



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN IMPLANTE FLUIDO INYECTABLE
PARA LA LIBERACIÓN SOSTENIDA DE ESTRADIOL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. María Teresa Pineda Hernández

Tutor principal:

**Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO 2022



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.



**FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN IMPLANTE FLUIDO INYECTABLE PARA LA
LIBERACIÓN SOSTENIDA DE ESTRADIOL**

Jurado de examen de grado

Presidente:

Dr. Andrés Navarrete Castro

Vocales:

Dr. Emilio Bucio Carrillo

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Secretaria:

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Resumen

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos para la elaboración y caracterización de un implante de formación *in situ* termorreversible a base de dos copolímeros tribloque (Pluronic® F127 y Pluronic® F68), al cual se le incorporaron nanoacarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) formados por un lípido líquido (Capryol® 90) un lípido sólido (Precirol® ATO 5) y un estabilizante (Cremophor® RH 40). Este sistema se propuso para la liberación de valerato de estradiol (VE). Este fármaco es empleado en terapia de reemplazo hormonal para mujeres que se encuentran en la menopausia, aplicándose con el fin de tratar los síntomas asociados como bochornos frecuentes, sudoración excesiva de predominio nocturno, insomnio, labilidad emocional y depresión, además de la prevención de condiciones que se han vuelto comunes en el periodo posmenopáusico tales como la osteoporosis y la enfermedad cardiaca isquémica.

La primera etapa del trabajo incluyó la obtención de la formulación óptima de los NLC, caracterizándolos por tamaño de partícula (143.6 ± 21.1 nm), índice de polidispersión (0.324 ± 0.08), potencial zeta (-11.6 ± 1.2 mV), morfología (esférica), tasa de encapsulación (90.14 ± 2.94 %) y capacidad de carga (25.77 ± 0.82 mg VE/g de NLC), eligiendo aquellos en los que se consiguió encapsular la mayor cantidad de valerato de estradiol. También se caracterizaron los NLC cargados con fármaco, por tamaño de partícula (122 ± 11.2 nm), índice de polidispersión (0.344 ± 0.07), potencial zeta (-10.5 ± 1.3 mV), morfología (esférica), y a través de estudios de liberación *in vitro* (70 % a las 56 h).

Posteriormente se elaboraron geles con diferentes proporciones de Pluronic® F127 y Pluronic® F68 con intención de conseguir una temperatura de transición sol-gel cercana a la temperatura corporal (37 °C) para asegurar la formación del implante una vez inyectado. Al gel elegido (PF127:PF68 8:2), se le incorporaron los NLC cargados con fármaco (1 mg/mL) y se caracterizó el sistema mediante pruebas de viscosidad (< 300 mPa s), inyectabilidad (inyección fácil y con una fluidez continua), temperatura de transición sol-gel (37 °C), liberación *in vitro* (20 % a las 56 h).

Finalmente, el implante de formación *in situ* óptimo fue utilizado para realizar un estudio farmacocinético, empleando como referencia una formulación comercial (JUVENUM E Suspensión de 1mg, PRODUCTOS CIENTÍFICOS, S.A. DE C.V.). Ambas formulaciones fueron administradas en conejos, obteniendo para el implante de formación *in situ* una ABC (6809.8 pg h mL⁻¹), C_{máx} (1514.7 pg/mL) y t_{máx} (2.3 h) y para la formulación comercial ABC (403 pg h mL⁻¹), C_{máx} (38 pg/mL) y t_{máx} (0.4 h).



Con los resultados obtenidos, se concluyó que, aunque la formulación en gel preparada contribuye a prolongar la liberación *in vitro*, es importante ajustar la formulación, variando la proporción de los co-polímeros o bien mediante la adición de otros materiales que permitan una liberación sostenida *in vivo*, evitando la liberación inicial rápida que se observó en estas pruebas.

Finalmente, se cumplió con el objetivo de desarrollar y caracterizar un sistema en forma de un implante fluido inyectable con la inclusión de NLC para la administración de valerato de estradiol, se validaron métodos analíticos para la cuantificación del fármaco para las diferentes etapas de formulación y caracterización del sistema, y se logró comparar los perfiles farmacocinéticos de la formulación elaborada contra una ya disponible comercialmente.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora, Dra. Adriana Ganem Rondero, por la asesoría que me brindó en la elaboración del trabajo. Por guiarme en mi formación como científica, por su calidez humana y el apoyo en las circunstancias difíciles en el ámbito profesional y personal, y por su amistad invaluable.

A mi comité tutor, Dra. Elizabeth Piñón Segundo y Dr. Sebastián Lira Rocha por resolverme cada duda y abrir el panorama de mi investigación en cada evaluación.

Al Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán/UNAM, campo 1 y campo 4, por las instalaciones y equipos que me prestaron, y a todos mis compañeros de laboratorio con quienes formé una red de conocimiento y amistad.

Al Dr. José Trinidad Pérez Urizar, por las instalaciones y materiales utilizados en el Laboratorio de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al Dr. Gabriel Araujo, por la capacitación y ayuda brindada en el trabajo con animales de experimentación y su gran amistad.

A mis sinodales, Dr. Andrés Navarrete Castro, Dr. Emilio Bucio Carrillo, Dra. María Josefa Bernad Bernad, y Dr. Sergio Alcalá Alcalá, por enriquecer la escritura de la tesis.

Y agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca proporcionada No. 272135 y a los proyectos PAPIIT IN204022 (DGAPA-UNAM) y la Cátedra de Investigación CI2209 (FESC-UNAM).



**A MI HIJO RODRIGO QUE ME MOTIVÓ A FINALIZAR ESTA ESTAPA EN MI VIDA,
A MI ESPOSO LUIS QUE SIEMPRE HA ESTADO A MI LADO,
A MIS PADRES[†] QUE ME ENSEÑARON A SOÑAR Y NO RENDIRME,
A MIS HERMANOS JUAN, CLAUDIA Y FERNANDA POR SU AMOR Y AMISTAD,
Y A MIS AMIGOS POR HABERME HECHO SENTIR EN CASA ESTANDO EN OTRA CIUDAD.**



Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
MARCO TEÓRICO.....	18
1. Menopausia.....	18
1.1 Síntomas y signos	19
1.2 Terapia hormonal (TH)	20
1.3 Terapia estrogénica (TE).....	23
2. Valerato de Estradiol (VE)	24
2.1 Mecanismo de acción.....	24
2.2 Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas	25
3. Sistemas de liberación controlada	26
3.1 Implantes de formación <i>in situ</i>	27
3.1.1 Clasificación de implantes de formación <i>in situ</i>	27
3.2 Sistemas poliméricos termo-responsivos	30
3.2.1 Mecanismo de transición sol-gel.....	32
3.2.2 Método de preparación de geles de Pluronic®	33
3.2.3 Caracterización de geles de Pluronic®	33
4. Nanopartículas lipídicas	34
4.1 Métodos de preparación.....	35
4.2 Caracterización de NLC.....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS	37
Objetivo General	37
Objetivos Particulares	37
METODOLOGÍA.....	38
1. Materiales	38



1.1 Equipos	38
1.2 Reactivos	38
2. Métodos	39
2.1 Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC).....	39
2.1.1 Selección de los componentes de los NLC	39
2.1.2 Preparación de los NLC	39
2.1.3 Caracterización de NLC.....	41
A. Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (IPD)	41
B. Potencial zeta (PZ).....	42
C. Tasa de encapsulación	42
D. Morfología	43
E. Caracterización térmica.....	43
F. Estabilidad del valerato de estradiol en solución para los estudios de liberación <i>in vitro</i> . ..	43
G. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	44
2.2 Geles de Pluronic®	44
2.2.1 Preparación de los geles de Pluronic®	44
2.2.2 Caracterización de geles de Pluronic®	45
A. Viscosidad	45
B. Temperatura de transición sol-gel	45
C. Inyectabilidad	45
D. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	45
E. Estudios farmacocinéticos.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
1. Selección de los componentes, preparación y caracterización de los NLC.....	46
2. Preparación y caracterización de los geles de Pluronic®	52
3. Estabilidad del valerato de estradiol en solución para los estudios de liberación <i>in vitro</i> ...	56
4. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	57
5. Estudios farmacocinéticos.....	58
CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS	62



Referencias.....	63
ANEXOS	69
ANEXO 1. Validación de métodos analíticos.	69
1. Validación del método analítico para la cuantificación de valerato de estradiol en los estudios de liberación <i>in vitro</i>	70
2. Validación del método analítico para la cuantificación de valerato de estradiol para la tasa de encapsulación de NLC.	73
3. Validación del método analítico para la cuantificación de valerato de estradiol para los estudios de liberación <i>in vivo</i>	75
ANEXO 2. Presentaciones en eventos especializados.....	77
ANEXO 3. Artículo científico.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los estrógenos naturales.	23
Figura 2. Estructura química base de los estrógenos.	24
Figura 3. Mecanismo de acción del valerato de estradiol (Brusco, 2015)	25
Figura 4. Diagrama de bloques para la clasificación de implantes de liberación <i>in situ</i>	28
Figura 5. Estructura química de los co-polímeros tribloque (PEOa-PPOb-PEOa).	31
Figura 6. Fases micelares formadas por los Pluronic® al incrementar la temperatura (Escobar-Chávez <i>et al</i> , 2006)	33
Figura 7. A) representación de la matriz cristalina casi perfecta (ladrillos) de las SLN, B) representación de la estructura de la matriz cristalina imperfecta de los NLC (rocas) (Müller <i>et al</i> , 2007).	35
Figura 8. Preparación de NLC por homogenización a alto cizallamiento.	41
Figura 9. Celda utilizada para medir TP e IPD.	41
Figura 10. Celda utilizada para medir PZ.	42
Figura 11. Caracterización de los NLC por tamaño de partícula e índice de polidispersión utilizando diferentes lípidos líquidos (n=2).	47
Figura 12. Tamaño de partícula de los NLC preparados con Capryol® y Labrasol® como lípidos líquidos, variando el tiempo de emulsificación entre 5, 8 y 12 min (n=3).	48
Figura 13. Micrografías de A) NLC placebo y B) NLC cargadas con VE, la barra representa 500 nm. 50	
Figura 14. Termogramas de los NLC y sus componentes. Las imágenes (a), (b) y (c) muestran los termogramas para los componentes individuales y para las mezclas binarias con el fármaco: (a) lípido líquido Capryol® 90, b) estabilizante Cremophor® RH 40, c) lípido sólido Precirol® ATO 5. En la imagen (d) aparecen los termogramas de la mezcla física y de los NLC, en ambos casos incluyendo al VE.	51
Figura 14. Termogramas de los NLC y sus componentes. Las imágenes (a), (b) y (c) muestran los termogramas para los componentes individuales y para las mezclas binarias con el fármaco: (a) lípido líquido Capryol® 90, b) estabilizante Cremophor® RH 40, c) lípido sólido Precirol® ATO 5. En la imagen (d) aparecen los termogramas de la mezcla física y de los NLC, en ambos casos incluyendo al VE.	52
Figura 15. Curvas de viscosidad. a) curva de viscosidad de geles control con diferentes proporciones de Pluronic® F127 y Pluronic® F68. b) Curva de viscosidad de geles placebo con diferentes proporciones de Pluronic® F127 y Pluronic® F68 (n=3, las barras representan la D.E)...	54
Figura 16. Fotografía que ejemplifica la prueba de inversión de tubo, al mostrar lo observado con el gel placebo con la proporción PF127:PF68 8:2. a) Gel placebo a una temperatura de 27 °C (líquida), b) Gel placebo a 37 °C (formación del gel en la parte inferior del tubo invertido).	56
Figura 17. Perfiles de liberación de la solución de VE (azul), los NLC cargados con VE (rojo) y el gel con NLC cargados con VE (verde).	58



Figura 18. Perfiles de concentración plasmática vs tiempo para: a) gel con NLC cargados con VE y b) suspensión comercial.....	59
Figura 19. Curva de calibración de valerato de estradiol en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, Tween® 20 al 8% y etanol al 8%.....	71
Figura 20. Curva de calibración de valerato de estradiol en etanol.	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios en el nivel circulante de estrógenos durante la pre- y post menopausia (Moreta Hernández & Malacara Hernández, 2006).....	19
Tabla 2. Síntomas y signos a corto, mediano y largo plazo provocados por el déficit estrogénico (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999).	20
Tabla 3. Formulaciones disponibles para la TH (Yoo & Lee, 2006).	21
Tabla 4. Problemas para la elaboración de implantes de formación <i>in situ</i> y ejemplos de sus componentes	30
Tabla 5. Propiedades de algunos poloxámeros (He <i>et al.</i> , 2008).....	31
Tabla 6. Condiciones para optimizar la elaboración de NLC.....	40
Tabla 7. Resultados de la solubilidad del VE en lípidos líquidos.	47
Tabla 8. Valores promedio de TP, IPD y PZ para NLC preparados con Precirol® ATO 5 (LS), Cremophor® RH 40 (estabilizante) y Capryol® 90 o Labrasol® (LL) (n=3).	49
Tabla 9. Valores promedio de TP, IPD y PZ para los NLC placebo y los NLC cargados con VE (n=2). 49	
Tabla 10. Temperatura de transición sol-gel para los geles de Pluronic® control y placebo con diferentes proporciones PF127:PF68.....	55
Tabla 11. Concentración de VE en medio de disolución a través del tiempo.....	57
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos para una suspensión comercial conteniendo estradiol y para el gel con NLC cargados con VE, al ser administrados por vía intramuscular (i.m) y por vía subcutánea (s.c), respectivamente (las barras representan la D.E).....	59
Tabla 13. Valores de absorbancia para la curva estándar en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, Tween® 20 al 8% y etanol al 8%.	71
Tabla 14. Resultados de la evaluación de la exactitud.....	72
Tabla 15. Resultados de la evaluación de la precisión.	72
Tabla 16. Resultados de la evaluación de la repetibilidad.	72
Tabla 17. Valores de absorbancia para la curva estándar en etanol.	73
Tabla 18. Resultados de la evaluación de la exactitud.....	74
Tabla 19. Resultados de la evaluación de la precisión.	74
Tabla 20. Resultados de la evaluación de la repetibilidad.	75
Tabla 21. Curvas de calibración.....	76
Tabla 22. Resultados estadísticos de las curvas.....	76
Tabla 23. Puntos controles.....	76

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados Celsius
CE	Ésteres de celulosa
C_{máx}	Concentración máxima
CP	Punto de nube (cloud point)
CV	Coefficiente de variación
D.E	Desviación estándar
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E₁	Estrona
E₂	Estradiol
E₃	Estriol
%EE	Tasa de encapsulación
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
ER	Receptor de estrogénico
g/mol	Gramos mol
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HR	Humedad relativa
HSP	Proteínas de choque calórico
i.m.	Intramuscular
IPD	Índice de polidispersión
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramos
λ	Longitud de onda
LL	Lípido líquido
LCST	Temperatura de solución crítica
LD	Límite de detección
LDL	Lipoproteína de baja densidad
logP	Logaritmo decimal del coeficiente de reparto
LS	Lípido sólido
LQ	Límite de cuantificación
min	Minutos
mPa.s	Mili Pascal segundo
mV	Milivolts
NLC	Acarreadores lipídicos nanoestructurados
o/w	Aceite en agua
p/p	Peso peso



p/v	Peso volumen
PBS	Solución reguladora de fosfatos
PEO	Poli óxido de etileno
PF68	Pluronic® F68
PF128	Pluronic® F127
PLGA	Ácido poli-láctico co-glicólico
PPO	Poli óxido de propileno
PZ	Potencial zeta
R²	Coeficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
s.c.	Subcutánea
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SHBG	Globulina ligadora de hormonas sexuales
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
TE	Terapia estrogénica
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TH	Terapia hormonal
t_{máx}	Tiempo máximo
TP	Tamaño de partícula
UV-Vis	Ultravioleta Visible
VE	Valerato de estradiol

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son hormonas endógenas con numerosas actividades fisiológicas. Los estrógenos se pueden encontrar en tres formas en el cuerpo humano: estrona (E_1), estradiol (E_2) y estriol (E_3), siendo más potente naturalmente el segundo. El estradiol es el estrógeno predominante durante el periodo de premenopausia, el cual disminuye después de la menopausia (Yoo & Lee, 2006).

La terapia estrogénica menopáusica (TE) se refiere al uso de estrógeno para mujeres durante el periodo de la menopausia, no solo para el tratamiento de síntomas como bochornos frecuentes, sudoración excesiva de predominio nocturno, insomnio, labilidad emocional y depresión sino también para la prevención de condiciones que se han vuelto comunes en el periodo posmenopáusico tales como la osteoporosis y la enfermedad cardiaca isquémica. La terapia estrogénica se da principalmente a mujeres que han tenido una histerectomía. Los estrógenos conjugados, estradiol y sus derivados como el benzoato de estradiol, etinil estradiol, valerato de estradiol, entre otros son utilizados en el tratamiento de los trastornos de la menopausia (International Agency for Research on Cancer, 2012).

La terapia estrogénica menopáusica está disponible comercialmente en comprimidos orales, aerosoles intranasales, implantes subcutáneos, aplicaciones tópicas para uso vulvovaginal, anillos intravaginales, parches, y geles transdérmicos (International Agency for Research on Cancer, 2012), los cuales son considerados como sistemas de liberación controlada.

Los sistemas de liberación controlada son sistemas capaces de regular la cantidad y la velocidad de liberación del fármaco, manteniendo su concentración dentro del rango terapéutico durante un tiempo prolongado. Como otros sistemas de liberación controlada los implantes de formación *in situ* han ganado importancia por la gran variedad de aplicaciones biomédicas, entre ellas la liberación de fármacos (Singh *et al*, 2014).

Entre las ventajas que ofrecen los implantes de formación *in situ* se encuentran: fácil aplicación, liberación localizada, liberación prolongada, disminución de la dosis



administrada llevando a una posible reducción de efectos adversos y el aumento del cumplimiento y comodidad del paciente (Hafeti & Amsden, 2002).

En este trabajo se desarrolló un implante de formación *in situ* termorreversible, incluyendo acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC), los cuales están conformados por un lípido sólido, un lípido líquido y un estabilizante, el cual generalmente es un tensoactivo. Los sistemas preparados (tanto los placebos como los que contienen fármaco) se caracterizaron mediante pruebas de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, tasa de encapsulación, morfología, calorimetría diferencial de barrido, y pruebas de liberación *in vitro*. Los NLC cargados fueron incorporados en un gel termorreversible formado por una mezcla de poloxámeros (Pluronic® F127 y Pluronic® F68). El comportamiento de este sistema de liberación se caracterizó a través de pruebas de viscosidad, inyectabilidad, temperatura de transición sol-gel y estudios de liberación *in vitro*. Finalmente, con la formulación óptima del gel termorreversible que incluía a los NLC cargados con estradiol, se realizaron estudios de liberación *in vivo*, tomando como referencia una formulación de estradiol ya disponible en el mercado (JUVENUM E).



ANTECEDENTES

Los implantes de formación *in situ* a base de materiales biodegradables y biocompatibles, presentan diversas características, además de las dos ya mencionadas, que les confieren múltiples ventajas como una sencilla manufactura y fácil escalamiento, administración simple y poco invasiva al inyectarse como un bolo único, evitando la necesidad de ser removidos al final del tratamiento y liberación controlada para los fármacos incluidos. Backsi *et al.* (2006) desarrollaron un implante fluido inyectable para la liberación de clorhidrato de naltrexona para el tratamiento de drogadictos, en donde el polímero utilizado para su elaboración fue el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA); de igual manera el PLGA fue utilizado por Brodbeck *et al.* (1999) para la liberación sostenida de la hormona humana del crecimiento.

En cuanto a la liberación hormonal mediante implantes de formación *in situ* Kempe, *et al.* (2013) crearon un sistema para la liberación de aldosterona para evaluar su efecto en enfermedades vasculares para uso en estudios preclínicos en animales y Zhang *et al.* (2015) elaboraron un implante fluido inyectable para la liberación de undecanoato de testosterona para su posible uso como anticonceptivo masculino probado en ratas.

Actualmente se encuentran comercialmente disponibles implantes de formación *in situ*, entre los que se encuentra Eligard[®] (Sanofi) el cual contiene acetato de leuprorelina, utilizado para el tratamiento de cáncer de próstata avanzado y Atridox[®] (Tolmar Inc.) el cual contiene doxiciclina, utilizado para el tratamiento de periodontitis crónica para uso veterinario y humano.

Por otro lado, el uso de un gel polimérico termorreversible de formación *in situ* también ha ganado importancia para la liberación sostenida de fármacos y proteínas como el desarrollado por DesNoyer *et al.* (2003) para la liberación de una lisozima de clara de huevo a partir de un gel de Poloxámero 407 (Pluronic[®] F127), y el desarrollado por Strappe *et al.* (2005) para la liberación de lentiviral en el sistema nervioso central.

Además, el uso de este poloxámero (Pluronic[®] F127), permite su asociación con sistemas nanoacarreadores como el desarrollado por Barichello *et al.* (1999) en donde encapsularon

insulina en nanopartículas de PLGA y después éstas fueron incorporadas a un gel Pluronic® F127 para su administración parenteral, también el sistema de Olguín *et al.* (2017) en donde se liberan liposomas a partir de un gel de Pluronic® F127 para promover la diferenciación y proliferación celular, y el sistema desarrollado por Buyana *et al.* (2020) en el cual se incorporaron nanopartículas de óxido de zinc, norfloxacin y timol en un gel de Pluronic® F127 para el tratamiento de heridas.

MARCO TEÓRICO

1. Menopausia

Hacia los 40 años, aproximadamente, en la mujer comienza a disminuir la frecuencia de la ovulación y la normalidad de los ciclos menstruales y esto significa el inicio de un periodo de deterioro de la función ovárica. Este periodo es progresivo, duradero y a lo largo de los años conducirá a la anulación de la fertilidad, a la desaparición de la menstruación y a la paulatina disminución de la producción de estrógenos ováricos con sus consecuencias psíquicas y físicas en el organismo femenino (Hochstatter & Gutierrez Flores, 2000).

El periodo de transición en la vida de la mujer que se extiende desde la época de madurez y plena capacidad reproductiva hasta la senilidad es conocida como climaterio, el cual incluye a la premenopausia, menopausia y postmenopausia (Hochstatter & Gutierrez Flores, 2000).

La premenopausia es el periodo previo a la menopausia, cuando los cambios endocrinológicos, clínicos y biológicos están ocurriendo (Sowers, 2000).

La menopausia es un evento fisiológico que no es considerado una enfermedad, aunque en un elevado porcentaje de casos se asocia en su evolución natural con procesos que afectarán la salud de la mujer y requerirán atención médica (Matamoro, 2012).

La menopausia puede ser definida como el punto en el cual se presentan 12 meses consecutivos de amenorrea desde el último periodo menstrual, lo que refleja una disminución completa, pero natural de la secreción de hormonas ováricas (Soules *et al.* 2001).

La postmenopausia se define como el periodo posterior a la menopausia y comienza después de 12 meses de que se ha observado la amenorrea espontánea (Sowers, 2000).

Las bases biológicas de la pérdida de la función ovárica y de la menstruación (de manera natural) están bien fundamentadas y dependen de los cambios en la estructura y



funcionamiento ovárico. Durante la menopausia existe una relación recíproca entre los niveles de las hormonas ováricas (estrógenos), los cuales disminuyen, y los niveles de gonadotropinas pituitarias (hormona folículo estimulante y hormona luteinizante), los cuales aumentan (WHO technical report series, 1994).

En la Tabla 1 se presentan los cambios en el nivel circulante de estrógenos durante la pre y post menopausia (Moreta Hernández & Malacara Hernández, 2006).

Tabla 1. Cambios en el nivel circulante de estrógenos durante la pre- y post menopausia (Moreta Hernández & Malacara Hernández, 2006).

Hormona	Premenopausia (pg/mL)	Postmenopausia (pg/mL)
Estradiol	35-500	13-18
Estrona	30-200	30-60
Estriol	7-12	6

1.1 Síntomas y signos

El déficit estrogénico ocasiona una serie de síntomas y signos a corto, mediano y largo plazo (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999), en la Tabla 2 se muestra una descripción de las alteraciones que se presentan, así como sus signos o síntomas.

