

**Trabajo de Investigación de  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA  
NANOSUSPENSIÓN POLIMÉRICA DE UN FÁRMACO DE BAJA SOLUBILIDAD**

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE OBTENTION OF A LOW SOLUBILITY  
DRUG POLYMERIC NANOSUSPENSION**

**Elaborado por:**

**EDWIN ALEXANDER MADRIGAL ARISTIZABAL**

**Estudiante de Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**

**Tutor: QF. Freimar Segura Sánchez  
PhD en Farmacotécnica y Biofarmacia  
Profesor Universidad de Antioquia**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA  
MEDELLÍN  
2016**

## CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	6
AGRADECIMIENTOS .....	14
OBJETIVO GENERAL .....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Nanocristales .....	19
1.1.1. Velocidad de disolución y solubilidad de saturación en nanopartículas	21
1.2. Nanoemulsiones .....	26
1.3. Nanosuspensiones.....	27
1.4. Nanosuspensiones poliméricas.....	31
1.5. Nanocápsulas .....	35
1.6. Nanoesferas.....	36
1.7. Polialquil-cianoacrilatos (PACAs).....	37
1.8. Síntesis de nanocápsulas y nanoesferas con polialquil-cianoacrilatos .....	42
1.9. Mecanismos de estabilización de Nanosuspensiones.....	43
1.9.1. Estabilización electrostática.....	47
1.9.2. Estabilización estérica .....	48
1.9.2.1. Copolímeros de bloque .....	49
1.9.3. Estabilización electro-estérica .....	52

1.10.	Mecanismo de liberación del Fármaco.....	52
1.11.	Fármaco de elección: Acetaminofén .....	53
1.11.1.	Propiedades farmacocinéticas de ACMP.....	59
1.12.	Nanoprecipitación (solvente/antisolvente).....	60
2.	MATERIALES Y METODOS.....	61
2.1.	Materiales .....	61
2.2.	Metodología .....	61
2.2.1.	Desarrollo de la propuesta de formulación.....	63
2.2.1.1.	Componentes y rangos para la propuesta de formulación.....	64
2.2.1.2.	Solubilidad del fármaco en el sistema de solvente/antisolvente .....	65
2.2.1.3.	Solubilidad del monómero.....	67
2.2.1.4.	Efecto del pH en la polimerización .....	68
2.2.1.5.	Cantidad de monómero requerido .....	68
2.2.1.6.	Tiempo de polimerización .....	69
2.2.1.7.	Mecanismo de estabilización.....	70
2.2.1.8.	Cantidad de estabilizante .....	71
2.2.2.	Diseño estadístico (Datos categóricos por tabulación cruzada) .....	72
2.2.3.	Propuesta de formulación.....	73
2.2.4.	Metodología de preparación .....	73
2.2.4.1.	Síntesis de Nanopartículas .....	75

2.2.4.2.	Velocidad y tipo de agitación.....	77
2.2.5.	Caracterización de las nanopartículas .....	77
2.2.5.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	78
2.2.5.2.	Espectroscopía UV/VIS.....	79
2.2.5.3.	Distribución de tamaño de partícula por Dispersión de Luz Dinámica, Dynamic Light Scattering (DLS) .....	79
2.2.5.4.	Potencial Z.....	80
2.2.5.5.	Microscopía Electrónica de Transmisión de Electrones (TEM).....	81
2.2.5.6.	Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación .....	82
2.2.6.	Liberación del fármaco .....	84
2.2.7.	Estabilidad de la Formulación propuesta .....	87
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	89
3.1.	Desarrollo de la propuesta de formulación .....	89
3.1.1.	Solubilidad del fármaco en el sistema solvente/antisolvente.....	91
3.1.2.	Solubilidad del monómero .....	95
3.1.3.	Efecto del pH en la polimerización.....	97
3.1.4.	Tiempo de polimerización.....	100
3.1.5.	Cantidad de monómero requerido .....	102
3.1.6.	Mecanismo de estabilización.....	105
3.1.7.	Cantidad de estabilizante .....	107

3.2.	Diseño estadístico (Datos categóricos con tabulación cruzada).....	109
3.3.	Propuesta de formulación .....	115
3.4.	Metodología para preparación, velocidad y tipo de agitación .....	115
3.5.	Caracterización de las Nanopartículas .....	120
3.5.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	121
3.5.2.	Valoración por UV/VIS .....	127
3.5.3.	Potencial Z .....	130
3.5.4.	Distribución del tamaño de partícula por DLS .....	133
3.5.5.	Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM).....	136
3.5.6.	Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.....	141
3.5.7.	Ensayos de estabilidad .....	144
3.5.8.	Liberación de fármaco .....	147
4.	CONCLUSIONES.....	150
	BIBLIOGRAFÍA .....	155

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Nanopartículas poliméricas: ventajas de los métodos de preparación <sup>27</sup> .....	34
Tabla 2: Solubilidad del Acetaminofén en diferentes solventes a 30°C <sup>69</sup> .....	66
Tabla 3: Características de peso y composición de los Pluronic® tipo F <sup>80</sup> .....	71
Tabla 4: Especificaciones para evaluación de la estabilidad. ....	88
Tabla 5: Componentes seleccionados para la pre-formulación según su función.....	90
Tabla 6: Resultados de la determinación del potencial Z de diferentes muestras... ..	107
Tabla 7: Efecto del volumen de etanol sobre los factores de respuesta. ....	111
Tabla 8: Efecto del volumen de monómero sobre los factores de respuesta. ....	111
Tabla 9: Efecto de la cantidad de estabilizante sobre los factores de respuesta. ...	112
Tabla 10: Análisis de Varianza para Floculación o Sedimento. ....	112
Tabla 11: Análisis de Varianza para Cristales. ....	112
Tabla 12: Análisis de Varianza para Coloración. ....	112
Tabla 13: Composición cuantitativa de la formulación propuesta. ....	115
Tabla 14: Tamaño de partícula: efecto del tipo y velocidad de agitación. ....	120
Tabla 15: Especificaciones para evaluación de la estabilidad. ....	146
Tabla 16: Resultados de estabilidad. ....	146

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clases y características de las nanopartículas .....	18
Figura 2: Características especiales de los nanocristales: .....	23
Figura 3: Tipos de nanopartículas poliméricas. ....	33
Figura 4: Representación esquemática de una Nanocápsula.....	35
Figura 5: Representación esquemática de una Nanoesfera. ....	36
Figura 6: Estructura química de algunos monómeros de etil-cianoacrilato usados en la preparación de Nanopartículas poliméricas.....	38
Figura 7: Representación de la formación de polialquil-cianoacrilato por polimerización aniónica <sup>44</sup> . ....	40
Figura 8: Principales mecanismos de estabilización de nanopartículas. ....	46
Figura 9: Estabilización electrostática de partículas cargadas negativamente <sup>49</sup> .....	47
Figura 10: Representación del mecanismo de estabilización estérico. ....	48
Figura 11: Representación simplificada de cadenas poliméricas y copolímeros.....	49
Figura 12: Representación de la fórmula estructural del Pluronic® F127 y su forma de interacción con una superficie hidrofóbica.....	51
Figura 13: Representación gráfica de estabilización estérica. ....	51
Figura 14: Estructura molecular del Acetaminofén (N-acetil-p-aminofenol) .....	58
Figura 15: Diagrama donde se esquematizan los procedimientos realizados para la obtención de la propuesta de formulación para la nanosuspensión. ....	62
Figura 16: Metodología para la preparación de la nanosuspensión.....	74
Figura 17: Representación de la composición de las fases de la nanosuspensión...	76

Figura 18: Representación esquemática del montaje de diálisis para la prueba de liberación del fármaco. ....	87
Figura 19: Termogramas del fármaco (A), matriz (B), y nanosuspensión (C). ....	122
Figura 20: Termogramas de agente estabilizante (D), polímero (E), y matriz (polímero más agente estabilizante) (C). ....	123
Figura 21: Termogramas de fármaco (G), estabilizante (H), y fármaco más agente estabilizante (I).....	124
Figura 22: Espectros UV-VIS de muestra de Estándar 100% y Nanosuspensión...	129
Figura 23: Curva de calibración y estándares .....	129
Figura 24: Potencial Z de Matriz sin estabilizante, Pluronic® F127 y nanosuspensión. ....	132
Figura 25: Gráficos de determinación de tamaño con NanoSighth® (arriba) y Nano ZS® (abajo). ....	135
Figura 26: Micrografía TEM de cristales de Acetaminofén en el sistema solvente anti-solvente sin Etil-cianoacrilato y con estabilizante estérico Pluronic® F127. ....	136
Figura 27: Micrografía TEM de partículas de PECA sin carga de fármaco y con agente estabilizante (Matriz). ....	138
Figura 28 A y B: Micrografía TEM de una muestra de matriz cargada con fármaco. ....	140
Figura 29: Gráfico de liberación de fármaco: muestra y blanco en PBS 7,4. ....	147
Figura 30: Porcentaje de liberación de fármaco en el tiempo (36 horas). ....	148

## INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1: Solubilidad de Acetaminofén en diferentes proporciones de Solvente/Antisolvente.....	92
Imagen 2: Dispersión de la luz láser. ....	93
Imagen 3: Solubilidad del fármaco en solvente/antisolvente (dispersión de luz).....	94
Imagen 4: Imágenes de microscopía óptica de cristales de fármaco.....	95
Imagen 5: Muestras con diferentes cantidades de etil-cianoacrilato en el sistema. ...	96
Imagen 6: Partículas de polímero en el sistema.....	97
Imagen 7: Muestras con diferentes cantidades de etil-cianoacrilato, sistema a pH ácido. ....	99
Imagen 8: Partículas de polímero en el sistema con ajuste previo de pH.....	99
Imagen 9: Tiempo de polimerización del monómero en el sistema con ajuste de pH. ....	101
Imagen 10: Muestras de ensayos de cantidad de monómero requerido. ....	103
Imagen 11: Cristales formados en el sistema: insuficiente cantidad de polímero. ...	103
Imagen 12: Muestra con 100 $\mu$ L de monómero (Izquierda); Muestra con 300 $\mu$ L de monómero (derecha).....	104
Imagen 13: Imágenes de los ensayos de mecanismo de estabilización. ....	107
Imagen 14: Izquierda: Muestra si agente estabilizante, Derecha: Muestra con estabilizante: Pluronic® F127.....	108
Imagen 15: Sistemas de agitación utilizados. Izquierda: agitador magnético, velocidad máxima 1200 RPM. Derecha: agitador tipo aspas, velocidad máxima 9500 RPM.....	119

## RESUMEN

El propósito de este trabajo es desarrollar un método para la preparación de una nanosuspensión polimérica de un fármaco de baja solubilidad (Acetaminofén), empleando la técnica de precipitación o solvente/antisolvente la cual se combina con polimerización iónica, ambas técnicas están basadas en los principios de generación de nanopartículas utilizando metodologías “botton up”.

Se utilizó un monómero de la familia de los acrilatos (Etil-cianoacrilato) a fin de encapsular o entrapar el fármaco con lo cual se pretende mejorar la estabilidad del mismo en medio acuoso y también para otorgarle propiedades de liberación modificada al producto final.

Después de obtener una propuesta de formulación se realizaron ensayos de optimización de la metodología comparando la agitación magnética con la agitación por aspas y posteriormente evaluando el efecto de la velocidad de agitación sobre los parámetros de tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de la nanosuspensión.

La nanosuspensión final se sometió a varios análisis de caracterización como: determinación del tamaño y de la distribución del tamaño de partícula por Dispersión de luz dinámica (DLS), potencial zeta, microscopía de transmisión de electrones (TEM) y calorimetría diferencial de barrido (DSC); adicionalmente, también se analizaron otras características de la nanosuspensión obtenida como: perfil de

liberación del fármaco *in vitro*, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación del sistema.

