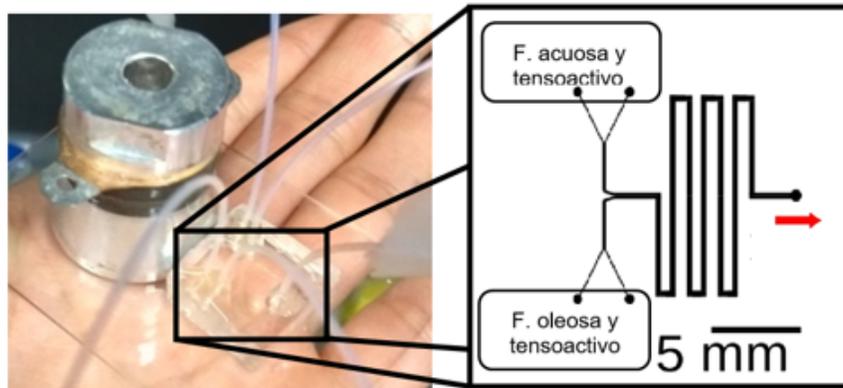


Figura 6.2: Plataforma microfluídica con diseño de un canal impreso en una réplica de PDMS.

6.3.1. Bombas y arreglos experimentales para fabricación de nanoemulsiones

Para la fase inicial experimental se dispuso de cuatro bombas para jeringas programables New Era Multi-Phaser™ modelo NE-1002X. Los experimentos posteriores requirieron hasta cinco bombas. Se utilizaron jeringas BD Ultra-Fine™ 25G x 16mm de 1 mL de capacidad.

Las jeringas cargadas con sus respectivos componentes para la formación de cada nanoemulsión, fueron colocadas en las bombas programmables. Las tuberías insertadas previamente a los canales del microchip fueron conectadas a las jeringas, de acuerdo a los esquemas que se muestran más adelante, cuyos experimentos variaron en función del diseño del microchip.

Los flujos que se presentarán más adelante en la lectura se obtuvieron a partir de la composición de las nanoemulsiones. No obstante, es importante notar que el porcentaje total de tensoactivos permaneció constante, aunque la composición fue modificada sistemáticamente con base en el HLB requerido, cuyo valor fue seleccionado arbitrariamente para calcular la composición de la mezcla de tensoactivos con base en la siguiente ecuación: $HLB_{req} = HLBT1(xT1) + HLBT2(1 - xT1)$. Donde x es la fracción del tensoactivo, $T1$ representa al tensoactivo 1 y $T2$ representa al tensoactivo 2. Por lo tanto, la composición de una cantidad fija de una mezcla de tensoactivos cambió de

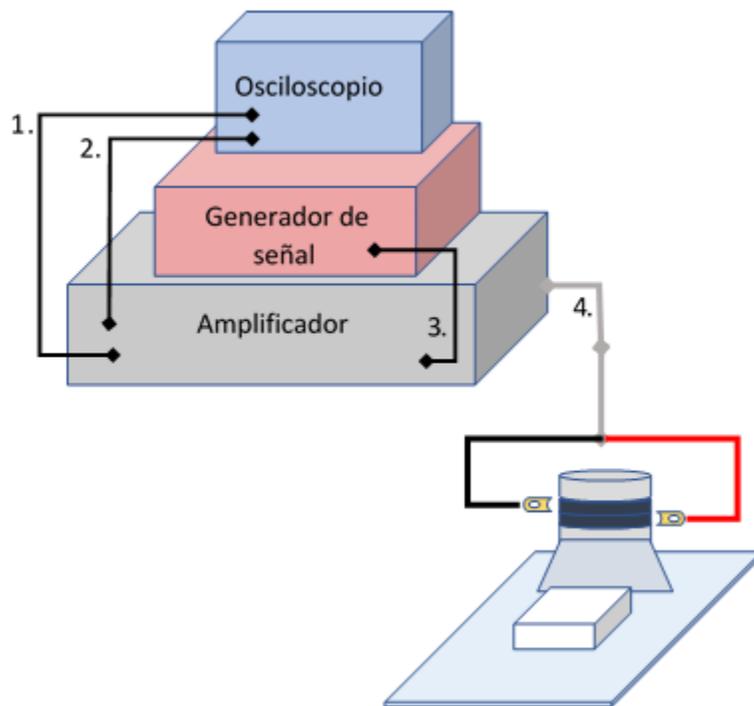


Figura 6.3: Esquema general de las conexiones de los equipos electrónicos necesarios para suministrar energía al piezoeléctrico. 1. Monitor/Voltaje; 2. Monitor/Corriente; 3. Señal Entrada/Salida; 4. Salida de energía al transductor piezoeléctrico.

ensayo a ensayo al configurar los flujos, por lo que fue posible hacer diferentes ensayos en donde se controló y varió el parámetro HLB. Debido a lo anterior, y gracias al flujo continuo, por cada experimento fue posible realizar más de una nanoemulsión, obteniendo entre 100 y 200 μL de cada formulación para su análisis.

6.4. Dispersión dinámica de luz

Las mediciones del tamaño de las gotas de las nanoemulsiones fueron realizadas en el equipo *Zetasizer Nano ZS*. Para poder obtener una buena lectura, se hizo una dilución de 1:50 tomando un volumen de 20 μL de nanoemulsión y completándolo con 980 μL de agua desionizada. A partir de la dilución resultante, se realizaron las medidas de tamaño de partícula colocando el volumen en una celda de vidrio.

Las lecturas se realizaron por triplicado y cada repetición fue el resultado promedio de 6 corridas.

6.5. Curva de calibración de praziquantel

Se construyeron dos curvas de calibración de praziquantel en dos pH distintos. De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos se preparó medio intestinal y gástrico simulado con pH 7.5 y 1.2 respectivamente (ver Preparación de soluciones), mediante los cuales se realizaron las curvas correspondientes por triplicado.

Debido a la baja solubilidad de PZQ en agua, los stock se prepararon pesando y disolviendo previamente 10 mg del polvo en 1200 μL de metanol grado HPLC, y llevándose a un volumen de 100 mL en un matraz volumétrico con los respectivos medios gástrico o intestinal.

En total se prepararon seis soluciones stock a una concentración teórica de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los cuales 3 fueron a pH 7.5 y los restantes a pH 1.2. Después, de cada stock se tomaron: 100, 200, 300, 400, 500 y 600 microlitros los cuales se depositaron y aforaron a 10 mL en matraces volumétricos para obtener concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$

respectivamente.

La selección de la longitud de onda a la cual se leyeron todas las absorbancias, se realizó con base en los barridos obtenidos en cada medición. Para la construcción de las curvas de calibración, la longitud de onda utilizada fue de 210.1 nm.

6.6. Cinética de liberación de la nanoemulsión de praziquan- tel

Los experimentos de liberación del fármaco se realizaron con tres muestras distintas, en las cuales se midió la liberación del fármaco en disolución a través de una membrana semipermeable, otra del fármaco incorporado en la nanoemulsión a 7.5 mg/mL y la última consistió en una liberación blanco (nanoemulsión sin fármaco).

Para desarrollar los experimentos, el material necesario fue:

- 6 agitadores magnéticos
- 8 vasos de precipitados de 250 mL
- Un baño con control de temperatura con capacidad mínima para 8 vasos
- Una parrilla con agitación magnética
- Termómetro de mercurio
- Papel aluminio
- Una micropipeta de 1000 μ L
- Matraces volumétricos de 2mL y 5mL
- Tubos de ensaye de 13 mm x 100 mm
- Gradilla

- Celda de cuarzo
- Membranas de diálisis de celulosa regenerada con peso molecular de 12000 a 14000 daltons (Spectra/Por™)
- Fluido gástrico e intestinal simulado (ver en Preparación de soluciones)

Para el ensayo de liberación de PZQ libre en disolución, se enjuagaron 6 membranas de diálisis con 10 cm de largo cada una con agua desionizada. Después de ser enjuagadas, se dejaron hidratar en otro recipiente con agua desionizada un día antes de comenzar el experimento. Del mismo modo, un día antes se colocaron 8 vasos sellados con papel aluminio dentro de la tina en un baño térmico a $36^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y con agitación magnética. La mitad de los vasos contenía cada uno 200 mL de fluido gástrico simulado pH 1.2 y la otra mitad 200 mL de fluido intestinal simulado pH 7.5. El volumen de 200 mL fue establecido para mantener condiciones sink en el medio de liberación, lo que significa que el volumen del medio de disolución debe ser de cinco a diez veces mayor que el volumen requerido para preparar una solución saturada.

Transcurrido un día completo, con las membranas hidratadas y listas, así como los medios de liberación a 36°C , se procedió con el llenado de las membranas. A partir del stock de PZQ de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ se llenaron las 6 membranas con 6 mL cada una a través de una micropipeta de $1000 \mu\text{L}$, teniendo una cantidad total de $600 \mu\text{g}$ de PZQ dentro de la bolsa. Posteriormente se sellaron herméticamente con ligas en cada extremo y se aseguró que no escurriera el contenido.

Para ambos medios de liberación se dispuso de tres vasos para realizar por triplicado la liberación y un vaso extra solo con medio gástrico o intestinal, con el propósito de reponer el volumen recolectado por cada tiempo de muestreo.

El cronómetro para los muestreos se inició inmediatamente después de introducir las membranas con PZQ a los vasos con los medios de liberación. Se realizaron tiempos de muestreo para cada vaso con PZQ liberado como se muestra en la tabla 6.1.

Por cada tiempo de muestreo se recolectaron 3 mL del medio de liberación en tubos de ensayo perfectamente limpios. No obstante, el medio de liberación se repuso con los medios amortiguadores correspondientes.

Tabla 6.1: Tiempos de muestreo de PZQ liberado en su respectivo medio de liberación

Alícuota	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tiempo (h)	0.25	0.50	0.75	1	2	4	6	8	10	12	24	48

Una vez recolectadas las alícuotas, cada una fue medida en el espectrofotómetro de luz UV-Visible, para lo cual se tomó inicialmente la lectura de la solución amortiguadora sin PZQ disuelto, para restar la línea base que se registra en el barrido generado por el equipo, y realizar las mediciones pertinentes de las alícuotas recolectadas a 210.1 nm.

Las pruebas de liberación en la nanoemulsión con y sin PZQ se realizaron por triplicado y siguiendo los mismos pasos que para PZQ en disolución, a excepción de la longitud de las membranas cuyas dimensiones fueron de 8 cm y el volumen introducido en ellas de 2 mL, y con la particularidad de iniciar con las membranas y su contenido inmersas en los medios gástricos durante las primeras dos horas, y posteriormente cambiándolas al medio intestinal hasta las 48 horas subsiguientes.

Para las alícuotas cuya absorbancia medida excedía el punto máximo en las curvas de calibración, se realizaron las diluciones pertinentes para que las absorbancias medidas pudieran interpolarse en los gráficos y por ende poder calcular la concentración real.

A partir de las curvas de liberación hechas *in vitro*, la cinética de liberación fue determinada utilizando el complemento de software de Excel: DDSolver, a través de un análisis de regresión lineal y regresión no lineal, de acuerdo a la ecuación descrita por cinco modelos, los cuales fueron, orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin. El modelo matemático que mejor expresaba y describía el perfil de liberación fue seleccionado en función del coeficiente más alto de determinación ajustado ($R^2_{Adjusted}$), el valor más bajo del criterio Akaike (AIC) [27][41], y con base en un análisis visual de bondad de ajuste, representado como un gráfico de correlación de residuales en función del tiempo.

6.7. Pruebas biológicas

La realización de las pruebas biológicas fue posible gracias a una colaboración con la Dra. Nelly Martínez Castro y a su equipo del Instituto Nacional de Neurología, del laboratorio de Neuropsicofarmacología.

6.7.1. Muestreo.

Se tomaron dos o tres muestras de sangre por rata (1 mL), para cubrir los intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos. El metabolismo del PZQ es por la enzima CYP 3A4, sufre metabolismo de primer paso y su vida media es de 1.0 - 2.0 horas. Por esa razón se cubrió ese intervalo de tiempos de muestreo. La diferencia del número de muestras en los tiempos de muestreo en cada semana, se debió a situaciones experimentales no previstas, como el estado de estrés de los animales y en el manejo de los mismos. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3500 rpm y el plasma fue separado del paquete celular, mismo que se mantuvo en congelación a -72°C hasta su análisis por HPLC. En la figura 6.4 y 6.5 se muestran fotografías tomadas en el Instituto Nacional de Neurología, del laboratorio de Neuropsicofarmacología, donde se observan las muestras de plasma recolectadas a los diferentes tiempos y las muestras de plasma a ser analizadas por HPLC.