Tabla 2. Síntomas y signos a corto, mediano y largo plazo provocados por el déficit estrogénico (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999).

Déficit estrogénico: síntoma o signo		
Corto plazo	Alteraciones neurovegetativas	Sofocos, sudoración, insomnio y parestesias
	Alteraciones psicológicas	Disminución del estado de ánimo, tendencia a la depresión y pérdida de memoria
Mediano plazo	Alteraciones en el aparato génito-urinario	Disminución de la turgencia tisular y de la resistencia a la tracción, incontinencia de orina, urgencia miccional, infecciones de orina de repetición, además de la dispareunia por vaginitis atrófica
Largo plazo	Osteoporosis	Pérdida de masa ósea
	Enfermedades cardiovasculares	Metabolismo de lípidos (↑ LDL y ↓ HDL por cambios en la actividad de la lipasa hepática), Formación de placa ateromatosa
	Alteraciones sobre el Sistema Nervioso Central	Aumento de riesgo de Alzheimer
	↑ LDL= Aumento de las lipoproteínas de baja densidad ↓ HDL= Disminución de las lipoproteínas de alta densidad	

Las alteraciones presentes a corto plazo afectan en promedio a un 75% de las mujeres y a la tercera parte de ellas les impide realizar una vida normal. En cuanto a los síntomas a mediano plazo, van a deteriorar en gran medida la calidad de vida de la mujer, todavía joven y generalmente con responsabilidades sociales y por último las enfermedades que se presentan a largo plazo van a ser muy importantes para la mujer, y con gran repercusión sobre la salud pública (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999) sobre todo la enfermedad cardiovascular, la cual es la tercera causa de muerte en mujeres postmenopáusicas (INEGI, 2016).

1.2 Terapia hormonal (TH)

Desde la introducción de la primera terapia de reemplazo hormonal en 1942, la TH ha sido utilizada para mejorar la calidad de vida de mujeres que sufren de los síntomas de la menopausia, además de que existe evidencia de que la TH ofrece protección a largo plazo

contra enfermedades cardiovasculares y disminuye el número de fracturas por osteoporosis (Yoo & Lee, 2006).

Los efectos farmacológicos de la TH pueden variar dependiendo de las dosis, el tipo de formulaciones y rutas de administración. Las formulaciones más comúnmente utilizadas son tabletas orales y parches transdérmicos, pero más de la mitad de las mujeres que utilizan estas vías de administración descontinúan el tratamiento durante el primer año debido a las limitaciones que presentan (Yoo & Lee, 2006).

En la Tabla 3 se presentan las diferentes formulaciones disponibles para la TH, así como sus ventajas y desventajas (Yoo & Lee, 2006).

Tabla 3. Formulaciones disponibles para la TH (Yoo & Lee, 2006).

Formulación	Ventajas	Desventajas
Tabletas	Fácil de tomar, baratas, efecto benéfico en los niveles de colesterol	Toma diaria, efectos secundarios por las dosis altas
Parche transdérmico	Absorción rápida, primera opción para pacientes con triglicéridos altos y problemas de deglución	Irritación de la piel, Frecuencia de administración (1 o 2 veces por semana), caros
Sublingual/parche bucal	Absorción rápida, primera opción para pacientes con triglicéridos altos y problemas de deglución	Irritación en mucosas, caros, uso diario
Implante sólido	Alta aceptación, efecto prolongado (4-8 meses), menos caro	Se requiere de procedimiento quirúrgico
Dispositivo intrauterino	Efecto directo en mucosa uterina	Solo para liberación de progesterona
Preparaciones vaginales	Alta eficiencia para aliviar síntomas vaginales	A largo plazo riesgo de proliferación endometrial
Spray nasal	Fácil de usar	Irritación nasal, uso diario
Inyecciones	Efecto prolongado	Dolor en el sitio de inyección



La TH óptima se basa en utilizar preparados farmacológicos con mínimos o nulos efectos secundarios, administrar la menor dosis posible para conseguir el efecto deseado, comodidad y aceptabilidad por parte de la mujer, la indicación y las pautas de tratamiento deben establecerse siempre de forma individualizada (Hochstatter & Gutierrez Flores, 2000).

La TH es indicada para mujeres con: (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999)

- ✓ Menopausia precoz natural o quirúrgica, antes de los 45 años.
- ✓ Factores de riesgo coronario o enfermedad coronaria establecida.
- ✓ Factores de riesgo u osteoporosis establecida.
- ✓ Mujeres sintomáticas con disminución de su calidad de vida.
- ✓ Mujeres que solicitan la TH, y tras ser informadas sobre el riesgo-beneficio, aceptan la TH.

La TH está contraindicada para mujeres con: (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999)

- ✓ Cáncer de mama.
- ✓ Cáncer de endometrio (excepto estadio bien diferenciado).
- ✓ Alteración hepática grave.
- ✓ Tromboembolismo venoso.
- ✓ Melanoma.
- ✓ Lupus eritematoso diseminado.
- ✓ Porfiria.

Algunos de los fármacos utilizados son estrógenos (terapia estrogénica) y gestágenos, los cuales son administrados en conjunto con estrógenos en las mujeres que conservan el útero para la prevención de la hiperplasia endometrial y el adenocarcinoma de endometrio. Su acción principal es la transformación del endometrio evitando el efecto nocivo del estrógeno (Martín Azaña & Iglesias Goy, 1999).

Al administrar por vía oral estrógenos como el estradiol, se ha observado que se necesita una dosis 50 veces más alta a la necesaria, debido al metabolismo de primer paso en el hígado, por lo que se recomienda administrar por otra vía, y así a su vez, disminuir el riesgo de tromboembolismo venoso debido a que los factores de coagulación son producidos en el hígado (Ruan, 2022).

1.3 Terapia estrogénica (TE)

La TE en el climaterio se realiza con la administración de estrógenos exógenos. Los estrógenos naturales empleados son: estradiol, estriol, estrógenos conjugados (Hochstatter & Gutierrez Flores, 2000), estradiol micronizado y las sales de estradiol como benzoato, valerato, enantato, cipionato y succinato. La TE solo puede ser usada en mujeres que hayan tenido una histerectomía (International Agency for Research on Cancer, 2012).

Los estrógenos son hormonas endógenas con numerosas actividades fisiológicas. Los estrógenos esteroideos se pueden encontrar en tres formas en el cuerpo humano: estrona (E_1), estradiol (E_2) y estriol (E_3) (Yoo & Lee, 2006).

El estradiol, es el estrógeno natural más potente, por tener acciones mediadas por receptores estrogénicos (ER) α y β , siguiéndole en importancia estrona y estriol. En la Figura 1 se muestran sus estructuras químicas (Loose & Stancel, 2007).



Figura 1. Estructura química de los estrógenos naturales.

Cada compuesto como se muestra en la figura 2 contiene un anillo fenólico A con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un grupo β -OH o cetónico en posición 17 (Loose & Stancel, 2007).

El anillo A fenólico es la principal estructura de la que depende la unión selectiva hacia ambos receptores. Casi todas las sustituciones alquilo en el anillo mencionado disminuyen la capacidad de unión, pero se pueden tolerar en los anillos C o D. Las sustituciones etínicas en la posición C17 incrementan notablemente la potencia de productos ingeribles, al inhibir el metabolismo de primer paso por el hígado (Loose & Stancel, 2007).

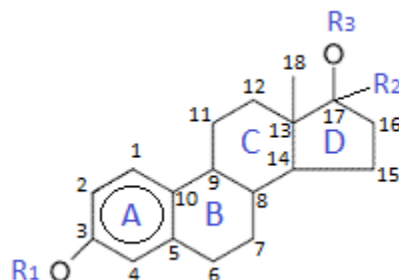


Figura 2. Estructura química base de los estrógenos.

Los estrógenos conjugados son la mezcla de más de ocho compuestos, incluyendo estrona sulfato de sodio, equilina sulfato de sodio, derivados naturalmente de la orina equina o sintéticamente de estrona y equilina. Además, contienen como componentes concomitantes conjugados de sulfato de sodio de 17 α -dihidroequilina, 17 β -dihidroequilina y 17 α -estradiol (International Agency for Research on Cancer, 2012).

Para este proyecto se utilizó como principio activo el valerato de estradiol, el cual tiene la misma eficacia que el estradiol, debido a que en circulación sistémica el valerato es separado y éste no tiene ningún efecto farmacológico (Ruan, 2022).

2. Valerato de Estradiol (VE)

El valerato de estradiol (VE) es considerado como un éster de estradiol. Tiene la apariencia de un polvo cristalino blanco, que por lo general es inodoro, pero puede tener un leve olor a grasa.

2.1 Mecanismo de acción

Los estrógenos ejercen sus efectos por la interacción con receptores que son miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Los receptores estrogénicos (ER por sus siglas en inglés *estrogen receptor*) son factores de transcripción activados por ligandos que aumentan o disminuyen la transcripción de genes “destinatarios”. Una vez que penetran en la célula por difusión pasiva a través de la membrana plasmática, la hormona se liga a un ER en el núcleo (Loose & Stancel, 2007).

En dicha zona de la célula, el receptor existe en forma de monómero inactivo unido a proteínas de choque calórico (HSP), y una vez que se liga el estrógeno, el cambio conformacional del receptor disocia las HSP y ocasiona dimerización del receptor, lo cual intensifica la afinidad y la rapidez de unión del receptor a ADN (Loose & Stancel, 2007).

El complejo ER/ADN recluta una cascada de proteínas coactivadoras a la región del promotor de genes “destinatarios”, permitiendo la transcripción (Loose & Stancel, 2007). En la Figura 3 se ilustra el mecanismo de acción.

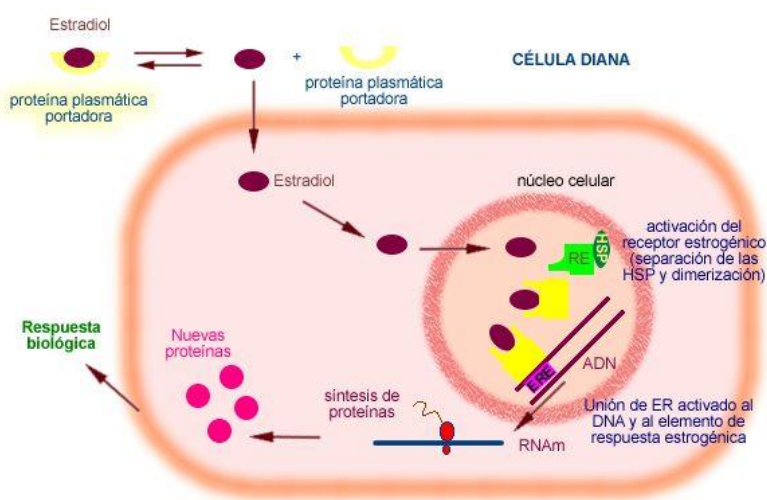


Figura 3. Mecanismo de acción del valerato de estradiol (Brusco, 2015)

2.2 Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas

Las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del valerato de estradiol son las siguientes: (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2022)

- Nombre químico:** (17 β)-Estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol, 17-pentanoato
Fórmula: C₂₃H₃₂O₃
Peso molecular: 356.50 g/mol
Solubilidad: Casi insoluble en agua. Soluble en metanol, etanol, benzoato de benzilo, dioxano y en aceite de ricino, moderadamente soluble en aceite de sésamo y en aceite de cacahuete.
Punto de fusión: 144-145 ° C
LogP: 5.2
pKa: 10.33

Absorción:	Por vía oral, se absorbe rápida y completamente
Biodisponibilidad:	Por vía oral, es del 3%
Unión a proteínas:	Se une a la albúmina sérica y a la globulina de unión a hormonas sexuales de un 30 a 40 %.
Volumen de distribución aparente:	Después de su administración intravenosa en bolo único es de 1 kg/L
Metabolismo:	En hígado, obteniendo ácido valérico y estradiol
Eliminación:	El aclaramiento sérico total del estradiol después de una administración intravenosa única muestra una alta variabilidad en el rango de 10 – 30 ml/min/kg. Una cierta proporción de los metabolitos del estradiol se excretan por la bilis y sufren circulación enterohepática. Los metabolitos del estradiol son excretados principalmente como sulfatos y glucoronidos en la orina.

3. Sistemas de liberación controlada

La liberación controlada de fármacos ha progresado en las últimas seis décadas, comenzando en 1952 con la primera formulación de liberación sostenida. La primera generación (1950-1980) se enfocó en la liberación sostenida oral y transdérmica y en el establecimiento del mecanismo de liberación controlada (Park, 2014).

La segunda generación (1980-2010) se dedicó al desarrollo de sistemas de liberación de orden cero, sistemas de administración de fármacos autorregulados, formulaciones de depósito a largo plazo y sistemas basados en nanotecnología, principalmente nanopartículas (Park, 2014).

Para la tercera generación (2010- a la fecha), los sistemas de administración de fármacos deberán centrarse en comprender las barreras biológicas para que puedan superarse mediante la manipulación de ingeniería de los sistemas de administración de fármacos (Yun, Lee, & Park, 2014).

Siendo de interés para el desarrollo de un sistema de liberación prolongada, en este proyecto se incorporaron nanoacarreadores lipídicos nanoestructurados en gel termorreversible con la intención de conseguir un depósito como un implante de formación *in situ*.

3.1 Implantes de formación *in situ*

Los implantes de formación *in situ* son sistemas de liberación controlada formados por compuestos biodegradables que pueden ser inyectados con una jeringa en el cuerpo y, una vez inyectados solidificarse para formar un depósito semisólido (Chikatará *et al*, 2006). Estos sistemas son de gran interés para la liberación de fármacos debido a las grandes ventajas que ofrecen como: fácil aplicación, liberación localizada, liberación prolongada, disminución de la dosis utilizada para lograr el efecto terapéutico, disminución de efectos secundarios, disminución del número de aplicaciones, y aceptación y comodidad para el paciente (Hafeti & Amsden, 2002).

Los implantes de formación *in situ*, son considerados como sistemas de liberación sostenida parenteral, siendo de elección para fármacos con baja biodisponibilidad oral o un alto metabolismo de primer paso, debiendo tomarse en cuenta las propiedades fisicoquímicas del fármaco y su toxicidad (Burgess & Wright, 2012).

3.1.1 Clasificación de implantes de formación *in situ*

Existen diferentes estrategias para la preparación de implantes semisólidos de formación *in situ* los cuales pueden ser clasificados en 4 categorías basadas en el mecanismo para lograr su solidificación *in vivo*: 1) pastas termoplásticas, 2) sistemas entrecruzados, 3) precipitación *in situ* y 4) organogeles de solidificación *in situ*. En la Figura 4 se muestra un diagrama de bloques donde se presenta esta clasificación (Hafeti & Amsden, 2002).

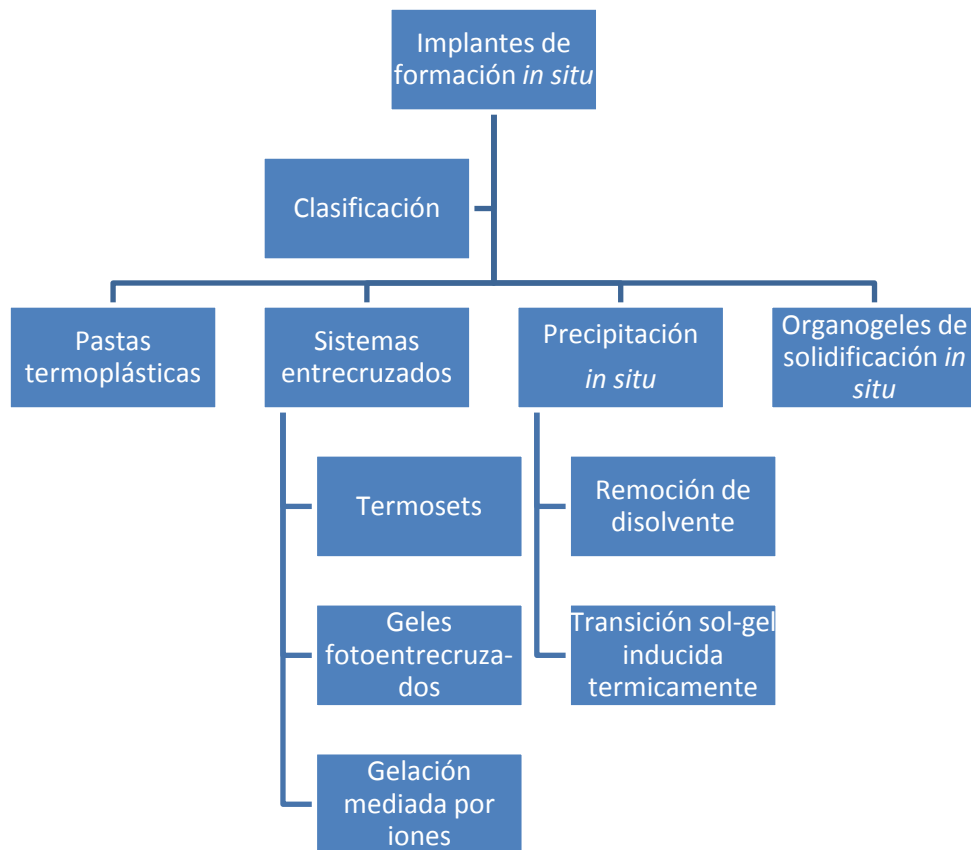


Figura 4. Diagrama de bloques para la clasificación de implantes de liberación *in situ*.

De acuerdo con esta clasificación los mecanismos para lograr su solidificación son los siguientes (Hafeti & Amsden, 2002):

- 1) Pastas termoplásticas: son sistemas poliméricos los cuales son inyectados fundidos y son enfriados a la temperatura corporal formando un depósito semisólido. Los polímeros utilizados se caracterizan por tener un punto de fusión entre 25 y 65 °C y poseen una viscosidad intrínseca de 0.05 a 0.8 dL/g medido a 25 °C.
- 2) Sistemas entrecruzados: se utilizan polímeros los cuales forman una red entrecruzada sólida consecuencia de diferentes iniciadores como el calor (termosets), la absorción de fotones o interacciones entre iones (pequeños cationes y los aniones poliméricos).
- 3) Precipitación *in situ*: la formación del depósito proviene de la precipitación de polímeros a partir de una solución de éstos, inducida por la remoción de disolvente, un cambio de temperatura o de pH.



- 4) Organogeles de formación *in situ*: los organogeles están formados por lípidos anfifílicos insolubles en agua, los cuales se hinchan en agua y forman cristales líquidos liotrópicos. La naturaleza de la fase cristalina formada depende del lípido, temperatura, fármaco incorporado y de la cantidad de agua en el sistema.

Los implantes de formación *in situ*, presentan diferentes retos para su elaboración y desarrollo, relacionados con la estabilidad del fármaco que se incluye, la cinética de liberación y el sitio de administración. En la Tabla 4, se presentan los principales problemas que se asocian a cada categoría de implantes, así como los componentes más comúnmente utilizados para la elaboración de cada uno de ellos (Hafeti & Amsden, 2002).

Tabla 4. Problemas para la elaboración de implantes de formación <i>in situ</i> y ejemplos de sus componentes		
Sistema de liberación	Problemas presentados	Ejemplos de componentes
Pastas termoplásticas	Altas temperaturas al ser inyectado.	PLA ¹ , PLGA ² & PCL ³ . Alcoholes como iniciadores
Sistemas entrecruzados		
Termosets	Liberación de calor inaceptable durante su formación. Toxicidad de los monómeros que no reaccionan. Efecto Burst.	Octoato de estaño como catalizador, oligómeros de PLA, PDLLA ⁴ & PCL, polioles como iniciador y peróxidos como agente de curado
Fotoentrecruzados	El encogimiento y fragilidad del polímero debido al alto grado de entrecruzamiento	PGA, PLA, PCL & PEG ⁵ , iniciadores como eosina, fuente de luz (UV o laser)
Gelación mediada por iones	Bajo tiempo de almacenamiento. Efecto Burst. Largo tiempo de degradación.	Alginato con Ca ²⁺ como agente gelante
Precipitación <i>in situ</i>		
Remoción de disolvente	Efecto Burst. Uso de disolventes orgánicos.	PDLLA, PCL & PLA. Solventes como DMSO ⁶ o NMP ⁷
Transición sol-gel inducida térmicamente	Efecto Burst	NIPAAM ⁸ , PEG, PLA, PLGA, Quitosano, Pluronic
Organogeles	Falta de datos de toxicidad. Separación de fases. Estabilidad de aceites y ceras.	Aceite de cacahuete & Labrafil, ceras (cera de abeja)
¹ Ácido poliláctico, ² Ácido poli (láctico co-glicólico), ³ Policaprolactona, ⁴ Ácido poli (d,l-láctico), ⁵ Polietilenglicol, ⁶ Dimetilsulfóxido, ⁷ N-metil-2-pirrolidona, ⁸ Poli (N-isopropilacrilamida)		

3.2 Sistemas poliméricos termo-responsivos

Los sistemas poliméricos termorresponsivos corresponden a la categoría de implantes de formación *in situ* por precipitación, y su transición sol-gel es inducida térmicamente. Son sistemas poliméricos que responden a los cambios de temperatura, son considerados como

sistemas que presentan transiciones termo-reversibles sol-gel caracterizados por tener una temperatura de solución crítica (LCST por sus siglas en inglés; *Lower critical solution temperature*), la cual al ser rebasada se traduce en la formación de un gel (Chitkara *et al*, 2006).

Entre los polímeros termo-reversibles utilizados que presentan ese comportamiento, se encuentra el co-polímero tribloque poli-(óxido de etileno)-*b*-poli (óxido de propileno)-*b*-poli (óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) conocido como Pluronic® (BASF) o Poloxámero® (ICI). En la Figura 5, se muestra su estructura química, en la cual los extremos de la cadena del co-polímero corresponden al PEO y poseen una naturaleza hidrofílica, mientras que el centro de la cadena corresponde al bloque PPO con una naturaleza hidrofóbica. Además, estos poloxámeros son considerados como tensoactivos no iónicos (He *et al*, 2008).

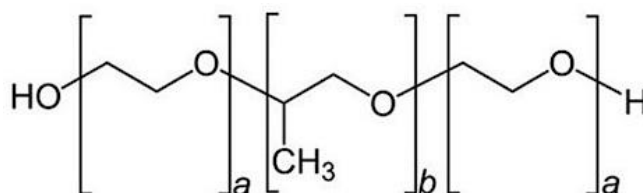


Figura 5. Estructura química de los co-polímeros tribloque (PEOa-PPOb-PEOa).

Los poloxámeros presentan, dependiendo del tamaño de las cadenas de cada bloque, una gran variedad de temperaturas de gelación, algunas cercanas a la del cuerpo humano (37 °C), encontrando gran aplicabilidad biomédica y farmacéutica. Algunas de las propiedades de diferentes poloxámeros se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Propiedades de algunos poloxámeros (He *et al.*, 2008)

Polímero	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	CP (°C)*	PEO (peso %)
P65	3 400	27	82	50
P85	4 600	34	85	50
P105	6 500	35	91	50
F87	7 700	49	>100	70
F127	12 600	56	>100	70

*CP= punto de nube (cloud point) al 1% en solución acuosa



El Pluronic® más utilizado para la elaboración de formas farmacéuticas parenterales es el F127 el cual presenta propiedades termorreversibles en solución acuosa en un rango de concentraciones entre el 20 y 30 % (He *et al*, 2008).

3.2.1 Mecanismo de transición sol-gel

Los poloxámeros a bajas concentraciones (10^{-4} – 10^{-5} %) forman micelas mono-moleculares, al aumentar la concentración se forman agregados multi-moleculares, los cuales presentan un acomodo con un centro hidrofóbico gracias a la parte correspondiente de polióxido de propileno (PPO) del copolímero tribloque, y con las cadenas hidrofílicas de polióxido de etileno (PEO) acomodadas hacia la parte externa interactuando con el medio acuoso (Escobar-Chávez *et al*, 2006).