Los resultados obtenidos muestran que la agitación con espas permite obtener tamaños de partícula de menor tamaño, adicionalmente se pudo determinar que la velocidad de agitación es un factor que influye en el tamaño de partícula, a mayor tamaño de velocidad de agitación, menor es el tamaño de partícula final.

Se concluye que es posible obtener nanosuspensiones de partículas poliméricas de acetaminofén por la metodología propuesta con un tamaño de partícula promedio de 166 nm y con índice de polidispersidad promedio de 0,087 y con un perfil de liberación modificado como lo mostraron los análisis de liberación del fármaco.

**PALABRAS CLAVE:** Nanosuspensión, bottom-up, cianoacrilato, antisolvente, nanoprecipitación, copolímero.

## **ABSTRACT**

The goal of this work is to develop a method for the preparation of a polymeric nanosuspension of a drug of low solubility (Acetaminophen), using the technique of precipitation in modified solvent or solvent/antisolvent which it is combined with the ionic polymerization, both techniques are based on the principles of nanoparticles generation "bottom up".

To obtain the nanoparticles, a monomer of the family of the acrylates (Etil-cyanoacrylate) was used in order to encapsulate or entrap the drug, wherewith it is expected to improve the stability of the drug in aqueous medium and also to grant it the properties of modified release to the final product.

After obtaining a formulation proposal, tests of optimization of the methodology were made comparing the magnetic stirring with the stirring blade and subsequently evaluating the effect of the speed of stirring on the parameters of particle size and the polydispersity index of the nanosuspension.

The final nanosuspension was put through several analyses of characterization like: determination of the distribution of the particle size for Dynamic Light Scattering (DLS), zeta potential, Transmission Electron Microscopy (TEM), and Differential Scanning Calorimetry (DSC); in addition, other characteristics of the nanosuspension obtained were analyzed like: in vitro drug release profile, load capacity and encapsulation efficiency of the system.

The obtained results show that the blade stirring type allows to obtain sizes of particle of minor size, in addition to this it was possible to determine that the stirring speed is a factor that influences the size of the particle, to major size of stirring speed, minor is the size of the final particle.

At the end of this work, then it is concluded that it is possible to obtain nanosuspensions of polymeric particles of acetaminophen through the methodology proposed with an average particle size of 166 nm and with an average polydispersity index of 0,087 and with a modified release profile as it was shown by the drug release analyses.

**KEYWORDS:** Nanosuspension, bottom-up, cyanoacrylate, antisolvente, nanoprecipitation, copolymer.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres: Hilda M. Aristizábal G. y José M. Madrigal A. porque aunque suene trillado, sin ellos la realización de este trabajo, el crecimiento y la formación de la persona que soy hoy en día no hubiera sido posible y me siento orgulloso por tenerlos como padres, a mis hermanos y sobrinos que hoy pertenecen a mi núcleo familiar y en los que encontré en algún momento la fuerza para seguir adelante.

A mi asesor el Profesor Freimar Segura y a mi Jefe y colega el Sr. Francisco Cano por ser más que maestros un ejemplo de dedicación y constancia, a los profesores y personas de la universidad de Antioquía que en cada semestre de este trabajo me aportaron cada uno a su manera ideas valiosas; a las personas de CORPAUL farmacéutica y al grupo de investigación Biopolimer, porque sin ellas no existirían instituciones como estas, que contribuyen a la formación personal y profesional de cada ser humano que las conforma.

A la persona que ha sido mi ejemplo, mi fortaleza, que es objeto de mi más grande admiración y también mi novia: Norelly Serna, muchas gracias amor por tu paciencia, y por toda tu ayuda a lo largo de este viaje, espero algún día poderte apoyar tanto como tú lo has hecho conmigo.

A mi colega, mi amigo, mi compañero de viaje en este posgrado Julián D. García P., porque con él he compartido, debatido, estudiado, pero principalmente, me ha

enseñado algo que la Universidad, que un posgrado no puede enseñar: la humildad,  
a ser un buen amigo y compañero, muchas gracias Juli.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un método para obtención de una nanosuspensión polimérica de un fármaco de baja solubilidad.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar un método para la elaboración de una nanosuspensiones polimérica por el método solvente/antisolvente y polimerización iónica aplicándola a un fármaco de baja solubilidad.
2. Evaluar el efecto de la encapsulación del fármaco con (etil-cianoacrilato) sobre la liberación del mismo.
3. Caracterizar las nanopartículas obtenidas.

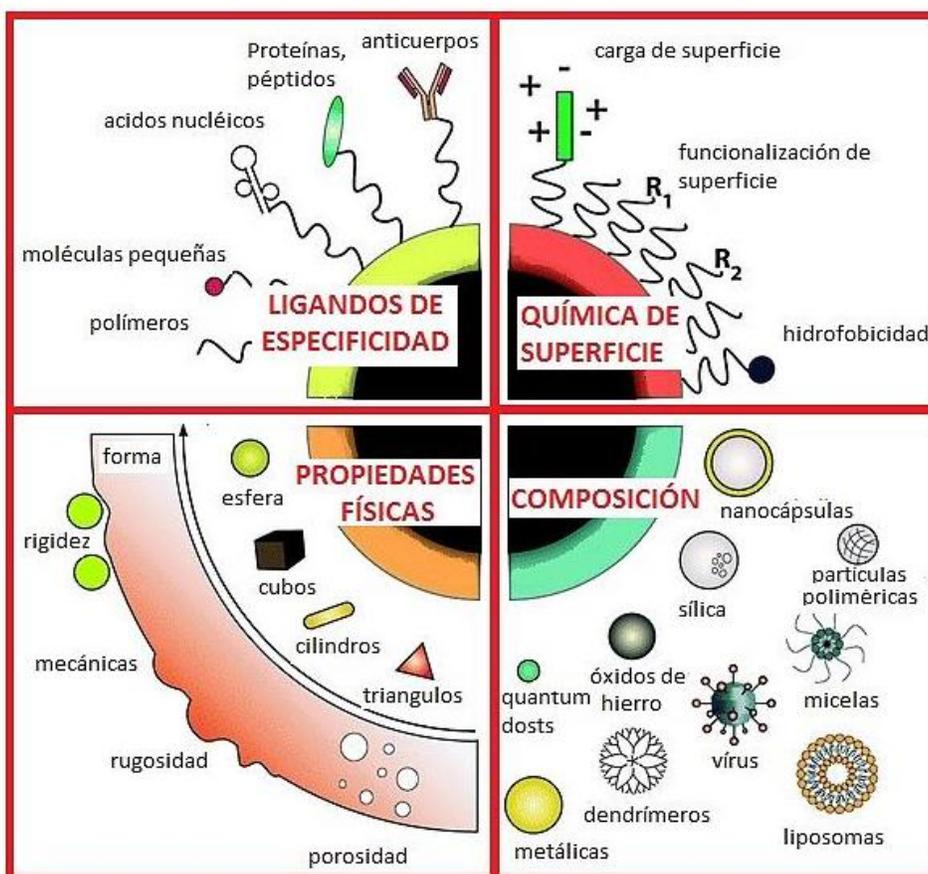
## 1. INTRODUCCIÓN

La investigación y desarrollo de sistemas de liberación de fármacos se está incrementando rápidamente en todo el mundo. Esta tendencia, a futuro seguirá aumentando como política de salud pública debido a que es necesario la disminución de los costos y el aumento de la eficiencia y seguridad en nuevas terapias. Para satisfacer esta demanda, muchos fármacos bien conocidos y eficientemente aplicados pueden ser reformulados en nuevos sistemas de liberación que pueden ser de valor agregado para una actividad terapéutica optimizada. Un aspecto importante en el reciente campo de desarrollo de la medicina es el uso de sistemas de liberación de fármacos nanoparticulados permitiendo nuevos e innovadores avances terapéuticos<sup>1</sup>.

La nanotecnología como una plataforma de liberación de fármacos ofrece aplicaciones muy prometedoras; debido a su tamaño, tales sistemas de liberación se han convertido en una herramienta muy valiosa para el enfoque farmacéutico. Las propiedades de liberación van desde la selectividad o liberación específica en el sitio de acción del fármaco, el aumento del transporte de fármaco a través de barreras biológicas produciendo una biodisponibilidad incrementada del fármaco, y/o la liberación intracelular, lo cual es de especial interés por ejemplo en la terapia génica y para el tratamiento del cáncer<sup>1</sup>.

Los avances nanotecnológicos en la liberación de fármacos incluyen una gran variedad de formas de transporte y liberación, principalmente sistemas basados en

lípidos, nanopartículas poliméricas, liposomas, micelas poliméricas y ciclodextrinas, entre otras, tales nanopartículas son definidas como sistemas de transporte con un tamaño por debajo de una micra o de tamaño submicrométrico<sup>1,2,3</sup>. Existen numerosos tipos de nanopartículas las cuales pueden ser fabricadas teniendo en cuenta el uso que se les quiera dar, a continuación se muestra una imagen con algunas de las características de las nanopartículas<sup>4</sup>, ver **Figura 1**.



**Figura 1:** Clases y características de las nanopartículas<sup>a</sup>

Como se puede observar en la imagen anterior, el campo de la nanotecnología tiene infinidad de posibilidades para construir nanopartículas con infinitas formas,

<sup>a</sup> (Tomado y adaptado de: Chou LYT, Ming K, Chan WCW. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):233-245).

composición, conformación estructural y superficie, dependiendo de las aplicaciones que se les quiera dar. Adicionalmente, las nanopartículas también se pueden formular en formas farmacéuticas similares a las tradicionales como emulsiones, suspensiones, entre otras; dichas formas farmacéuticas dependerán de la naturaleza de las nanopartículas en cuanto a su composición y la metodología de preparación.

### **1.1. Nanocristales**

Los nanocristales son partículas sólidas de fármacos puros con un diámetro medio inferior a una micra y estabilizados por surfactantes o polímeros en bajas concentraciones. Los nanocristales presentan un estado cristalino de partículas discretas, pero dependiendo del método de producción pueden ser parcial o totalmente amorfas<sup>5</sup>. Se debe distinguir entre nanocristales y nanopartículas poliméricas porque las nanopartículas poseen una matriz polimérica con un fármaco incorporado, en cambio los nanocristales no poseen ningún material como matriz, son sistemas coloidales de liberación de fármacos libres de transportador y en la escala submicrométrica y son considerados como una plataforma versátil para la administración de fármacos por diversas vías de administración, tales como oral, parenteral, oftálmica, transdérmica y pulmonar<sup>5</sup>. Se ha reportado que los nanocristales tienen un buen comportamiento cuando son administrados a organismos vivos y han probado tener buena biodisponibilidad, buen potencial de liberación sitio-efectivo y son adecuados para formular medicamentos con una estrecha ventana terapéutica<sup>6,7</sup>.

Existen dos estrategias de procesamiento o enfoques principales para la preparación de nanocristales o nanopartículas en general: "Bottom Up" y "Top Down". Las tecnologías top Down son métodos físicos, métodos descendentes de desgaste o molienda que buscan reducir los componentes y estructuras desde un tamaño mayor hacia uno menor; mientras que las tecnologías bottom up, son métodos ascendentes de autoensamblaje que consisten en crear partículas partiendo desde átomos o moléculas que se van organizando y/o sintetizando de forma controlada hasta formar arreglos en forma de nanopartículas.

Las tecnologías "bottom-up" para la producción de nanocristales comprenden el uso de la técnica de precipitación controlada/cristalización por adición de un anti-solvente. Las tecnologías "top down" incluyen procesos de molido o homogenización. Sin embargo, la combinación de técnicas que comprenden pasos previos de pretratamiento seguidos por la reducción del tamaño son también usados para la producción de nanopartículas con la distribución de tamaño de partícula deseado<sup>8</sup>.