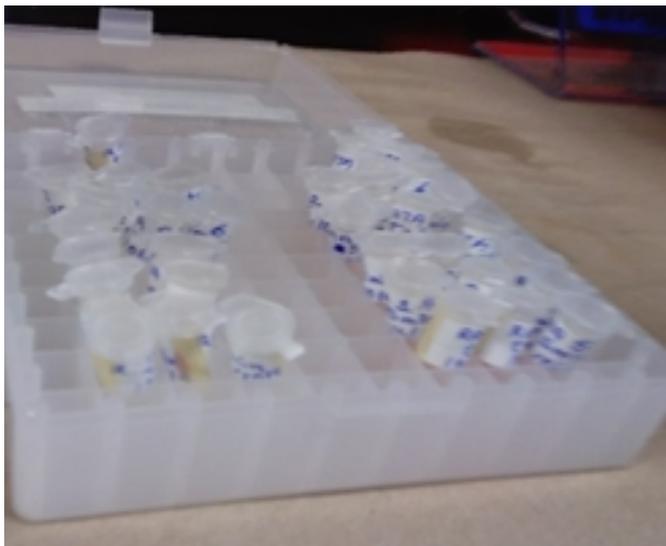


Figura 6.4: Muestras de plasma recolectadas a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos.



Figura 6.5: Muestra de plasma a analizar por HPLC.

6.7.2. Extracción de muestras plasmáticas.

Se preparó una curva patrón de PZQ en plasma en el rango de 16 a 3000 ng/mL y puntos control en plasma dentro del rango de la curva.

A 300 μL de plasma (de curva patrón, puntos control y muestras de estudio) se le adicionaron 30 μL de carbamazepina (estándar interno E.I. con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), también se preparó un blanco y un blanco adicionado de E.I. Posteriormente se agitó por 10 segundos.

A cada muestra se les adicionó 300 μL de NaOH 0.2 N, se agitó y posteriormente se adicionaron 6 mL de la fase de extracción (acetato de etilo: eter isopropílico, 70:30).

Se agitaron durante tres minutos, posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm y se dejaron en ultracongelación por 20 minutos a -72°C . El sobrenadante se decantó y se evaporó bajo corriente de nitrógeno y baño maría (25°C). Después, las muestras evaporadas se reconstituyeron en 50 μL de metanol HPLC y se inyectaron 30 μL al sistema cromatográfico.

6.7.3. Análisis de muestras por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

El análisis se llevó a cabo en el equipo Agilent 1260, con bomba isocrática, automuestreador y detector UV.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna Agilent XDB-C18 (150 x 5.0 mm), fase móvil acetonitrilo/Agua (45:55), flujo 0.8 mL/min y longitud de onda 217 nm.

Las muestras se analizaron el mismo día con el siguiente orden de análisis

- a) Metanol HPLC.
- b) Estándar Interno (E.I.; carbamazepina 10 mcg/mL).
- c) Estándar PZQ (100 mcg/mL).
- d) Adecuabilidad del sistema (6 inyecciones de E.I. y PZQ ambos en solución) para evaluar la respuesta del equipo. Se debe cumplir un coeficiente de variación menor a 2.

- e) Blanco en plasma .
- f) Curva de calibración en plasma.
- g) Muestras plasmáticas (Ratas de estudio).
- h) Puntos control intercalados en el análisis de muestras plasmáticas.

Capítulo 7

Resultados y discusión

7.1. Fabricación de nanoemulsión sin PZQ

Debido a una colaboración con la Dra. Nelly Castro se llegó al acuerdo de incorporar al fármaco en aceite de moringa, cuyo origen proviene de las semillas de un árbol con el mismo nombre, pues se cree que este aceite en especial podría tener consecuencias positivas en el efecto terapéutico de PZQ. Los primeros experimentos se realizaron a partir del diseño del microchip A como se muestra en la figura 7.1. La disposición de las bombas se realizó partiendo con una línea imaginaria el centro del microchip en el eje y , se encuentran del lado izquierdo los componentes oleosos y del lado contrario los componentes acuosos. Del lado izquierdo una de las jeringas fue cargada con aceite de moringa, y la otra con una mezcla de aceite de moringa con Span 80 al 10 % m/m. Por el lado opuesto se inyectó en el canal superior derecho agua desionizada (ultra pura Milli-Q), y en el canal inferior Tween 80 diluido al 10 % m/m con agua desionizada. Así, se prepararon cuatro nanoemulsiones O/W sin PZQ y con diferentes valores de HLB, pero en cada caso se mantuvo constante: 5 % de aceite y 1 % de tensoactivos (T80+S80) en porcentaje masa, y el 96 % restante con agua ultra pura Milli-Q.

De acuerdo al arreglo mostrado en la figura 7.1, fueron generadas durante una sesión experimental cuatro nanoemulsiones con distintos valores de HLB: 4.3, 7.0, 11.0 y 15.0. Los respectivos flujos de cada emulsión se muestran en la tabla 7.1.

En las nanoemulsiones mostradas en la figura 7.2, se observa que el ensayo número 4, el cual no

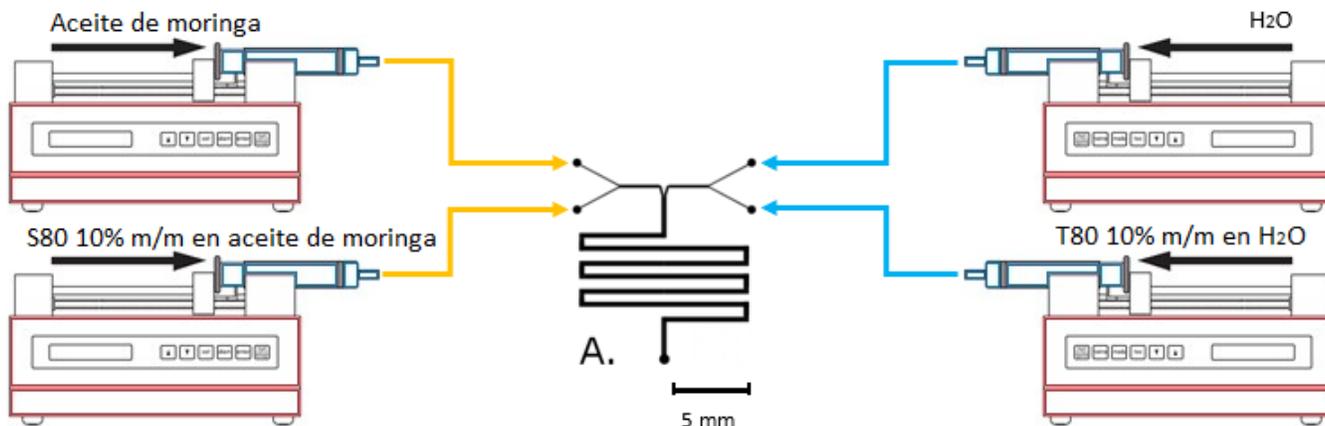


Figura 7.1: Disposición de las bombas para jeringas programables con base en el diseño A de los microchips.

Tabla 7.1: Flujos inyectados en ($\mu\text{L}/\text{h}$) en función del HLB requerido. Composición en porcentajes masa: 5 % Aceite de moringa; 1 % Tensoactivos; 94 % Agua desionizada.

NE	HLB	Fase oleosa+ S80 ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase oleosa s/Ta ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase acuosa+ T80 ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase acuosa s/Ta ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Flujo total ($\mu\text{L}/\text{h}$)
1	4.3	21.8	43.3	0	934.9	1000
2	7.0	16.3	46.2	26.7	910.7	1000
3	11.0	8.2	50.6	66.3	874.8	1000
4	15.0	0	55.1	105.9	838.9	1000

contiene S80, representa un sistema aparentemente más estable en términos visuales (cualitativos), respecto a los ensayos 1, 2 y 3 ya que se nota un efecto progresivo de translucidez a medida que va disminuyendo el flujo de S80 y va aumentando el de T80, o visto de otro modo, mientras que el parámetro HLB aumenta.

Tomando como base los resultados obtenidos en la primera fase de experimentación, se procedió con la incorporación del fármaco en la fase oleosa.

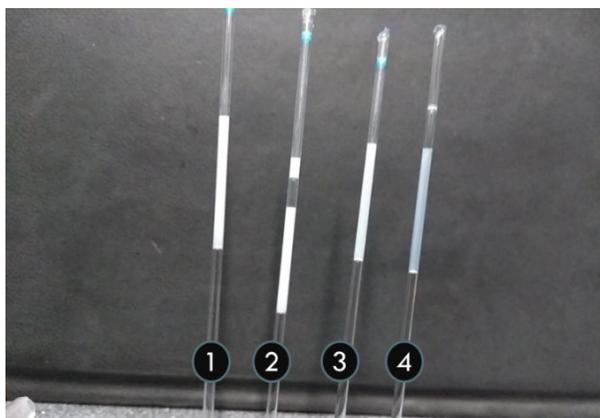


Figura 7.2: Nanoemulsiones O/W con fracciones masa de aceite 5% y mezclas de tensoactivos al 1%. Para los ensayos 1, 2, 3 y 4, en función de la composición de la mezcla de tensoactivos, los valores HLB son 4.3, 7, 11 y 15, respectivamente.

7.2. Elección de la fase oleosa

El primer paso para la formación de la nanoemulsión cargada con PZQ consistió en solubilizar al fármaco en la fase oleosa, para posteriormente introducir un determinado volumen o cantidad en la fase continua. Por lo tanto, se propuso comenzar con pruebas de solubilidad de PZQ en el aceite de moringa.

El aceite de moringa presentó una capacidad deficiente para disolver el fármaco como se muestra en la Figura 7.3, por lo que se optó por solubilizar el PZQ en ácido oleico (figura 7.4).

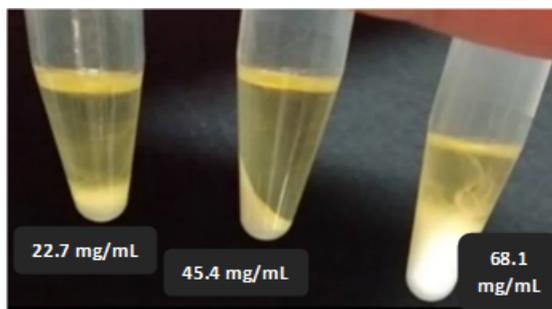


Figura 7.3: Prueba de solubilidad de PZQ en aceite de moringa a diferentes concentraciones.



Figura 7.4: Prueba de solubilidad de PZQ en ácido oleico.

Para cada aceite se intentó primero disolver 22.70 mg o 22.32 mg de PZQ en 1 mL de aceite de moringa o ácido oléico, respectivamente. El aceite de moringa solubilizó una cantidad muy pequeña del fármaco, por lo que no fue tomado en cuenta como medio de incorporación para el fármaco en los ensayos posteriores; en contraste, el ácido oleico disolvió hasta el doble de la cantidad inicial de PZQ. Las soluciones se agitaron 1 hora en el Vortex Type 16700 Mixer hasta llegar a obtener una apariencia homogénea. Solo en el ácido oleico fue posible disolver en 1 mL 22.32 mg y hasta 44.69 mg de PZQ.

Gracias a que fue posible solubilizar tales cantidades de PZQ en ácido oleico, la fabricación de las nanoemulsiones que se presentan en la siguiente sección fueron posibles, debido a que a partir de las soluciones resultantes de PZQ se calculó el porcentaje masa necesario de principio activo disuelto en la fase oleosa para introducirlo a la fase continua, y así poder obtener formulaciones a determinadas concentraciones.

7.3. Nanoemulsiones con PZQ y estabilidad cinética

Debido a los resultados preliminares de solubilidad y a que las nanoemulsiones más estables fueron aquellas con valores de HLB altos, se decidió preparar las siguientes nanoemulsiones de PZQ,

donde se utilizó una mezcla de Tween 80 (HLB = 15.0) con Tween 20 (HLB = 16.70). Además se aumentó el porcentaje masa de la mezcla de tensoactivos en los sistemas, por lo que la relación de los reactivos fue de 5 % ácido oleico con PZQ a una concentración de 22.3 mg/mL y 3 % de la mezcla de tensoactivos (T80+T20), donde el HLB requerido para cada nanoemulsión fue de 16.02, 16.36 y 16.70. El porcentaje masa de ácido oleico con el fármaco implica una concentración final en la formulación de 1.25 mg/mL de PZQ. La concentración final se basó en el volumen máximo que puede ser administrado via oral a un ratón con un peso promedio de 20 g, y por supuesto, en la concentración mínima de PZQ de 25 mg/kg para cuantificar niveles en suero. A continuación, en la tabla 7.2 se muestran los flujos requeridos para la formación de las nanoemulsiones.

Tabla 7.2: Flujos inyectados en ($\mu\text{L/h}$) en función del HLB requerido. Composición en porcentaje masa: 5 % Ácido oleico; 3 % Tensoactivos; 92 % Agua desionizada.

NE	HLB	Fase acuosa+ T20 ($\mu\text{L/h}$)	Fase acuosa+ T80 ($\mu\text{L/h}$)	Fase acuosa s/Ta ($\mu\text{L/h}$)	Fase oleosa s/Ta ($\mu\text{L/h}$)	Flujo total ($\mu\text{L/h}$)
1	16.02	177.7	119.1	647.9	55.29	1000
2	16.36	237.0	59.58	648.2	55.30	1000
3	16.70	296.3	0	648.4	55.30	1000

Aunado al cambio de tensoactivos, fue necesario hacer una modificación al diseño del microchip, por lo tanto, los experimentos consecuentes se llevaron a cabo en el microchip del diseño B mostrado en la figura 7.5. El diámetro hidrodinámico promedio de las partículas de las tres nanoemulsiones de la tabla 7.2 fue monitoreado bajo la técnica de dispersión dinámica de luz DLS (por sus siglas en inglés) con respecto al tiempo de almacenamiento. También se registró el índice de polidispersidad PDI (por sus siglas en inglés) para determinar que tan amplia o estrecha era la distribución del tamaño de partícula dentro de los sistemas formados. En la figura 7.6 se encuentra representado el diámetro hidrodinámico promedio de cada sistema obtenido con base en el resultado de las distribuciones ponderadas por intensidad en función del tiempo transcurrido durante su almacenamiento a temperatura ambiente.