La micelización ocurre en soluciones diluidas del copolímero tribloque, en algunos disolventes por arriba de la concentración micelar crítica, a una determinada temperatura. A mayores concentraciones, las micelas se pueden ordenar en una red, por lo que las soluciones de estos copolímeros se transforman de soluciones transparentes de baja viscosidad en geles sólidos al aumentar la temperatura (Escobar-Chávez *et al*, 2006).

En cuanto a cómo afecta la temperatura en la transición sol-gel, se conoce por ejemplo que el Pluronic® F127 es más soluble en agua fría que en agua caliente, debido al aumento de la solvatación y la formación de puentes de hidrógeno de las cadenas del copolímero con el agua a bajas temperaturas (4 – 5 °C), por lo que la solución es líquida a bajas temperaturas, transformándose en un gel al ir aumentando la temperatura (Escobar-Chávez *et al*, 2006).

A bajas temperaturas la solución es estable en una fase micelar, pero al aumentar la temperatura se forma una estructura cúbica, y finalmente a temperaturas más altas, se forma una fase de cilindros hexagonales empaquetados como se observa en la Figura 6 (Escobar-Chávez *et al*, 2006).

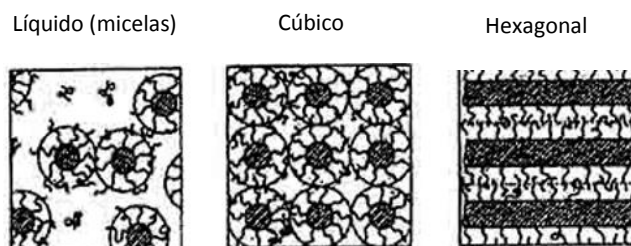


Figura 6. Fases micelares formadas por los Pluronic® al incrementar la temperatura (Escobar-Chávez *et al*, 2006)

3.2.2 Método de preparación de geles de Pluronic®

Los geles de Pluronic® se preparan por el método “en frío” en el cual se pesa cierta cantidad de Pluronic® y se agrega lentamente en agua fría con agitación mecánica sutil, la solución se deja hidratándose y dispersándose durante la noche a 4 °C hasta su completa disolución (Escobar-Chávez, 2005).

Como se mencionó con anterioridad a bajas temperaturas, en solución acuosa, se hidratan las cadenas de Pluronic®. Cuando la temperatura aumenta, las cadenas de copolímero se desolvatan resultando en el rompimiento de los puentes de hidrógeno que se habían formado entre el disolvente y las cadenas. Esto favorece las interacciones entre los extremos hidrofóbicos del copolímero (PPO) y favorece la formación del gel, debido a que el proceso de deshidratación hace más accesibles a los grupos hidroxilo (Escobar-Chávez, 2005).

3.2.3 Caracterización de geles de Pluronic®

La caracterización de los geles de Pluronic® es importante debido que se necesita de una solución con la viscosidad apropiada para ser inyectada, que presente una transición sol-gel a temperatura corporal, y que libere al fármaco de forma controlada, por lo que las pruebas que deben realizarse son las siguientes:

- ✓ Viscosidad: se determina a diferentes temperaturas y puede aumentar o disminuir dependiendo de las propiedades termo-reversibles del excipiente utilizado y su temperatura de solución crítica (Escobar-Chávez *et al*, 2006).

- ✓ Temperatura de transición sol- gel: puede determinarse con la prueba de inversión de tubo, en donde la solución con propiedades termo-reversibles se somete a diferentes temperaturas para determinar la temperatura de transición sol- gel (Chaibundit *et al*, 2010).
- ✓ Inyectabilidad: es evaluada en términos de facilidad de inyección siguiendo lo reportado por Cilurzo *et al*. (2011), en donde: (1) La inyección no es posible o es muy difícil, no fluye ni gotea; (2) La inyección es difícil, inicialmente gotea y después fluye continuamente; (3) la inyección es moderada, fluye continuamente; (4) la inyección es fácil, fluye continuamente. Esta prueba es importante debido a que es importante asegurar que su inyección no representará un problema para la persona que lo administre al paciente y puede guardar relación con el dolor de la inyección. Además, dependiendo del resultado, se pueden probar diferentes calibres de aguja.
- ✓ Estudios de liberación *in vitro*: la liberación del fármaco contenido puede evaluarse a través de distintas técnicas, entre ellas, empleando bolsas de diálisis, dentro de las cuales se coloca la formulación, la bola se sumerge en un medio receptor y se cuantifica la liberación del fármaco a través del tiempo.

4. Nanopartículas lipídicas

El uso de lípidos biocompatibles ha ganado la atención para la formulación de acarreadores para la liberación de fármacos poco solubles. De manera general, existen dos tipos de nanopartículas lipídicas: con una matriz sólida, las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). Ambos tipos de nanopartículas pueden ser ampliamente utilizadas para la liberación de fármacos tanto por vía oral, parenteral y tópica (Das *et al*, 2012).

Las SLN fueron desarrolladas al principio de los 1990's, fueron formadas al sustituir el lípido líquido (aceite) de una emulsión aceite en agua (o/w) por un lípido sólido. Las SLN están compuestas por el 0.1 % (p/p) al 30 % (p/p) de lípido sólido, disperso en medio acuoso y si es necesario, un tensoactivo como estabilizante (generalmente del 0.5 % p/p al 5 % p/p) (Pardeike *et al*, 2009).

La segunda generación de nanopartículas lipídicas, llamados NLC, están formadas por una mezcla de lípidos sólidos y lípidos líquidos (aceites). Los lípidos sólidos y lípidos líquidos son

mezclados preferentemente en una proporción de 70:30 hasta 99.9:0.1 (Pardeike *et al*, 2009).

Los NLC fueron desarrollados para eliminar los inconvenientes de las SLN, ya que los NLC presentan mayor capacidad para cargar un gran número de principios activos, tienen un menor contenido de agua y evitan/minimizan la expulsión del principio activo durante su almacenamiento (Pardeike *et al*, 2009).

En la Figura 7 se representa la formación de una estructura cristalina más o menos perfecta de los lípidos sólidos en las SLN, parecida a una pared de ladrillos, la cual limita la capacidad de carga del fármaco; en cambio, en los NLC la estructura cristalina de la matriz formada por el lípido sólido y el lípido líquido contiene muchas imperfecciones parecidas a rocas con diferentes formas, y estas imperfecciones aumentan la capacidad de carga del fármaco (Müller *et al*, 2007).

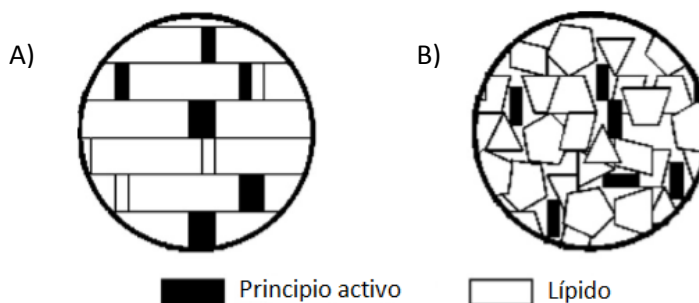


Figura 7. A) representación de la matriz cristalina casi perfecta (ladrillos) de las SLN, B) representación de la estructura de la matriz cristalina imperfecta de los NLC (rocas) (Müller *et al*, 2007).

4.1 Métodos de preparación

Los SLN y los NLC pueden prepararse por diferentes técnicas como: ultra sonicación, doble emulsión, inyección de disolvente, emulsificación y posterior evaporación de disolvente y homogenización a alto cizallamiento (Borges *et al*, 2020), la cual es utilizada en este proyecto.

La técnica de homogenización a alto cizallamiento, y ésta puede ser realizada en frío o en caliente. En ambas variantes el principio activo se puede solubilizar o dispersar en un lípido

fundido, y posteriormente es estabilizado con una solución de tensoactivo (Müller *et al.*, 2002). A continuación se describen ambas variantes de la técnica de homogenización a alto cizallamiento:

Homogenización en caliente: es la técnica más comúnmente aplicada, aunque el fármaco sea sensible a la temperatura, debido a que el tiempo de exposición a ésta es muy corto. Los lípidos sólidos son fundidos, y el lípido líquido y la solución de tensoactivo son calentados a la misma temperatura para posteriormente ser incorporados con el lípido sólido fundido y ser homogeneizados a alto cizallamiento.

Homogenización en frío: esta técnica es recomendada para fármacos extremadamente sensibles a la temperatura y para compuestos hidrofílicos.

Para la elaboración de NLC se pueden modificar distintas variables con el fin de obtener el tamaño de partícula deseado además de mejorar la tasa de encapsulamiento como pueden ser: la proporción lípido sólido y lípido líquido, el tiempo de homogenización, la velocidad de homogenización y la concentración de tensoactivo.

4.2 Caracterización de NLC

La caracterización de los NLC es importante debido a que proporciona información sobre su posible distribución en el cuerpo humano, su estabilidad y capacidad para encapsular al fármaco. Las pruebas que se realizan para su caracterización son:

- ✓ Tamaño de partícula (TP): puede determinarse por la técnica de dispersión de luz dinámica donde después de varias lecturas se obtiene el tamaño promedio de las nanopartículas presentes en la dispersión.
- ✓ Índice de polidispersión (IPD): se realiza por la técnica de dispersión de luz dinámica. Shah *et al.* (2014), reportaron que el IPD refleja la calidad de la dispersión representado dentro de un rango de 0 a 1. Generalmente un valor de $IPD \leq 0.1$ indican una alta calidad de la dispersión, un valor ≤ 0.3 es considerado como óptimo y un valor ≤ 0.5 como aceptable.
- ✓ Potencial zeta (PZ): se realiza por movilidad electroforética, es un indicador del grado de repulsión entre partículas con carga similar. De manera ideal se esperaría obtener valores de 30 mV o más sin importar que el valor sea positivo o negativo

ya que sería un indicativo de una buena estabilidad física de la formulación (Malvern Instruments Ltd, 2004).

- ✓ Tasa de encapsulación (%EE): se puede determinar por diferentes técnicas como bolsa de diálisis, y centrifugación en donde se separa el fármaco encapsulado del no encapsulado y se procede a cuantificarlo ya sea en el sedimento o en el sobrenadante, dependiendo del nanoacarreador utilizado.
- ✓ Caracterización térmica: se realiza para determinar alguna interacción entre el fármaco y los componentes de los NLC.
- ✓ Morfología: se hace por medio de alguna técnica de microscopía electrónica, e.g., microscopía electrónica de transmisión (TEM), o microscopía electrónica de barrido (SEM), para observar tanto el tamaño como la forma de la nanopartícula, la cual puede ser esférica para los NLC.
- ✓ Estudios de liberación *in vitro*: puede realizarse por la técnica de bolsa de diálisis, cuantificando el fármaco liberado en un medio receptor a través del tiempo.

HIPÓTESIS

Si se incorpora estradiol en una formulación inyectable capaz de formar un implante de formación *in situ*, entonces se podrá conseguir una liberación sostenida que permita reducir la dosis administrada y la frecuencia de dosificación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar y caracterizar un sistema en forma de un implante fluido inyectable para la administración de valerato de estradiol que permita lograr una liberación sostenida.

Objetivos Particulares

- ✓ Validar métodos analíticos para la cuantificación espectrofotométrica de estradiol, con el fin de determinar tasa de encapsulación y cantidad liberada en los estudios de liberación *in vitro*.
- ✓ Validar un método analítico por ELISA, para la cuantificación de estradiol en plasma, al administrar la formulación en un modelo animal.



- ✓ Preparar y caracterizar acarreadores lipídicos nanoestructurados conteniendo estradiol, determinando tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial-Z, morfología, tasa de encapsulación y estudio de liberación *in vitro*.
- ✓ Preparar un gel termorreversible a base de poloxámeros, con y sin los acarreadores lipídicos nanoestructurados conteniendo estradiol, y caracterizarlos determinando su viscosidad, realizando estudios de liberación e inyectabilidad.
- ✓ Llevar a cabo estudios *in vivo* en un modelo animal, administrando la formulación desarrollada en el presente trabajo, comparando los resultados obtenidos con los de una formulación comercial.

METODOLOGÍA

1. Materiales

1.1 Equipos

- ✓ Balanza Electrónica Shimadzu ATX 224 (USA)
- ✓ Espectrofotómetro Hitachi U-5100 (Japón)
- ✓ Zetasizer® nano series nano-ZS90 Malvern Instruments (USA)
- ✓ Ultra-Turrax® T18 basic (USA)
- ✓ Microscopio electrónico de transmisión JEOL 2010 200kv (USA)
- ✓ Calorímetro diferencial de barrido DSC Q20, TA (USA)
- ✓ Viscosímetro digital de plato CAP200 Brookfield (USA)
- ✓ Bomba de inyección Cole Parmer 60061 (USA)
- ✓ Centrífuga Z326k HERMLE, (Alemania)
- ✓ Potenciómetro Hanna Instrument 8521 (USA)
- ✓ Termómetro digital
- ✓ Microbalanza E. METTER serie 190403 Zürich (Alemania)

1.2 Reactivos

- ✓ β - estradiol 17-valerato $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich) lote: BCBQ2224V
- ✓ Etanol (Fermont, México)
- ✓ Fosfato Monobásico de Potasio (J.T Baker, USA)
- ✓ Hidróxido de Sodio (MEYER, México)
- ✓ Tween® 20 (HYCEL Reactivos de México S.A DE C.V)



- ✓ Miristato de isopropilo (Droguería cosmopilita, México)
- ✓ Glicerol (Droguería cosmopilita, México)
- ✓ Labrafac® (Gattefossé, Francia)
- ✓ Labrasol® (Gattefossé, Francia)
- ✓ Lauroglicol (Gattefossé, Francia)
- ✓ Capryol™ 90 (Gattefossé, Francia)
- ✓ Cremophor® RH 40 (Acofarma, México)
- ✓ Pluronic® F127 (Sigma Aldrich, USA)
- ✓ Pluronic® F68 (Sigma Aldrich, USA)
- ✓ Compritol® 888 ATO (Gattefossé, Francia)
- ✓ Precirol® ATO 5 (Gattefossé, Francia)
- ✓ Estradiol ELISA kit (Bio-Estradiol, MEXLAB, México)

2. Métodos

2.1 Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)

2.1.1 Selección de los componentes de los NLC

Los materiales para la preparación de los NLC se seleccionaron con base en la solubilidad del valerato de estradiol (VE). Para ello, se determinó la solubilidad de VE en diferentes lípidos líquidos colocando 1 mL de los siguientes lípidos líquidos: miristato de isopropilo, glicerol, Labrafac®, Labrasol®, Lauroglicol® y Capryol® 90 en viales, agregando VE hasta su saturación, agitando magnéticamente durante 48 h. Posteriormente se colocaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 17,000 rpm/10 min. Se tomó una alícuota de 100 µL del sobrenadante y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL llevando al aforo con etanol. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis (U-5100, HITACHI, Japón) a una $\lambda = 281$ nm para calcular la concentración de VE (método analítico previamente validado, Anexo 1).

2.1.2 Preparación de los NLC

Los NLC fueron preparados por la metodología descrita por (López García, 2014) mediante la técnica de dispersión homogenización a alto cizallamiento, en donde el homogenizador tipo rotor-estator (Ultra-Turrax® T18 basic) es usado para producir emulsiones con los lípidos fundidos (fase oleosa) y el estabilizante (fase acuosa) las cuales se hacen enfriar para obtener NLC.



Se probaron diferentes condiciones para optimizar la elaboración de NLC placebo las cuales se muestran en la Tabla 6, evaluando el tamaño de partícula obtenido, utilizando los lípidos líquidos seleccionados de acuerdo con las pruebas de solubilidad antes mencionadas, y probando dos lípidos sólidos y dos estabilizantes (tensoactivos), estos seleccionados de acuerdo con reportes de la literatura y de trabajos previos realizados en nuestro laboratorio.

Tabla 6. Condiciones para optimizar la elaboración de NLC.

<i>Condición</i>	<i>Variables</i>
<i>Lípido líquido (LL)</i>	Capryol® 90 Labrasol® Labrafac® Lipophile WL 1349
<i>Lípido sólido (LS)</i>	Compritol® 888 ATO Precirol® ATO 5
<i>Estabilizante (tensoactivo)</i>	Poloxámero 188 (Lutrol® F68) Cremophor® RH 40
<i>Tiempo se emulsificación</i>	5, 8, 12 min
<i>Proporción LS:LL*</i>	90:10 80:20 70:30
<i>*Lípido sólido (LS):Lípido líquido (LL)</i>	

El procedimiento general (Figura 8) para la preparación de NLC fue el siguiente:

1. Se funde el lípido sólido y el lípido líquido a una temperatura de 90 °C (en este paso se agrega el fármaco para los lotes cargados).
2. El estabilizante es disuelto en agua y calentado a 90 °C.
3. Se emulsifican ambas fases a 20, 000 rpm/ 90 °C (se varía el tiempo, Tabla 6).
4. Se agita mecánicamente con una barra magnética durante 5 min/ 5 °C.

1. Fundir lípidos a 90°C



2. Disolver estabilizante en agua y calentar a 90°C



3. Emulsificar



4. Enfriar



Figura 8. Preparación de NLC por homogenización a alto cizallamiento.

2.1.3 Caracterización de NLC

A. Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (IPD)

Se determinó por dispersión de luz dinámica. La muestra se preparó tomando 1 mL de dispersión de NLC y se diluyó en 2 mL de agua destilada, posteriormente se colocó en la celda de poliestireno cuadrada mostrada en la Figura 9 y fue analizada en el equipo Zetasizer nano series Nano-ZS90, Malvern (USA) por triplicado.



Figura 9. Celda utilizada para medir TP e IPD.

B. Potencial zeta (PZ)

Se determinó por movilidad electroforética. La muestra se preparó tomando 1 mL de dispersión de NLC y se diluyó en 2 mL de agua desionizada, posteriormente se colocó en la celda capilar desechable mostrada en la Figura 10 y fue analizada en el equipo Zetasizer Nano series Nano-ZS90, Malvern (USA) por triplicado.

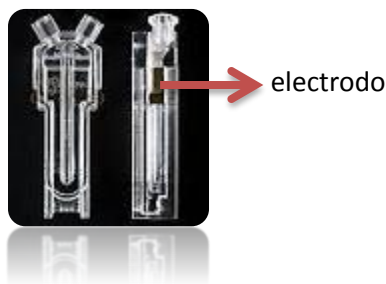


Figura 10. Celda utilizada para medir PZ.

C. Tasa de encapsulación

Para determinar la tasa de encapsulación, la dispersión de NLC fue centrifugada a 12,000 rpm durante 2 h por 3 ciclos. El fármaco no encapsulado sedimentó y los NLC cargados se encontraron en el sobrenadante. Un mL de NLC se sonicó con etanol para romperlos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 min para separar los componentes insolubles de los NLC y el fármaco en el sobrenadante se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis a una $\lambda = 281$ nm (método analítico previamente validado, Anexo 1). Se calculó la tasa de encapsulación (% EE) y la capacidad de carga mediante las siguientes fórmulas:

$$\% EE = \frac{\text{cantidad de VE encapsulada (mg)}}{\text{cantidad inicial de VE (mg)}} \times 100$$

$$\text{Capacidad de carga} = \frac{\text{cantidad de VE encapsulada (mg)}}{\text{Peso total de NLC (g)}}$$

D. Morfología

La morfología de las nanopartículas se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Se colocó una gota de la dispersión de NLC sobre una rejilla recubierta, se quitó el exceso con papel filtro, y se dejó secar a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente se colocó una gota de ácido fosfotúngstico al 1% sobre la rejilla con muestra durante 1 min, se quitó el exceso de solución con papel filtro, se dejó secar y fue analizado con el microscopio electrónico JEOL 2010 200kv.

E. Caracterización térmica

Se realizó con el DSC Q20, TA (USA) con el fin de determinar alguna interacción entre el fármaco y los componentes de los NLC. Para todos los termogramas las condiciones fueron: velocidad de calentamiento 10 °C/min de 30 a 250 °C, utilizando charolas de aluminio. Los picos exotérmicos se mostraron hacia arriba.

F. Estabilidad del valerato de estradiol en solución para los estudios de liberación *in vitro*.

Se realizó un estudio de estabilidad del fármaco en el medio de disolución para los estudios de liberación, para ello se preparó una solución de fármaco (41 µg/mL) por triplicado, y se procedió de acuerdo con las condiciones abajo descritas:

Medio de disolución: Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4 adicionado con Tween 20 al 8 % + etanol 8 %.

Temperatura: 40 °C ± 2 °C

Humedad Relativa: 75 % ± 5 % HR

Tiempos de muestreo: 0, 30, 60 y 90 días aproximadamente (tiempo 0, 1, 2, y 3, respectivamente).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos para determinar si hubo un cambio estadísticamente significativo entre la concentración inicial (tiempo cero) y las concentraciones a través del tiempo.

G. Estudios de liberación *in vitro*

Se realizó el estudio de liberación utilizando bolsas de diálisis CE de 100 kDa (SpectraPor® 6000-8000 Da, USA), y como medio de disolución PBS pH 7.4 adicionado con Tween® 20 y etanol al 8 %. La concentración de VE (1mg/ mL) fue la misma para los siguientes sistemas:

- ✓ Solución de VE en PBS pH 7.4 adicionado con Tween® 20 y etanol al 8 %.
- ✓ Dispersión de NLC cargados con VE.

Se colocó 1 mL de la solución o dispersión en la bolsa de diálisis y se colocaron en 10 mL del medio de disolución a 37 °C con agitación constante. La prueba se realizó por cuadruplicado.

Se tomaron muestras de 2 mL del medio de disolución a intervalos definidos de tiempo con reposición de medio, para mantener durante todo el tiempo las condiciones “sink” durante 56 h. La cuantificación del fármaco se llevó a cabo por espectrofotometría UV-Vis a $\lambda = 281$ nm (método previamente validado, Anexo 1).

2.2 Geles de Pluronic®

2.2.1 Preparación de los geles de Pluronic®

Se prepararon los geles por el método en frío (Escobar-Chávez *et al.* 2006), el cual consiste en la disolución del Pluronic® en agua o bien en la dispersión de NLC. El sistema se dejó a 4 °C durante toda la noche para asegurar su total disolución. De esta manera, se prepararon geles variando la concentración de Pluronic F127 (18, 20, 23.5 y 27%).

Por otro lado, se probaron mezclas de Pluronic® F127 y Pluronic® F68. Para ello, se prepararon geles conteniendo una concentración final del 20 % (p/v) de Pluronic®, variando la proporción PF127:PF68 de 8:2, 8.5:1.5, 9:1 (Khateb, *et al.* 2016). Los geles fueron identificados según las siguientes características:

- Gel control:** Pluronic® + agua destilada (como medio de hidratación)
- Gel placebo:** Pluronic® + dispersión de NLC placebo (como medio de hidratación)
- Gel cargado:** Pluronic® + dispersión de NLC cargados con el VE 1mg/ mL (como medio de hidratación)



2.2.2 Caracterización de geles de Pluronic®

A. Viscosidad

La viscosidad fue medida en un viscosímetro digital de plato (CAP200, Brookfield, USA) colocando 200 μ L de muestra y utilizando la aguja # 1, en un rango de temperatura de 5 a 40 °C, aumentando 2 °C/min de los 5 a los 30 °C y 1 °C/ min de los 30 a los 40 °C, a una velocidad de 50 rpm, por triplicado.

B. Temperatura de transición sol-gel

Se hizo por la técnica de inversión de tubo en donde 1 mL de solución de Pluronic® con o sin NLC se colocó en tubos de vidrio de 1 cm de diámetro. Éstos fueron colocados en un baño de agua, incrementando la temperatura 1 °C, dejando estabilizar el sistema durante 5 min, y tomando la temperatura con un termómetro digital. Esto se repitió a temperaturas crecientes, en cada una de las cuales, el vial se invertía y se consideraba como temperatura de transición sol-gel el momento en que la solución se convertía en gel y no fluía al invertir el tubo.