Las ventajas terapéuticas de los nanocristales son debidas principalmente a la reducción del tamaño de partícula y pueden tener ventajas en cuanto a la biodisponibilidad debido a su alta capacidad de carga y su relativa monodispersidad la cual minimiza la probabilidad inestabilidad por maduración de Ostwald, adicionalmente aumentan la velocidad de disolución y la solubilidad de saturación.

### 1.1.1. Velocidad de disolución y solubilidad de saturación en nanopartículas

Las ventajas de las nanopartículas de compuestos poco solubles en medio acuoso se dan por un aumento de la velocidad de disolución y de la solubilidad de saturación que se pueden explicar basándose principalmente en las ecuaciones de Noyes-Whitney y Prandtl, que describen cómo la reducción del tamaño de partícula facilita un aumento del área superficial y una disminución del espesor de la capa de difusión, y así proporcionar una velocidad de disolución mejorada; y la mejora de la solubilidad de saturación con partículas nanométricas se describe por las ecuaciones de Ostwald-Freundlich y Kelvin, que correlacionan el tamaño de partícula y la curvatura de las partículas con la solubilidad<sup>9</sup>, y que demuestran que con partículas por debajo de un micrómetro, la solubilidad de saturación depende no sólo de la composición del fármaco, del medio de disolución y de la temperatura sino también del tamaño de partícula<sup>10</sup>, estas características especiales de los nanocristales se resumen en la **Figura 2**.

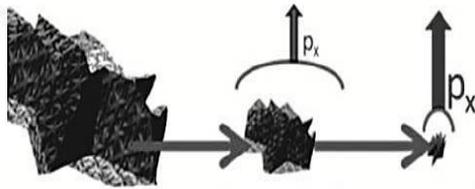
De acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney (**Figura 2**), la velocidad de disolución ( $dc / dt$ ) está determinada por la tasa de cambio de masa disuelta en el tiempo ( $t$ ), relacionada con el coeficiente de difusión ( $D$ ) a través de una capa estática de líquido de Espesor  $h$ ;  $C_s$  es la solubilidad de equilibrio (la concentración del soluto requerida para saturar el solvente) y la cantidad disuelta en el volumen del medio en el tiempo  $t$  es  $Ct$ <sup>11</sup>. La concentración alrededor de las partículas en el tiempo  $t$  ( $C_t$ ), puede ser influenciada por un tamaño de partícula cambiante. De acuerdo con la ecuación, un aumento en el área superficial ( $A$ ) de un fármaco dará lugar a un

proceso de disolución más rápido, ( $C \lll C_s$ ). Según la ecuación de la capa límite de Prandtl ( $k$  denota una constante), Ecuación 1:

$$h = k(L^{\frac{1}{2}} / V^{\frac{1}{2}}) \quad (\mathbf{Ecuación\ 1})$$

En sistemas dispersos sólidos-líquidos, la reducción del tamaño de partícula da como resultado un aumento de la velocidad de disolución de un material poco soluble, disminuyendo el espesor de la capa de difusión ( $h$ ) alrededor de cada partícula<sup>12</sup>. Cuando el  $h$  disminuye, tanto la  $C_s$  y el gradiente de concentración ( $(C_s - C_t) / h$ ) aumentarán y por lo tanto la tasa de disolución aumentará de acuerdo con Noyes-Whitney. Básicamente, según Prandtl, una disminución en el tamaño de partícula conduce a una disminución tanto en la longitud de la superficie en la dirección de flujo ( $L$ ) como en la velocidad relativa del líquido que fluye que rodea a los perímetros de las partículas ( $V$ ), donde la red es una capa de difusión más fina ( $h$ ) alrededor de las partículas y lleva a un aumento en la velocidad de disolución específica de la superficie<sup>13</sup>.

1. Solubilidad de saturación  $C_s$ :  
 =f (tamaño - d)  
 =f (curvatura)  
 =f (presión de disolución -  $P_x$ )



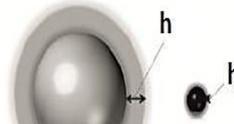
Ecuaciones de Kelvin  
 and Ostwald- Freundlich

macropartícula d = 100  $\mu\text{m}$     micropartícula d = 10  $\mu\text{m}$     nanopartícula d = 200nm

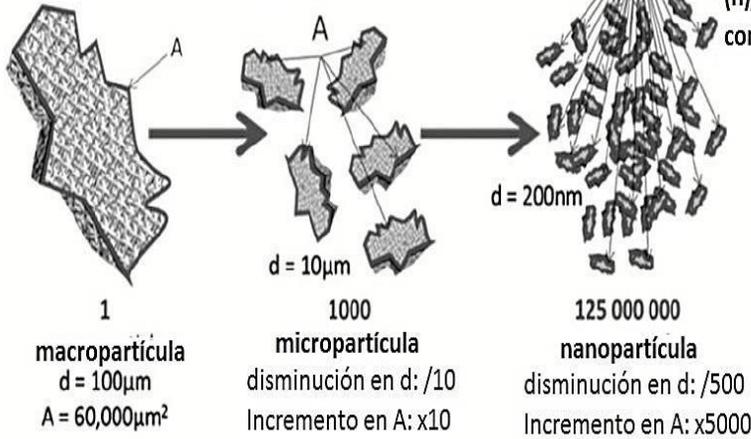
2. Velocidad de disolución  $dc/dt$ :  
 =f (solubilidad de saturación -  $C_s$ )  
 =f (distancia difusional - h)  
 =f (area superficial total - A)

Ecuación de Noyes-Whitney

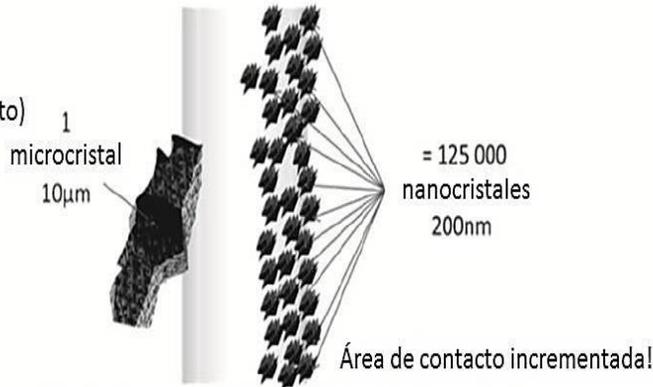
$$\frac{dc}{dt} = DA \frac{(C_s - C_t)}{h}$$



Disminución de la distancia difusional (h), y incremento en el gradiente de concentración  $(C_s - C_t)/h$



3. Adhesividad:  
 =f (tamaño)  
 =f (área de contacto)



1 Punto de contacto Vs 125,000 puntos de contacto

**Figura 2:** Características especiales de los nanocrisales:

1. aumento de la solubilidad de saturación ( $C_s$ ) debido al aumento de la presión de disolución de los nanocrisales fuertemente curvados; 2. Aumento de la velocidad de disolución ( $dc / dt$ ) debido al aumento del área superficial (A) y la disminución de la distancia difusional h);y 3. Mayor adhesividad de los nanocrisales debido a la mayor área de contacto.

En partículas submicrométricas (nanopartículas), la solubilidad de saturación es una función del tamaño de partícula, es decir, la solubilidad de saturación aumenta con la disminución del tamaño de partícula. Esto se basa en un aumento de la curvatura de la superficie de la partícula y por lo tanto una mayor presión de disolución **Figura 2**. El fenómeno puede ser explicado por las ecuaciones de Kelvin (**Ecuación 2**) y Ostwald-Freundlich (**Ecuación. 3**)<sup>14</sup>. Inicialmente, la ecuación de Kelvin define la presión de vapor sobre una superficie curvada de una gotita líquida en fase gaseosa<sup>15</sup>; Una disminución en el tamaño de partícula de la gotita de líquido proporciona un aumento en la curvatura de la superficie y la presión de vapor aumenta. La transferencia de moléculas de una fase líquida (gotita) a una fase gaseosa es en principio idéntica a la transferencia de moléculas desde una fase sólida (nanocristal) a una fase líquida (medio de dispersión). Por lo tanto, la presión de vapor se considera equivalente a la presión de disolución. Por lo tanto, la ecuación de Kelvin también es aplicable para explicar la relación entre la presión de disolución y la curvatura de las partículas sólidas en líquido<sup>15</sup>.

$$\ln \frac{Pr}{Po} = \frac{2\gamma Vm}{rRT} \quad (\mathbf{Ecuación\ 2})$$

Donde  $Pr$  es la presión de disolución (vapor) de una partícula con el radio  $r$ ,  $Po$  es la presión de disolución saturada del medio circundante o superficie plana,  $\gamma$  es la tensión superficial,  $Vm$  es el volumen molecular de la partícula de soluto,  $R$  es el Constante de gas,  $T$  es la temperatura absoluta y  $r$  es el radio de la partícula. En una

solución saturada, existe un equilibrio entre moléculas de disolución y recristalización. El equilibrio se transfiere cuando la presión de disolución aumenta (tamaño de partícula decreciente), y por lo tanto aumenta la solubilidad de saturación. Además, la ecuación de Ostwald-Freundlich, que es equivalente a la ecuación de Kelvin, expresa con precisión la relación entre la solubilidad de saturación y el tamaño de partícula<sup>15</sup>:

$$\ln \frac{S}{S_0} = \frac{2\gamma V_m}{rRT} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde  $S$  es la solubilidad de saturación,  $S_0$  es la solubilidad del sólido que consiste en partículas grandes,  $\gamma$  es la tensión interfacial de la sustancia,  $V_m$  es el volumen molar del material de la partícula,  $R$  es la constante del gas,  $T$  es la temperatura absoluta y  $r$  es el radio. En la ecuación de Ostwald-Freundlich (**Ecuación 3**), se muestra claramente que la solubilidad de saturación ( $S$ ) de un fármaco aumenta con una disminución en el tamaño de partícula ( $r$ ). Sin embargo, este efecto es mayor únicamente para partículas submicrométricas.

Los Nanocristales de fármacos poseen también una característica sobresaliente de adhesividad claramente creciente a la mucosa biológica incluyendo la mucosa gastrointestinal (GI)<sup>16</sup> (**Figura 2**). El aumento de la adhesividad se debe generalmente a un aumento del área de contacto de los nanocristales, lo que conduce a una mejora de la absorción oral de fármacos poco solubles, aparte de la mayor solubilidad de saturación y velocidad de disolución. Para los nanocristales, la capa de gel mucoso es una estructura porosa, en la que pueden penetrar rápida y

profundamente y alcanzar un contacto cercano con la red mucosa<sup>16</sup>. Además, la isoterma de adsorción muestra un incremento lineal con la concentración de partículas. Se han propuesto diferentes teorías de los mecanismos de mucoadhesión de las nanopartículas<sup>17</sup>: la teoría electrónica (fuerzas de atracción electrostática entre las superficies de las partículas y el moco), la teoría de la adsorción (fuerzas secundarias como puentes de hidrógeno y de Van der Waals entre las superficies de las partículas y el moco), la teoría de la difusión (interpenetración y enmarañamiento físico de la proteína del moco y cadenas poliméricas) y la teoría de la captura (retención de nanopartículas por la superficie irregular de la mucosa). La mucoadhesión de fármacos en el tracto gastrointestinal permite la liberación del fármaco exactamente en los sitios de absorción, lo que conduce a un alto gradiente de concentración y prolongación del tiempo de retención.

## **1.2. Nanoemulsiones**

Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles en la cual un líquido (fase dispersa) está dispersado en otro (fase continua), la fase dispersa o discontinua al ser líquida se estabiliza tomando una forma esférica o globular. Las nanoemulsiones son emulsiones con glóbulos de tamaño nanométrico, que se usan para mejorar la administración de fármacos generalmente insolubles en agua y estabilizadas generalmente por agentes tensoactivos. La principal diferencia entre una emulsión y una nanoemulsión radica en el tamaño de los glóbulos dispersados en la fase continua<sup>18</sup>.