Apreciando las gráficas anteriores, es posible notar que el tamaño de partícula de los tres siste-

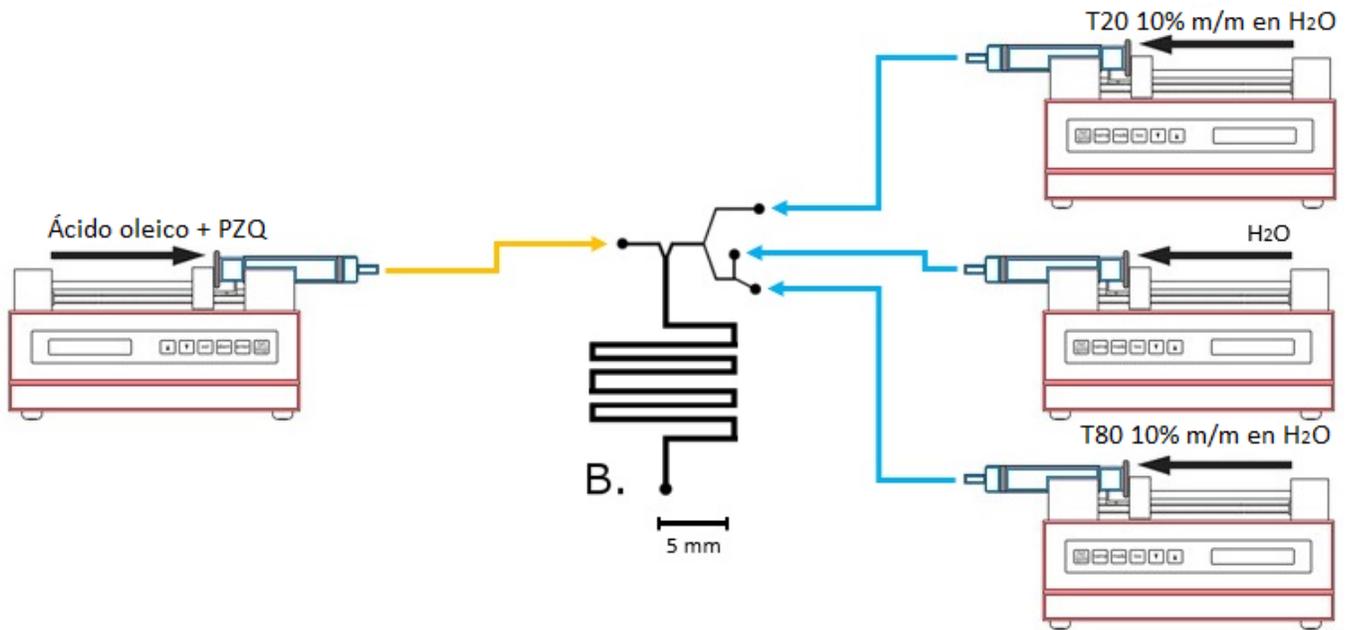


Figura 7.5: Diseño B. Un canal del lado de los compuestos oleosos es omitido, mientras que del lado opuesto se añade un canal para la introducción de T20.

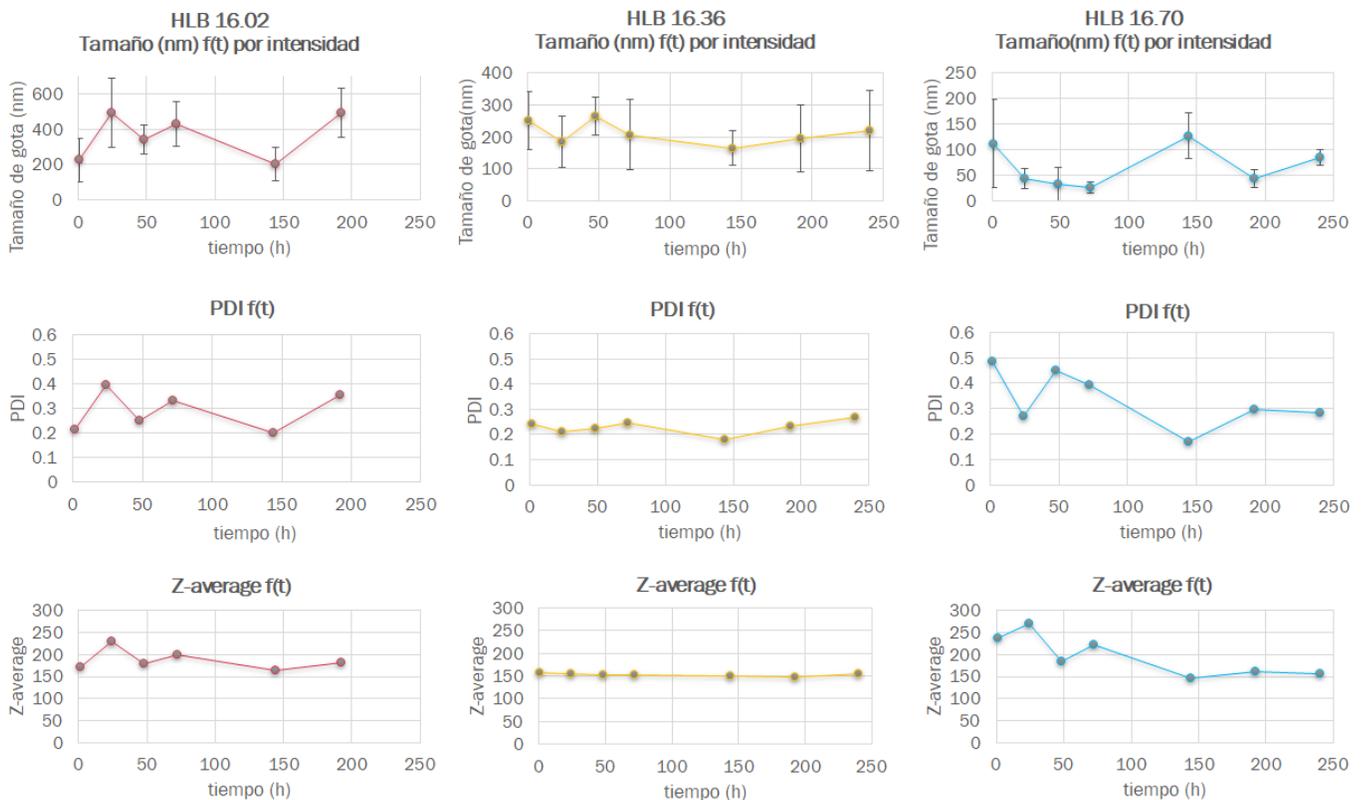


Figura 7.6: Estabilidad cinética de las nanoemulsiones con HLB requerido de 16.02, 16.36 y 16.70.

mas ponderado en intensidad no se manitiene constante a través del tiempo, como se esperarí de un sistema cinéticamente estable, pero las gotas fluctuan en cierto tamaño y no se ve una tendencia de aumento o disminución de tamaño, no obstante, la diferencia entre los tres sistemas formulados se aprecia aún mejor en el comportamiento mostrado como el cambio del tamaño promedio Z (Z-average) y el PDI en función del tiempo, donde la formulación cuyo HLB es de 16.36 fue la que mejores resultados presentó, posiblemente debido al aumento del parámetro HLB. Adicionalmente, en la figura 7.7 se representa la distribución de tamaño por intensidad para la nanoemulsión con HLB de 16.36, donde se demuestra que la distribución de tamaño de partícula de dicho sistema es monomodal al inicio, aunque al final de las mediciones (a los 24 días) se observa un segundo pico, lo cual puede estar relacionado a la desestabilización de la nanoemulsión, dando como resultado la aparición de familias de gotas con tamaños mayores. Ciertamente el último sistema con HLB de 16.70 no resultó tan estable como el ensayo 2, posiblemente por la ausencia de un segundo tensoactivo que promoviera la estabilidad en la interfase agua/aceite.

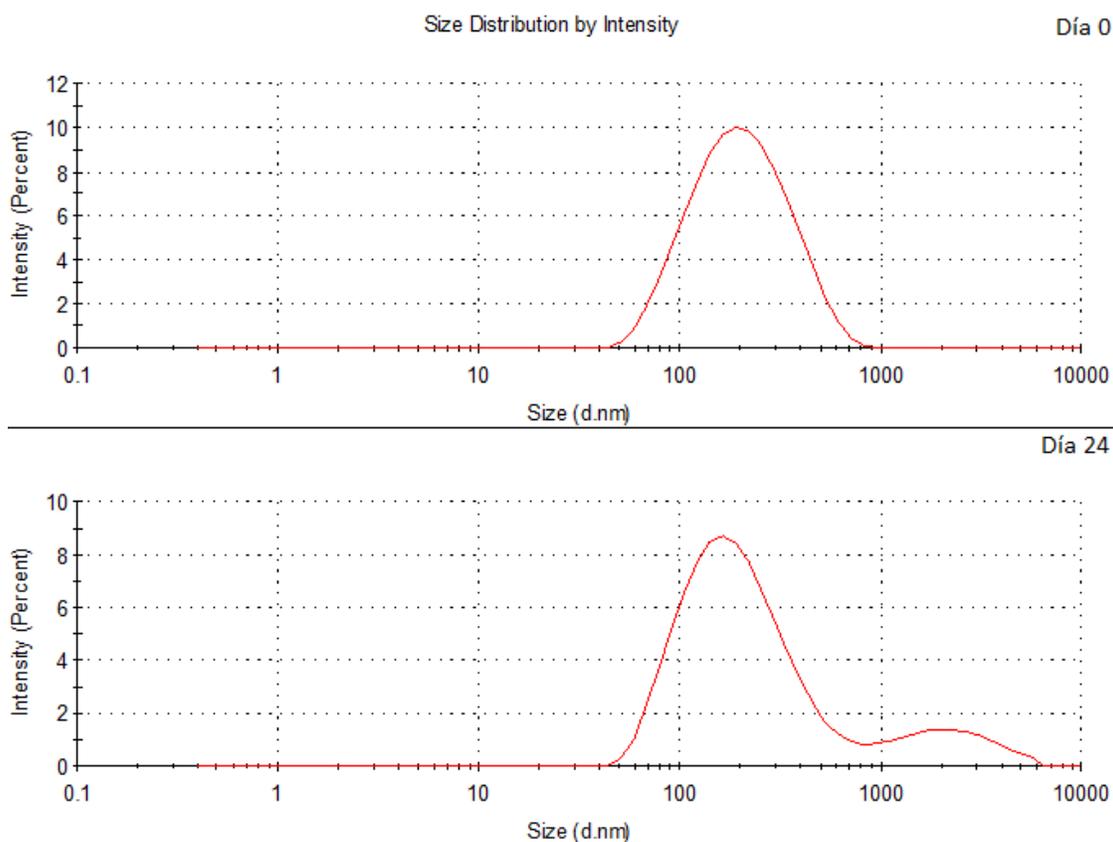


Figura 7.7: Distribución de tamaño por intensidad del día 0 al día 24 de la NE con HLB de 16.36.

Como fue planteado al inicio del proyecto, uno de los objetivos principales fue generar una dispersión O/W, de la cual, las gotas de aceite con fármaco presentes en el medio continuo, tuvieran un tamaño alrededor o menor a 150 nm en el mejor de los casos, por lo que es de particular interés la nanoemulsión del ensayo número 2, la cual contiene en su fase dispersante partículas con un tamaño que osciló desde 148.2 nm hasta 156.3 nm. Adicionalmente, del PDI obtenido de las mediciones, el cual se mantuvo entre 0.179 hasta 0.267, se puede deducir de acuerdo al instrumento de medición, que no hay una diferencia considerable entre el tamaño de las partículas que componen al sistema, es decir, la distribución del tamaño de partícula es más estrecha y por lo tanto más estable, pues se evitarán fenómenos como la coalescencia o la maduración de Ostwald, a diferencia de los ensayos 1 y 3, donde es distinguible un comportamiento errático y variable con PDI cercanos a 0.4 y 0.5 respectivamente, por lo que en consecuencia, los valores de tamaño promedio Z no son confiables.

Observando el comportamiento de los tres sistemas se propuso incorporar un nuevo tensoactivo con base en la tendencia de los ensayos por presentar una mayor estabilidad cinética a medida que el HLB aumenta.

De la siguiente fase de experimentación con los microdispositivos, destacan los resultados obtenidos a partir del diseño C (figura 7.8), cuya longitud de recorrido, desde el punto de intersección entre fase acuosa y oleosa, hasta el punto de salida es mayor, respecto a los diseños A y B. Incluso se destaca el acoplamiento de una entrada extra del lado de los componentes afines a la fase acuosa.