C. Inyectabilidad

Se utilizó el inyector Cole Parmer 60061 (USA) y jeringas de 1 mL con aguja de 27 y 25 G x 13 mm (DL MEDICA S.A DE C.V, México) y se evaluó la facilidad de inyección a una velocidad de 0.2 mL min⁻¹ considerada como una velocidad intermedia de inyección a 27 °C, según Berteau *et al.* (2015), la cual es considerada no dolorosa.

D. Estudios de liberación *in vitro*

Se realizó por bolsa de diálisis bajo las mismas condiciones que la prueba de liberación de NLC, colocando un mililitro del gel con una concentración de 1 mg/mL de VE en la bolsa de diálisis, empleando como medio de disolución PBS pH 7.4 adicionado con Tween® 20 al 8 % y etanol al 8%.

E. Estudios farmacocinéticos

Se realizaron los estudios *in vivo* en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el Laboratorio de Farmacología a cargo del Dr. José Trinidad Pérez Urizar. Se emplearon dos grupos experimentales de 6 conejos cada uno (New Zealand, 4 kg aproximadamente) a los cuales se les administró:

Grupo 1. Se administró una dosis inicial única intramuscular en la pata trasera del conejo de una presentación comercial de estradiol (JUVENUM E Suspensión de 1mg, PRODUCTOS CIENTÍFICOS, S.A. DE C.V.). La dosis utilizada fue la misma que en humanos, corregida por el peso del conejo.

Grupo 2. Se administró una dosis inicial subcutánea en el dorso del conejo de la formulación óptima desarrollada (gel cargado). La dosis utilizada fue la equivalente a la utilizada en el grupo 1.

Una vez administradas las formulaciones, se tomaron muestras de sangre (500 μ L) con jeringas heparinizadas a partir de un catéter (BD Instyte 24 GA, México) colocado en la vena exterior de la parte posterior de la oreja del conejo a diferentes tiempos durante 24 h (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 minutos y 24 horas). Se separó el suero de la sangre y se congeló a -20°C hasta su análisis.

Se determinó la concentración de fármaco en el fluido biológico (plasma) por medio de un método enzimático (KIT ELISA Bio-Estradiol, Grupo MEXLAB, México) previamente validado (Anexo 1) y se determinaron los parámetros farmacocinéticos mediante el software WinNonlin (V02.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Selección de los componentes, preparación y caracterización de los NLC

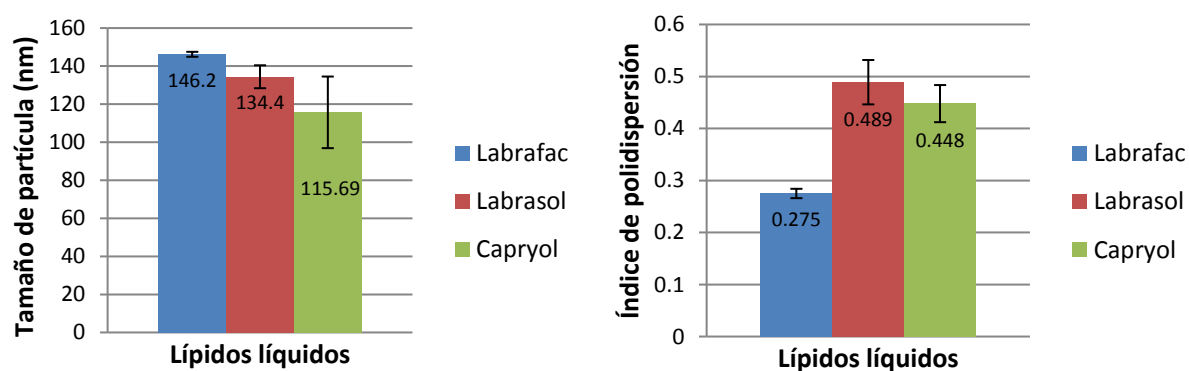
Los materiales y condiciones óptimas para la fabricación de los NLC fueron seleccionados tomando en cuenta en primer lugar la solubilidad del VE en diferentes lípidos líquidos, en la Tabla 7 se muestra su solubilidad en orden decreciente. Como mencionan Müller *et al.* (2002) los NLC contienen en su matriz imperfecta pequeños compartimientos líquidos oleosos, los cuales aumentan la tasa de encapsulación si el fármaco presenta una alta solubilidad en el lípido líquido.

Tabla 7. Resultados de la solubilidad del VE en lípidos líquidos.

Lípido líquido	Solubilidad (mg/mL)
Labrasol®	72.74
Capryol® 90	65.68
Lauroglicol	45.78
Labrafac®	25.96
Miristato de isopropilo	22.94
Glicerol	Insoluble

De acuerdo con estos resultados, se eligieron como lípidos líquidos Labrasol® y Capryol® 90, en los que la solubilidad del VE fue mayor. Sin embargo, como en un trabajo previo realizado en el laboratorio (López-García y Ganem-Rondero, 2015), se obtuvieron NLC con buenas características en cuanto a tamaño e IPD, al utilizar Labrafac®, se decidió incluirlo en la lista de lípidos líquidos, probando las condiciones reportadas por esos autores y que fueron: Compritol® 888 ATO (lípidos sólidos), Pluronic® F68 (estabilizante), una proporción LS:LL 90:10, con tiempo de emulsificación de 5 min utilizando Ultraturrax a 20,000 rpm. Los sistemas preparados bajo estas condiciones se caracterizaron midiendo el TP, el IPD y tasa de encapsulación. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) $\alpha = 0.05$ y una prueba de múltiples rangos, encontrando diferencias significativas en el tamaño sólo entre los NLC preparados con Labrafac® y Capryol® 90.

**Figura 11.** Caracterización de los NLC por tamaño de partícula e índice de polidispersión utilizando diferentes lípidos líquidos (n=2).

En cuanto al IPD, como puede verse en la Figura 11, se obtuvo un valor sensiblemente más bajo al utilizar Labrafac[®], lo que indica una población más homogénea. Por tanto, se determinó la tasa de encapsulación y la capacidad de carga utilizando Compritol[®] 888 ATO (LS), Labrafac[®] (LL), Pluronic[®] F68 (estabilizante) en una proporción 90:10 obteniendo una % EE = 91.05 ± 0.78 % equivalente a una concentración de VE en la dispersión de 0.5 mg/mL y una capacidad de carga de 7.72 mg de VE/g de NLC. Aunque estos resultados fueron buenos, se decidió evaluar la influencia del tiempo de emulsificación, utilizando Labrasol[®] y Capryol[®] como lípidos líquidos, que fue en los que, como ya se mencionó, el VE presentó la mayor solubilidad.

En la Figura 12 se presentan los resultados del TP promedio al variar el tiempo de emulsificación. Aunque un incremento en el tiempo de emulsificación puede contribuir a reducir el TP, solo se observó un cambio significativo ($p= 0.0024$) en el caso de los NLC preparados con Capryol[®], donde el tamaño se redujo en un 18 % al emulsificar por 12 min en comparación con 5 min. Con el Labrasol[®], no hubo un cambio en el tamaño por efecto del tiempo de emulsificación.

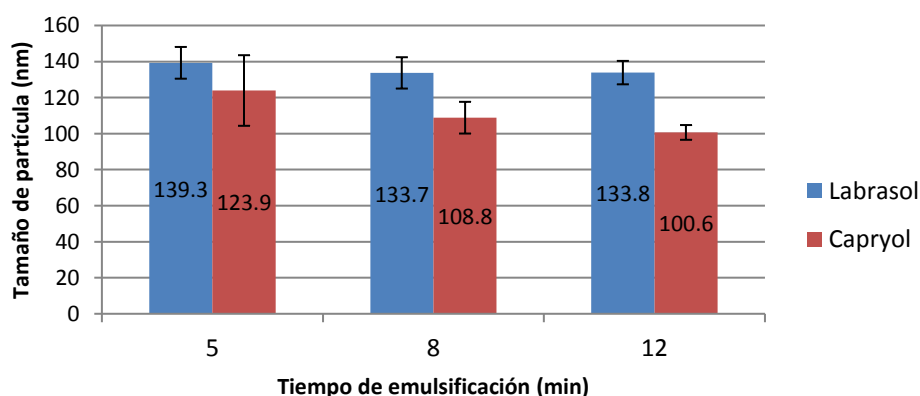


Figura 12. Tamaño de partícula de los NLC preparados con Capryol[®] y Labrasol[®] como lípidos líquidos, variando el tiempo de emulsificación entre 5, 8 y 12 min (n=3).

Una observación importante con estos sistemas fue que al conservarlos en refrigeración a 4 °C gelificaron. Esto puede atribuirse a las propiedades termorreversibles del Pluronic[®] F68 (He *et al.*, 2008).

Al consultar la bibliografía se encontraron los artículos de Zhang *et al.* (2014) y Guo *et al.* (2015) quienes también reportan la preparación de NLC utilizando como lípidos líquidos

Capryol® 90 y Labrasol®, respectivamente. La diferencia en relación a estos autores es que emplean como lípido sólido Precirol® ATO 5, y como estabilizante Cremophor® RH 40 (1% p/v), con un tiempo de emulsificación de 5 min y, una proporción LS:LL 80:20. Se decidió probar estas condiciones con el VE, preparando 3 lotes con cada lípido líquido, los cuales se caracterizaron por TP, IPD, y PZ, determinando la tasa de encapsulación y la capacidad de carga. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores promedio de TP, IPD y PZ para NLC preparados con Precirol® ATO 5 (LS), Cremophor® RH 40 (estabilizante) y Capryol® 90 o Labrasol® (LL) (n=3).

Lípido líquido	TP (nm)	IPD	PZ (mV)	%EE	Capacidad de carga (mg/g)
Capryol 90	136.4± 25.7	0.343± 0.054	-11.4± 0.86	92.72	26.4
Labrasol	60.38± 6.68	0.385± 0.02	-8.32± 0.79	72.38	21

Como se puede ver, la capacidad de carga prácticamente se triplicó al emplear Capryol 90 y Labrasol®, en relación con la formulación con Labrafac®, Compritol® 888 ATO y Pluronic® F68. Esta alta tasa de inclusión se atribuye a las propiedades de solubilidad del VE, siendo prácticamente insoluble en agua y con alta solubilidad en la matriz lipídica, de acuerdo con los resultados de solubilidad antes presentados.

Por otro lado, tanto los TP como los IPD tuvieron valores bastante aceptables. Considerando estos resultados, se prepararon lotes placebo y cargados con VE bajo las siguientes condiciones: Precirol® ATO (LS), Capryol® 90 (LL), Cremophor® RH40 (estabilizante), proporción LS:LL 80:20, tiempo de emulsificación de 5 min. a 20,000 rpm. Los resultados aparecen en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores promedio de TP, IPD y PZ para los NLC placebo y los NLC cargados con VE (n=2).

	NLC placebo	NLC cargados con VE
Tamaño de partícula (nm)	143.6 ± 21.1	122± 11.2
Índice de polidispersión	0.324± 0.08	0.344±0.07
Potencial zeta (mV)	-11.6± 1.2	-10.5±1.3

Se obtuvieron NLC con tamaños nanométricos, por la técnica de homogenización a alto cizallamiento. Wissing *et al.* (2004), explican que esta técnica permite obtener partículas de talla nanométrica con distribuciones estrechas debido al fenómeno de cavitación y turbulencia involucrados. En cuanto al IPD, el valor obtenido refleja la calidad de la

dispersión, representado dentro de un rango de 0 a 1. De acuerdo con lo indicado por Shah *et al.* (2014), un valor de IPD ≤ 0.1 indican una alta calidad de la dispersión, un valor ≤ 0.3 es considerado como óptimo y un valor ≤ 0.5 como aceptable. De acuerdo con este criterio los valores obtenidos son considerados como aceptables. Finalmente, el PZ es un indicador del grado de repulsión entre partículas con carga similar, de manera ideal se esperaría obtener valores altos de 30 mV o más sin importar que el valor sea positivo o negativo ya que sería un indicativo de una buena estabilidad física de la formulación (Malvern Instruments Ltd, 2004). Aun así, la repulsión entre partículas no es el único mecanismo de estabilización, pues esta puede ser el resultado de estabilizantes que actúan por un efecto estérico. Es el caso de tensoactivos no iónicos, como el Cremophor® RH 40 se obtienen valores de PZ entre -10 y -11 mV, el cual cubre a los NLC, disminuyendo la movilidad electroforética de las partículas y por tanto reduciendo el valor del PZ. No obstante, la estabilidad de los NLC se atribuiría sobre todo al efecto estérico ejercido por este estabilizante.

La morfología de estas partículas se visualizó por TEM. Las micrografías obtenidas tanto para el lote placebo como el lote con VE, muestran en ambos casos, partículas de forma esférica, con tamaños similares a los obtenidos por dispersión de luz dinámica (Figura 13).

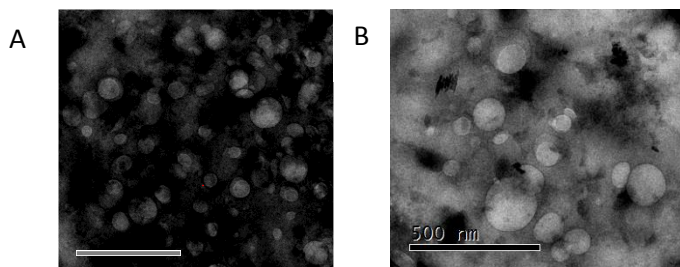


Figura 13. Micrografías de A) NLC placebo y B) NLC cargadas con VE, la barra representa 500 nm.

Los sistemas se caracterizaron mediante pruebas de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas obtenidos para el VE, los componentes individuales de los NLC, así como de las mezclas binarias del VE con cada uno de estos componentes, aparecen en la Figura 14 (a-c), en donde todas las señales son endotérmicas. El VE puro muestra un punto de fusión en 148 °C, el cual concuerda con el reportado de 143- 150 °C (ACOFARMA, 2016). El lípido líquido Capryol® 90 (Figura 14 a) y el Cremophor® RH 40 (Figura 14 b) no tienen punto de fusión. En la Figura 14 a, se observa en la mezcla binaria que no aparece la señal

del VE debido a que está solubilizado en el lípido líquido. En la Figura 14 c, el lípido sólido Precirol® ATO 5 a 54.71 °C, cercano al reportado de 56 °C (Rowe *et al*, 2009), cuyo desplazamiento podría deberse a la presencia de humedad. Finalmente, en la Figura 14 d, la señal correspondiente al fármaco desaparece en el caso de los NLC cargados con fármaco sugiriendo que éste se encuentra incorporado dentro de la matriz lipídica comparado con la mezcla física de todos los componentes de los NLC, en donde aparece la señal perteneciente al VE.

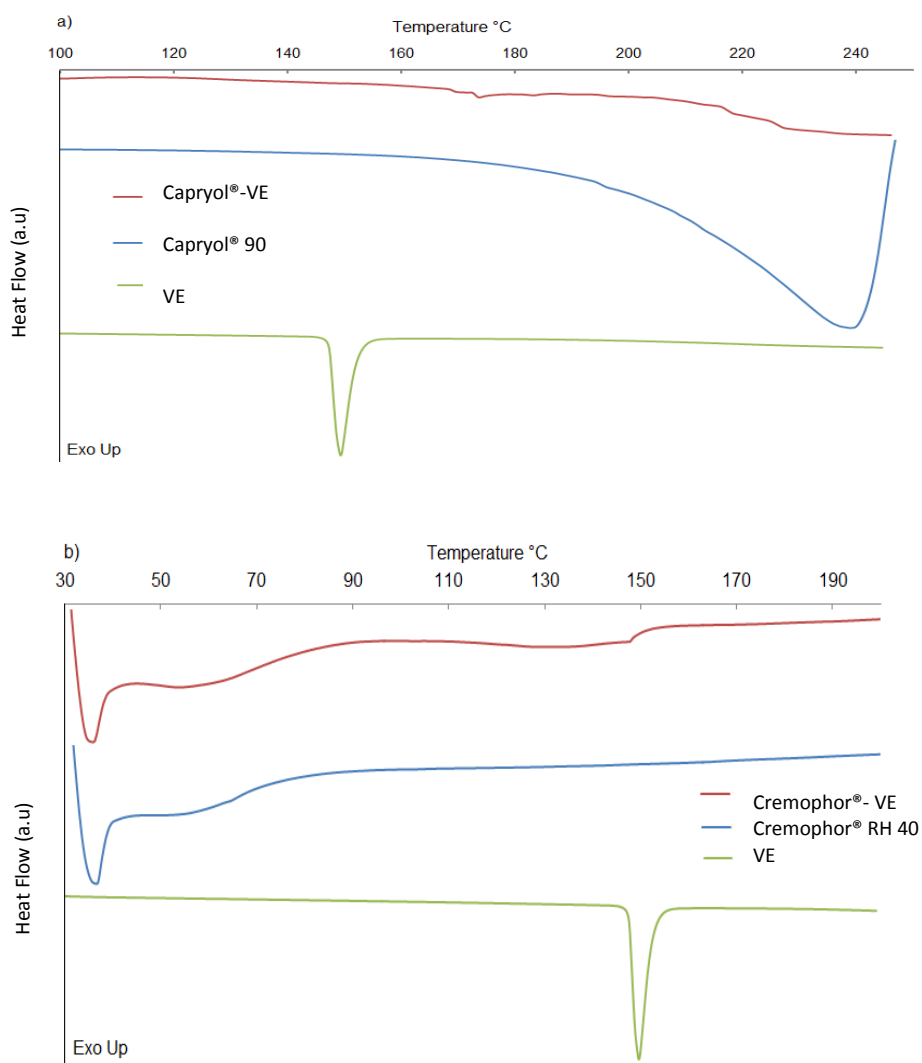


Figura 14. Termogramas de los NLC y sus componentes. Las imágenes (a), (b) y (c) muestran los termogramas para los componentes individuales y para las mezclas binarias con el fármaco: (a) lípido líquido Capryol® 90, b) estabilizante Cremophor® RH 40, c) lípido sólido Precirol® ATO 5. En la imagen (d) aparecen los termogramas de la mezcla física y de los NLC, en ambos casos incluyendo al VE.

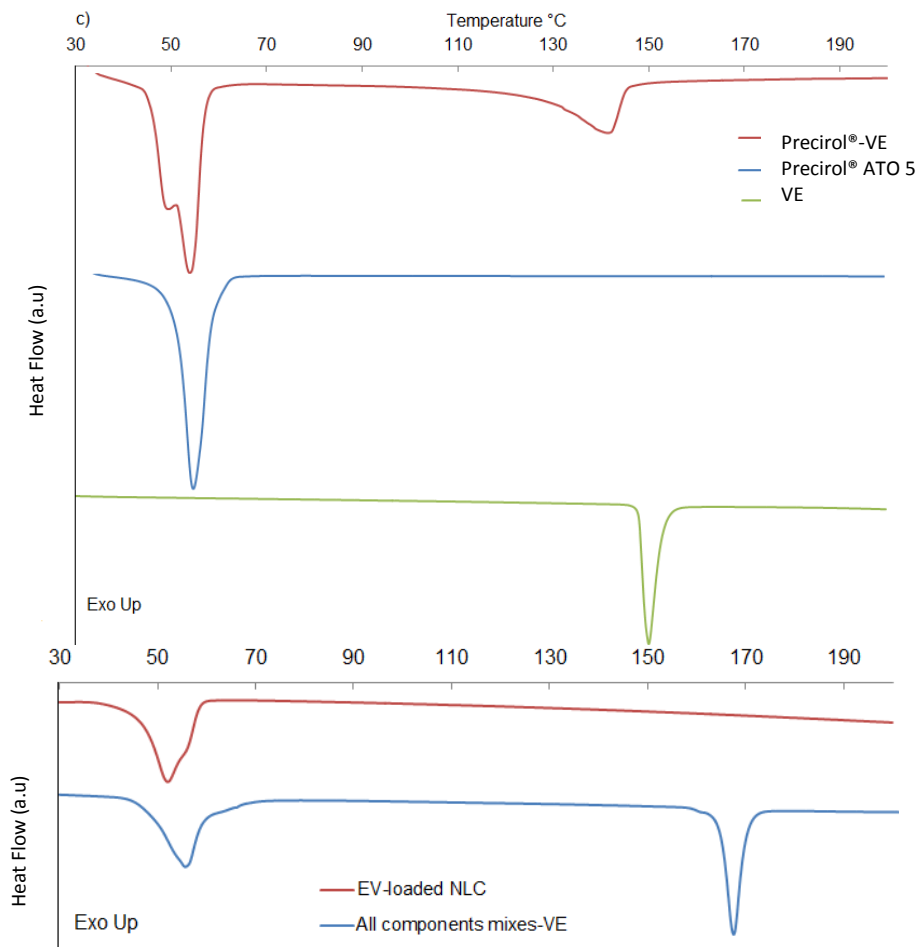


Figura 15. Termogramas de los NLC y sus componentes. Las imágenes (a), (b) y (c) muestran los termogramas para los componentes individuales y para las mezclas binarias con el fármaco: (a) lípido líquido Capryol® 90, b) estabilizante Cremophor® RH 40, c) lípido sólido Precirol® ATO 5. En la imagen (d) aparecen los termogramas de la mezcla física y de los NLC, en ambos casos incluyendo al VE.

2. Preparación y caracterización de los geles de Pluronic®

Viscosidad

Se sabe que los poloxámeros (Pluronic®, por el nombre comercial) son co-polímeros que presentan un comportamiento termorreversible que depende tanto de su temperatura y de su concentración en solución acuosa. En este sentido, se prepararon geles de Pluronic® F127 con concentraciones de 18 a 27 %. A bajas concentraciones forman micelas, en las



cuales el interior es hidrofóbico y el exterior hidrofílico, debido al acomodo de los segmentos de la cadena PEO hacia el exterior y del monómero PPO hacia el interior. Al ser los Pluronic[®] más solubles a temperaturas bajas, cuando se aumenta la temperatura se presenta una desolvatación de las cadenas y se rompen los puentes de hidrógeno formados entre el co-polímero y el disolvente, favoreciendo la interacción entre los dominios PPO. La deshidratación causada por el incremento de la temperatura permite el cambio en el acomodo de las micelas pasando de un arreglo cúbico a uno hexagonal llevando a la formación del gel y por lo tanto el aumento de la viscosidad (Escobar *et al.*, 2006). Por otro lado, se probaron mezclas de dos tipos de poloxámero, Pluronic[®] F127 y Pluronic[®] F68, manteniendo una concentración total de Pluronic[®] del 20 % (p/v).

Las curvas de viscosidad para estas formulaciones se presentan en la Figura 15, y a partir de ellas se pueden mencionar los siguientes puntos: (i) un incremento en la temperatura implica un aumento en la viscosidad. (ii) La viscosidad aumenta por la presencia de los NLC en los geles. Al comparar las Figuras 15 (a) y (b), se puede observar que en el gel que contiene los NLC (gel placebo) la viscosidad es mayor a menores temperaturas comparada con el gel que no contiene los NLC (gel control). Esto se puede deber a que los NLC podrían interactuar con la estructura micelar del hidrogel, afectando su temperatura de transición, además de que al tener presentes partículas sólidas se incrementa la resistencia a fluir y por lo tanto la viscosidad. (iii) En cuanto a la concentración total del polímero, así como la proporción de PF127:PF68, se observa que al aumentar la proporción de PF127, se incrementa la viscosidad del gel a menores temperaturas debido a que los poloxámeros con bloques largos PPO requieren de una menor temperatura para su micelización (Bodratti *et al.*, 2018). Todo esto es importante, porque al hablar de implantes de formación *in situ* la viscosidad es un parámetro relevante debido a que si tiene un valor muy alto se presentarán problemas de inyectabilidad, pero, por otro lado, si es muy bajo, el gel no se formará una vez inyectado en el cuerpo humano o la viscosidad no será suficiente para prolongar la liberación a partir del depósito formado (Shi *et al.*, 2013).