Una nanoemulsión típica contiene una fase oleosa, una fase acuosa y un agente emulsionante, generalmente un tensoactivo de naturaleza anfifílica. La adición de este agente emulsionante es crítica para la formación de gotas (glóbulos) de tamaño pequeño ya que se disminuye la tensión interfacial, es decir, la energía de superficie por unidad de área, entre la fase oleosa y la fase acuosa. El agente emulsionante también desempeña un papel muy importante en la estabilización de la nanoemulsión, pues es el responsable de evitar las interacciones entre glóbulos o partículas por medio de repulsiones electrostáticas o por impedimentos estéricos, este emulsionante es generalmente un agente tensoactivo pero también las proteínas y los lípidos son eficaces en la preparación de nanoemulsiones dependiendo de la composición y características de la nanoemulsión<sup>19</sup>.

### **1.3. Nanosuspensiones**

Muchos principios activos poseen baja solubilidad intrínseca y presentan un reto para llevarlos a formulaciones tradicionales óptimas que permitan ser usadas por una vía de administración determinada y a concentraciones adecuadas; las nanosuspensiones pueden ser utilizadas como una estrategia para la formulación de estos fármacos que no sólo permite sobrepasar sus problemas de solubilidad, si no que puede aportar beneficios adicionales como por ejemplo mejorar su estabilidad.

Las nanosuspensiones son definidas en términos generales como dispersiones coloidales de partículas de tamaño submicrométrico (menor a  $1\mu\text{m}$ )<sup>20</sup> donde el fármaco es mantenido en estado sólido y que son estabilizadas por lo general por

agentes tensoactivos como por ejemplo los polisorbatos tipo TWEEN® o por compuestos poliméricos como el polietilenglicol (PEG), o co-polímeros de bloque como por ejemplo los denominados PLURONIC®. Una nanosuspensión también puede ser definida como un sistema bifásico que comprende partículas puras de fármaco dispersas en un vehículo acuoso o en algunos casos embebidas o recubiertas por una matriz adecuada en la cual el diámetro de la partícula en suspensión es inferior a una micra<sup>21,22</sup>.

Una nanosuspensión puede incrementar la velocidad de disolución y la solubilidad de saturación de un fármaco poco soluble, una posible explicación para el aumento de la solubilidad de saturación es la creación de superficies de alta energía cuando se rompen los microcristales de fármaco y forman nanopartículas<sup>23,24</sup>, como resultado, la tasa de difusión del componente activo aumenta y los máximos niveles plasmáticos se alcanzan más rápidamente, es decir, aumenta su biodisponibilidad.

El incremento en la tasa de disolución de las partículas submicrométricas está directamente relacionado con un incremento en el área superficial que termina aumentando su velocidad de disolución. Adicionalmente, la distancia difusional sobre la superficie de las nanopartículas del fármaco disminuye, y esto lleva a un incremento del gradiente de concentración. Los incrementos simultáneos en el área de superficie y en el gradiente de concentración, causan un incremento más pronunciado en la velocidad de disolución comparados con un producto micronizado; estas ventajas únicas para aumentar la solubilidad de un principio activo poco soluble sólo las presentan las nanosuspensiones sobre otras formas farmacéuticas<sup>25</sup>.

Las nanosuspensiones son usadas entonces con moléculas de baja solubilidad en

medio acuoso, baja permeabilidad a membranas biológicas o ambas. Adicionalmente, la reducción en el tamaño de partícula tiene la gran ventaja de permitir la administración vía intravenosa de medicamentos poco solubles sin bloqueo de los capilares sanguíneos<sup>20,26</sup>.

Debido a que en muchos casos no es suficiente con garantizar sólo la dosificación adecuada sino que también es necesario garantizar o prolongar el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo para ejercer su efecto farmacológico y aumentar el tiempo de frecuencia de administración, se usan estrategias como la adición de compuestos poliméricos que tienen la doble función de aportar estabilidad a la nanosuspensión y otorgar un periodo de liberación prolongado en el tiempo. Existen numerosos estudios sobre el uso de algunos compuestos poliméricos que cumplen estas funciones, entre los cuales se encuentran los polímeros de la familia de los acrilatos que permiten obtener formulaciones en forma de nanosuspensiones poliméricas que pueden ser usadas en humanos y que poseen buenas características de biocompatibilidad, propiedades de estabilidad aumentada y liberación modificada del componente activo de la formulación<sup>27</sup>.

Si bien es necesario estabilizar una nanosuspensión, ésta es más estable que una suspensión de partículas de mayor tamaño. La estabilidad de las partículas obtenidas en una nanosuspensión es atribuida a su tamaño de partícula uniforme, el cual puede ser obtenido por varios procesos de manufactura. La ausencia de partículas con grandes diferencias en tamaño en una nanosuspensión previene la existencia de diferentes solubilidades de saturación y gradientes de concentración,

previniendo entonces el efecto de maduración de Ostwald. La maduración de Ostwald es responsable del crecimiento de cristales y la subsecuente formación de micropartículas. Esto es causado por una diferencia en la presión de disolución/solubilidad de saturación entre las partículas grandes y pequeñas. La difusión de moléculas del área de concentración más alta alrededor de pequeñas partículas las cuales tienen una más alta solubilidad de saturación a una área alrededor de partículas más grandes que poseen una concentración más baja de fármaco. Esto lleva a la formación de una solución supersaturada alrededor de las partículas más grandes y consecuentemente a la cristalización y crecimiento de partículas grandes<sup>24</sup>.

Los métodos convencionales de precipitación se denominan tecnologías "Bottom Up". Por ejemplo, en la nanoprecipitación, se busca iniciar la formación de partículas desde el tamaño más pequeño de la molécula hasta el tamaño nanométrico del fármaco, para tal fin el fármaco es disuelto en un solvente en el cual es altamente soluble y luego, se añade esta solución a un medio donde el fármaco es insoluble (antisolvente) pero que es miscible con el solvente, esto se hace para lograr precipitar el fármaco en forma de cristales de un tamaño adecuado para la formación de nanopartículas.

La ventaja básica de la técnica de precipitación es el uso de equipos simples y de bajo costo. El reto fundamental es que durante el procedimiento de precipitación de los cristales de fármaco, es necesario controlar tanto el tamaño como la velocidad de crecimiento de los cristales mediante la adición de un tensoactivo, surfactante o

agente estabilizante y también para evitar la formación de macropartículas que podrían ser nocivas para el organismo y que a su vez no presentan las propiedades propias y características de las nanopartículas. La limitación de esta técnica de precipitación es que el fármaco debe ser soluble en al menos un solvente y este solvente debe ser miscible con el solvente de precipitación (antisolvente) en el cual el fármaco es poco soluble o insoluble.

Debido a que no es suficiente en muchos casos garantizar solo la dosificación adecuada sino que también es necesario garantizar el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo para ejercer su efecto farmacológico y aumentar el tiempo de vida media, se han planteado estrategias tales como la adición de compuestos poliméricos, que pueden aportar estabilidad a la nanosuspensión y otorgar un periodo de liberación prolongado en el tiempo.

#### **1.4. Nanosuspensiones poliméricas**

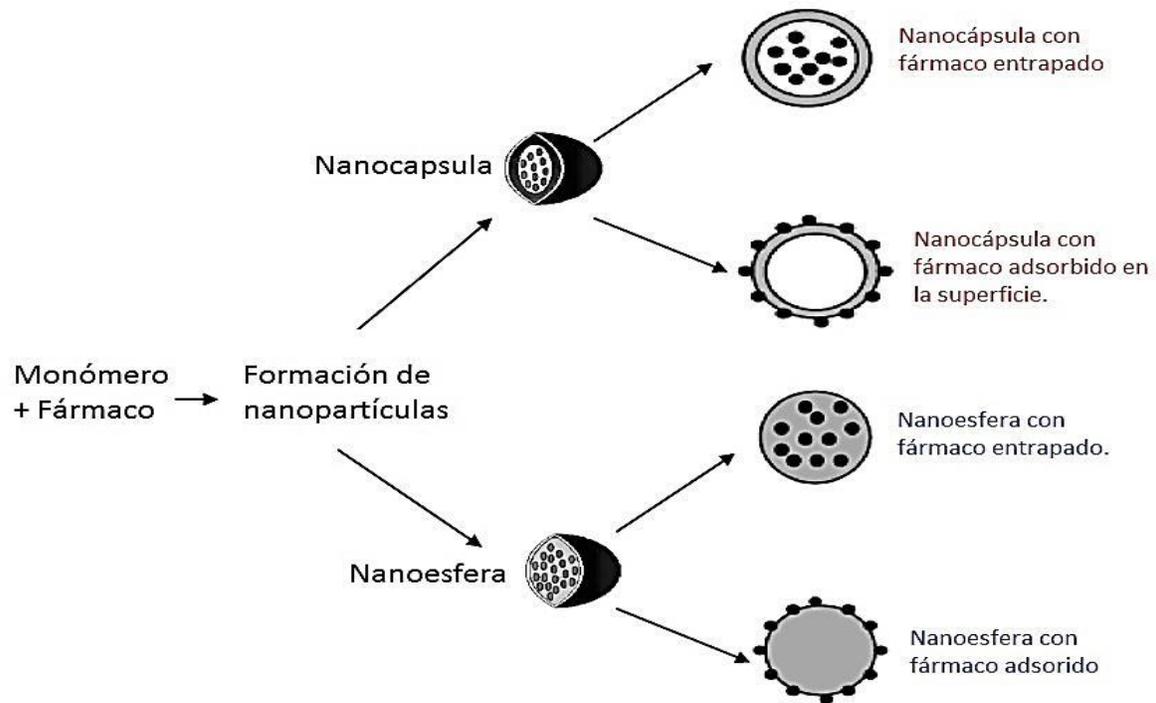
Debido al alto número de fármacos con muy baja solubilidad en medio acuoso, se han propuesto muchas técnicas para poderlos incorporar en diversos tipos de formas farmacéuticas tales como dispersiones sólidas, emulsiones, liposomas y nanopartículas basadas en transportadores lipídicos o poliméricos, entre otros.

Una nanosuspensión polimérica para uso farmacéutico es una dispersión coloidal que está compuesta por partículas sólidas muy finas de fármaco, encapsuladas o embebidas en una matriz polimérica. La nanosuspensión es estabilizada utilizando

sales, surfactantes, polímeros o una mezcla de estos. Estas nanosuspensiones tienen una elevada carga de fármaco, le otorgan mayor estabilidad, reducen la incidencia de efectos secundarios asociados en muchos casos al alto porcentaje de excipientes (surfactantes, cosolventes, etc.) y se pueden obtener a bajos costos de preparación<sup>28</sup>.

Una denominación general de nanosuspensión polimérica es un nombre colectivo destinado para nombrar dos diferentes tipos de objetos coloidales que según su organización estructural pueden ser denominados como nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC), las cuales pueden ser obtenidas dependiendo del proceso de preparación empleado. Básicamente, las nanoesferas son sistemas de una matriz sólida constituida por un polímero y en el cual el fármaco está uniforme y físicamente disperso, mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los cuales el fármaco está ubicado en una cavidad central que puede ser sólida o líquida y que está rodeada por una capa de polímero<sup>29,30</sup>, ver **Figura 3**.

Además de todas las ventajas de las nanopartículas, las nanosuspensiones de partículas poliméricas usadas como transportadores permiten obtener perfiles de liberación modificada, adicionalmente, pueden ser funcionalizadas para lograr una liberación sitio dirigida y mejorar la eficiencia en la entrega del fármaco en el lugar de acción.