El diseño del microchip C se construyó con el objetivo de introducir dos componentes extra, cuya afinidad se inclina hacia la fase acuosa. El primero de ellos es un tensoactivo no iónico, se trató de poloxámero 407 o por su nombre comercial: Pluronic F-127. Dicho tensoactivo posee un HLB de 22 [42]. El segundo componente añadido fue polietilenglicol 1500, del cual dicho número hace referencia al peso molecular promedio del copolímero; es soluble en agua y funciona como agente estabilizante [42].

En los experimentos ulteriores fue sustituido el uso del tensoactivo T80 por PF-127. Se prepararon cuatro formulaciones con HLB de 17.76, 19.88, 20.94 y 22, a las cuales, además se agregó

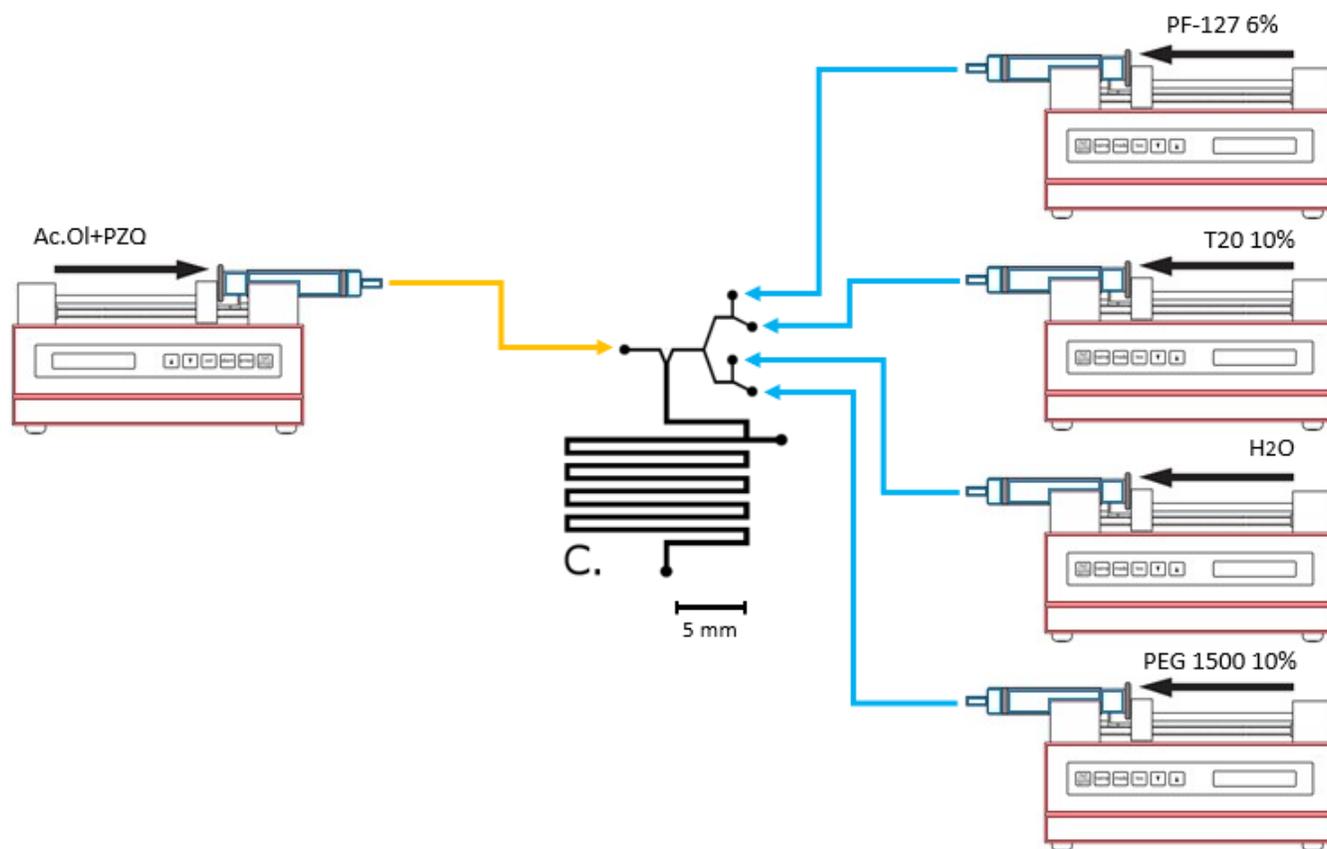


Figura 7.8: Diseño de microchip C y disposición de bombas en función de la naturaleza de los componentes que integran las nanoemulsiones con un HLB más alto.

un copolímero como polietilenglicol con un peso molecular promedio de 1500 g/mol para darle mayor estabilidad. Las formulaciones propuestas se realizaron al 5 % de aceite, 3 % de la mezcla de tensoactivos y al 2 % de PEG-1500 en porcentaje masa. A continuación se muestra en la tabla 7.3 los flujos utilizados

Tabla 7.3: Flujos inyectados en ($\mu\text{L/h}$) en función del HLB requerido. Composición en porcentaje masa: 5 % Ácido oleico; 3 % Tensoactivos; 2 % PEG-1500; 90 % Agua desionizada.

NE	HLB	Fase acuosa + T20 ($\mu\text{L/h}$)	Fase acuosa + PF-127 ($\mu\text{L/h}$)	Fase acuosa + PEG-1500 ($\mu\text{L/h}$)	Fase acuosa s/Ta ($\mu\text{L/h}$)	Fase oleosa s/Ta ($\mu\text{L/h}$)	Flujo total ($\mu\text{L/h}$)
1	17.76	237.3	99.67	198.6	409.0	55.34	1000
2	19.88	118.6	298.9	198.5	328.6	55.35	1000
3	20.94	59.29	398.5	198.5	288.4	55.36	1000
4	22.00	0	498.0	198.4	248.2	55.38	1000

A las muestras recolectadas se les determinó el tamaño de partícula los tres primeros días y posteriormente se monitoreó su tamaño después de un mes, hasta 69 días posteriores. Se observó que las formulaciones con HLB de 17.76 y 22 mostraron PDI mayor a 0.2 y tamaños mayores a los 160 nm, respectivamente, aunque su aspecto y su tamaño no cambiaron drásticamente al término de los 69 días de medición. Las otras dos formulaciones con HLB de 19.88 y 20.94 fueron más prometedoras, de acuerdo a sus PDI y tamaño promedio Z mostrados en la figura 7.9. Con el resultado obtenido se demuestra que el cambio en la fórmula de la preparación fue positivo, pues el tamaño de partícula de estas dos últimas formulaciones se mantuvo por debajo de los 150 nm, oscilando entre los 120.5 nm y los 142.6 nm, además, el PDI disminuyó a valores por debajo de 0.16, menor al de las nanoemulsiones que contenían T80 en vez de PF-127, y después de más de dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente, dichos parámetros no se modificaron abruptamente, teniendo aún un buen indicador de PDI y de tamaño. El comportamiento monomodal de la formulación con HLB de 19.88 es evidente en la figura 7.10, pues en las mediciones hechas al inicio y al final se observa un solo pico en la distribución de tamaño con un ligero aumento en la desviación estándar, lo que indica que la desestabilización del sistema fue mínima.

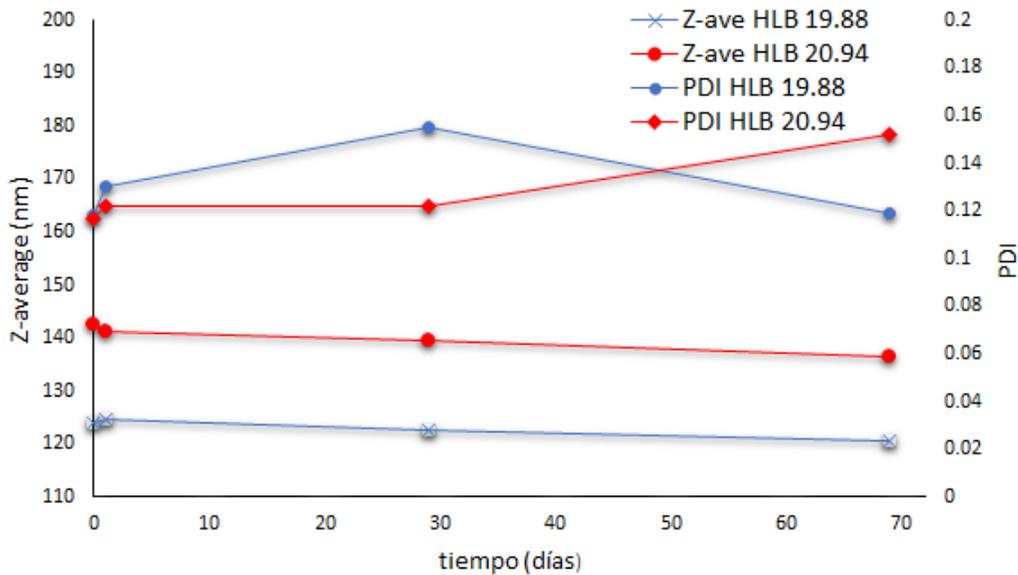


Figura 7.9: Diámetro promedio de gota (Z-average) e índice de polidispersidad (PDI) de las nanoemulsiones con HLB de 19.88 y 20.94 en función del tiempo.

La presencia de PF-127 y del copolímero mejoró considerablemente la estabilidad y el tamaño de las nanopartículas, posiblemente debido al efecto estérico que genera la presencia de las cadenas poliméricas alrededor de la capsula que contiene a la fase oleosa con el fármaco disuelto, promoviendo en consecuencia el movimiento browniano.

Mediante la plataforma microfluídica fue posible encontrar al menos dos formulaciones cinéticamente estables, con un tamaño menor a 150 nm y PDI menores a 0.16. Tales nanoemulsiones fueron formuladas a una concentración final de PZQ de 1.25 mg/mL como se indicó al principio en la sección 7.3.

Aun cuando se obtuvieron mejores resultados en cada fase experimental, hasta tal punto no fue necesario aumentar la dosis de PZQ en las nanoemulsiones. No obstante, a medida que el proyecto avanzó, se requirió incrementar la cantidad de PZQ en la formulación, ya que el uso de ratones a futuro para pruebas *in vivo*, fue sustituido por ratas, por cuestiones de disponibilidad.

Para tales cambios, se contempló fabricar primero una nanoemulsión en el microchip con una concentración final de 7.5 mg/mL de PZQ, considerando un peso máximo de 300 g por rata, con-

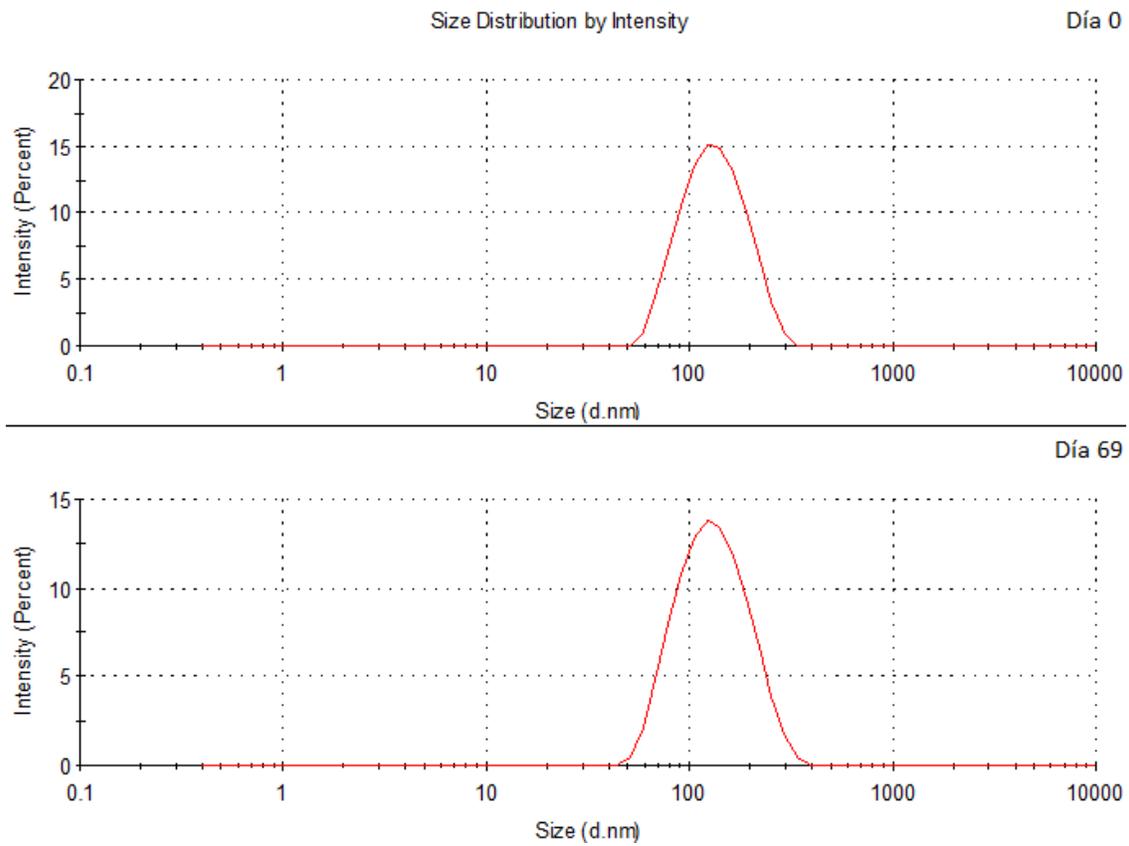


Figura 7.10: Distribución de tamaño por intensidad del día 0 al día 69 de la nanoemulsión con HLB de 19.88.

centración mínima de 25 mg/kg para cuantificación de niveles en suero y un volumen máximo de 1 mL para administración oral.