Entonces, tanto la concentración como la proporción de los Pluronic[®] juegan un papel muy importante para que la formulación fluya de una manera fácil al momento de ser administrada, pero una vez en el organismo, forme un depósito lo suficientemente rígido para prolongar la liberación del fármaco.

La viscosidad fue medida también en presencia del VE encapsulado en los NLC, sin que se encontrara una diferencia con respecto al gel placebo. Esto puede deberse a que el fármaco incluido en los acarreadores no afecta el comportamiento reológico del gel.

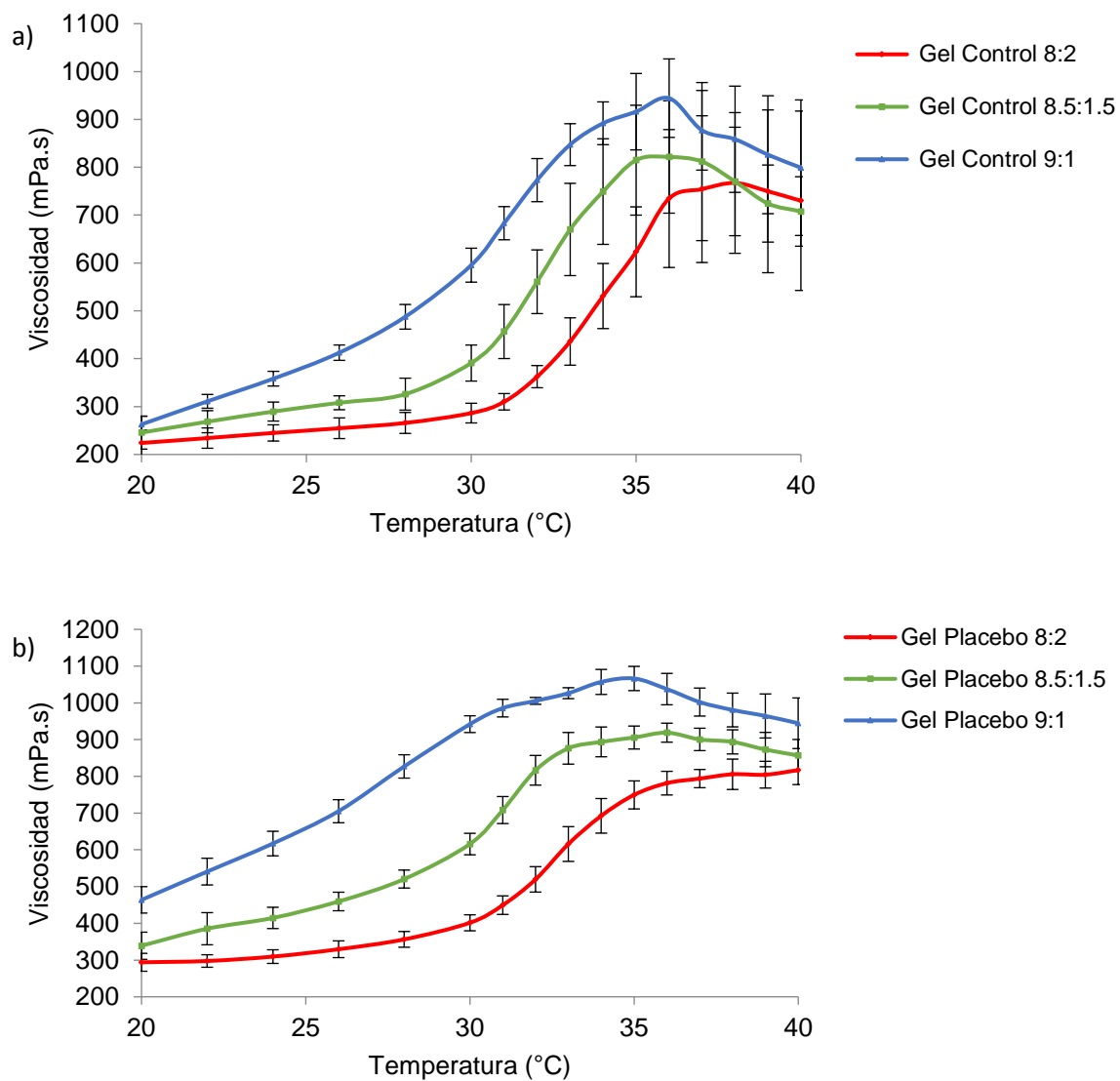


Figura 16. Curvas de viscosidad. a) curva de viscosidad de geles control con diferentes proporciones de Pluronic® F127 y Pluronic® F68. b) Curva de viscosidad de geles placebo con diferentes proporciones de Pluronic® F127 y Pluronic® F68 (n=3, las barras representan la D.E.).

Temperatura de transición sol-gel

Existen diversas técnicas para determinar la temperatura de gelación crítica o temperatura de transición sol-gel. En este trabajo se recurrió a la técnica de inversión de tubo para complementar los resultados obtenidos al determinar la viscosidad en función de la temperatura. La Figura 16 (a) ejemplifica esta prueba, al presentar lo observado con el gel PF127:PF68 en una proporción 8:2 a una temperatura de 27 °C en donde aún presenta fluidez lo que permite que sea inyectado fácilmente, posteriormente, conforme se va aumentando la temperatura gradualmente hasta llegar a los 37 °C, se forma un gel rígido como en la Figura 16 (b) el cual permanece en la parte inferior del tubo invertido, asegurando la formación del implante después de ser administrado. En la Tabla 10 se presentan las temperaturas determinadas por esta técnica para todas las proporciones de PF127:PF68 preparadas. Se puede apreciar que la inclusión de los NLC disminuye la temperatura de gelación en comparación a los geles control (sin NLC). Esto puede atribuirse a que la inclusión de los NLC en la dispersión reduce el número de moléculas de agua al desplazarlas del volumen total, lo cual favorece la deshidratación de las cadenas de PEO–PPO–PEO. Por ello, para el resto de las evaluaciones se eligió la formulación con la proporción PF127:PF68 8:2.

Tabla 10. Temperatura de transición sol-gel para los geles de Pluronic® control y placebo con diferentes proporciones PF127:PF68.

Formulación	Proporción del gel PF127:PF68	Temperatura de transición sol-gel (°C)
Gel Control	8:2	37
	8.5:1.5	34
	9:1	32
Gel Placebo	8:2	37
	8.5:1.5	31
	9:1	25



Figura 17. Fotografía que ejemplifica la prueba de inversión de tubo, al mostrar lo observado con el gel placebo con la proporción PF127:PF68 8:2. a) Gel placebo a una temperatura de 27 °C (líquida), b) Gel placebo a 37 °C (formación del gel en la parte inferior del tubo invertido).

Inyectabilidad

La administración del gel es recomendada por vía subcutánea debido a que ofrece a la paciente la facilidad de autoinyección. El gel placebo PF127:PF68 8:2, presentó una fluidez adecuada a 27 °C (temperatura ambiente) al ser inyectada a través de una jeringa de 27 G × 13-mm a una velocidad de 1.2 mL/min, la cual es considerada por Berteau *et al.* (2015), como no dolorosa. La inyectabilidad fue evaluada en términos de facilidad de inyección siguiendo lo reportado por Cilurzo *et al.* (2011), en donde: (1) La inyección no es posible o es muy difícil, no fluye ni gotea; (2) La inyección es difícil, inicialmente gotea y después fluye continuamente; (3) la inyección es moderada, fluye continuamente; (4) la inyección es fácil, fluye continuamente. Para esta formulación a 27 °C se tuvo una inyección fácil y con una fluidez continua, lo cual era esperado considerando la viscosidad obtenida. Está reportado que una viscosidad de 300 mPa·s a 25 °C es considerada como el límite en cuanto a inyectabilidad por lo que la formulación utilizada se encuentra prácticamente en el límite (Din *et al.*, 2015, Dimer *et al.*, 2013).

3. Estabilidad del valerato de estradiol en solución para los estudios de liberación *in vitro*

Era importante asegurar que durante los estudios de liberación *in vitro* el VE no se degradara en el medio de disolución, en la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos durante la prueba de estabilidad. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para

comparar las medias ($F_{\text{calculado}} = 10.51 > F_{\text{crítico}} 4.34$) seguido de una prueba de rangos múltiples indicando que hay una diferencia significativa entre la concentración de VE en el tiempo 3 con todos los demás tiempos, y ninguna diferencia significativa en la concentración de VE entre los tiempos 0, 1 y 2, indicando que el VE es estable en el medio de disolución durante 60 días.

Tabla 11. Concentración de VE en medio de disolución a través del tiempo.

Tiempo	Días	Muestra 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra 3 ($\mu\text{g/mL}$)
0	0	41.59	41.77	41.55
1	30	41.61	-	41.13
2	60	41.33	41.16	41.49
3	90	18.42	25.55	33.71
La muestra 2 en el tiempo 1 no se cuantificó porque el frasco se derramó				

4. Estudios de liberación *in vitro*

En la Figura 17 se presentan los perfiles de liberación para la solución de VE, la dispersión de NLC cargados con VE, y para el gel (PF127:PF68 8:2) cargado con NLC. La solución presenta una velocidad de liberación mayor, liberando el 98 % de VE en 28.5 h. En este caso la liberación hacia el medio receptor depende solamente del gradiente de concentración entre ambos compartimentos. La dispersión de NLC cargados con VE retrasa la liberación, liberando un 58.8 % al medio receptor en 28.5 h y un 70 % a las 56 h. Finalmente la inclusión de los NLC cargados en el gel termorreversible reduce la velocidad de la liberación atribuible a la viscosidad del gel a 37 °C y a que el VE tiene que atravesar dos barreras: una impuesta por los NLC y otra por el gel, liberando sólo un 20 % a las 56 h (Nie *et al.*, 2011). También debe de considerarse que el VE es un fármaco lipofílico, por lo que la liberación depende más de la disolución de la matriz del gel que de la difusión del fármaco a través de ella. La presencia de los NLC dispersos en el gel podría disminuir la velocidad de erosión del gel (Nie *et al.*, 2011).

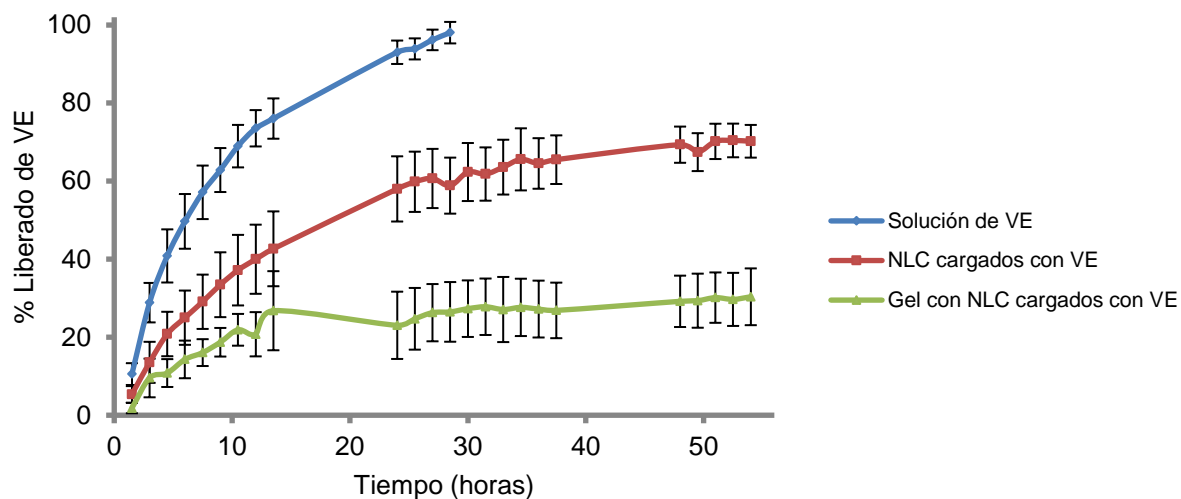


Figura 18. Perfiles de liberación de la solución de VE (azul), los NLC cargados con VE (rojo) y el gel con NLC cargados con VE (verde).

5. Estudios farmacocinéticos

Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos en conejos a los que se les administró la formulación del gel (PF127:PF68 8:2) incluyendo NLC cargados con el VE, comparando el perfil de concentración plasmática vs tiempo con el de una formulación comercial. La Figura 18 muestra estos perfiles y pone en evidencia la gran diferencia para el gel con NLC y para la suspensión comercial conteniendo estradiol. Como se puede observar en la Figura 18 y en la Tabla 12, en el caso de la formulación comercial se presentó un rápido incremento de la concentración plasmática durante los primeros minutos presentando un $t_{m\acute{a}x}$ de 0.4 h y una $C_{m\acute{a}x}$ de 38 pg/mL la cual disminuye rápidamente en las primeras 4 h manteniéndose constante de 6 a 24 h (14.19 - 15.88 pg/mL). Para el gel con NLC se observó la $C_{m\acute{a}x}$ en 2.3 h, siendo ésta mucho mayor que la de la suspensión comercial (40 veces más alta). El ABC también fue mucho mayor para el gel con NLC (aproximadamente 16.8 veces) que para la suspensión comercial. Esto a pesar de los resultados obtenidos en la liberación *in vitro* donde el hecho de formular el VE en los NLC y a su vez incluirlos en el gel, retrasó significativamente la liberación (aproximadamente 59.3 % menos a las 56 h).

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos para una suspensión comercial conteniendo estradiol y para el gel con NLC cargados con VE, al ser administrados por vía intramuscular (i.m.) y por vía subcutánea (s.c.), respectivamente (las barras representan la D.E).

Formulación	ABC (pg h mL ⁻¹)	C _{máx} (pg/mL)	t _{máx} (h)
Suspensión comercial (i.m.)	403	38	0.4
Gel con NLC cargados con VE (s.c.)	6809.8*	1514.7*	2.3*

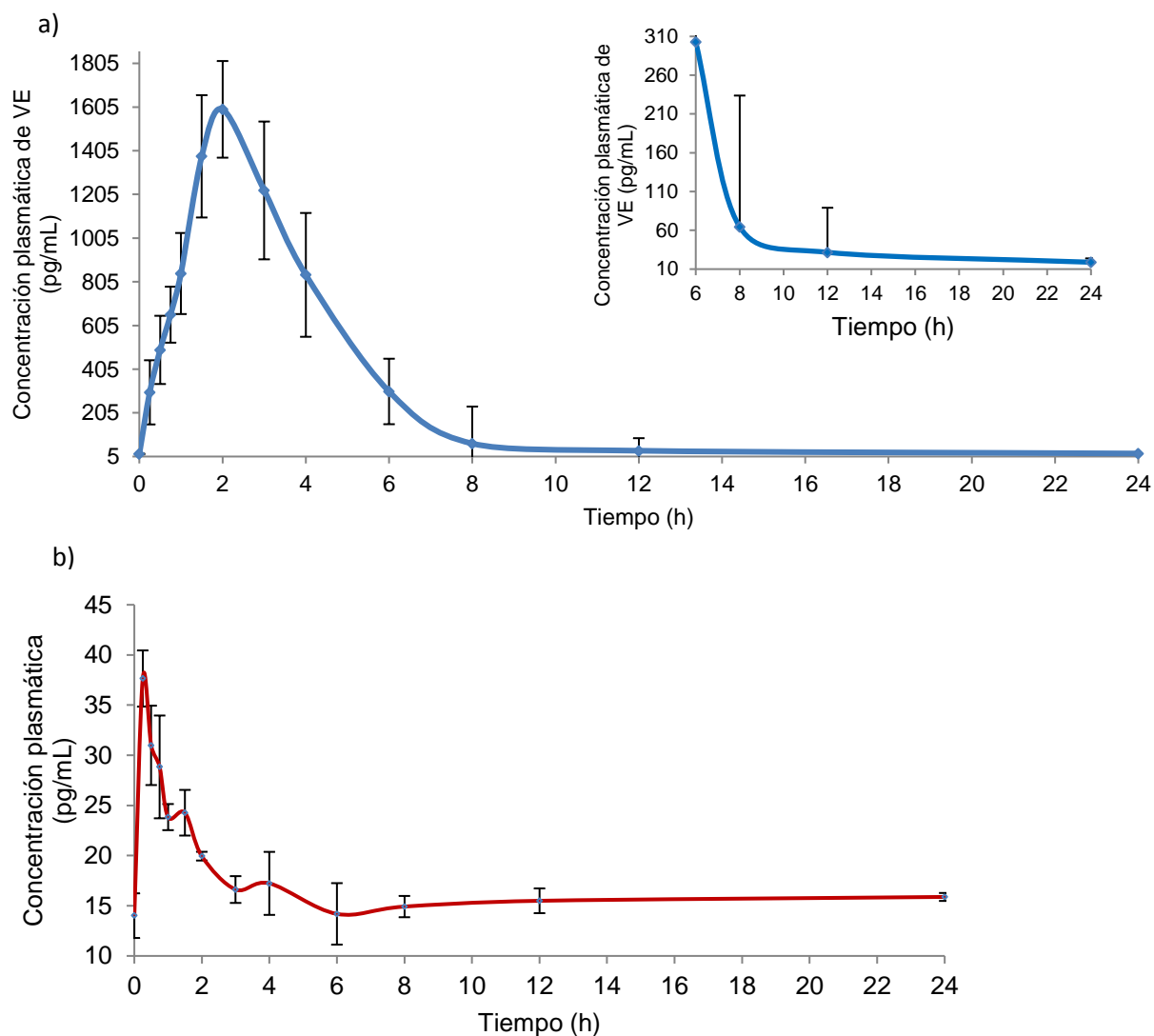


Figura 19. Perfiles de concentración plasmática vs tiempo para: a) gel con NLC cargados con VE y b) suspensión comercial.

Un resultado interesante en este trabajo es que al comparar los perfiles de liberación *in vitro* y farmacocinético, se encontró una correlación. El perfil *in vitro* presenta una liberación en tres etapas:

(i) La primera etapa coincide con el $t_{\text{máx}}$ *in vivo* observado a las 2.3 h. En la Figura 17 se puede observar que a ese tiempo $9.16 \pm 4.16 \%$ y $11.7 \pm 4.2 \%$ del VE se liberó a partir del gel con NLC cargados con VE y de los NLC cargados con VE respectivamente, sin presentar una diferencia entre estos dos valores (t_{student} suponiendo varianzas iguales: $t_{\text{exp}} = 1.109$; $t_{0.05, 6} = 2.447$). Esto es particularmente importante porque indica que, hasta el momento, el gel aún no impone un retraso en la liberación, lo que podría explicar lo que sucede *in vivo* y por qué la concentración plasmática obtenida es tan alta.

Durante este lapso (0- 2.3 h), el gel funge como una barrera, y la encapsulación del VE en NLC es suficiente como para retrasar su liberación. La alta tasa de liberación también puede ser atribuida a la presencia de fármaco en la superficie de los NLC, el cual es rápidamente liberado al medio, y como el gel es soluble en agua, esto podría haber permitido su rápida filtración al medio *in vivo* durante la formación del implante (Bode *et al.*, 2019).

(ii) La segunda etapa (4 – 12 h) muestra una diferencia en los perfiles para el gel con NLC cargados con VE y los NLC cargados con VE. En este periodo, el gel con los NLC presentó una liberación más lenta. Por su parte, en los estudios *in vivo*, la concentración plasmática disminuyó desde las 2.3 a las 8 h, con un valor promedio de 64.5 pg/mL, alcanzando 31.6 pg/mL a las 12 h.

(iii) La tercera etapa ocurre entre las 12 y 56 h, donde la liberación *in vitro* es muy lenta, mientras que en los estudios *in vivo* no hay una diferencia en la concentración plasmática entre las 12 y 24 h (20-30 pg/mL).

A pesar de que la encapsulación del fármaco en nanoacarreadores dispersos en un hidrogel de Pluronic® es una estrategia para aumentar el tiempo de residencia en el sitio de inyección, la formación de un depósito para prolongar la liberación dependerá de la fuerza del hidrogel, la cual es proporcional a la concentración del co-polímero en el sistema. Aun así, debe de tenerse en mente que un aumento en la concentración de los co-polímeros, provoca una reducción en la temperatura transición sol-gel, pudiendo tener un sistema semisólido a temperatura ambiente y con ello dificultar su administración; o si la temperatura de transición es mayor a la temperatura fisiológica, el sistema permanecerá en estado líquido, favoreciendo con ello la rápida liberación del fármaco (Din *et al.* 2015; Dimer *et al.* 2013).



La relación PF127:PF68 8:2 utilizada en este trabajo, es líquida a temperatura ambiente y gelifica entre 32 y 37 °C. Sin embargo, aunque estas condiciones parecían ser óptimas para llevar a cabo los estudios *in vivo*, para lograr una liberación prolongada evitando una liberación inicial tan alta como la observada, sería prudente evaluar la posibilidad de agregar algún otro material que mejore la resistencia y el tiempo de residencia del gel, entre ellos, materiales como quitosano, carbopol y alginato de sodio, han sido reportados con estos fines (Giuliano *et al.* 2019).

Diversos autores han obtenido resultados favorables al combinar nanoacarreadores con hidrogel de Pluronic®, por ejemplo, Dimer *et al.* (2013), prepararon nanocápsulas con núcleo lipídico de poli(ε-caprolactona) dispersas en un hidrogel de Pluronic®, para la administración intramuscular de olanzapina (un fármaco hidrofóbico); y Shen *et al.* (2015), prepararon una formulación de nanopartículas poliméricas en un gel termorreversible a base de Pluronic® F127, Pluronic® F68, HPMC, HMC y alginato de sodio, conteniendo paclitaxel, logrando su retención durante 50 días en un tumor, y consiguiendo con ello una mayor reducción del tumor en comparación con una solución del fármaco o con el fármaco en las nanopartículas.

En este trabajo se utilizó la combinación de los co-polímeros Pluronic® F127 y Pluronic® F68 como opción para controlar la liberación del fármaco, debido a que se ha reportado (Din *et al.*, 2015; Akkari *et al.*, 2016) que esta combinación permite ajustar la temperatura de transición sol-gel favoreciendo la formación del gel a la temperatura corporal además de modular el tiempo de residencia y la liberación. No obstante, de acuerdo con los resultados obtenidos, para lograr una liberación prolongada de VE formulado en NLC/hidrogel, sin el efecto burst inicial, es necesario considerar la posibilidad de combinar este gel de Pluronic® con otros componentes que permitan modular el tiempo y la velocidad de gelificación, así como su permanencia en el sitio de administración, formando un depósito a partir del cual se lleve a cabo la liberación.



CONCLUSIONES

Se formuló un implante de formación *in situ* termorreversible, que contiene nanoacarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados con valerato de estradiol. Los NLC obtenidos, presentaron buenas características en términos de tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta, y una alta eficiencia de encapsulación. Estos sistemas, además, mostraron tener la capacidad para liberar al fármaco más lentamente en comparación con una solución del mismo. Por otro lado, la formulación conocida como gel con NLC cargados con VE permitió una liberación *in vitro* aún más lenta, al formarse un gel a temperatura fisiológica, lo que sugirió que se puede formar un depósito en el sitio de administración. Los estudios *in vivo* de esta formulación comparada con la suspensión comercial presentaron diferencias importantes en los parámetros farmacocinéticos, obteniendo valores mucho más altos para la $C_{\text{máx}}$ y para el ABC del gel con NLC que con la suspensión comercial. Los resultados indican que, aunque la formulación en gel preparada contribuye a prolongar la liberación *in vitro*, es importante ajustar la formulación, al variar la proporción de los co-polímeros y/o mediante la adición de otros materiales que permitan una liberación sostenida *in vivo*, evitando una liberación inicial rápida.

PERSPECTIVAS

Evaluar otros aditivos que mejoren la resistencia y el tiempo de residencia del gel que se forme *in situ* como quitosano, HPMC, entre otros, que aseguren la formación de un depósito a partir del cual se lleve a cabo la liberación y disminuyan la liberación inicial rápida del fármaco, así como seguir el estudio de farmacocinética por un tiempo mayor.