**Figura 3:** Tipos de nanopartículas poliméricas.

Para la preparación de nanosuspensiones se pueden emplear una variedad de materiales, incluyendo polímeros. La selección del agente transportador polimérico debe estar basada en los criterios de la aplicación final y se deben considerar varios factores como por ejemplo<sup>31</sup>:

- Tamaño final deseado de las nanopartículas.
- Propiedades del fármaco: (solubilidad en medio acuoso, estabilidad, etc).
- Afinidad entre el fármaco y el polímero.
- Características de superficie y funcionalidad de las nanopartículas deseadas.
- Grado de biodegradabilidad y biocompatibilidad.
- Perfil de liberación del fármaco en el producto final.

Dependiendo de los criterios seleccionados para la preparación de nanopartículas poliméricas, los métodos pueden ser clasificados teniendo en cuenta sus ventajas y desventajas, algunas de estas consideraciones a tener en cuenta se muestran en la

**Tabla 1.**

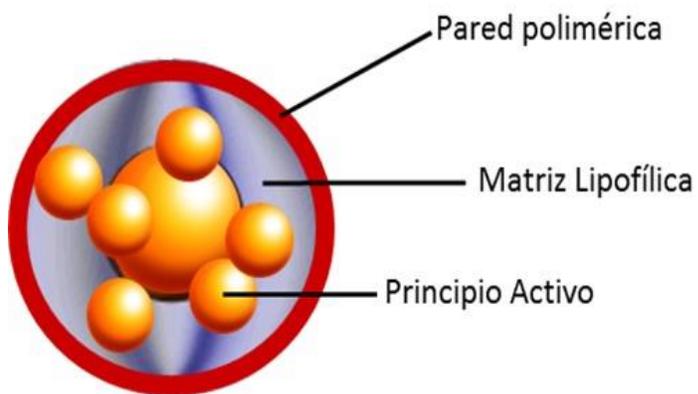
La selección de la técnica de preparación está muy ligada a los recursos y equipos con los que se cuente para su preparación y a las características deseadas de las nanopartículas que se pretendan obtener, adicionalmente dependiendo de los componentes y de la metodología de preparación será posible obtener nanocápsulas o nanoesferas las cuales son las principales formas nanoparticuladas que se pueden obtener usando transportadores poliméricos y las cuales se describen en el siguiente numeral.

**Tabla 1:** Nanopartículas poliméricas: ventajas de los métodos de preparación<sup>24</sup>

Método	Simplicidad del procedimiento	Necesidad de purificación	Facilidad de escalado	Eficiencia de encapsulación (%)	Seguridad de los componentes
<b>Polimerización de monómeros</b>					
<i>Polimerización - emulsión</i>					
Orgánica	Baja	Alta	NR	Baja	Baja
Acuosa	Alta	Alta	Alta	Alta	Media
polimerización interfacial	Baja	Alta	Media	Alta	Baja
<b>Polímeros preformados</b>					
<i>Sintéticos</i>					
Emulsificación/Evaporación de solvente	Alta	Baja	Baja	Media	Media
Desplazamiento de solvente y deposición interfacial	Alta	NR	NR	Alta	Media
Salting out	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja
Emulsión/Difusión de solvente	Media	Media	Alta	Alta	Media
<b>Polímeros preformados</b>					
<i>Naturales</i>					
Albúmina	NR	Alta	NR	Media	Baja
Gelatina	NR	Alta	NR	Media	Baja
<b>Polisacáridos</b>					
Alginato	Alta	Media	Alta	Alta	Alta
Quitano	Alta	Media	Alta	Alta	Alta
Agarosa	Media	Alta	NR	NR	Alta
Desolvación	NR	Alta	NR	Baja	Baja

## 1.5. Nanocápsulas

Las nanocápsulas pueden compararse a sistemas vesiculares en el que un fármaco está confinado en una cavidad que consiste en un núcleo interior líquido o sólido rodeado por una membrana polimérica<sup>32</sup>. Sin embargo, visto desde un nivel general, se pueden definir como sistemas nano-vesiculares que presentan una estructura de núcleo-coraza típico en la que el fármaco se limita a un depósito o está ubicado dentro de una cavidad rodeada por una membrana o recubrimiento de polímero<sup>33</sup>, ver **Figura 4**. Esta cavidad puede contener el fármaco en forma líquida o sólida o como una dispersión molecular<sup>34,35,36</sup>. Del mismo modo, este depósito puede ser de naturaleza lipofílica o hidrofílica dependiendo del método de preparación utilizado y las materias primas seleccionadas para tal sistema. Además, teniendo en cuenta las limitaciones operativas de los métodos de preparación, las nanocápsulas pueden también llevar la sustancia activa en su superficie o embebida en la membrana polimérica<sup>37,38</sup>.

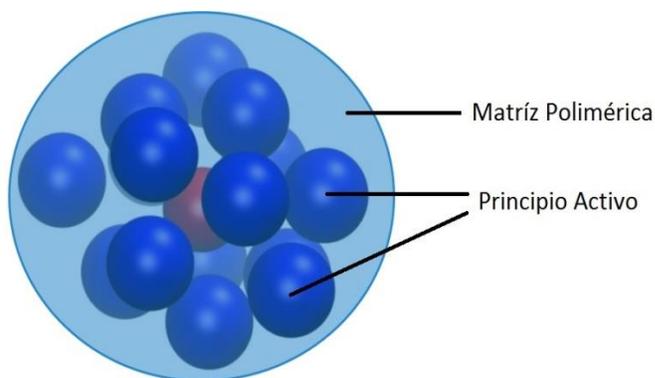


**Figura 4:** Representación esquemática de una Nanocápsula.

Se muestran en este caso las nanopartículas del principio activo embebidas en el interior de la matriz lipofílica y la pared polimérica que forma la cápsula.

## 1.6. Nanoesferas

Las nanoesferas son nanopartículas compuestas generalmente de una matriz polimérica con moléculas o nanopartículas de principio activo embebido en el interior, ver **Figura 5**. Las nanoesferas se encuentran dentro de un rango de tamaño que puede ir desde los 10 nm hasta los 200 nm, el principio activo que contienen puede ser de naturaleza cristalina o amorfa y dichas nanoesferas tienen la capacidad de proteger al principio activo embebido dentro de ellas de la degradación química o enzimática que se puede producir dentro del organismo<sup>39</sup>. Adicionalmente las nanoesferas (al igual que las nanocápsulas) brindan ventajas en cuanto a la estabilidad del principio activo en las formulaciones que las contienen, otorgando protección a condiciones del medio como lo son la luz, humedad y otras condiciones que en otro tipo de formulaciones convencionales no pueden ser prevenidas o evitadas<sup>33</sup>.



**Figura 5:** Representación esquemática de una Nanoesfera.

Se muestran las nanopartículas del Principio activo embebidas en el interior de la matriz polimérica.

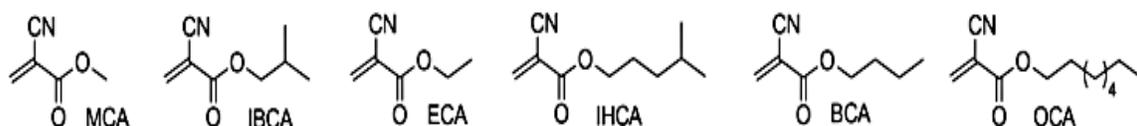
Algunas de las matrices más comunes de las nanoesferas biodegradables incluyen: Albumina, almidones modificados, gelatina, Acido Poliláctico, y algunos tipos de esteres de cianoacrilato.

## 1.7. Polialquil-cianoacrilatos (PACAs)

Una de las principales condiciones al momento de elegir los componentes de una formulación de una nanosuspensión polimérica es que el polímero seleccionado presente buenas características de biocompatibilidad y que no sea tóxico para el organismo, esto aplica para todos los productos a ser destinados para uso sistémico humano<sup>40</sup>.

Los alquil-cianoacrilatos son monómeros ampliamente conocidos, extremadamente apreciados por su alta reactividad y excelentes propiedades adhesivas de los polímeros resultantes. Los cianoacrilatos de cadena media y larga han sido desarrollados para propósitos biomédicos tales como pegamento para cerrar heridas de la piel y material embolítico para cirugía endovascular. Varios productos comerciales basados en cianoacrilatos han emergido de su uso en el campo biomédico, principalmente orientados a la adhesión de tejidos. Por ejemplo, el Metil-cianoacrilato (MCA) es el principal componente en el adhesivo de tejidos denominado Biobond® y los esteres de alquilo de cadena más larga tales como n-butil-cianoacrilato (nBCA) o octil-cianoacrilato (OCA), para aplicaciones similares han sido comercializados bajo las marcas de Indermil® Liquiband® y Dermabond®, respectivamente<sup>41</sup>, en la **Figura 6** se pueden apreciar las estructuras moleculares de los principales monómeros de cianoacrilato y los más empleados en aplicaciones biomédicas.

Los ésteres de polialquil-cianoacrilato (PACA) son polímeros que han sido ampliamente usados en la producción de nanopartículas. Los PACAs tienen perfiles de seguridad, biodegradabilidad y biocompatibilidad que han sido bien documentados. La mayor ventaja de las nanopartículas de PACA es su rápida eliminación del organismo, en tan solo unos pocos días, como resultado de su rápida degradación in vivo<sup>22</sup>.



**Figura 6:** Estructura química de algunos monómeros de etil-cianoacrilato usados en la preparación de Nanopartículas poliméricas.

**MCA:** Metil-cianoacrilato; **IBCA:** Isobutil-cianoacrilato; **ECA:** Etil-cianoacrilato; **IHCA:** Isohexil-cianoacrilato; **BCA:** Butil-cianoacrilato; **OCA:** Octil-cianoacrilato.

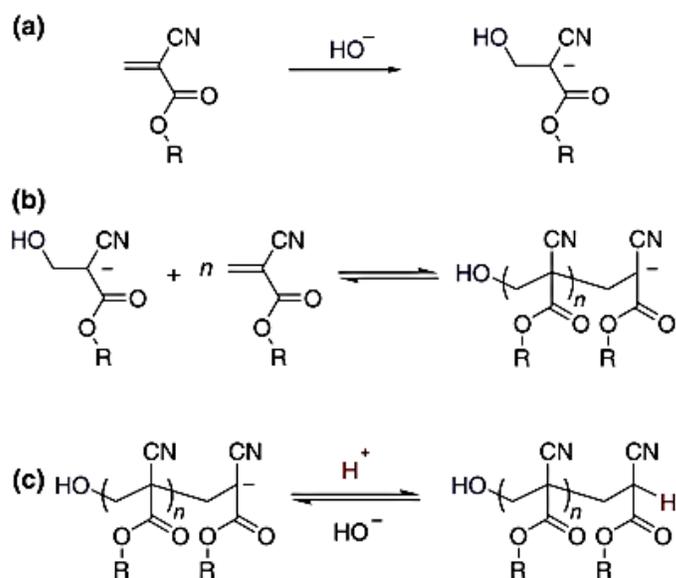
Las primeras nanopartículas coloidales biocompatibles y bioerosivas basadas en materiales a base de PACA fueron preparadas en 1979 y hasta el día de hoy estos materiales permanecen bajo investigación y mantienen la promesa para el desarrollo de nuevas formulaciones para la liberación específica de fármacos. Diferentes tipos de nanopartículas de PACA han sido desarrolladas durante los últimos 33 años, tales como nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas híbridas magnético-poliméricas, nanopartículas de larga circulación en el organismo, así como NP funcionalizadas con ligandos de especificidad, en la **Figura 3** se muestran los tipos de nanopartículas que se pueden obtener con estos polímeros. Una gran variedad de compuestos bioactivos han sido cargados en nanopartículas de PACA, tales como citostáticos, antibióticos, agentes antiretrovirales, antifúngicos, AINES, proteínas bioactivas, nucleótidos, etc<sup>42</sup>.