Se comenzó con la preparación de una solución de PZQ en ácido oleico a una concentración de 63.37 mg/mL. Dicha concentración es la cantidad máxima de PZQ que se puede disolver en ácido oleico, después de una hora de agitación constante. Con base en esta concentración, se estableció que el porcentaje en masa de 10.6 % de aceite era necesaria para generar una nanoemulsión con 7.5 mg/mL de PZQ.

A partir del microchip C y bajo el mismo esquema mostrado en la figura 7.8, se modificaron las fracciones masa del agua y del aceite con PZQ para fabricar la formulación requerida con HLB de 19.88. Los flujos requeridos para producir la nanoemulsión se muestran en la tabla 7.4.

Tabla 7.4: Flujos inyectados en ($\mu\text{L}/\text{h}$) en función del HLB requerido. Composición en porcentaje masa: 10.6 % Ácido oleico + PZQ [63.37 mg/mL]; 3 % Tensoactivos; 2 % PEG-1500; 84.4 % Agua desionizada.

NE	HLB	Fase acuosa +T20 ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase acuosa + PF-127 ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase acuosa + PEG-1500 ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase acuosa s/Ta ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Fase oleosa s/Ta ($\mu\text{L}/\text{h}$)	Flujo total ($\mu\text{L}/\text{h}$)
1	19.88	117.8	296.8	197.2	270.8	117.4	1000

La estabilidad (en términos de tamaño promedio Z y PDI) de esta nanoemulsión se monitoreó por siete días y los resultados se muestran en la tabla 7.5. Se distingue una tendencia creciente en cuanto al tamaño de partícula y la polidispersidad, teniendo como resultado un aumento de hasta 7.53 % y 27.9 % respectivamente en un lapso de siete días. Es posible que la estabilidad se vea afectada debido al incremento en el flujo de la solución de PZQ en ácido oleico, que a diferencia de las formulaciones anteriores, ésta aumentó hasta 10.6 % de fase oleosa.

Paralelamente se produjo la misma formulación en bulto, generando 18 mL finales para contrastar los resultados con la nanoemulsión hecha en el microchip con la misma composición, mismo

Tabla 7.5: Datos de la nanoemulsión fabricada en el microchip a una concentración final de 7.5 mg/mL de PZQ. Composición en porcentaje masa: 10.6 % Ácido oleico + PZQ [63.37 mg/mL]; 3 % Tensoactivos; 2 % PEG-1500; 84.4 % Agua desionizada.

Tiempo (días)	Tamaño promedio Z	Índice de Polidispersidad (PDI)
0	164.5	0.134
5	168.4	0.158
7	177.9	0.186

HLB de 19.88 y concentración final de 7.5 mg/mL de PZQ, además de tener suficiente muestra para las pruebas de liberación y pruebas *in vivo*. La gráfica de la figura 7.11 representa la estabilidad cinética del sistema formado a un volumen final de 18 mL, y en la figura 7.12 se presenta la distribución monomodal del sistema, cuya desviación estandar es estrecha y al término de los 85 días no se observan nuevas familias con tamaños de partícula mayores.

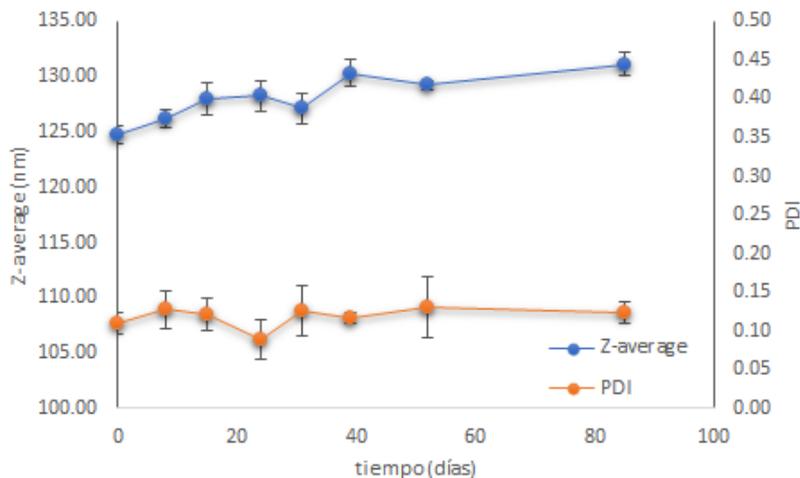


Figura 7.11: Estabilidad cinética de nanoemulsión formulada en bulto con HLB de 19.88.

Para la fabricación se requirió de un procesador ultrasónico para volúmenes pequeños Vibra Cell. La mezcla se sonicó en un vial de vidrio, sumergido en un baño de hielo a una temperatura aproximada de 5°C durante 50 minutos pulsados con un segundo activo y un segundo apagado, y se programó el equipo al 30 % de amplitud. El producto fue almacenado a temperatura ambiente.

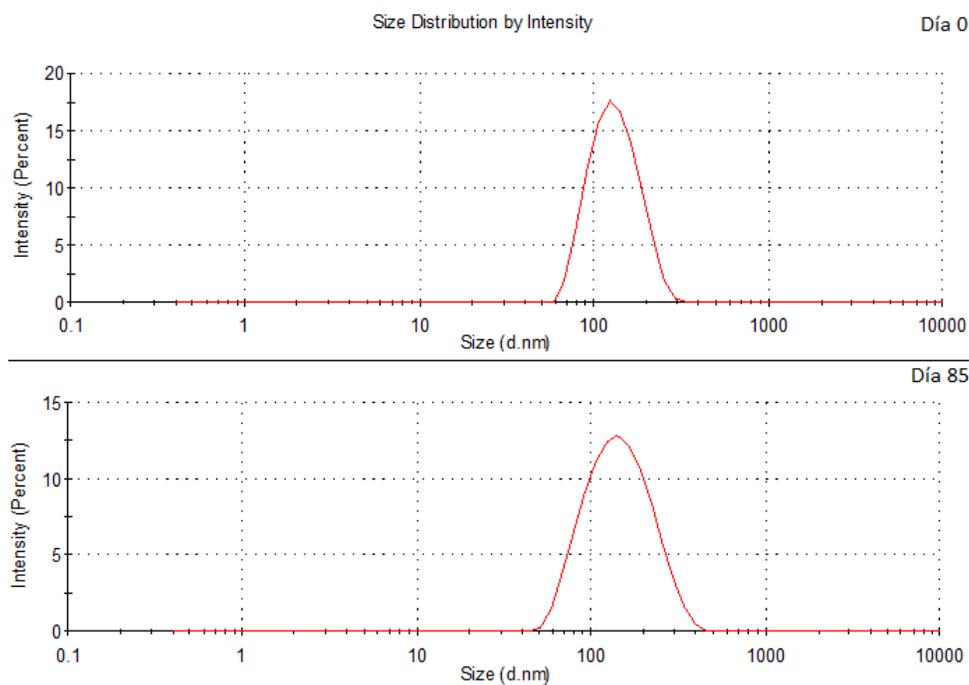


Figura 7.12: Distribución de tamaño por intensidad del día 0 al día 85, de la NE formada en bulto con HLB de 19.88.

Durante los primeros siete días de medición a la formulación anterior se observó una mayor estabilidad respecto a la formulación hecha en el microdispositivo, por lo que se continuó monitoreando el tamaño de partícula y el PDI hasta 85 días totales. Aunque se contempló la misma composición para ambas nanoemulsiones, el hecho de producirlas bajo técnicas distintas mostró diferencias notables en cuanto a la estabilidad de ambas nanoemulsiones debido a la disimilitud de las condiciones en que fueron producidas, tales como la temperatura y el tiempo de exposición de la mezcla a la sonicación. En comparación con el sistema formado en el microchip, el sistema producido en bulto implicó un tiempo total de sonicación activa de 25 minutos, mientras que el tiempo de recorrido por donde atraviesa y se forma la nanoemulsión en los canales del microchip, es menor a un minuto. Por otro lado, es importante destacar que uno de los retos más grandes a enfrentar durante la producción de nanoemulsiones, es el control de la temperatura, hecho que es indiscutiblemente importante en el proceso de fabricación, pues de éste depende ampliamente la distribución del tamaño de partícula [35]. En tanto los 18 mL se formaron en un entorno aproximado a los 5°C, la emulsión formada en el microchip se generó en un ambiente cerrado a 19°C. Para ambos casos, es difícil mantener y saber con certeza la temperatura presente en la nanoemulsión durante su formación, en el microchip, debido al pequeño espacio en el que está confinado la

formulación, y en bulto, por el riesgo que representa utilizar una punta ultrasónica, y el hecho de que es más fácil contaminar el producto.

A diferencia del método convencional, la plataforma microfluídica permite generar sistemas donde la composición objetivo es más exacta, debido a que los flujos de las bombas son programados con base en la composición que se desea obtener, en función de las concentraciones reales de cada componente, y considerando que los fluidos son inyectados de manera continua. Caso distinto con el método convencional, el cual implica que cada nanoemulsión varía en composición, como consecuencia de pesar y agregar individualmente cada reactivo.

Con el resultado positivo encontrado en la nanoemulsión hecha en bulto, se decidió buscar una imagen de dicho sistema antes de realizar más pruebas para su caracterización, tal como se muestra en las secciones posteriores. Para visualizar la morfología de las nanogotas se optó por realizar una microscopía electrónica de barrido de la nanoemulsión, por lo que se analizaron 10 μL de una dilución en agua 1:1000 de tal formulación. Las fotos obtenidas se muestran en la figura 7.13, donde es posible observar partículas con formas irregulares y particularmente aquellas con forma esféricas cuyo tamaño se aproxima a los 134 nm, de acuerdo a la imagen. Contrastando los tamaños reportados con la técnica de dispersión dinámica de luz, se destaca una gran semejanza con los tamaños de las partículas observadas a través de la microscopía electrónica de barrido.

7.4. Perfil de liberación del fármaco

Previo a la experimentación relacionada a la liberación del PZQ de la nanoemulsión, fueron construidas las curvas de calibración de este compuesto en los medios con pH 1.2 y 7.5. Ambas curvas se realizaron por triplicado desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tomando 4 puntos intermedios más, ya que en ese intervalo se cumplió la Ley de Lambert y Beer. En la figura 7.14 y 7.15 se muestran los barridos hechos en el espectrofotómetro, desde 200 nm hasta 300 nm en los medios con pH 1.2 y 7.5, respectivamente.