Referencias

- (AEMPS), A. E. (febrero de 2022). *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)*. Obtenido de <http://www.aemps.gob.es/>
- ACOFARMA. (2 de 12 de 2016). *Security file*. Obtenido de <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/15986212812e7f9ed43f9114bfee18c189e8fbc574f/main/files/Estradiol%20valerato.pdf>
- Akkari, A. C., Boava Papini, J. Z., Garcia, G. K., Dias Franco, M. K., Cavalcanti, C. P., Gasperini, A., . . . de Araujo, D. R. (2016). Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 299-307.
- Alginate-pluronic topical gels loaded with thymol, norfloxacin and ZnO nanoparticles as potential wound dressings. (2020). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101960.
- Bakhshi, R., Vasheghani-Farahani, E., Mobedi, H., Jamshid, A., & Khakpour, M. (2006). The effect of additives on naltrexone hydrochloride release and solvent removal rate from an injectable in situ forming PLGA implant. *Polymers for advanced technologies*, 1(17), 354-359.
- Barichello, J., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug development and industrial pharmacy*, 25(4), 471-476.
- Berteau, C., Felipe-Santos, O., Wang, T., Rojas, H., Granger, C., & Schwarzenbach, F. (2015). Evaluation of the impact of viscosity, injection volume, and injection flow rate on subcutaneous injection tolerance. *Medical Devices: Evidence and Research*, 8, 473-484.
- Bode, C., Kranz, H., Kruszka, A., Siepmann, F., & Siepmann, J. (2019). In-situ forming PLGA implants: How additives affect swelling and drug release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101180.
- Bodratti, A. M., & Alexandridis, P. (2018). Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(11), 1-24.
- Borges, A., de Freitas, V., Mateus, N., Fernandes, I., & Oliveira, J. (2020). Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 9(998), 1-24.
- Brodbeck, K. J., Pushpala, S., & McHugh, A. J. (1999). Sustained release of human growth hormone from PLGA solution depots. *Pharmaceutical Research*, 16(12), 1825-1829.
- Brusco, C. R. (2015). Marcadores biológicos en el cáncer de mama. *Revista Argentina de Mastología*, 34(124), 67-109.

- Burgess, D. J., & Wright, J. C. (2012). An Introduction to Long Acting Injections and Implants. En C. R. Society, *Long Acting Injections and Implants, Advances in Delivery Science and Technology* (págs. 1-10). Nueva York: Springer.
- Buyanaa, B., Aderibigbe, B., Ndintehb, D., Fonkui, Y., & Kumar, P. (2020). Alginate-pluronic topical gels loaded with thymol, norfloxacin and ZnO nanoparticles as potential wound dressings. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101960.
- Chaibundit, C., Ricardo, N. M., Ricardo, N. M., Muryn, C. A., Madec, M.-B. Y., & Booth, C. (2010). Effect of ethanol on the gelation of aqueous solutions of Pluronic F127. *Journal of Colloid and Interface Science*(351), 190-196.
- Chitkara, D., Shikanov, A., Kumar, N., & Domb J., A. (2006). Biodegradable injectable in-situ depot-forming drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*, 6, 977-990.
- Cilurzo, F., Selmin, F., Minghetti, P., Adami, M., Bertoni, E., Lauria, S., & Montanari, L. (2011). Injectability Evaluation: An Open Issue. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(1), 604-609.
- Das, S., Wai, K. N., & Reginald BH, T. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *European Journal of Pharmaceutical Science*, 47, 139-151.
- DesNoyer, J., & McHugh, A. (2013). The effect of Pluronic on the protein release kinetics of an injectable drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 86(1), 15-24.
- Dimer, F. A., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2013). Characterization of rheology and release profiles of olanzapine-loaded lipid-Core Nanocapsules in Thermosensitive hydrogel. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(8), 144-153.
- Din, F., Mustapha, O., Kim, D. W., Rashid, R., Park, J. H., Choi, Y., . . . Choi, H.-G. (2015). Novel dual-reverse thermosensitive solid lipid nanoparticle-loaded hydrogel for rectal administration of flurbiprofen with improved bioavailability and reduced initial burst effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 64-72.
- Dong In, H., Sang Bong, L., Moo Sang, C., & Young Moo, L. (s.f.). Preparation of Thermo-Responsive and Injectable Hydrogels Based on Hyaluronic Acid and Poly(N-isopropylacrylamide) and their drug release behaviors. *Macromolecular Research*, 14(1), 87-93.
- Escobar-Chávez, J. J., López-Cervntes, M., Naik, A., Kalla, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., & Ganem-Quintanar, A. (2006). Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in

- Pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 9(3), 339-358.
- Escobar-Chávez, J. J., Quintanar-Guerrero, D., & Ganem-Quintanar, A. (2005). In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in Pluronic F-127 gels: Effect of Azone and Transcutol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(1), 447-454.
- Giuliano, E., Paolino, D., Fresta, M., & Cosco, D. (2019). Drug-Loaded Biocompatible Nanocarriers Embedded in Poloxamer 407 Hydrogels as Therapeutic Formulations. *Medicines*, 6(7).
- Guo, T., Zhang, Y., Zhao, J., Zhu, C., & Feng, N. (2015). Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from *Aconitum sinomontanum*. *Journal of Nanotechnology*, 13(47), 1-14.
- Hafeti, A., & Amsden, B. (2002). Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 80, 9-8.
- He, C., Kim, S. W., & Lee, D. S. (2008). In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of controlled release*, 127(3), 189-207.
- Hochstatter, A., & Gutierrez Flores, C. (2000). Climaterio y Menopausia. *Revista Médica*, 2(18), 14-26.
- INEGI. (26 de Mayo de 2016). *Estadísticas de Mortalidad*. Recuperado el 08 de octubre de 2016, de Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido:
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- International Agency for Research on Cancer. (25 de Septiembre de 2012). *IARC Monographs*. (W. IARC, Ed.) Recuperado el 04 de Diciembre de 2015, de IARC MONOGRAPHS VOLUME 100 A : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/mono100A-17.pdf>
- Kempe, S., Schreier, B., Ruhs, S., Wollert, I., Teixeira, M., Gekle, M., & Mäder, K. (2013). Development and Noninvasive Characterization of Hormone Releasing In Situ Forming Implants. *Macromolecular Symposia*, 334(1), 98-105.
- Khateb, K. A., Ozhmukhametova, E. K., Mussin, M. N., Seilkhanov, S. K., Rakhypbekov, T. K., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2016). In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 502(1-2), 70-79.

- Loose, D. S., & Stancel, G. M. (2007). Estrógenos y Progestágenos. En G. & Gilman, *Las bases farmacológicas de la TERAPÉUTICA* (Undécima ed., págs. 1541-1572). Colombia: McGraw-Hill Interamericana.
- López García, M. d. (2014). Preparación y caracterización de nanopartículas lipídicas y evaluación de su efecto sobre las propiedades de la barrera de la piel. *Tesis de Maestría*. FES-C/UNAM.
- Malvern Instruments Ltd. (2004). *User Manual*. United Kingdom: Zetasizer Nano Series.
- Martín Azaña, M., & Iglesias Goy, E. (1999). Terapia hormonal sustitutiva en la menopausia. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 23(2), 33-44.
- Matamoro, D. L. (2012). *Colecciones de Guías de Prácticas Clínicas-OSECAC*. Recuperado el 11 de julio de 2016, de http://www.osecac.org.ar/documentos/guias_medicas/GPC%202008/Ginecologia/Gin-44%20Terapia%20Hormonal%20de%20Reemplazo_v1-12.pdf
- Moreta Hernández, L., & Malacara Hernández, J. M. (2006). Condiciones metabólicas y hormonales en la menopausia. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14(3), 149-155.
- Müller, R., Petersen, R., Hommoss, A., & Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 522-530.
- Müller, R., Radtke, M., & Wissing, S. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery*, 54(S1), S132-S155.
- Nie S, W. H. (2011). Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 151–166.
- Olgúin, Y., Campos, C., Catalán, J., Velásquez, L., Osorio, F., Montenegro, I., . . . Cristian. (2017). Effects of Liposomes Contained in Thermosensitive. *Materials*, 1-16.
- Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and Pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, 170-184.
- Park, K. (2014). The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back. *Journal of Controlled Release*, 190, 3-8.
- Patel, D. P., Li, P., & Serajuddin, A. T. (2012). Enhanced microemulsion formation in lipid-based drug delivery systems by combining mono-esters of medium-chain fatty acids with di- or tri-esters. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 2(3), 29-44.



- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Sexta ed.). Londres: Pharmaceutical Press.
- Ruan, X., & Mueck, A. O. (2022). Optimizing menopausal hormone therapy: for treatment and prevention, menstrual regulation, and reduction of possible risks. *Global Health Journal*, 1-9.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. *Journal of Physical Science*, 25(1), 59-75.
- Shen, M., Xu, Y.-Y., Sun, Y., Han, B.-S., & You-Rong, D. (2015). Preparation of a Thermosensitive Gel Composed of a mPEG-PLGA-PLL-cRGD Nanodrug Delivery System for Pancreatic Tumor Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(37), 20530–20537.
- Shi, Y., Zhang, X., Li, J., Wang, Z., Cheng, S., Chen, L., . . . Ni, J. (2013). Preparation and pharmacokinetics of an injectable thermosensitive hydrogel of diminazene aceturate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 23(6), 531–536.
- Singh Thakur, R. R., McMillan, H. L., & Jones, D. S. (2014). Solvent induced phase inversion-based in situ forming controlled release drug delivery implants. *Journal of Controlled Release*(176), 8-23.
- Soules, M. R., Sherman, S., Parrott, S., Rebar, R., Santoro, N., Utian, W., & Woods, N. (2001). Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertility and Sterility*, 76(5), 874-878.
- Sowers, M. (2000). 92 - Menopause: Its Epidemiology. *Women and Health*, 1155-1168.
- Strappe, P. M., Hampton, D. W., Cachon-Gonzalez, B., Fawcett, J. W., & Lever, A. (2005). Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61(3), 126-133.
- WHO technical report series. (1994). *WHO Scientific Group on Research on the Menopause in the 1900's*. Geneva: WHO Library Cataloguing in Publication Data.
- Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257-1272.
- Yabin, S., Xiaoyun, Z., Jianyoung, L., Zuoneng, W., Sen, C., Liangang, C., . . . Jingman, N. (2013). Preparation and Pharmacokinetics of an injectable thermosensitive hydrogel of diminazene aceturate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 23(6), 531-536.



- Yoo, J.-W., & Lee, C. H. (2006). Drug delivery systems for hormone therapy. *Journal of Controlled Release*, *112*, 1-14.
- Yun, Y., Lee, B. K., & Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: the next 30 years. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, *8*(3), 276-279.
- Zhang, C., Peng, F., Liu, W., Wan, J., Wan, C., Xu, H., . . . Yang, X. (2014). Nanostructured lipid carriers as a novel oral delivery system for triptolide: induced changes in pharmacokinetics profile associated with reduced toxicity in male rats. *International Journal of Nanomedicine*, *9*, 1049–1063.
- Zhang, X.-W., Zhang, C., Zhang, W., Yang, D., Meng, S., Wang, P., . . . Liu, D.-H. (2015). Suppression of spermatogenesis by testosterone undecanoate-loaded injectable in situ forming implants in adult male rats. *Asian Journal of Andrology*, *17*, 1-7.

ANEXOS

ANEXO 1. Validación de métodos analíticos.

El propósito de realizar la validación de métodos analíticos es cuantificar el valerato de estradiol de manera confiable en solución, por lo que se evaluaron parámetros como: linealidad, exactitud, precisión y repetibilidad, basándose en la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C (CNQFBM).

La cuantificación de fármaco se hizo por espectrofotometría UV-Vis a $\lambda = 281$ nm que corresponde a su longitud de onda de máxima absorción.

De manera general las validaciones se hicieron de la siguiente manera:

Preparación de la curva estándar

Realizar la curva utilizando un estándar (STD) de valerato de estradiol (pureza 98%) en una solución adecuada. La solución madre se preparó de la siguiente manera: se pesaron 10 mg de STD en una microbalanza y se diluyeron en 100 mL de solución para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Se tomó cierto volumen de la solución inicial para preparar 5 puntos con concentraciones de 5, 10, 40, 60 y 90 $\mu\text{g/mL}$; cada punto se preparó por triplicado.

Exactitud

Se hicieron 6 pesadas independientes de aproximadamente 1 mg de STD y se diluyeron en 25 mL de solución.

Precisión

A partir de una solución stock de 100 $\mu\text{g/mL}$ se preparó por sextuplicado el punto medio de la curva estándar (40 $\mu\text{g/mL}$) en dos días diferentes.

Repetibilidad

A partir de una solución stock de 100 $\mu\text{g/mL}$ se preparó por sextuplicado tres puntos de la curva estándar bajo, medio y alto (5, 40 y 90 $\mu\text{g/mL}$).



Límite de detección (LD)

Se hizo con base en la curva estándar y desviación estándar de los blancos (5 blancos diferentes). El límite de detección se calculó con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3x Sb}{b}$$

Sb= Desviación estándar de los blancos

b= Valor de la pendiente de la curva estándar

Límite de cuantificación (LQ)

Se hizo con base en la curva estándar y desviación estándar de los blancos (5 blancos diferentes). El límite de detección se calculó con la siguiente ecuación:

$$LQ = \frac{10 x Sb}{b}$$

Sb= Desviación estándar de los blancos

b= Valor de la pendiente de la curva estándar

1. Validación del método analítico para la cuantificación de valerato de estradiol en los estudios de liberación *in vitro*.

El medio utilizado es solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, Tween® 20 al 8 % y etanol al 8 %, para asegurar la solubilización completa del valerato de estradiol.

En la Tabla 13 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva de calibración por triplicado además de la desviación estándar (D.E), coeficiente de variación (CV), linealidad (R²), pendiente y ordenada al origen. En las Tablas 14, 15 y 16 los resultados de la exactitud, precisión y repetibilidad respectivamente.

Tabla 13. Valores de absorbancia para la curva estándar en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, Tween® 20 al 8% y etanol al 8%.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
5.02	0.0389	0.036	0.0353
10.05	0.0708	0.0696	0.0674
40.20	0.2457	0.2445	0.2438
60.30	0.3624	0.3644	0.36
90.44	0.5411	0.5396	0.5387

DE	0.0006
CV	9.1
R ²	0.9999
Pendiente	0.0059
Ordenada al origen	0.0086

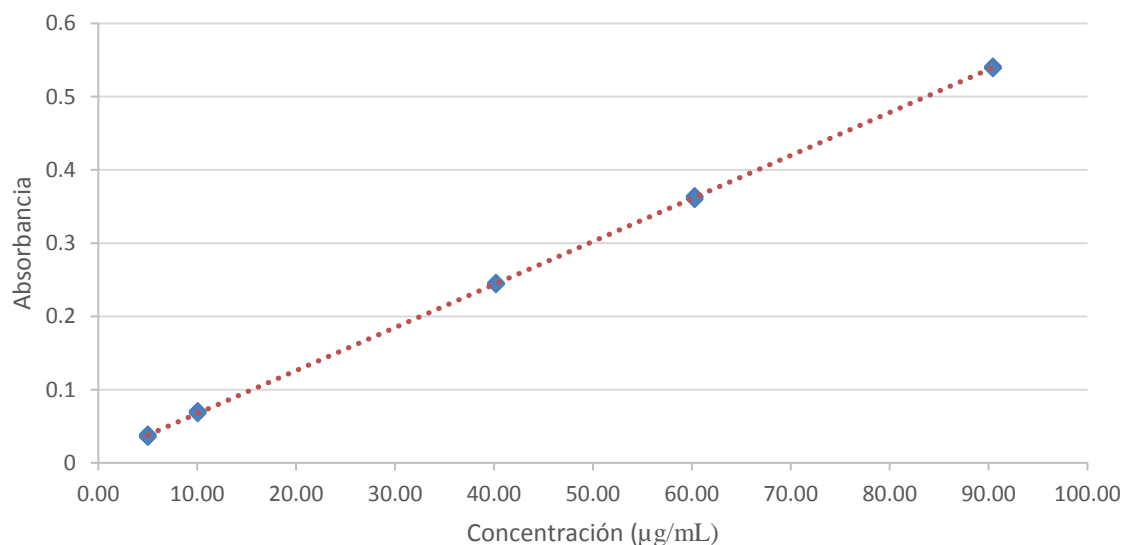


Figura 20. Curva de calibración de valerato de estradiol en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, Tween® 20 al 8% y etanol al 8%.



Tabla 14. Resultados de la evaluación de la exactitud.

Muestra	Peso de valerato de estradiol (mg)	Absorbancia	Concentración (µg/mL)	% Recobro
1	1.05	0.2487	41.16	98.87
2	1.15	0.2746	45.08	100.01
3	0.895	0.2176	35.084	100.97
4	1.37	0.3297	53.704	101.33
5	1.05	0.2514	41.16	99.98
6	0.97	0.2382	38.024	102.34

Tabla 15. Resultados de la evaluación de la precisión.

Concentración (µg/mL)	Día 1	Día 2
	Absorbancia	Absorbancia
40.20	0.2424	0.2407
40.20	0.245	0.2422
40.20	0.2481	0.2436
40.20	0.2494	0.2476
40.20	0.2488	0.2427
40.20	0.2451	0.2473

Tabla 16. Resultados de la evaluación de la repetibilidad.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia	Pendiente
5.02	0.0329	0.00655
5.02	0.0312	0.00621
5.02	0.0326	0.00649
5.02	0.0323	0.00643
5.02	0.0308	0.00613
5.02	0.0317	0.00631
40.20	0.2465	0.00613
40.20	0.2451	0.00610
40.20	0.2468	0.00614
40.20	0.2416	0.00601
40.20	0.2438	0.00607
40.20	0.2460	0.00612
90.44	0.5500	0.00608
90.44	0.5470	0.00605
90.44	0.5452	0.00603
90.44	0.5415	0.00599

90.44	0.5422	0.00599
90.44	0.5479	0.00606

2. Validación del método analítico para la cuantificación de valerato de estradiol para la tasa de encapsulación de NLC.

El medio utilizado es etanol.

En la Tabla 17 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva de calibración por triplicado además de la desviación estándar (D.E), coeficiente de variación (CV), linealidad (R^2), pendiente y ordenada al origen. En las Tablas 18, 19 y 20 los resultados de la exactitud, precisión y repetibilidad respectivamente.

Tabla 17. Valores de absorbancia para la curva estándar en etanol.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
4.97	0.0221	0.0226	0.0227
9.94	0.0553	0.0550	0.0532
39.77	0.2322	0.2338	0.2314
59.66	0.3455	0.3454	0.3475
89.48	0.5219	0.5256	0.5280

DE	0.00053
CV	9.7
R^2	0.9999
Pendiente	0.0054
Ordenada al origen	0.0059

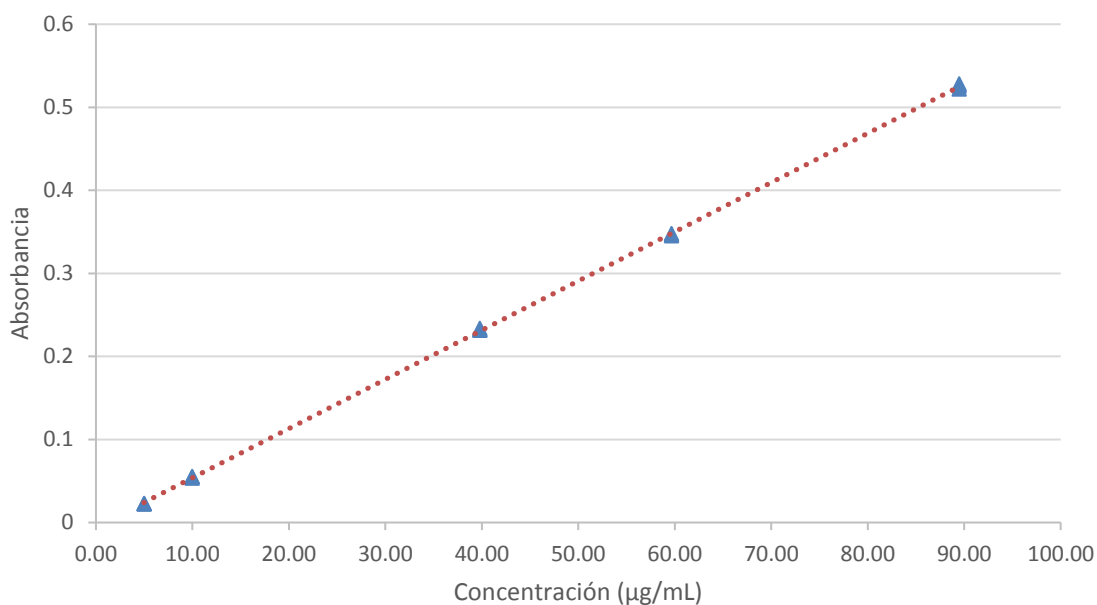


Figura 21. Curva de calibración de valerato de estradiol en etanol.

Tabla 18. Resultados de la evaluación de la exactitud.

Muestra	Peso de valerato de estradiol (mg)	Absorbancia	Concentración (µg/mL)	% Recobro
1	1.175	0.2701	46.06	101.38
2	0.935	0.2111	36.65	100.12
3	1.75	0.4012	68.60	100.46
4	1.23	0.2727	48.22	97.76
5	1.27	0.2939	49.78	101.90
6	1.035	0.241	40.57	102.93

Tabla 19. Resultados de la evaluación de la precisión.

Concentración (µg/mL)	Día 1	Día 2
	Absorbancia	Absorbancia
41.80	0.2422	0.2404
41.80	0.2414	0.2416
41.80	0.2405	0.241
41.80	0.2401	0.2418
41.80	0.2414	0.2409
41.80	0.2418	0.2413



Tabla 20. Resultados de la evaluación de la repetibilidad.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Pendiente
5.03	0.0317	0.00630
5.03	0.0323	0.00642
5.03	0.0326	0.00648
5.03	0.0322	0.00640
5.03	0.0325	0.00646
5.03	0.0323	0.00642
40.27	0.2465	0.00612
40.27	0.2475	0.00615
40.27	0.2479	0.00616
40.27	0.2468	0.00613
40.27	0.2473	0.00614
40.27	0.2476	0.00615
90.62	0.5429	0.00599
90.62	0.5658	0.00624
90.62	0.5612	0.00619
90.62	0.561	0.00619
90.62	0.5665	0.00625
90.62	0.5555	0.00613

3. Validación del método analítico para la cuantificación de valerato de estradiol para los estudios de liberación *in vivo*.