En un caso ideal, estos nanotransportadores pueden ser cargados con uno o varios fármacos y pueden ser dirigidos a una ubicación patológica específica en el organismo, produciendo una elevada biodisponibilidad del fármaco en el sitio de acción, alcanzando por ejemplo altas concentraciones de fármaco en células infectadas o anormales y baja concentración en células normales, disminuyendo entonces la toxicidad del fármaco y los efectos adversos indeseables y permitiendo incluso disminuir la dosis efectiva; también se puede lograr la protección de fármacos inestables a factores externos.

Se ha descubierto que muchos polímeros sintéticos diferentes pueden ser usados para la preparación de varios nanotransportadores de fármacos como por ejemplo: Acido poliláctico (PLA), copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico (PLGA), poli(alquil-cianoacrilatos) (PACA), poli( $\epsilon$ -caprolactona), etc. Cada uno de estos polímeros posee ventajas y desventajas, y éstas deben ser tenidas en cuenta cuando se pretende desarrollar nuevos sistemas de liberación<sup>42</sup>.

Los monómeros de alquil-cianoacrilato son altamente reactivos y pueden ser polimerizados por vía aniónica<sup>43</sup>, zwitterionica o mecanismos radicalarios en medios de polimerización adecuados<sup>27</sup>, dando como resultado nanotransportadores tipo nanoesferas, nanopartículas core-shell (con polímeros hidrofílicos covalentemente unidos sobre la superficie), nanocápsulas (con centro oleoso o acuoso), nanopartículas híbridas con centro magnético, entre otras<sup>42</sup>.

Para los mecanismos de polimerización de cianoacrilatos se han propuesto varios postulados y se ha reportado que la polimerización aniónica vía emulsión/dispersión en medio ácido es el principal mecanismo de polimerización y que se da paso a paso comprendiendo un mecanismo de propagación y terminación reversible <sup>44</sup>, **Figura 7**.



**Figura 7:** Representación de la formación de polialquilcianoacrilato por polimerización aniónica<sup>44</sup>.

**(a)** Iniciación;  
**(b)** propagación reversible;  
**(c)** terminación reversible.

Básicamente, lo que ocurre es una formación de oligómeros de polialquilcianoacrilato en forma de gotas de monómero las cuales son inhibidas por los agentes ácidos presentes en el medio y a la vez son reversiblemente terminadas por los agentes inhibidores ácidos. Seguidamente, ocurre la etapa de reiniciación y la terminación causada por especies con “cadenas vivientes” produciendo una reacción de mayor polimerización hasta alcanzar unos pesos moleculares a los cuales se logra en última instancia un equilibrio que es similar a un proceso de despolimerización y re-polimerización. En lo que sí coinciden los postulados del mecanismo de polimerización de los PACA es que son mediados por la presencia de iones hidroxilo provenientes de la fase acuosa independientemente de cualquier otro reactante existente en el medio donde se lleva a cabo la polimerización<sup>44</sup>.

En contraste con otros sistemas de polimerización que requieren aporte de energía la cual puede comprometer la estabilidad del fármaco incorporado, el método de polimerización acuosa con polialquil-cianoacrilatos es iniciado espontáneamente a temperatura ambiente, esto debido principalmente a los iones hidroxilo que resultan de la disociación del agua del medio, sin embargo algunos fármacos de naturaleza básica pueden actuar como iniciadores. Estos hidroxilos inducen una polimerización iónica la cual se da de una forma muy rápida<sup>45</sup>. Por esta razón, el pH del medio determina la velocidad de polimerización. El pH del medio debe ser acidificado en un rango de 1,0 a 3,5<sup>46</sup>, con el fin de prevenir una polimerización excesivamente rápida y posibilitar la formación de nanopartículas monodispersas.

Las nanopartículas de PACA tienden a ser una buena alternativa para la formulación de nanopartículas ya que son consideradas como moléculas biodegradables; la polimerización ocurre a temperatura ambiente y no requiere de un iniciador químico, evitándose así el calentamiento y otras formas de radiación. El mecanismo de polimerización es un proceso aniónico<sup>27</sup> tal como se observa en la **Figura 7**. Los fármacos hidrofílicos pueden ser encapsulados con buena eficiencia usando este tipo de polímeros. Moléculas poco solubles en agua pueden ser cargadas en nanoesferas de PACA pero deben ser disueltas previamente en un solvente en el cual sean más solubles o en un surfactante líquido antes de ser adicionadas al medio de polimerización acuoso<sup>29,45</sup>.

## 1.8. Síntesis de nanocápsulas y nanoesferas con polialquil-cianoacrilatos

Las nanocápsulas son nanopartículas de tipo depósito en las que los fármacos pueden encapsularse de acuerdo con sus características y afinidad por el agente encapsulante. En otras palabras, las nanocápsulas que contienen materiales oleosos o lipofílicos serán capaces de encapsular fármacos hidrofóbicos, mientras que las sustancias hidrofílicas se encapsularán eficazmente en nanocápsulas que contienen agua<sup>41</sup>. Básicamente, la cápsula está formada por efecto de la polimerización aniónica espontánea del cianoacrilato de alquilo que tiene lugar en la interfase entre la fase dispersa y la fase continua<sup>41</sup>.

Para la obtención de nanocápsulas se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

- El comportamiento de difusión del solvente orgánico (que actúa como soporte monomérico) dentro de la fase acuosa. Esto determina la naturaleza de la formación de las nanopartículas de polímero.
- Precipitación simultánea del polímero en la interfase agua/solvente orgánico, es decir, el polímero debe ser insoluble tanto en la fase acuosa como en la fase orgánica. Normalmente, las nanocápsulas exhiben un tamaño dependiente de varios parámetros fisicoquímicos tales como la cantidad de agente estabilizante y la naturaleza y concentración del monómero y del fármaco encapsulado.

En 1979, Couvreur y colaboradores desarrollaron un proceso simple para la obtención de nanoesferas de cianoacrilatos de cadena corta en el cual se adicionaba el monómero lentamente a un medio previamente acidificado (pH entre 2 y 3) y con agitación a una solución que contenía un agente estabilizante, en este caso un surfactante no iónico, luego de varios estudios con sistemas similares lograron identificar algunos de los parámetros más importantes que afectaban la cinética de polimerización y las características de las macromoléculas y las nanoesferas que resultaban del proceso de polimerización en este medio acuoso<sup>44</sup>.

### **1.9. Mecanismos de estabilización de Nanosuspensiones**

En el proceso de obtención de nanopartículas, uno de los factores más importantes a tener en cuenta durante el diseño del proceso de obtención es la definición del mecanismo de estabilización adecuado, el cual dependerá del tipo de nanopartículas que se pretenden obtener, del medio en el que éstas estén en su forma final y del tipo de interacciones que se puedan presentar entre ellas y los demás componentes del sistema.

El estabilizador o agente estabilizante juega un papel muy importante en la formulación de una nanosuspensión. En ausencia de un agente estabilizante apropiado, la alta energía de superficie de las nanopartículas puede inducir aglomeración o agregación. Las funciones principales de un agente estabilizante están en prevenir la maduración de Ostwald, la aglomeración o la floculación

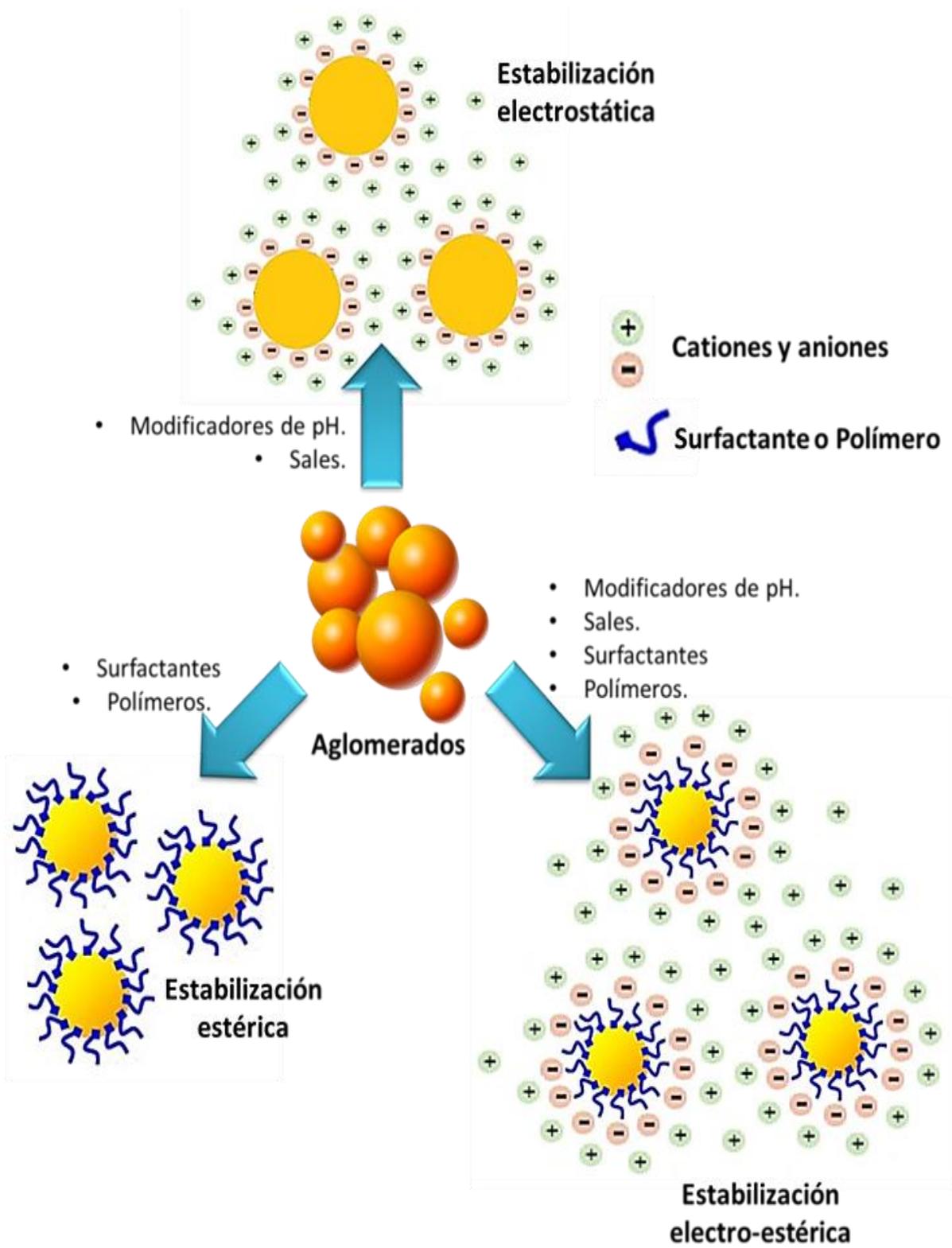
dependiendo del sistema nanoparticulado, esto a fin de obtener una formulación físicamente estable formando barreras estéricas o iónicas o ambas.

El tipo y cantidad de agente estabilizante tiene un pronunciado efecto sobre la estabilidad física y el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de la nanosuspensión. En algunos casos, se requiere una mezcla de agentes y mecanismos estabilizadores para obtener una nanosuspensión óptima y estable<sup>47</sup>. La proporción fármaco: agente estabilizante en la formulación puede variar de 1:20 a 20:1 y debe ser investigada específicamente para cada caso o sistema. Los agentes estabilizantes que han sido ampliamente estudiados incluyen celulosas, poloxámeros, polisorbatos, lecitinas, povidonas, entre otros<sup>47</sup>.