PZQ mostró absorción a 210.1 nm en ambos pH por lo que esta longitud de onda se eligió como

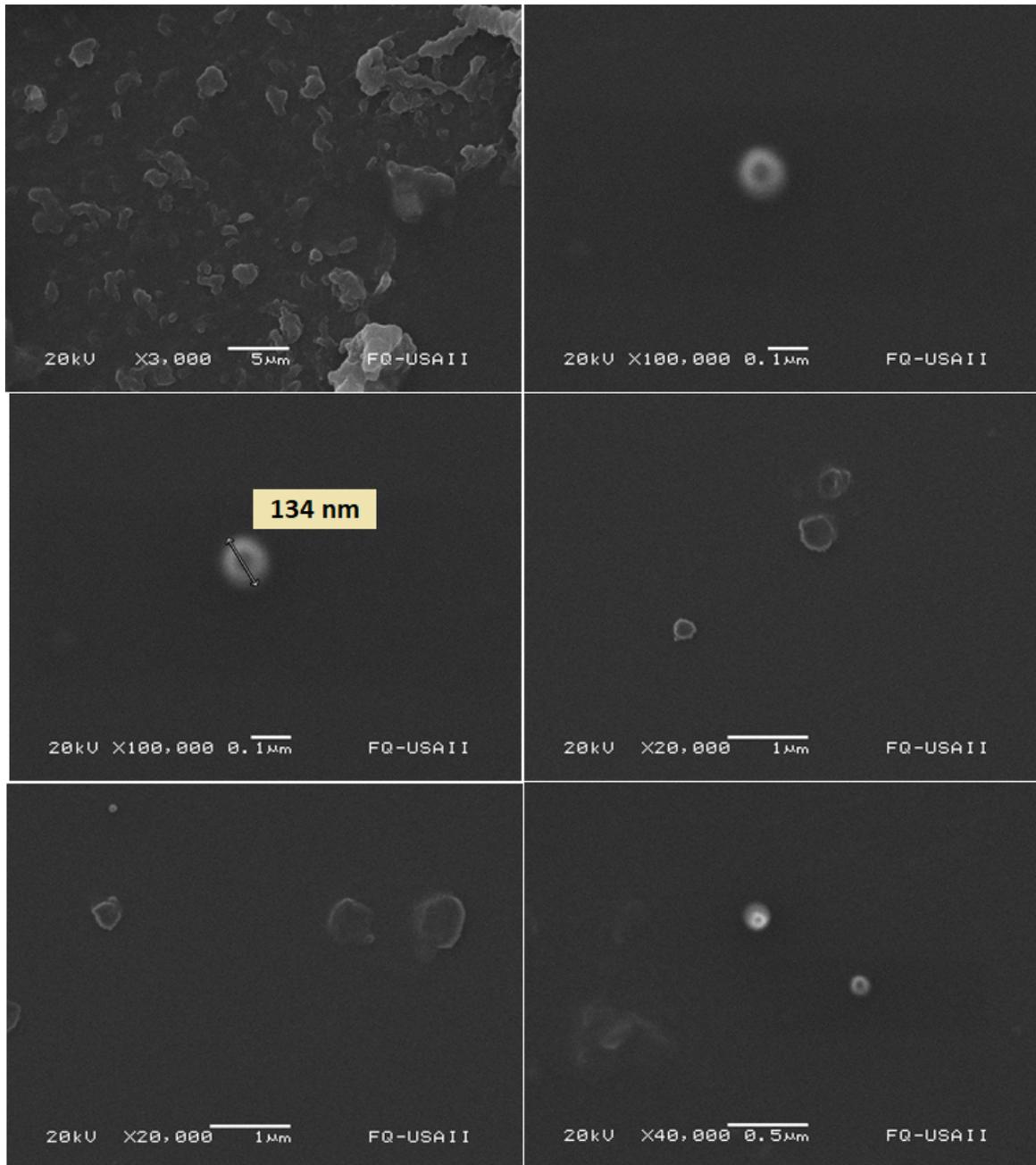


Figura 7.13: Fotografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de la NE hecha en bulto con un HLB de 19.88

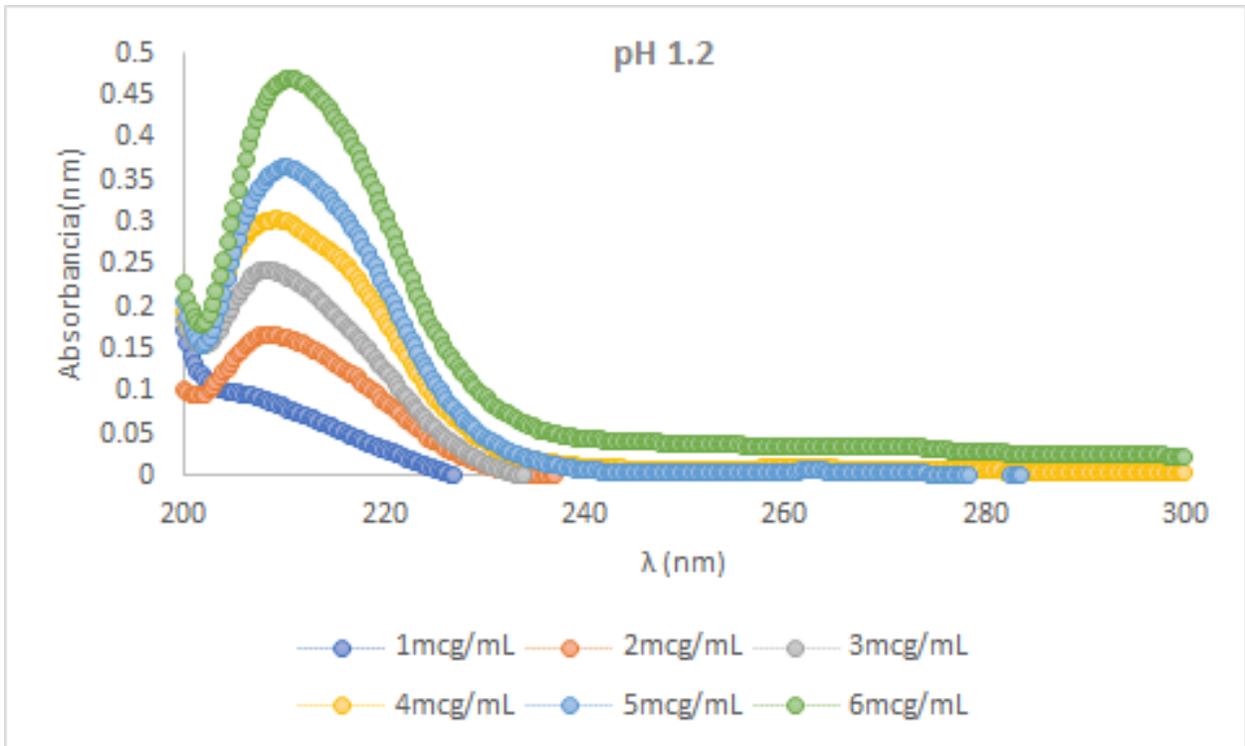


Figura 7.14: Barrido espectral UV de PZQ en fluido gástrico simulado a pH 1.2

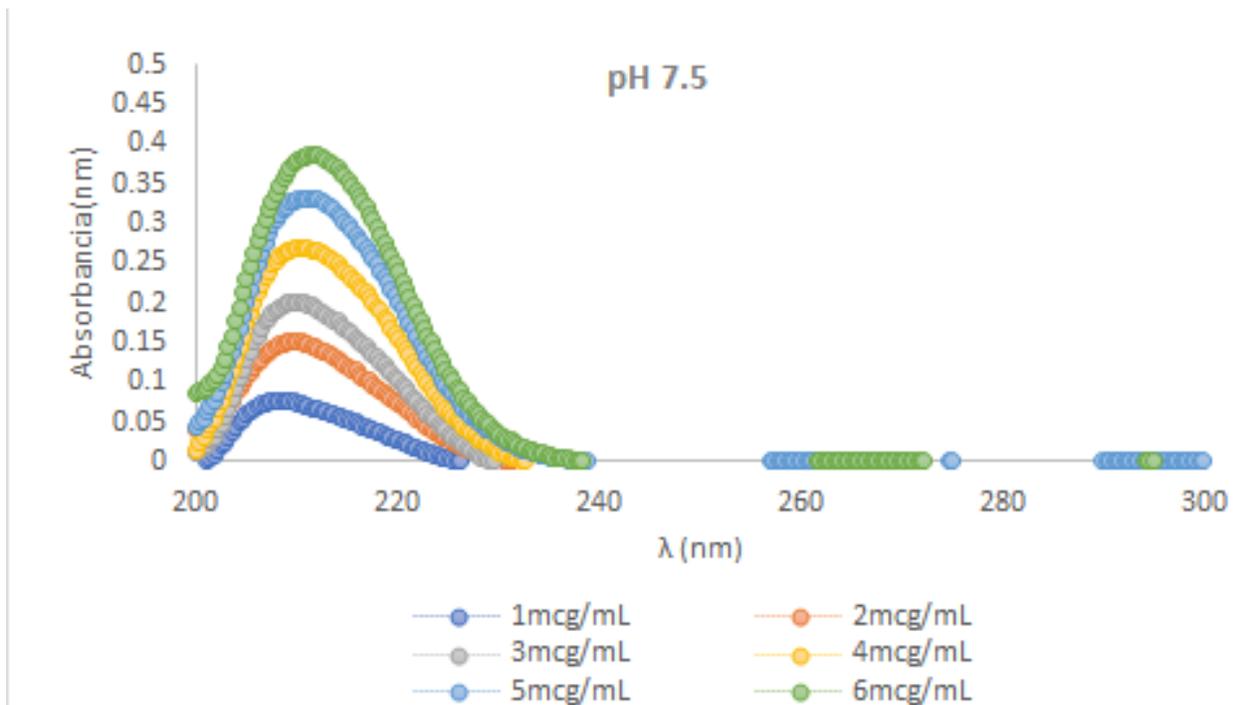


Figura 7.15: Barrido espectral UV de PZQ en fluido intestinal simulado a pH 7.5

la longitud de onda analítica. Se leyeron en el espectrofotómetro las soluciones a las concentraciones anteriormente mencionadas y se hizo un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos. La ecuación de la curva en fluido gástrico simulado fue $y = 0.076x + 0.013$ con un coeficiente de correlación de 0.997. Para el fluido intestinal simulado la ecuación fue $y = 0.066x + 0.011$ y el coeficiente de correlación de 0.996 (figuras 7.16 y 7.17).

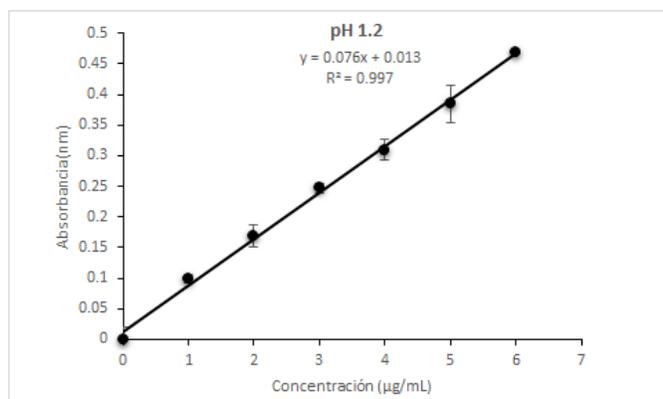


Figura 7.16: Curva de calibración de PZQ en fluido gástrico simulado a pH 1.2 a 210.1 nm

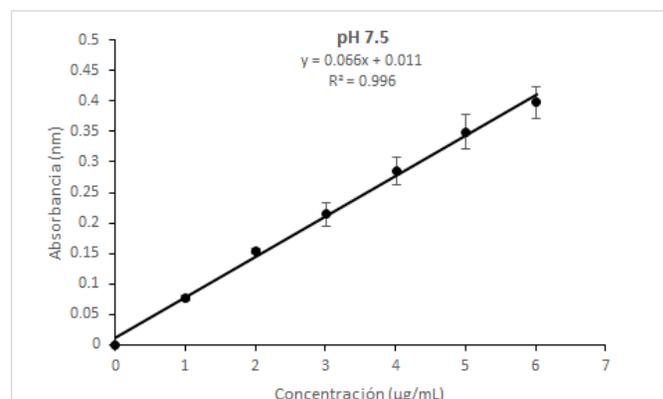


Figura 7.17: Curva de calibración de PZQ en fluido intestinal simulado a pH 7.5 a 210.1 nm.

Tomando como base las curvas de calibración anteriores, se prosiguió con las pruebas concernientes a la liberación, las cuales constaron de tres ensayos diferentes:

- Liberación de PZQ libre en disolución
- Liberación blanco (nanoemulsión sin PZQ)
- Liberación de PZQ incorporado en la nanoemulsión hecha en bulto a una concentración final de 7.5 mg/mL.

Tal y como se explica en la sección 6.6, el primer experimento realizado fue el de la liberación de PZQ en disolución. El propósito fue demostrar que la membrana utilizada con tamaño de poro de 12 a 14 kDa (≈ 3 nm)[40], no actuó como una barrera limitante del paso de las moléculas de fármaco a través de la membrana y, por lo tanto, fue posible utilizar la misma membrana para determinar las características de liberación de PZQ contenido en la nanoemulsión.

Como se muestra en la figura 7.18 y 7.19, el porcentaje acumulado del fármaco en el medio de liberación fue graficado como una función del tiempo. Se observa que a los 30 minutos se ha acumulado aproximadamente entre el 70 % y 80 % del fármaco, y para cuando ha transcurrido una hora, se observa casi el 100 % de liberación del fármaco en el medio. A partir de ese momento la curva llega a una meseta, y se confirma que la membrana no está implicada en limitar el paso de las moléculas de PZQ, por lo que se continuó con los perfiles de liberación de PZQ dentro de la nanoemulsión y también con la liberación blanco.

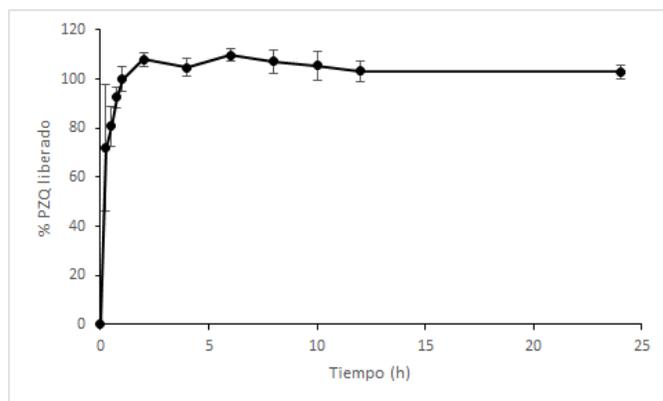


Figura 7.18: Perfil de liberación de PZQ sin excipientes a pH 1.2.