Reader Type: Elx800

Plate Type: 96 Weel plate

Read: Absorbance Endpoint, Full Plate, Wavelengths 450, read speed normal

Tabla 21. Curvas de calibración

Concentración (pg/mL)	LOG Concentración	Abs 01	Abs 02	Abs 03	Abs 04	Abs 05	Promedio	SD
0		2.380	2.159	2.514	2.44	3.09	2.517	0.347
10	1.00	2.122	1.863	2.322	2.212	2.914	2.287	0.390
30	1.48	1.792	1.636	2.02	1.886	2.531	1.973	0.342
100	2.00	1.270	1.131	1.3	1.191	1.595	1.297	0.179
300	2.48	0.651	0.548	0.679	0.614	0.799	0.658	0.093
1000	3.00	0.142	0.138	0.14	0.137	0.204	0.152	0.029

Tabla 22. Resultados estadísticos de las curvas

	Abs 01	Abs 02	Abs 03	Abs 04	ABS 05	Promedio
A	-1.020	-0.908	-1.142	-1.085	-1.431	-1.117
B	3.227	2.871	3.565	3.368	4.458	3.498
R ²	0.992	0.984	0.990	0.992	0.988	0.990

Tabla 23. Puntos controles

Control	Muestra	ABS	LOG concentración	Concentración (pg/mL)	%RSD
MCB 10 pg/mL	1	2.132	1.22	16.69	66.878
	2	2.167	1.19	15.53	55.264
	3	2.087	1.26	18.31	83.095
MCM 100 pg/mL	1	1.333	1.94	86.61	-13.389
	2	1.316	1.95	89.70	-10.301
	3	1.256	2.01	101.51	1.507
MCA 300 pg/mL	1	0.565	2.62	421.70	40.565
	2	0.618	2.58	378.06	26.020
	3	0.670	2.53	339.64	13.212



ANEXO 2. Presentaciones en eventos especializados

- ✓ Asistencia al V Congreso Internacional de Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las Disciplinas. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. 28, 29 y 30 de septiembre del 2016. Presentación de cartel: “Formulación y caracterización de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) para la liberación sostenida de estradiol”.
- ✓ Ponencia compartida: “Nanoacarreadores y promotores de permeación físicos”. 5ta Reunión de exalumnos de la carrera de QFB. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 27 de abril de 2017.
- ✓ Ponencia: “Optimización del Método de Preparación de NLC, para el Encapsulamiento de Valerato de Estradiol”. 3er Congreso en Ciencia, Educación y Tecnología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1. 19, 20, 21 y 22 de junio de 2017.
- ✓ Asistencia al Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas AFM. Tequila Jalisco, México. 03 al 07 de septiembre de 2017. Presentación de cartel: “Preparación y caracterización de un implante de formación *in situ* para la liberación de Estradiol”.
- ✓ Asistencia al Congreso Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference 2017. Roma, Italia. 18, 19 y 20 de octubre de 2017. Presentación de cartel: “Development of a thermo-reversible *in situ* forming implant associated with Nanostructured Lipid Carriers (NLC) as sustained delivery system for estradiol valerate”.
- ✓ Ponencia: “Nanosistemas lipídicos para la liberación de fármacos a través de piel”. 6to Encuentro Estudiantil de Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 28 de noviembre de 2017.
- ✓ Asistencia al Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas AFM. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 31 octubre al 03 de septiembre de 2018. Presentación de cartel: “Elaboración de un implante de *formación in situ* termo-reversible para la liberación de estradiol”.

**ANEXO 3. Artículo científico**

Pineda-Hernández, M.T; Pérez-Urizar. J.T; Ganem-Rondero, A. (2020). Thermo-reversible in situ forming implant with nanostructured lipid carriers (NLC) as a delivery system for the administration of estradiol valerate. *Drug Delivery and Translational Research*. 10 (5): 1393-1402.

<https://doi.org/10.1007/s13346-019-00704-4>



Thermo-reversible in situ forming implant with nanostructured lipid carriers (NLC) as a delivery system for the administration of estradiol valerate

María Teresa Pineda-Hernández¹ · José Trinidad Pérez-Urizar² · Adriana Ganem-Rondero¹

© Controlled Release Society 2020

Abstract

A thermo-reversible in situ forming implant, based on the combination of Pluronic® F-127 and Pluronic® F-68 with nanostructured lipid carriers (NLC), was formulated with the aim of achieving the sustained release of estradiol valerate (EV). EV-loaded NLC, prepared by the hot high-pressure homogenization technique, presented an entrapment efficiency of $90 \pm 2.9\%$, a particle size (PS) of 122 ± 11.2 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.344 ± 0.07 , and a zeta potential (ZP) of -10.5 ± 1.3 mV. Once obtained, NLC were then included in a thermo-reversible gel (EV-loaded NLC gel), which was characterized by its rheological behavior, gelation temperature, and injectability. The in vitro release tests showed that the EV-loaded NLC gel delayed the release significantly, in comparison with a solution of the drug and with the EV-loaded NLC. The EV-loaded NLC gel and a commercially available suspension containing estradiol were administered parenterally to rabbits. A 16.8-fold greater AUC and a 40-fold higher C_{max} were obtained with the EV-loaded NLC gel, compared to the commercial suspension. A rapid initial release of EV in vivo, from the EV-loaded NLC gel, suggests that it is necessary to adjust the ratio of the copolymers or to include in the gel an additive that improves gelation time and gel strength, in order to achieve a sustained release. An interesting observation was that the in vitro profile, which has a three-phase behavior, coincides with what was observed in the in vivo study.

Keywords Estradiol valerate · Nanostructured lipid carriers · Thermo-reversible · Hormone, replacement therapy · Pluronic

Introduction

Estrogen replacement therapy in postmenopausal women has been widely used not only to relieve climacteric symptoms but also due to the beneficial effects for the prevention of osteoporosis and cardiovascular diseases. Different systems have been proposed for the administration of hormones, through a number of routes, seeking to achieve a sustained release, with constant plasma levels, which allows reducing the dosage frequency. The effect of these systems depends on the characteristics of the formulation (i.e., composition, physical form, and

functional properties) and the route of administration. Oral dosage forms were for many years the most commonly used for the administration of hormones; however, alternative modes such as transdermal patches, subcutaneous implants, topical gels, and creams have become increasingly common due to the advantages and comfort they offer to patients [1, 2]. Generally, oral administration of hormones is done daily, so the patient must adhere to this regimen. The same goes for topical semisolid forms, e.g., gels. Furthermore, although in the latter case there are dosing containers, the application area is difficult to control. Therefore, it is desirable to have alternatives with less frequent administrations. Such is the case for patches, easy to place and remove (if necessary), where the dose and the area of application are perfectly controllable. The recommendation for patches with estradiol is that they should be changed every 3 to 4 days. Some inconveniences that patients have reported with the use of patches are that sometimes they tend to peel off, presence of moisture in the area, glue residues which must be cleaned when removing the patch and some rare cases of irritation [3, 4]. That is why systems have been proposed that release for longer periods of time, in an

✉ Adriana Ganem-Rondero
ganemq@hotmail.com

¹ División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 54740 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Mexico

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

effort to offer the patient a more comfortable scheme, with constant plasma concentrations throughout the period. Although solid implants have the advantage that a long-lasting release time can be achieved, placement at the release site involves making an incision, which may represent some degree of discomfort for patients. In addition, they may present some side effects such as inflammation at the site of application, fibrosis, and reaction against a foreign body. That is why researchers have looked for simpler application systems, such as in situ forming implants (IFI) [5, 6]. There are different types of IFIs, which are classified according to the way they solidify, e.g., in situ cross-linked systems, in situ phase separation systems, thermoplastic pastes, and in situ solidifying organogels [5]. One of the great challenges of these systems is the initial burst drug release. To overcome this drawback, various strategies have been used such as the inclusion of some additives and the use of high molecular weight polymers or concentrated polymer solutions [6, 7]. The problem with the last two options is that formulations are usually very viscous and therefore difficult to inject. Some authors such as Dong et al. [8] prepared IFIs based on PLGA, reducing the initial burst release, by incorporating lipids.

To obtain an IFI, it is possible to use temperature-responsive hydrogels, such as those based on poloxamers, which are triblock copolymers of poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide)–poly (ethylene oxide) (PEO–PPO–PEO), which exhibits phase transitions from sol to gel as a function of temperature [9]. They are fluid at room temperature, which allows them to be easily injected into tissues or cavities of the body, gelling at body temperature, allowing a localized and sustained release of drugs [10]. However, despite the numerous advantages offered by these hydrogels, such as being GRAS (generally recognized as safe) excipients and being compatible with various molecules and excipients, the rapid release of drugs limits their application when a prolonged action is sought [11]. Furthermore, low rates of incorporation are obtained in the case of hydrophobic compounds. Then, it could be thought that the combination of both nano- and gel technologies would allow incorporating a greater amount of drug, would help reduce the burst effect, and would prolong the release [12–15].

That is why this paper proposes the incorporation of estradiol valerate in lipid nanoparticles, particularly in the so-called nanostructured lipid carriers (NLC), which are drug delivery systems produced by using a blend of solid and liquid lipids. These systems have several advantages in relation to other nanocarriers, such as having a high loading capacity, reduction of the expulsion of the drug during storage, avoid the use of organic solvents during manufacturing, possibility of achieving a sustained release, and biodegradation, among others [16–18]. Therefore, it is expected that the subsequent incorporation of the NLC loaded with estradiol in a poloxamer gel would allow obtaining an easy administration system,

which, when gelled by the effect of body temperature, releases the drug slowly. The in vivo behavior of the proposed formulation was compared with that of a commercial formulation composed of a suspension of estradiol in microspheres, which is indicated to be administered intramuscularly every 30 days (after reaching the maximum plasma concentration, it decreases, maintaining concentrations between 20 and 35 pg/ml during the 30 days) (https://www.medicamentosplm.com/Home0/productos/juvenum_e_suspension/35/101/542_91/194, accessed October 10, 2019).

Materials and methods

Materials

β -Estradiol 17-valerate ≥ 98 %, Pluronic® F 68, Pluronic® F 127, and ethanol absolute for HPLC ≥ 99.8 %, were all purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); Capryol™ 90 and Precirol® ATO 5 (Gattafossé, SAINT PRIEST Cedex, France) were kindly donated by Químicos Lyontec (CDMX, Mexico); Cremophor® RH 40 was a donation from Acofarma (CDMX, Mexico); Tween® 20 was acquired in Droguería Cosmopolita (Estado de México, Mexico).

Preparation of NLC

Nanostructured lipid carriers (NLC) were prepared by a hot high-pressure homogenization technique. Briefly, estradiol valerate (EV) was dissolved in an oil phase containing a mixture of solid and liquid lipids (Precirol® ATO 5:Capryol™ 90, 80:20) and was heated at 90 °C. Then, an aqueous solution containing a surfactant (Cremophor® RH 40 1% w/w), at 90 °C, was poured into the lipid phase and mixed with a rotor stator disperser (IKA® T18 Digital Ultra Turrax®, Wilmington, NC, USA) at 20,000 rpm for 5 min. This emulsion was cooled at 4 °C for 5 min under constant magnetic stirring, to obtain the NLC dispersion. The same procedure was used to prepare placebo formulations, omitting the addition of the drug.

Characterization of NLC

Measurements of particle size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP)

To make these determinations, the NLC suspension was diluted in half with distilled water. The particle size (PS) and the polydispersity index (PDI) were measured by dynamic light scattering (DLS) and the zeta potential (ZP) by electrophoretic mobility with a Zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), at 90° scattering angle at 25 °C. The measurements were made in triplicate for each sample.

Entrapment efficiency (EE) and drug-loading capacity (DL)

The free drug and the drug included in the NLCs were separated by centrifugation. It is important to mention that several tests were done (data not included), in order to determine the optimal conditions of time and speed of centrifugation, in such a way that the NLC (with a low density) were dispersed in the supernatant and the drug (insoluble in aqueous medium) sedimented. The procedure was the following: A volume of NLC dispersion was centrifuged at 12,000 rpm for 2 h with a centrifuge Z326k, HERMLE, Labor Technik GmbH (Wehingen Germany). The supernatant (containing the NLCs) was centrifuged twice more, under the same conditions, in order to ensure that all the free drug sedimented. Subsequently, the supernatant was taken, and 3 mL of ethanol was added to break the NLC. This mixture was sonicated for 20 min (Sonicator 8891, Cole-Parmer, IL, USA) and then centrifuged for 30 min at 12,000 rpm. The pellet was washed with 3 ml of ethanol, sonicating and centrifuging twice more. The ethanol solution was filtered and appropriately diluted to measure its absorbance by UV spectrophotometry (Spectrophotometer U-5100, Hitachi, USA) at the maximum absorption wavelength of EV (281 nm) [19]. The drug content was determined from a calibration curve using ethanol as a dissolution medium, making the readings at 281 nm. This method was previously validated ($y = 0.0059x - 0.0054$; $R^2 = 0.9999$; intermediate precision: $CV = 0.25$; repeatability: $CV = 2.27$; accuracy: $CV = 1.77$, % recovery = 100.76; $LD = 0.42 \mu\text{g/ml}$; $LQ = 1.26 \mu\text{g/ml}$). The entrapment efficiency (EE%) and the drug-loading capacity (DL) were calculated according to the following equations:

$$EE\% = \frac{EV \text{ encapsulated (mg)}}{EV \text{ initial (mg)}} \times 100$$

$$DL = \frac{EV \text{ encapsulated (mg)}}{\text{Total weight of NLC (g)}}$$

where:

EV_{initial} amount of drug added to prepare the NLC
 $EV_{\text{encapsulated}}$ amount of drug in the ethanol solution

Transmission electron microscopy (TEM)

A drop of the NLC suspension was placed on a coated grid, removing the excess of suspension with the aid of a filter paper, allowing it to dry for 1 hour. Then, a drop of phosphotungstic acid (1% w/v) was added to the grid, leaving it in contact for 1 min and absorbing the excess of the solution with a filter paper. The sample was allowed to dry before being examined by TEM (Transmission electron microscope, JEOL 2010 200kv).

Differential scanning calorimetry (DSC)

For DSC measurements (DSC Q20, TA, New Castle, DE, USA), the individual components of the NLC (i.e., EV, liquid and solid lipids, and surfactant), as well as mixtures of the components with the drug, were placed in hermetic aluminum pans (3–5 mg). The heating rate of the DSC scanning was $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ in a range of $0\text{--}350 \text{ }^\circ\text{C}$.

In vitro drug release study from EV-loaded NLC

In vitro drug release studies of EV-loaded NLC were performed by the dialysis bag technique using 100 kD CE membrane (Spectra/Por® Dialysis Membrane, Biotech CE tubing). One milliliter of EV solution or EV-loaded NLC dispersion containing 1 mg of EV were placed in the CE membrane and immersed in 10 mL of PBS pH 7.4 containing 8 % Tween® 20 and 8 % ethanol to maintain sink conditions. The systems were kept at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ under constant stirring. Samples were taken at predetermined time intervals, replacing the volume withdrawn with fresh medium. The test was performed in quadruplicate. The amount of drug released was determined by a UV spectrophotometric method, constructing a calibration curve in the dissolution medium (8% Tween® 20 and 8% ethanol in PBS pH 7.4), measuring the absorbance at 281 nm, with a spectrophotometer U-5100, Hitachi (Tokyo, Japan). This method was validated, obtaining the following data: $y = 0.0059x + 0.0086$; $R^2 = 0.9999$; intermediate precision: $CV = 1.15$; repeatability: $CV = 2.77$; accuracy: $CV = 1.21$, % recovery = 100.58; $LD = 1.69 \mu\text{g/ml}$; and $LQ = 3.59 \mu\text{g/ml}$.

Preparation of gels

Gels were prepared by the well-known cold method [20], dispersing Pluronic® F 127 (PF 127) and Pluronic® F 68 (PF 68) in different proportions 8:2, 8.5:1.5, and 9:1. All the formulations had a total concentration of Pluronic of 20% (w/v). The dispersing medium changed depending on the system, being distilled water for the control gel, NLC dispersion without drug for placebo gel, and EV-loaded NLC dispersion for the EV-loaded NLC gel.

Characterization of gels

Viscosity

A viscosity vs. temperature profile was performed, for control gels and for placebo gels, from $5 \text{ }^\circ\text{C}$ to $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperature ramp from $5 \text{ }^\circ\text{C}$ to $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $2 \text{ }^\circ\text{C/min}$; temperature ramp from $30 \text{ }^\circ\text{C}$ to $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $1 \text{ }^\circ\text{C/min}$) using a digital plate viscometer (CAP200, Brookfield, USA) with the spindle no. 1 at 50 rpm (shear rate 666.7 s^{-1}). Samples of all proportions of PF127:PF 68 were analyzed in triplicate.

Gelation temperature

The gelation temperature was determined using the visual tube inversion method. Briefly, 1 mL of each formulation (control gel and placebo gel, in duplicate) was placed in flat tubes, increasing the temperature by 1 °C every 5 min, with the help of a water bath starting from 20 °C. Tubes were turned upside down at different time intervals to determine the point at which the medium did not flow at all, considering this point as the gelation temperature. Temperature was measured with a digital thermometer.

Injectability

In order to control the speed of injection, 1 mL of placebo gel was placed in an insulin syringe (DL MEDICA S.A DE C.V., Mexico) with a 27 G × 13 mm needle. Then, the syringe was set upon the single-syringe infusion pump (115 VAC, Cole-Parmer, IL, USA), and the gel was injected at a speed of 1.2 mL/min at 27 °C.

In vitro drug release study from the EV-loaded NLC gel

The EV-loaded NLC gel was heated to 37 °C to promote gel formation (remembering that at room temperature Pluronic is in a fluid form, while at body temperature, it gels). Once the gel was formed, it was placed inside the CE dialysis membrane, following, from this point, the procedure described in the In vitro drug release study from EV-loaded NLC Section.

In vivo evaluation of the EV-loaded NLC gel

Female New Zealand white rabbits (3.5–4 kg) were separated into two groups of six animals each. The EV-loaded NLC gel formulation, containing 1 mg/mL of EV, was sterilized by radiation with a UV lamp at 365 nm (UVL-4 UV Lamp, UVP, UK) for 3 min. The EV-loaded NLC gel formulation was injected subcutaneously (sc), into the back of the rabbits of group 1. The rabbits of group 2 were given a commercial formulation (*Juvenum e*, Carnot Laboratories, Mexico) by intramuscular route (im). *Juvenum e* is a suspension of microspheres containing 1 mg/ml of estradiol. Care was taken to inject the same dose with both formulations (17 µg/kg). A venous catheter was placed (24GA, BD Insyte™, Brazil) into the ear vein, collecting samples of 0.5 ml of blood in heparinized Eppendorf tubes at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 min, and 24 h. The plasma was separated by centrifugation at 2000 rpm for 4 min, keeping it at –20 °C until analysis. The plasma concentration of EV was determined with an Estradiol ELISA kit (Bio-Estradiol, MEXLAB, Mexico). The pharmacokinetics parameters were calculated using WinNonLin noncompartmental analysis (V02.1).

Results and discussion

Characterization of NLC

Particle size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP)

NLC placebo and EV-loaded NLC were in the nanometric size range (143.6 ± 21.1 nm and 122 ± 11.2 nm, respectively). Wissing et al. [21] explain that the hot high-pressure homogenization technique allows obtaining nanometric sizes with narrow distributions due to the cavitation and turbulence phenomena that are involved. Regarding polydispersity indices, values of 0.324 ± 0.08 and 0.344 ± 0.07 were obtained for the NLC placebo and for the EV-loaded NLC, respectively. Shah et al. [22] reported that the PDI reflects the quality of the dispersion, in a range of 0 to 1. Usually, a PDI value ≤ 0.1 indicates a high-quality dispersion, a value ≤ 0.3 as optimal and a value ≤ 0.5 as acceptable. According to these criteria, the PDI values obtained are considered acceptable. ZP values of -11.6 ± 1.2 mV and of -10.5 ± 1.3 mV were obtained for placebo and for EV-loaded NLC, respectively. ZP is an indicator of the degree of repulsion between similarly charged particles, so it is expected that high values of ZP (30 mV or higher), whether positive or negative, are indicative of good physical stability of the formulation [23]. However, the repulsion between the particles is not the only stabilization mechanism, as this can be achieved by stabilizers that prevent the aggregation of the particles by a steric effect. Cremophor® RH 40, used as a stabilizer in this work, being a nonionic surfactant, produces relatively low ZP values. What happens is that Cremophor® covers the NLC, which decreases the electrophoretic mobility of the particles and therefore reduces the ZP values. Therefore, as already mentioned, the physical stability of the NLC is attributed mainly to the steric effect of this surfactant [22]. In any case, this must be corroborated through stability studies.

Entrapment efficiency (EE%) and drug-loading capacity(DL)

An entrapment efficiency of 90.14 ± 2.94 % and a drug-loading capacity of 25.77 ± 0.82 mg EV/g of NLC were found. The high EE% can be attributed to the solubility of EV in the lipid matrix and to the fact that it is practically insoluble in water. The commercial formulation used as a reference for the in vivo studies contains 1 mg of estradiol in 1 ml. Therefore, according to the drug-loading capacity, 40 mg of NLC are required, to administer 1 mg of estradiol. These data were taken into account for the preparation of the EV-loaded NLC gel.

Transmission electron microscopy (TEM)

The images obtained by TEM showed particles of spherical shape and sizes that correlate well with those obtained by DLS, as shown in the micrographs of Fig. 1.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermograms of EV, of the individual components of the NLC, as well as mixtures of EV with these components, were recorded and compared with those reported in the literature. Figure 2 shows curves of individual components of NLC, as well as of excipient-EV binary mixtures. Pure EV showed a melting point at 148 °C, which is in accordance with that already reported at 143–150 °C [24]. There were no signals for Capryol™ 90 (liquid lipid) (Fig. 2a) and for Cremophor® RH 40 (surfactant) (Fig. 2b), as they do not have a melting point. In Fig. 2a, no signal was observed for EV in the binary mixture, because it is soluble in Capryol™ 90. In Fig. 2c, Precirol® ATO5 (solid lipid) had a signal at 54.71 °C close to that reported (56 °C) [25], probably because of the presence of humidity. Finally, the signal corresponding to the drug disappeared in the case of EV-loaded NLC, suggesting that EV was incorporated within the lipid matrix compared to the mixture that includes all the components, where the EV peak is present.

Characterization of gels

Viscosity

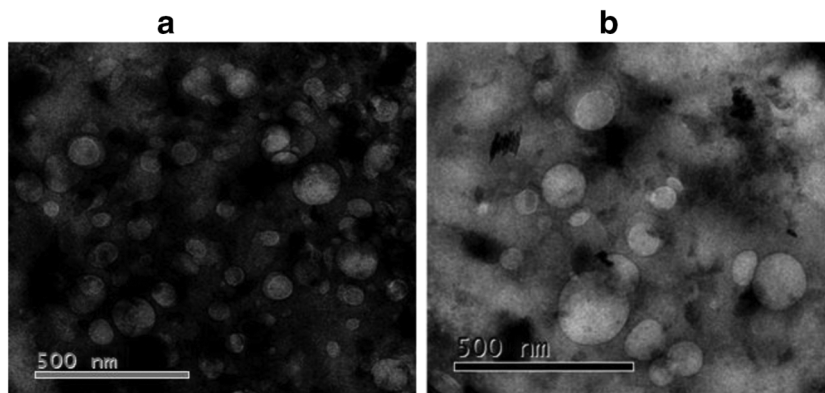
It is well known that Pluronics show a thermo-reversible behavior depending on their concentration and temperature in aqueous solution. It has been reported that the dehydration of its PEO–PPO–PEO chains is due to the breaking of some hydrogen bonds with water molecules, leading to the formation of micellar structures with hydrophobic polypropylene oxide (PPO) block forming the core of micelles. Then, further increases in temperature cause the micelles to rearrange into a gel structure [26], increasing the viscosity. The viscosity

curves of Fig. 3 show two important things: (i) As the PF127:PF68 ratio increases, there is an increase in viscosity values. (ii) The presence of the NLC increases viscosity values. As shown in Fig. 3a and b, the gel containing NLC (placebo gel) had a higher viscosity than the gel without NLC (control gel). In the case of in situ formation implants, viscosity is a relevant parameter, taking into account that if this is very high, problems of injectability would be encountered; but on the other hand, if it is too low, the gel simply will not form once the body temperature is reached, or the viscosity will not be enough to prolong the release from the depot formed [27]. Both the total polymer concentration and the proportion of PF127:PF68 play an important role for the formulation to flow smoothly at the time of administration, forming a gel with sufficient rigidity to generate a deposit that would prolong the release, once in the organism. Based on this and as discussed below, the proportion PF127:PF68 (8:2) was selected for the rest of the studies. The viscosity of the selected formulation was measured but now in the presence of the drug (EV-loaded NLC gel), with no difference in relation to the placebo. This can be explained because the drug is included in the NLCs, and as already mentioned, neither the size of the particles nor their zeta potential was different between the placebo and the formulation with the drug, so that the presence of the drug did not affect the rheological behavior of the gel.