Otro de los aspectos que se debe tener en cuenta a la hora de seleccionar el agente estabilizante en un sistema nanoparticulado es el uso que se le dará; en este sentido es importante resaltar que para sistemas a ser usados como sistemas de liberación o transporte de fármacos se debe tener en cuenta la ruta o vía de administración: oral, nasal, ocular, parenteral, pulmonar, dérmica, entre otras; también es necesario tener en cuenta la forma farmacéutica final ya que de ello dependerá en gran medida la estabilidad de producto final y la cual se verá afectada por factores como: sedimentación, aglomeración, o maduración de Ostwald y posteriormente la formación de partículas o agregados de tamaño micrométrico los cuales pueden producir efectos nocivos en el organismo, como por ejemplo, en el caso de un sistema para uso parenteral la formación de agregados de tamaño micrométrico puede causar bloqueo de los capilares y producir obstrucciones del flujo

sanguíneo<sup>48</sup>. Adicionalmente se debe tener en cuenta que si dicho sistema será administrado como medicamento, los agentes estabilizantes deberán estar aprobados para su uso por el ente regulatorio del país en el que se pretenda comercializar dicho producto.

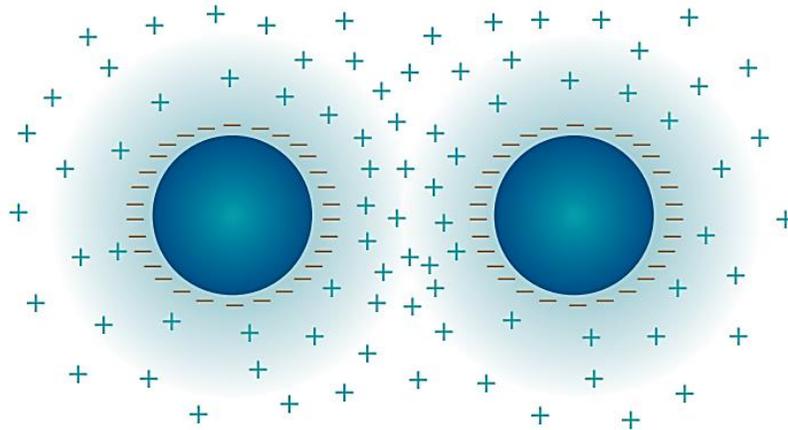
Existen tres tipos de mecanismos de estabilización de sistemas coloidales o nanoparticulados: estabilización electrostática, estabilización estérica y estabilización electroestérica. A continuación se muestra una representación esquemática de los principales mecanismos de estabilización de las nanopartículas y los principales agentes para lograr dicha estabilización,



**Figura 8:** Principales mecanismos de estabilización de nanopartículas.

### 1.9.1. Estabilización electrostática

Cuando una partícula se encuentra en un medio de dispersión líquido los grupos iónicos presentes pueden adsorberse en la superficie de la partícula a través de diferentes mecanismos para formar una capa cargada. Para mantener la electro-neutralidad, un número igual de contra iones con carga opuesta rodea las partículas y se forma una doble capa de carga neutra, en la **Figura 9** se observa una representación de este mecanismo.

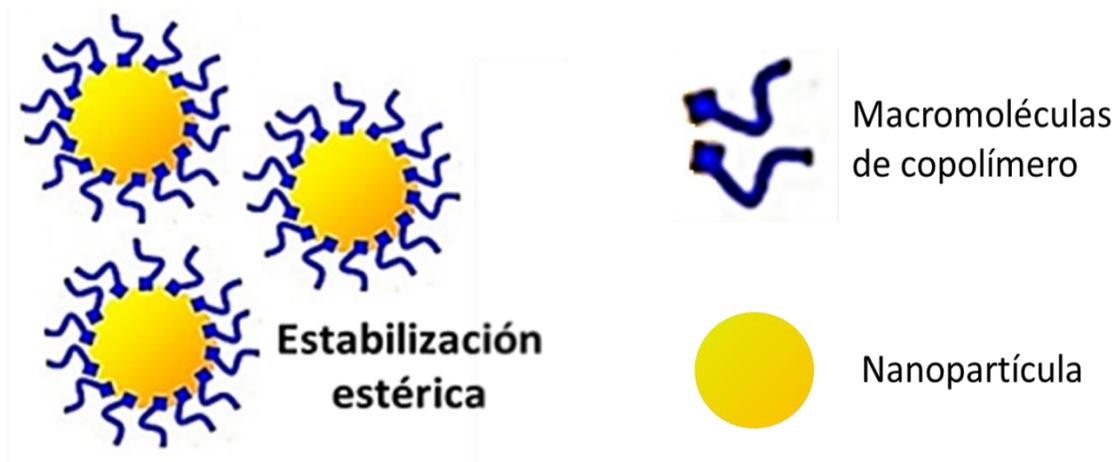


**Figura 9:** Estabilización electrostática de partículas cargadas negativamente<sup>49</sup>.

En la estabilización electrostática, es la repulsión mutua de estas doble capas que rodean las partículas las que proporcionan la estabilidad, por lo tanto, si el potencial eléctrico asociado con la doble capa es suficientemente alto, la repulsión electrostática entre las partículas impide su agregación (**Figura 9**). En un sistema regulado electrostáticamente, el grado de dispersión se controla ajustando la fuerza iónica o el pH de la solución electrolítica por medio de la adición de sales o agentes modificadores de pH.

### 1.9.2. Estabilización estérica

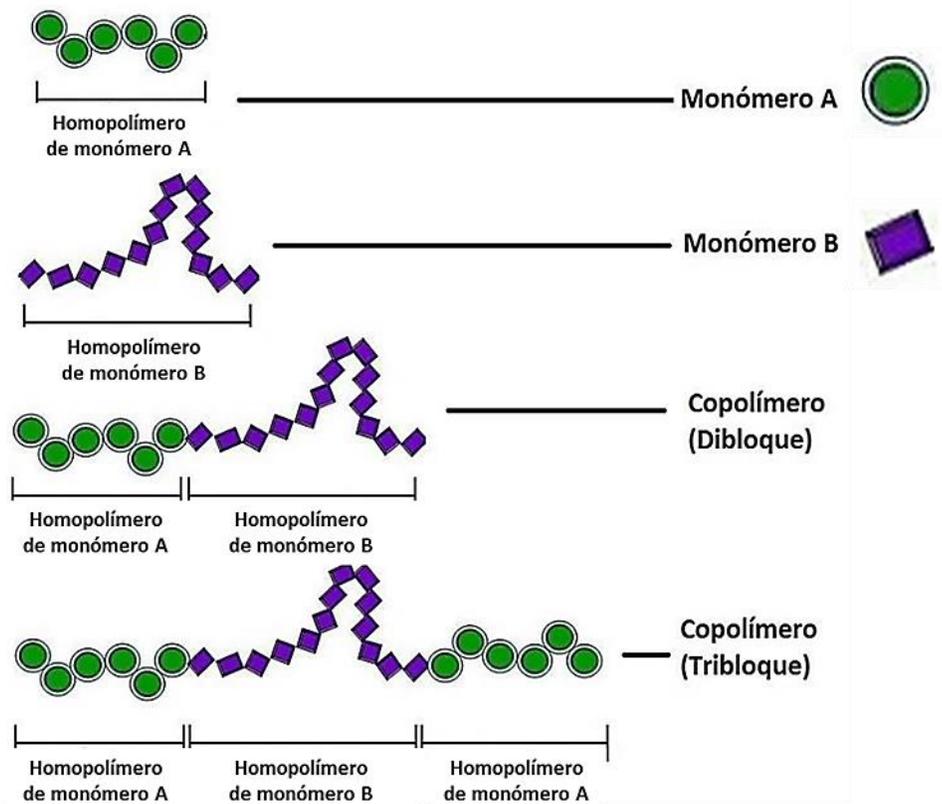
La estabilización estérica se logra por la adhesión en la superficie de la nanopartícula de macromoléculas de agente estabilizante estérico, por ejemplo, los agentes estabilizantes estéricos de naturaleza polimérica que poseen propiedades anfifílicas tienen en su estructura cadenas ramificadas que al entrar en contacto con las cadenas de otras nanopartículas reducen las interacciones debido a un impedimento estérico<sup>50</sup>, ver **Figura 10**.



**Figura 10:** Representación del mecanismo de estabilización estérico.

El mecanismo de estabilización estérico es uno de los más usados en la preparación de sistemas basados en nanopartículas poliméricas de cianoacrilatos<sup>42,43,51,52,53</sup> debido a las características de superficie de estos sistemas poliméricos ya que poseen bajo potencial de cargas en su superficie, por lo cual se prefiere el uso de agentes estabilizantes estéricos. Dentro de los principales agentes estabilizantes estéricos se encuentran los poloxámeros, más específicamente los copolímeros de bloque.

### 1.9.2.1. Copolímeros de bloque

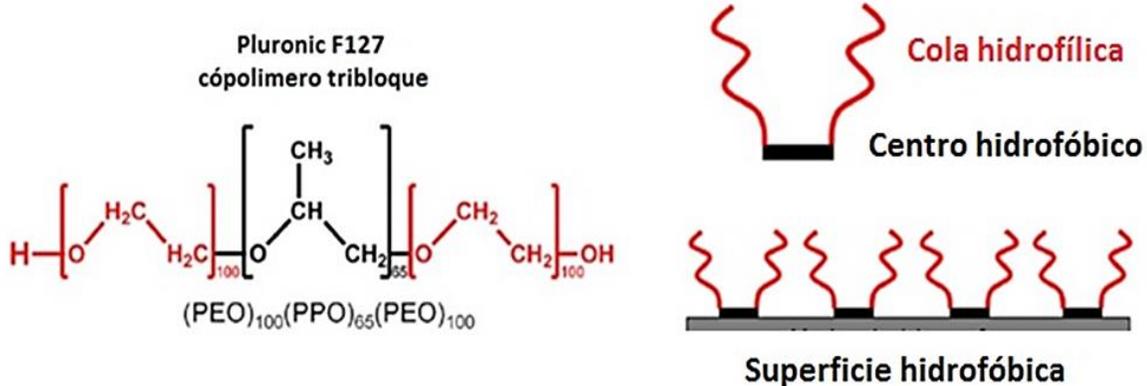


**Figura 11:** Representación simplificada de cadenas poliméricas y copolímeros.

Si tenemos en cuenta que un polímero puede ser definido como una molécula de relativamente alto peso molecular la cual consta de unidades regulares repetidas (monómeros), o químicamente similares conectadas por enlaces covalentes primarios, podríamos entonces definir un copolímero como un polímero constituido por dos monómeros diferentes incorporados dentro de la misma cadena polimérica<sup>54,55</sup>. Los copolímeros pueden presentarse estructuralmente con formas estadísticamente aleatorias, bloques alternados, ramificados, entre otros. Cuando el polímero está conformado por dos o más monómeros en forma de homopolímeros

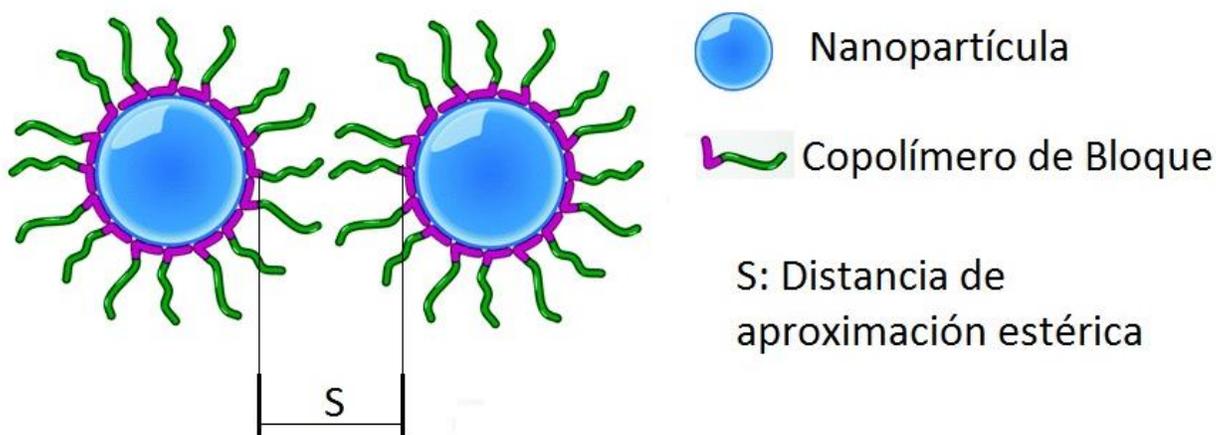
(polímeros formados por un solo monómero) unidos entre sí, se considera que cada uno de estos homopolímeros está conformando un bloque y cada bloque del copolímero puede tener propiedades muy diferentes dependiendo de las propiedades del monómero que lo conforma, por ejemplo se puede tener un copolímero formado por un bloque hidrofílico y otro bloque hidrofóbico. Ver **Figura 11**; podríamos decir entonces que los copolímeros de bloque poseen alternativas infinitas para ser usados como agentes estabilizantes de nanopartículas.