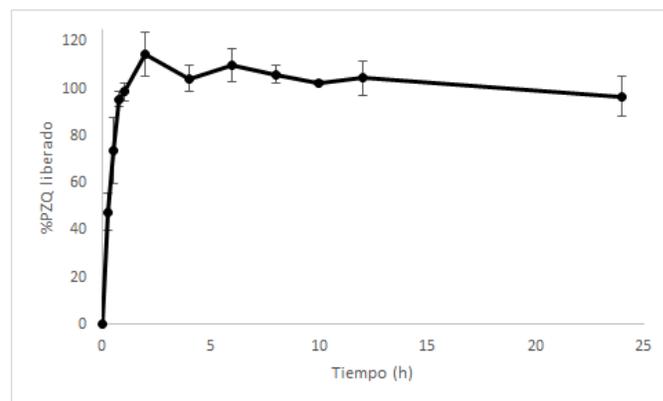


Figura 7.19: Perfil de liberación de PZQ sin excipientes a pH 7.5.

Para determinar que los tensoactivos y el polietilenglicol presentes en la nanoemulsión no interfirieron en la detección del fármaco incorporado en la formulación, se hizo una liberación blanco, es decir, de una nanoemulsión sin PZQ. Como ejemplo, en la figura 7.20 se muestra graficado el comportamiento de la absorbancia del medio de liberación obtenido a partir de una nanoemulsión sin fármaco y una con PZQ, en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 400 nm, de alícuotas tomadas a las 24 horas para ambos sistemas. Se observó que el cambio de la absorbancia a 210.1 nm en función del tiempo en la nanoemulsión sin PZQ fue muy pequeño (<0.01) después de 24 horas. Por el contrario, al realizar la liberación de la nanoemulsión con PZQ, el cambio a 210.1 nm fue significativo.

Es importante destacar la gran diferencia que representa el sistema cargado con PZQ, respecto al que solo contiene los excipientes sin el principio activo, puesto que es posible realizar la cuantificación mediante el espectrofotómetro a 210.1 nm, donde la absorbancia de los excipientes posiblemente disueltos en el medio no es significativa para calcular la cantidad liberada de PZQ

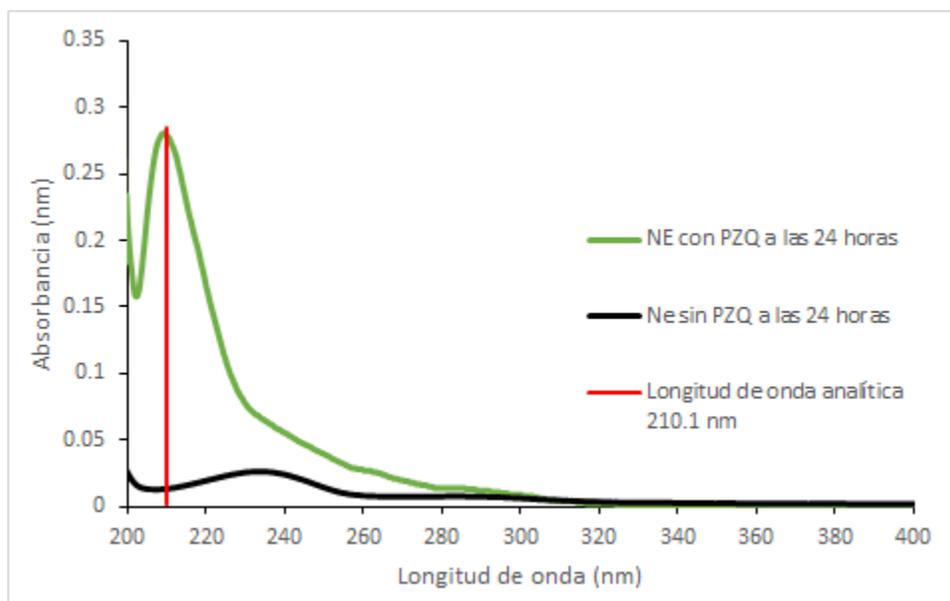


Figura 7.20: Espectro de las alicuotas tomadas del medio de liberación de las nanoemulsiones con y sin PZQ a las 24 horas.

de la nanoemulsión. Sin embargo, para el perfil de liberación de la formulación, en el cálculo se consideró restar las absorbancias obtenidas en la liberación blanco.

En la figura 7.21 se muestra el perfil de liberación de la nanoemulsión con PZQ, como un promedio de tres ensayos y sus respectivas barras de error. Con estos datos fue posible definir cual de los cinco modelos propuestos en la sección 6.6 fue el modelo más adecuado para explicar los datos experimentales. Esto se logró considerando dos parámetros, el primero de ellos es el coeficiente de determinación ajustado, el cual determina que modelo representa mejor los datos experimentales a medida que su valor se acerca más a 1. El segundo es el criterio de información Akaike o también conocido como AIC (*An Information Criterion*), cuyo valor tiende a ser más bajo para aquellos modelos que pierden la menor cantidad posible de información, esto es, que representan un mejor ajuste para la curva de liberación. Dichos valores se encuentran reportados en la tabla 7.6, los cuales indican que el análisis de correlación entre la cantidad disuelta experimental y la cantidad disuelta predicha en función del tiempo, es descrito más apropiadamente por el modelo de Peppas-Sahlin.

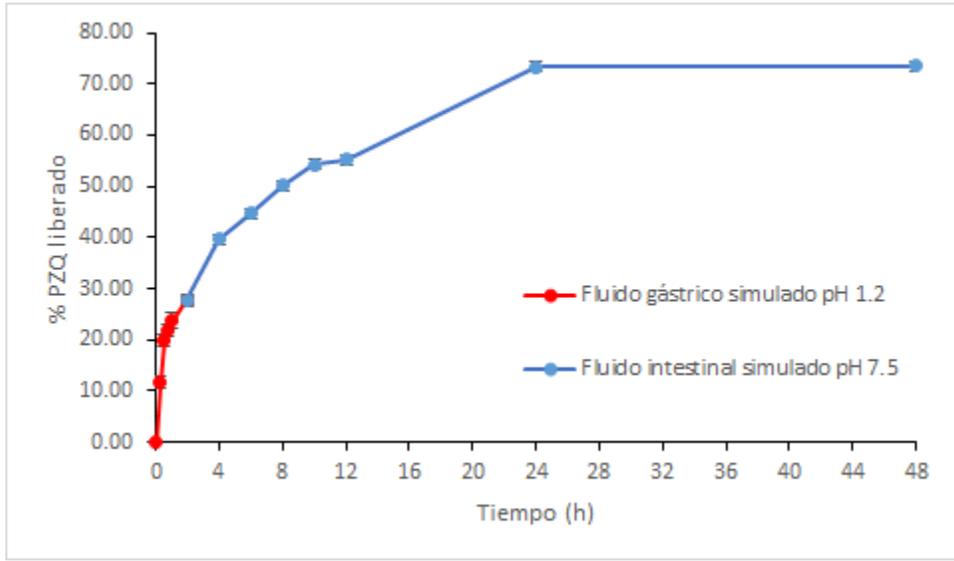


Figura 7.21: Perfil de liberación de nanoemulsión cargada con PZQ a 7.5 mg/mL.

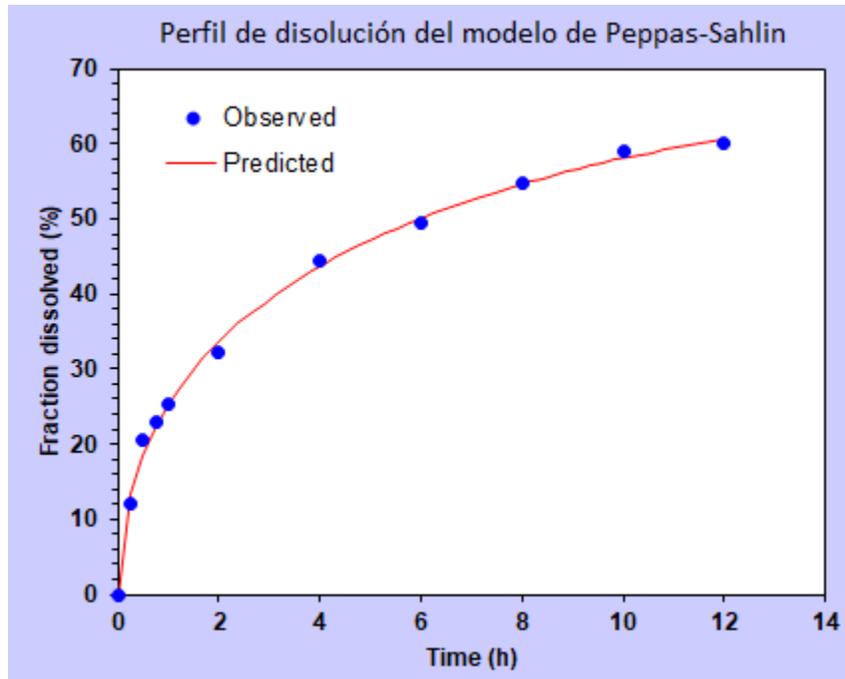


Figura 7.22: Perfil de disolución observado y predicho del modelo de Peppas-Sahlin.

Adicionalmente, se muestra en la figura 7.22 un análisis visual de bondad de ajuste representado como un gráfico de correlación de residuales contra el tiempo, con el cual se refuerza la aseveración de que el modelo de Peppas-Sahlin es el que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Tabla 7.6: Modelos cinéticos para perfil de liberacion

Modelo cinético	Ecuación	$R^2_{Adjusted}$	AIC
Orden cero	$F = k_0 * t$	-0.1527	120.65
Primer Orden	$F = 100 * [1 - e^{k_1 t}]$	0.7972	98.07
Higuchi	$F = k_H * t^{0.5}$	0.8291	95.84
Korsmeyer-Peppas	$F = k_{KP} * t^n$	0.9935	38.94
Peppas-Sahlin	$F = k_1 * t^m + k_2 * t^{2m}$	0.9969	31.59

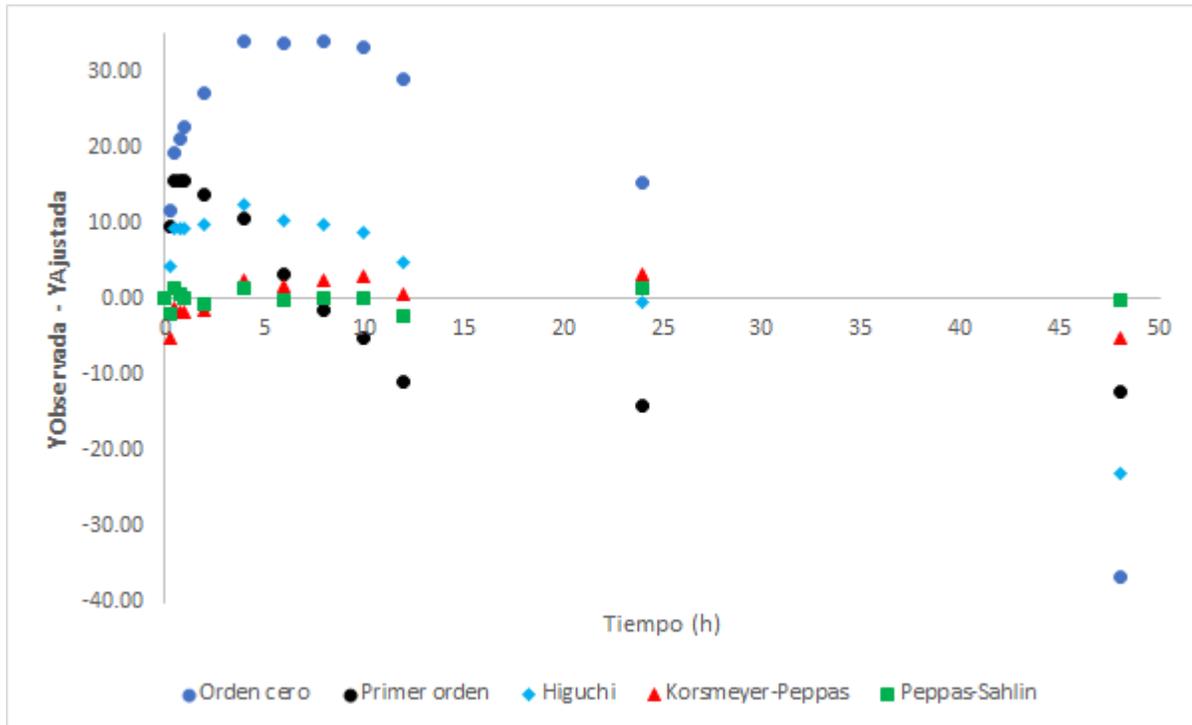


Figura 7.23: Análisis de bondad de ajuste. Correlación de residuales contra tiempo.

Como es evidente, los valores representados con cuadros verdes no forman un patrón específico, con lo cual se confirma que el modelo de Peppas-Sahlin corresponde a la función que mejor

describe el fenómeno de disolución de PZQ a través de la nanoemulsión, seguido por el modelo de Korsmeyer-Peppas representado en la gráfica con triángulos rojos.