Gelation temperature

The tube inversion method was used as a complement to the viscosity measurements as a function of temperature, to determine the gelation temperature. In this case, the temperature of the gels was gradually increased, registering the moment in which a firm gel was formed that remained at the bottom of the tube. As an example, Fig. 4 shows a photograph of the placebo gel PF127:PF68 ratio 8:2 (selected from the viscosity studies) at 27 °C (Fig. 4a) where it is observed that it was able to flow and at 37 °C, where a rigid gel formed at the bottom of the inverted tube (Fig. 4b). Below 30 °C the placebo gel PF127:PF68 was fluid enough to be injected, while the sol-gel transition begins to occur at 32 °C, with the formation of a

Fig. 1 TEM images of NLC placebo (a) and EV-loaded NLC (b). As shown, both have a spherical shape and particle sizes that correlate well with those values obtained by DLS (143.6 ± 21.1 nm and 122 ± 11.2 nm, respectively)



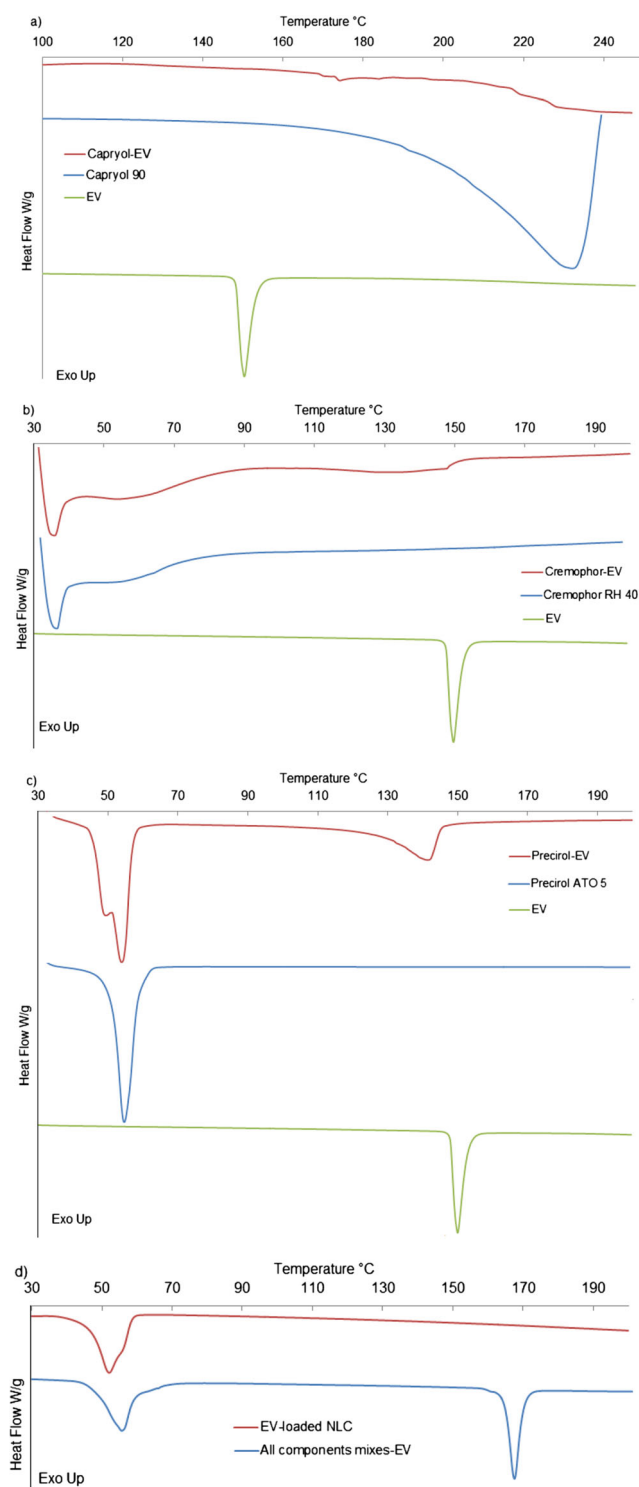


Fig. 2 Thermograms for NLCs and their components. The images (a), (b), and (c) show the thermograms for the individual components of the NLC, as well as for the binary mixtures of the drug: (a) with the liquid lipid (Capryol™ 90); (b) with the surfactant (Cremophor® RH 40); (c) with the solid lipid (Precirol® ATO 5). Image (d) presents the thermograms for the EV-loaded NLC formulation, as well as for the physical mixture of all NLC components, including the drug

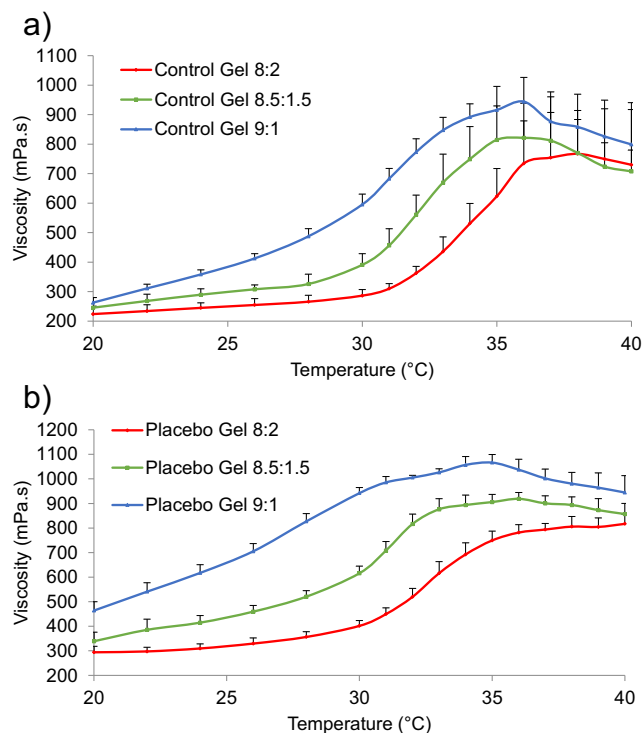


Fig. 3 Rheological behavior for gels prepared with different proportions of Pluronic F127 and Pluronic F68. The proportions used of PF127:PF68 were: 9:1, 8.5:1.5, and 8:2. (a) Gel control. To prepare this gel, distilled water was used as dispersion medium; (b) placebo gel. The dispersion medium was a suspension of NLC placebo (40 mg/ml). The average of the determinations is reported, and the error bars represent the standard deviation ($n = 3$)

firm gel at 37 °C, which ensures the formation of the implant after its administration. Table 1 shows the gelation temperatures determined by this method, for all proportions PF127:PF68 prepared. As can be seen, the inclusion of NLC in the gel resulted, in general, in a lower gelation temperature, in relation to the control gels, a fact that can be attributed to a lower content of water molecules in the NLC dispersion, which can favor the dehydration of the PEO–PPO–PEO chains.



Fig. 4 Tubes showing the behavior of the PF127:PF68 gel (proportion 8:2) with nanoparticles, at different temperatures. (a) At 27 °C (low viscosity). (b) At 37 °C (gel formed)

Table 1 Gelation temperatures for control and placebo gels at different PF127:PF68 proportions

Formulation	Gel proportion PF127:PF68	Gelation temperature (°C)
Control gel	8:2	37
	8.5:1.5	34
	9:1	32
Placebo gel	8:2	37
	8.5:1.5	31
	9:1	25

Injectability

Subcutaneous administration of the gel is recommended, due to it offering patients the convenience of self-injection. The placebo gel PF127:PF68 8:2 showed an adequate flow at room temperature (27 °C) when testing its injectability through a 27 G × 13-mm needle at a speed of 1.2 ml/min, considered by Berteau et al. at [28] as not painful. Injectability was evaluated in terms of the ease of injection, using the arbitrary score reported by Cilurzo et al. [29]: (1) Injection not possible or very difficult, no flow or drop wise; (2) injection difficult, initially drop wise, and then continuous flow; (3) injection moderate, flow continuous; and (4) injection easy, flow continuous. In this case, the gel at 27 °C had an easy injection and continuous flow, a result that was expected considering the viscosity values obtained at that temperature. In this sense, it is reported that the threshold in syringe ability is a viscosity of about 300 mPa s at 25 °C, so according to Fig. 3, the formulation is at the limit [13, 30].

In vitro drug release study

Figure 5 shows the in vitro release profiles for the EV solution, the drug NLC dispersion (EV-loaded NLC), and the EV-loaded NLC gel. The solution showed the highest release rate, releasing 98 % of EV at 28.5 h. In this case, the diffusion toward the receptor medium depended only on the concentration gradient between both compartments. The formulation of EV in NLC (EV-loaded NLC) delayed the release, finding 58.8% in the receptor medium at 28.5 h, and 70% at 56 h. The inclusion of EV-loaded NLC into the thermosensitive hydrogel (EV-loaded NLC gel) further reduced the rate of release, a fact attributable, on the one hand, to the increase in viscosity with formation of the gel at 37 °C and, on the other hand, to the fact that EV must now overcome two barriers: one imposed by the NLC and the other by the gel, so in this case, only 20% has been released at 56 h [11].

It should also be considered that EV is a lipophilic drug, which implies that its release depends more on the dissolution

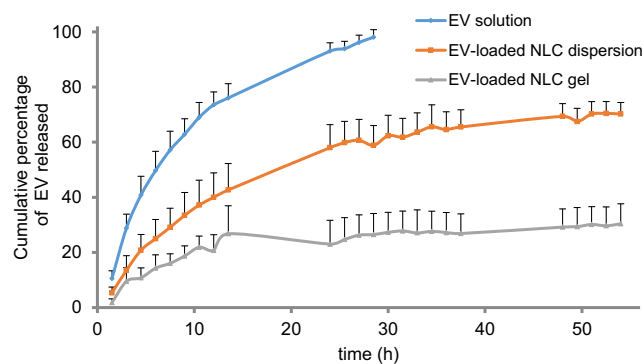


Fig. 5 In vitro release profile curves for EV solution, EV-loaded NLC dispersion, and EV-loaded NLC gel (PF127:PF68 ratio 8:2). The graph was constructed with the averages of four replicates ($n = 4$). Error bars represent the standard deviation

of the polymer matrix of the gel, rather than on its diffusion through it. In addition, the presence of the NLC dispersed in the gel could reduce the gel erosion rate, according to Nie et al. [11], who studied the release of paclitaxel (a lipophilic drug) included in liposomes and incorporated in a Pluronic F127 gel.

In vivo evaluation of EV-loaded NLC gel

Plasma concentration vs time profiles for the EV-loaded NLC gel and for the commercial suspension containing estradiol are shown in Fig. 6. Important differences were observed in the behavior of both systems. As can be seen in Fig. 6 and Table 2, in the case of the commercial formulation, there was a rapid increase in plasma concentration during the first minutes, with a t_{max} of 0.4 h and a C_{max} of 38 pg/mL, which decreased quickly in the first 4 h and remained almost constant from 6 to 24 h (14.19–15.88 pg/ml). For the EV-loaded NLC gel, although it took 2.3 h to reach C_{max} , this was much higher than with the commercial formulation (about 40-folds). Similarly, the AUC was also much higher for the EV-loaded NLC gel than for the commercial formulation (about 16.8-folds). As mentioned in the in vitro release tests, the fact of including EV in NLC and in turn in the gel (EV-loaded NLC gel) delayed the release significantly (approximately 59.3 % less at 56 h). By carefully examining the in vitro and in vivo profiles, an important correlation was found. The in vitro profile showed a three-phase release. The first stage coincides with the in vivo t_{max} that is located at 2.3 h and as seen in Fig. 5, at that time 9.16 ± 4.16 % and 11.7 ± 4.2 % of EV had been released from EV-loaded NLC gel and from EV-loaded NLC, respectively, with no difference between these two values (student test assuming equal variances: $t_{exp} = 1.109$; $t_{0.05,6} = 2.447$). This is particularly important because it reflects that until this time, the gel had not yet imposed a delay in release. This could explain what is happening in vivo and why the plasma concentration obtained is so high. At that time

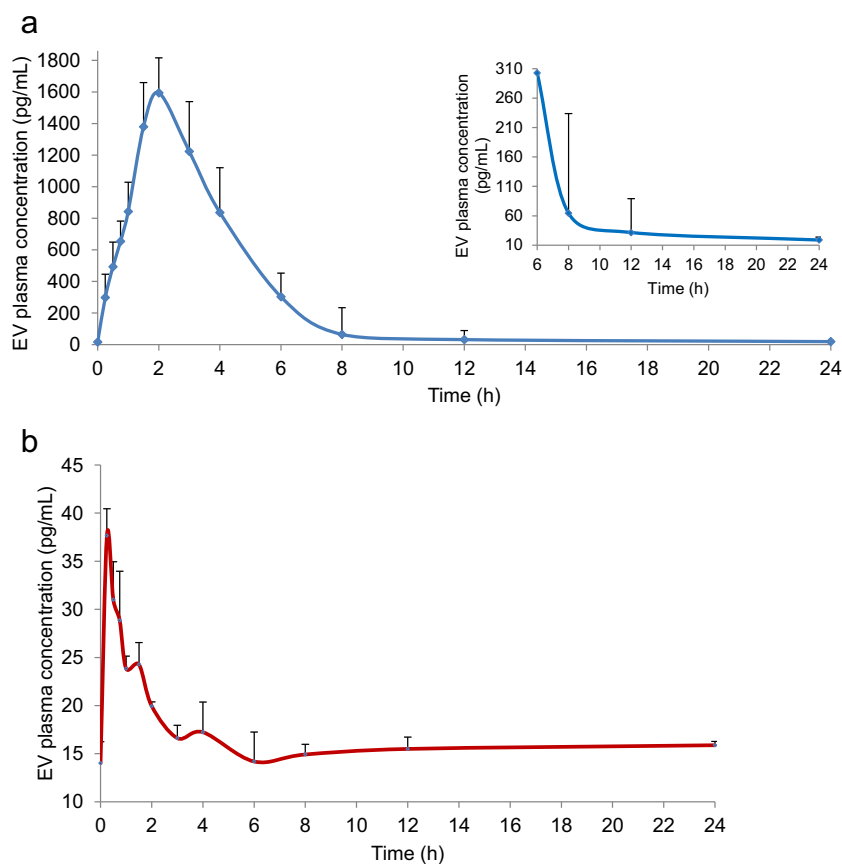


Fig. 6 Graph of the plasma concentration of estradiol valerate (EV) in pg/mL vs time for (a) EV-loaded NLC gel administered subcutaneously (the final part of the profile is shown in the box) and (b) commercial

formulation with EV administered intramuscularly. The study was performed in six animals. The average concentration is reported, and the error bars represent the standard deviation

(0–2.3 h), the gel did not yet function as a barrier, and the encapsulation of EV in nanocarriers was not enough to delay the release. This high release rate can also be attributed to the presence of drug on the surface of NLC that is quickly transferred to the surrounding medium, mainly because the hydrogel, being soluble in water, might rapidly leach out into the aqueous in vivo medium during implant formation [7].

In vivo, the plasma concentration decreased from 2.3 h to 8 h where it has an average value of 64.5 pg/ml, reaching 31.6 pg/ml at 12 h. During that period, the in vitro profile presented a second stage (4–12 h) where the release profiles for the EV-loaded NLC and the EV-loaded NLC gel already had a difference, with a slower release from the gel formulation. The third stage in the in vitro profile occurred between 12 and 56 h. Here the release was extremely slow. On the other hand, in vivo, no difference in plasma concentration was found between 12 and 24 h (20–30 pg/ml).

Although the encapsulation of drugs within nanocarriers dispersed in Pluronic hydrogels is a strategy used to increase the residence time at the injection site, forming a deposit and, therefore, prolonging the release, this depends on the strength of the hydrogel, which is proportional to the concentration of the

copolymer. However, it should be considered that an increase in concentration causes a reduction in the sol-gel transition temperature, rendering the system semisolid at room temperature, thereby making it difficult to administer (e.g., gelation temperatures below 30 °C). On the other hand, if the transition temperature is higher than the physiological temperature, it will remain in a liquid state and this lead to leakage [13, 15]. In this work, it was thought that the combination of Pluronic F127 and Pluronic F68 would be an interesting option to prolong drug release. According to what was reported by some authors [13, 31], this combination allows adjusting the sol-gel transition temperature, so that its administration is facilitated, forming a gel at body temperature, thereby modulating the residence time and the release rate. The ratio PF127:PF68 8:2, used in this work, existed as liquid at room temperature and gelled at 32–37 °C. However, although these conditions appeared to be optimal for carrying out the in vivo studies, to achieve a prolonged release without an initial release as high as that observed, it would be pertinent to evaluate the possibility of adding some other material that improve the strength and the residence time of the gel. Materials such as chitosan, carbopol and sodium alginate, among others, have been added for this purpose [15].

Table 2 Pharmacokinetic parameters for EV-loaded NLC gel and for the commercial suspension, following parenteral administration

Formulation	AUC (pg h mL ⁻¹)	C _{max} (pg/mL)	t _{max} (h)
Commercial suspension (im)	403	38	0.4
EV-loaded NLC gel (sc)	6809.8*	1514.7*	2.3*

*Significant difference ($P < 0.05$) in the mean value compared with commercial formulation using Students t-test. *im* intramuscular administration, *sc* subcutaneous administration

Different authors have obtained favorable results by combining nanocarriers with Pluronic hydrogels. As an example, Dimer et al. [30] prepared poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules dispersed in a Pluronic hydrogel, with high potential for the intramuscular administration of olanzapine (a hydrophobic drug); and Shen et al. [32] manage to retain a polymeric nanoparticle formulation in a thermosensitive gel based on Pluronic F127, Pluronic F68, HPMC, HMC, and sodium alginate, containing paclitaxel, for 50 days in a tumor, achieving a greater reduction of the tumor compared to a solution of the drug or with the drug in nanoparticles. Then, according to the results obtained, to achieve a prolonged release of EV formulated in NLC/hydrogel, without an initial burst effect, it is necessary to consider the possibility of combining the Pluronic gel with other components that allow modulating time and speed of gelation, as well as its permanence in the administration site, forming a depot from which the release occurs.

Conclusion

A thermo-reversible in situ formation implant containing nanostructured lipid carriers loaded with estradiol valerate (EV-loaded NLC gel) was formulated. The NLC obtained, in addition to showing good characteristics in terms of size, polydispersity index, Z potential, and high encapsulation efficiency, released the drug more slowly, in relation to the drug in solution. On the other hand, the complete system (EV-loaded NLC gel) allows a slower release by forming a gel at body temperature, which suggests that a depot can be formed at the site of administration. In vivo studies with this formulation and its comparison with a commercial suspension showed important differences in the pharmacokinetic parameters, obtaining much higher C_{max} and AUC with the EV-loaded NLC gel than with the commercial suspension. The results suggest that although the gel contributes to delaying the in vitro release, it would be pertinent to evaluate the possibility of adjusting the proportion of both copolymers or the addition of some other material that allow to achieve a sustained release in vivo, avoiding a rapid initial release.

Funding information The authors are grateful for the financial support provided by CONACyT (Mexico), PAPII/UNAM (Ref. 1803), and

PAPIIT/UNAM (Ref. IN226119). Likewise, they want to thank Dr. Gabriel Araujo-Silva for their excellent assistance with rabbit work.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

Animal studies “All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.”

References

- Ameller T, Legrand P, Marsaud V, Renoir J-M. Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92:1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.05.006>.
- Yoo J-W, Lee C-H. Drug delivery systems for hormone therapy. *J Control Release.* 2006;112:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.021>.
- Gaffield ME, Curtis KM, Mohllajee AP, Peterson HB. Medical eligibility criteria for new contraceptive methods: combined hormonal patch, combined hormonal vaginal ring and the etonogestrel implant. *Contraception.* 2006;73:134–44. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.08.002>.
- Blanc B, Cravello L, Micheletti M-C, d’Ercole C, Zartarian M. Continuous hormone replacement therapy for menopause combining noregestrol acetate and gel, patch, or oral estrogen: a comparison of amenorrhea rates. *Clin Ther.* 1998;20(5):901–12.
- Elkasabgy NA, Abdel-Salam FS, Mahmoud AA, Basalious EB, Amer MS, Mostafa AA, et al. Long lasting in situ forming implant loaded with raloxifene HCl: an injectable delivery system for treatment of bone injuries. *Int J Pharm.* 2019;571:118703. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118703>.
- Kamali H, Khodaverdi E, Hadizadeh F, Yazdian-Robati R, Haghbin A, Zohuri G. An in-situ forming implant formulation of naltrexone with minimum initial burst release using mixture of PLGA copolymers and ethyl heptanoate as an additive: in vitro, ex vivo, and in vivo release evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2018;47:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.027>.
- Bode C, Kranz H, Kruszka A, Siepmann F, Siepmann J. In situ forming PLGA implants: how additives affect swelling and drug release. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;53:101180.
- Dong S, Wang S, Zheng C, Liang W, Huang Y. An in situ-forming, solid lipid/PLGA hybrid implant for long-acting antipsychotics. *Soft Matter.* 2011;7:5873–8. <https://doi.org/10.1039/C1SM05310H>.

9. Jeong B, Sung K, You B. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):37–51. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00242-3).
10. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermos-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2006;9:339–58.
11. Nie S, Wendy Hsiao WL, Pan W, Yang Z. Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:151–66. <https://doi.org/10.2147/IJN.S15057>.
12. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006;23:2709–28.
13. Din F, Mustapha O, Kim DW, Rashid R, Park JH, Choi JY, et al. Novel dual-reverse thermosensitive solid lipid nanoparticle-loaded hydrogel for rectal administration of flurbiprofen with improved bioavailability and reduced initial burst effect. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;94:64–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.019>.
14. Pitorre M, Gondé H, Haury C, Messous M, Poilane J, Boudaud D, et al. Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? *J Control Release.* 2017;266:140–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.031>.
15. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Drug-loaded biocompatible nanocarriers embedded in poloxamer 407 hydrogels as therapeutic formulations. *Medicines.* 2019;6:7. <https://doi.org/10.3390/medicines6010007>.
16. Müller RH, Petersen RD, Hommons A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):522–30. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.012>.
17. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm.* 2009;366:170–84.
18. Tapeinos C, Battaglini M, Ciofani G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *J Control Release.* 2017;264:306–32. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.033>.
19. Yilmaz B, Kadioglu Y. Determination of 17 β -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. *Arab J Chem.* 2017;10(1):S1422–8. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.018>.
20. Schmolka IR. Artificial skin I. preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.* 1972;6(6):571–82. <https://doi.org/10.1002/jbm.820060609>.
21. Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(9):1257–72. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.002>.
22. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Optimization and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta. *J Phys Sci.* 2014;25(1):59–75 ISSN: 1675-3402.
23. Malvern Instruments Ltd. (2004). Zetasizer Nano Series. User Manual. United Kingdom.
24. ACOFARMA. (n.d.), Security file. Review date 2, 12, 2016. <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/15986212812e7f9ed43f9114bfee18c189e8fbc574f/main/files/Estradiol%20valerato.pdf>
25. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009. ISBN 978 0 85369 792 3
26. Khateb KA, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, Seilkhanov SK, Rakhypbekov TK, Lau WM, et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm.* 2016;502(1–2):70–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.027>.
27. Shi Y, Zhang X, Li J, Wang Z, Cheng S, Chen L, et al. Preparation and pharmacokinetics of an injectable thermosensitive hydrogel of diminazene aceturate. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2013;23(6):531–6. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(13\)50081-5](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50081-5).
28. Berteau C, Felipe-Santos O, Wang T, Rojas HE, Granger C, Schwarzenbach F. Evaluation of the impact of viscosity, injection volume, and injection flow rate on subcutaneous injection tolerance. *Med Devices Evid Res.* 2015;8:473–84. <https://doi.org/10.2147/MDER.S91019>.
29. Cilurzo F, Selmin F, Minghetti P, Adami M, Bertoni E, Lauria S, et al. Injectability evaluation: an open issue. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2011;12(2):604–9. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9625-y>.
30. Dimer FA, Pohlmann AR, Guterres SS. Characterization of rheology and release profiles of olanzapine-loaded lipid-Core Nanocapsules in Thermosensitive hydrogel. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13:8144–53. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7933>.
31. Akkari ACS, Boava Papini JZ, Grcia GK, Dias Franco MKK, Cavalcanti LP, Gasperini A, et al. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Mater Sci Eng C.* 2016;68:299–307. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.088>.
32. Shen M, Xu YY, Sun Y, Han BS, Duan YR. Preparation of a thermosensitive gel composed of a mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanodrug delivery system for pancreatic tumor therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(37):20530–7. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06043>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.