El modelo propuesto por Peppas y Sahlin indica que la cinética de liberación puede estar gobernado por dos fenómenos aditivos, asociados a k_1 y k_2 , donde el primer término del lado derecho de la ecuación $F = k_1 * t^m + k_2 * t^{2m}$ indica que k_1 representa una contribución difusional Fickiana, mientras que el segundo término representa una contribución debido a la relajación de las cadenas poliméricas. El coeficiente m es un exponente de difusión Fickiano asociado a la forma geométrica donde el principio activo se encuentra incorporado. Para el perfil de liberación de PZQ a partir de la nanoemulsión los valores de k_1 y k_2 obtenidos fueron 28.27 y -2.98, respectivamente. El signo negativo asociado a k_2 indica que su contribución es despreciable, mientras que para k_1 es positivo, lo que apunta a que la contribución asociada a la liberación de PZQ está mayormente relacionado a una difusión Fickiana [41].

7.5. Pruebas biológicas

Como se mencionó en el capítulo 6 del presente proyecto, la realización de las pruebas biológicas fue posible gracias a una colaboración con la Dra. Nelly Martínez Castro y a su equipo del Instituto Nacional de Neurología, del laboratorio de Neuropsicofarmacología.

El estudio realizado en las instalaciones del Instituto Nacional de Neurología se hizo comparando la nanoemulsión de PZQ a 7.5 mg/mL contra una suspensión de PZQ. Se utilizaron 6 ratas para la formulación de prueba (Nanoemulsión) y 6 ratas para el fármaco en suspensión. Ambas fueron administradas en la misma dosis de 25 mg/kg. El peso promedio por rata fue de 300 g.

La metodología para el muestreo, extracción de muestras de sangre y su análisis por HPLC se describen con detalle en la sección de Metodología en el capítulo 6. Sin embargo se resalta que se cubrieron cinco intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 y 60 en el lapso de una hora, basado en la vida media del fármaco de 1.0 - 2.0 horas. Para la cuantificación del fármaco en plasma se procedió con una extracción y se preparó una curva patrón de PZQ en plasma en el rango de 16 a 3000 ng/mL, para posteriormente realizar un análisis por HPLC.

La curva patrón utilizada para la cuantificación de PZQ en las muestras se observa en la figura 7.23. Posteriormente se construyó la gráfica de la concentración de PZQ en ng/mL en función del tiempo (figura 7.24) para comparar la biodisponibilidad de fármaco a partir de la nanoemulsión y del fármaco en suspensión.

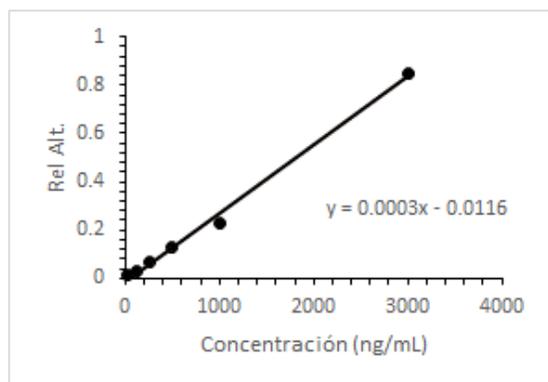


Figura 7.24: Curva de calibración de PZQ.

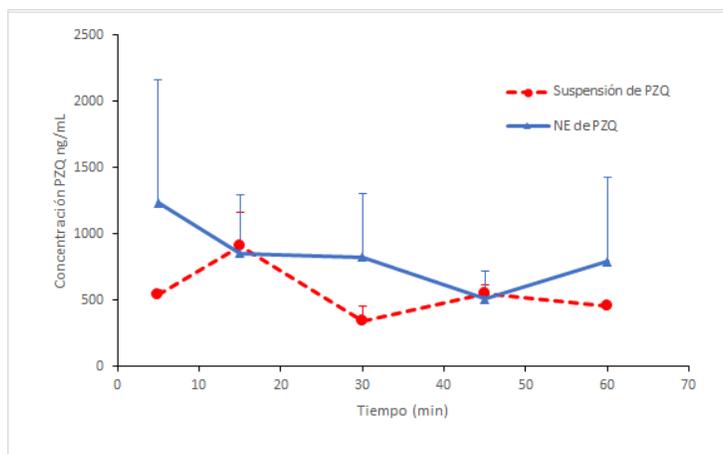


Figura 7.25: Biodisponibilidad de PZQ en nanoemulsión contra PZQ en suspensión.

De acuerdo a un análisis de área bajo la curva (AUC), se determinó que la biodisponibilidad de PZQ en nanoemulsión es 42% más biodisponible respecto a la suspensión. Además, se observó que la (CP_{max}) y el (t_{max}) para la nanoemulsión fueron de 1237.07 ng/mL y 5 minutos, respectivamente, mientras que los mismo parámetros para la suspensión de PZQ fueron de 908.44 ng/mL y 15 minutos, respectivamente.

Los resultados reflejan un incremento en la concentración del principio activo en circulación sanguínea, en un tiempo más corto respecto a la suspensión. Aunque se requeriría un mayor número de pruebas para realizar un análisis estadístico significativo, es posible aseverar que el resultado positivo sí está involucrado con la forma farmacéutica en la cual se incorporó el fármaco, muy posiblemente por la presencia del componente oleoso donde PZQ se mantuvo dispersado. Dicho efecto podría estar relacionado con la capacidad de la nanoemulsión para proteger al fármaco de su degradación enzimática, durante su transporte a través del tracto digestivo.

Capítulo 8

Conclusiones

Mediante la plataforma microfluídica se consiguieron 11 nanoemulsiones distintas, a partir de las cuales, se seleccionó la formulación adecuada con base en su estabilidad cinética y aquellas cuyo tamaño de partícula resultó ser menor a 150 nm, para ser reproducida posteriormente a mayor escala por ultrasonicación en bulto, y finalmente caracterizar su comportamiento físico y biológico, realizando un perfil de liberación *in vitro* y pruebas de biodisponibilidad en ratas, respectivamente.

El uso del dispositivo microfluídico, en combinación con la ultrasonicación en bulto permitió reducir alrededor de 100 veces la cantidad de nanoemulsión producida para su estudio, así como los residuos generados, y se demostró que en el dispositivo microfluídico se optimizó el proceso, agilizando la fabricación y eficientando los reactivos que conformaron a las nanoemulsiones.

Gracias a una colaboración en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, la Dra. Nelly Martínez Castro y su equipo de trabajo han concluido de las pruebas *in vivo* que la nanoemulsión de PZQ es 42% más biodisponible, la variabilidad observada en los perfiles plasmáticos es característica de PZQ, por lo que sería necesario tomar más muestras a los primeros tiempos y posiblemente incluir un tiempo de 10 min para determinar si hay diferencias en CP_{max} y t_{max}.

[39]

Bibliografía

- [1] Anselmo, A. C., Mitragotri, S. (2014). An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 15-28.
- [2] L. S. (1999). Classification of human parasites, vectors, and similar organisms. *Clinical infectious diseases*, 29(4), 734-736.
- [3] Pearson, R. D., and GUERRANT, R. L. (1983). Praziquantel: a major advance in anthelmintic therapy. *Annals of internal medicine*, 99(2), 195-198.
- [4] A World Health Organization resource. "WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Parasitic Diseases - Second Edition". URL:<https://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2924s/3.7.1.html> (Consulta: Noviembre/2019)
- [5] Bygott, J. M., and Chiodini, P. L. (2009). Praziquantel: neglected drug? Ineffective treatment? Or therapeutic choice in cystic hydatid disease?. *Acta tropica*, 111(2), 95-101.
- [6] Greenberg, R. M. (2005). Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?. *International journal for parasitology*, 35(1), 1-9.
- [7] Sinha, S., and Sharma, B. S. (2009). Neurocysticercosis: a review of current status and management. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(7), 867-876.
- [8] Harnett, W., and Kusel, J. R. (1986). Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology*, 93(2), 401-405.
- [9] Liu, Y., Wang, T., Ding, W., Dong, C., Wang, X., Chen, J., and Li, Y. (2018). Dissolution and oral bioavailability enhancement of praziquantel by solid dispersions. *Drug delivery and translational research*, 8(3), 580-590.

- [10] Pubchem. "Praziquantel (Compound)". URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4891#section=Acute-Effects> (Consulta: Noviembre/2019).
- [11] Mandour, M. E. M., Turabi, H. E., Homeida, M. M., Sadig, T. E., Ali, H. M., Bennett, J. L., ... and Harron, D. W. (1990). Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(3), 389-393.
- [12] Watson, M. (2009). Praziquantel. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 3(18), 229-231.
- [13] Castro, N., Medina, R., Sotelo, J., and Jung, H. (2000). Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(10), 2903-2904.
- [14] Cioli, D., and Pica-Mattocchia, L. (2003). Praziquantel. *Parasitology Research*, 90(1), S3-S9.
- [15] Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., and Rodriguez, L. (2006). Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics*, 318(1-2), 92-102.
- [16] Rodrigues, S. G., de Souza Chaves, I., de Melo, N. F. S., de Jesus, M. B., Fraceto, L. F., Fernandes, S. A., ... and Pinto, L. D. M. A. (2011). Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70(1-2), 19-28.
- [17] Cheng, L., Guo, S., and Wu, W. (2009). Characterization and in vitro release of praziquantel from poly (ϵ -caprolactone) implants. *International journal of pharmaceutics*, 377(1-2), 112-119.
- [18] Mourão, S. C., Costa, P. I., Salgado, H. R., and Gremião, M. P. D. (2005). Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *International journal of pharmaceutics*, 295(1-2), 157-162.
- [19] Spasic, A. M. (2018). *Rheology of Emulsions: Electrohydrodynamics Principles* (Vol. 22). Academic Press.
- [20] Petsev, D. N. (Ed.). (2004). *Emulsions: structure, stability and interactions* (Vol. 4). Elsevier.

- [21] McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- [22] Pathak, K., Pattnaik, S., and Swain, K. (2018). Application of Nanoemulsions in Drug Delivery. In *Nanoemulsions* (pp. 415-433). Academic Press.
- [23] Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.
- [24] McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8(6), 1719-1729.
- [25] Kale, S. N., and Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 39.
- [26] Mexicana, N. O. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998, QUE ESTABLECE LAS PRUEBAS Y PROCEDIMIENTOS PARA DEMOSTRAR QUE UN MEDICAMENTO ES INTERCAMBIABLE. REQUISITOS A QUE DEBEN SUJETARSE LOS TERCEROS AUTORIZADOS QUE REALICEN LAS PRUEBAS. URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html> (Consulta: Noviembre/2019)
- [27] Shaikh, H. K., Kshirsagar, R. V., and Patil, S. G. (2015). Mathematical models for drug release characterization: a review. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 4(4), 324-338.
- [28] Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., and Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841.
- [29] McClements, D. J., and Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 285-330.
- [30] Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368.
- [31] Bragheri, F., Vázquez, R. M., and Osellame, R. (2020). Microfluidics. In *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization* (pp. 493-526). William Andrew Publishing.

- [32] Cao, J. T., Zhu, Y. D., Rana, R. K., and Zhu, J. J. (2014). Microfluidic chip integrated with flexible PDMS-based electrochemical cytosensor for dynamic analysis of drug-induced apoptosis on HeLa cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 97-102.
- [33] Streets, A. M., and Huang, Y. (2013). Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research. *Biomicrofluidics*, 7(1), 011302.
- [34] Alvarado Tenorio, G., Reyes Betanzo, C., Sepulveda Guzmán, S., Agarwal, V., and Cruz Silva, R. (2008). Depósito de películas de polianilina con patrones mediante polimerización in situ confinada en capilares. *Ingenierias*, 11(39), 8-14.
- [35] Nazarzadeh, E., and Sajjadi, S. (2013). Thermal effects in nanoemulsification by ultrasound. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52(28), 9683-9689.
- [36] Villalobos-Castillejos, F., Granillo-Guerrero, V. G., Leyva-Daniel, D. E., Alamilla-Beltrán, L., Gutiérrez-López, G. F., Monroy-Villagrana, A., and Jafari, S. M. (2018). Fabrication of nanoemulsions by microfluidization. In *Nanoemulsions* (pp. 207-232). Academic Press.
- [37] Tseng, Q., Lomonosov, A. M., Furlong, E. E., and Merten, C. A. (2012). Fragmentation of DNA in a sub-microliter microfluidic sonication device. *Lab on a Chip*, 12(22), 4677-4682.
- [38] Gogate, P. R., Tayal, R. K., and Pandit, A. B. (2006). Cavitation: A technology on the horizon. *Current Science*, 91(1), 35-46.
- [39] Ochoa, A., Trejo, F., and Olguín, L. F. (2020). Droplet-Based Microfluidics Methods for Detecting Enzyme Inhibitors. In *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development* (pp. 209-233). Humana, New York, NY.
- [40] Foroogh Khodadadi. Relation between pore size and MWCO. Iran University of Science and Technology. URL: https://www.researchgate.net/post/Whatis_the_cheapest_solution_for_characterizing_the_UF_polymeric_membranes_with_MWCO_higher_than_600_KDa (Consulta: Noviembre/2019).
- [41] Bruschi, M. L. (2015). Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. Woodhead Publishing. 63-86.

- [42] Hormann, K., and Zimmer, A. (2016). Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. *Journal of Controlled Release*, 223, 85-98.