Los copolímeros de bloque hacen parte del grupo de los agentes estabilizantes estéricos los cuales son ampliamente usados debido a sus propiedades anfifílicas y principalmente por que poseen buena compatibilidad biológica, dentro de este grupo se encuentran los denominados Poloxámeros o copolímeros de bloque y comercialmente conocidos con los nombres de Synperonic®, Kolliphor®, Pluronic®, **Figura 12**, entre otros, y se comercializan bajo diferentes referencias dependiendo del tipo de cadenas poliméricas que los conforman y de su proporción; estos poloxámeros son ampliamente usados en sistemas de liberación de fármacos<sup>38,45,56,57</sup>, y algunos de ellos son reconocidos como excipientes farmacéuticos aprobados por las agencias gubernamentales para el control de medicamentos como la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA).



**Figura 12:** Representación de la fórmula estructural del Pluronic® F127 y su forma de interacción con una superficie hidrofóbica.

La estabilización estérica proporciona una ruta alternativa de control de la estabilidad coloidal que puede usarse en sistemas acuosos y no acuosos. En este enfoque, las moléculas poliméricas adsorbidas se utilizan para crear repulsión estérica entre las nanopartículas. Cuando dos partículas con capas de polímero adsorbidas se aproximan entre sí a una distancia de menos del doble del espesor de la capa adsorbida ( $S$ ) tiene lugar una interacción entre las dos capas, **Figura 13**. El grado de estabilización puede definirse cuantitativamente en términos del cambio de energía que se produce en la interacción de las capas adsorbidas.



**Figura 13:** Representación gráfica de estabilización estérica.

### **1.9.3. Estabilización electro-estérica**

Las especies de poli-electrolitos son aditivos ampliamente utilizados que pueden impartir estabilización electrostática y estérica a una dispersión coloidal dada. Estos sistemas se denominan a menudo como estabilizados electroestéricamente. Los poli-electrolitos contienen al menos un tipo de grupo ionizable (por ejemplo, grupos ácido carboxílico o ácido sulfónico), con arquitecturas moleculares que van desde homopolímeros, tales como poli (ácido acrílico) a copolímeros de bloque con uno o más segmentos ionizables. La adsorción de poli-electrolitos está fuertemente influenciada por las propiedades químicas y físicas de las superficies sólidas y el medio disolvente<sup>58</sup>. Para un sistema dado, el comportamiento de adsorción y la conformación de las especies de polielectrólitos pueden ser modulados adaptando las condiciones del disolvente (por ejemplo, pH y fuerza iónica).

### **1.10. Mecanismo de liberación del Fármaco**

El estudio del mecanismo o perfil de liberación del fármaco desde las nanopartículas es de gran importancia para conocer las propiedades de la formulación desarrollada. Los perfiles de liberación del fármaco desde las NP dependen de varios factores como por ejemplo: (a) Desorción de la superficie donde puede estar adherido el fármaco o de la matriz donde puede estar adsorbido, (b) difusión a través de la matriz de la NP, (c) difusión (en caso de nanocápsulas) a través de la pared polimérica, (d) erosión de la matriz de la NP, (e) y procesos combinados de erosión y difusión<sup>59</sup>; a nivel biológico también se suman procesos de biodegradación que

favorecen una mayor erosión y liberación. Uno de los métodos más empleado para el estudio *in vitro* de la liberación del fármaco es la técnica de difusión en bolsa de diálisis<sup>40,60,61,62,63</sup>; de todos los métodos empleados para la realización de pruebas de liberación del fármaco, el método de la bolsa de diálisis es el más versátil, en este método la separación entre las nanopartículas y el fármaco se realiza por un mecanismo de difusión el cual busca dejar pasar el fármaco desde un medio donde está a una concentración definida a un medio donde no hay fármaco inicialmente, esto permite valorar periódicamente la concentración de fármaco en el medio donde no estaba presente y determinar así la cantidad del mismo que se libera en el tiempo y definir un perfil de liberación *in vitro*.

### **1.11. Fármaco de elección: Acetaminofén**

La terapia farmacológica es quizás uno de los recursos más importantes en el tratamiento del dolor; sin embargo, el avance científico en el descubrimiento y diseño de nuevas alternativas ha sido lento e insuficiente, quizás porque el conocimiento de la fisiopatología también ha sido de la misma manera<sup>64</sup>.

En un enfoque práctico y dirigido solamente la tema del dolor nociceptivo, podríamos decir que el arsenal farmacológico en la actualidad está representado por tres tipos de medicamentos a saber: analgésicos opioides (morfina, oxicodona, codeína, etc.), analgésicos puros (acetaminofén, dipironas, entre otros) y los analgésicos antiinflamatorios (tradicionales e inhibidores selectivos de la COX2)<sup>64</sup>.

En pacientes que no pueden ser tratados con AINES, como por ejemplo, las personas con asma bronquial, úlcera péptica, hemofilia, pacientes sensibles a los salicilatos, niños menores de 12 años de edad, mujeres en embarazo o lactantes; el medicamento de elección y el más seguro es el Acetaminofén (ACMP) que ha sido usado durante más de 80 años para tratar diversas formas de dolor y es uno de los analgésicos y antipiréticos más populares y más comúnmente usados en todo el mundo, disponible sin prescripción médica en preparaciones mono y multi-componente. El ACMP también es recomendado como tratamiento de primera línea del dolor asociado con osteoartritis y cáncer. El mecanismo de acción es complejo e incluye el efecto de inhibición de la COX a nivel periférico y central, y mecanismos “redox”, el ACMP es bien tolerado y produce pocos efectos colaterales en el tracto gastrointestinal<sup>65,66</sup>.

Debido a que en muchos casos no es suficiente garantizar sólo la dosificación adecuada, sino que también es necesario garantizar el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo para ejercer su efecto farmacológico y aumentar el tiempo de frecuencia de administración, se usan estrategias como la adición de compuestos poliméricos que tienen la doble función de aportar estabilidad a la nanosuspensión y otorgar un periodo de liberación más prolongado en el tiempo.

En la literatura existen reportes de uso de algunos compuestos poliméricos del tipo acrilato, los cuales permiten obtener formulaciones en forma de nanosuspensiones para uso en humanos con las propiedades de estabilidad y liberación prolongada del componente activo de la formulación. Es por esto, y por el gran conocimiento y

experiencia en el uso del ACMP en el país y en el mundo que se seleccionó como un buen candidato para la elaboración de una nanosuspensión reuniendo los criterios de ser un fármaco de muy baja solubilidad en medio acuoso y de ser muy bien conocido en su farmacología a nivel mundial, estas características se tomaron como base para ser formulado como una nanosuspensión, adicional al hecho de que se pueden modificar sus características farmacotécnicas y farmacocinéticas y darle valor agregado para ser usado en terapias innovadoras.

En la actualidad según el *“listado de registros de Acetaminofén – INVIMA”* elaborado por el ministerio de salud y la protección social, a Enero de 2015 existían en Colombia unos 141 registros sanitarios para medicamentos que contenían ACMP en diversas formas farmacéuticas (tabletas, jarabes, inyectables), esto sin incluir los medicamentos donde se usa acetaminofén (ACMP) en combinación con otros medicamentos<sup>67</sup>.

Según el último reporte de la ANDI sobre la industria farmacéutica en Colombia, en el año 2012 el producto DOLEX® cuyo componente activo es el ACMP estuvo dentro de los 10 productos con más ventas dentro del grupo de medicamentos con más de 49 millones de dólares ocupando el segundo lugar en ventas; en el mismo estudio estuvo el ACMP como medicamento genérico y se ubicó en el décimo puesto en ventas con más de un millón de dólares en el mismo año<sup>68</sup>.

Adicionalmente, el ACMP es uno de los medicamentos más recetados por los médicos de las diferentes instituciones de salud, es el analgésico más usado para el

tratamiento de las patologías relacionadas con dolor leve a moderado y el tratamiento de episodios febriles dentro del contexto de las políticas de salud de nuestro país y es un medicamento de venta libre en Colombia, por lo tanto el ACMP es una alternativa viable para el desarrollo de nuevas y mejoradas formas farmacéuticas que permitan obtener alternativas innovadoras en el tratamiento de las diversas patologías en las que es utilizado y que permitan mejorar o modificar aspectos farmacocinéticos y farmacoterapéuticos.

La incorporación de fármacos poco solubles asociados al tratamiento del dolor en formulaciones de uso parenteral ha hecho que se exploren nuevas técnicas y tecnologías de formulación, especialmente cuando no es posible solubilizar el componente activo con las técnicas de formulación convencionales y también debido a que la cantidad de solventes y/o cosolventes que se requiere debe ser muy alta para lograr las concentraciones deseadas de fármaco en la formulación y a volúmenes aceptables para la administración parenteral, por esto, se han planteado técnicas para obtener formulaciones parenterales en forma de nanosuspensiones que permiten obtener productos finales con concentraciones terapéuticas de fármaco apropiadas y que son funcionales desde el punto de vista farmacotécnico y farmacológico y que de igual manera pueden ser usadas de forma segura en humanos.

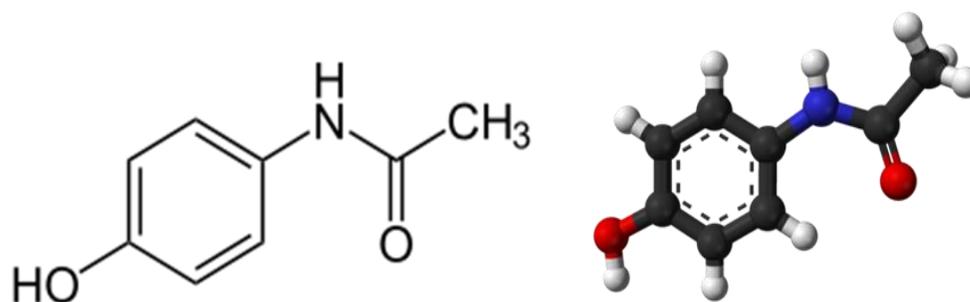
Es por esto que la nanotecnología se ha enfocado en el campo farmacéutico para ser usada como una herramienta para la obtención de nanopartículas de fármacos

activos o como sistemas transportadores de fármacos<sup>20</sup>, lo cual permite mejorar aspectos relacionados con el uso, seguridad y eficacia de los medicamentos.

También se ha demostrado con el paso del tiempo que el uso de sistemas basados en nanopartículas activas o sistemas transportadores para la liberación de fármacos puede cambiar la farmacocinética de diferentes principios activos, dichos cambios pueden resultar en mejoras de los índices terapéuticos. Tales transportadores incluyen micelas poliméricas, NP hechas de polímeros sintéticos biodegradables, proteínas o lípidos; liposomas, niosomas, dendrímeros, nanoemulsiones, nanotransportadores magnéticos, transportadores multifuncionales nanonizados, etc. Estos usualmente representan estructuras esféricas coloidales de tamaño submicrométrico, las cuales deben ser biodegradables y estables en los fluidos corporales, no causar toxicidad sistémica, embolismo o respuesta inmune<sup>42</sup>.

La reducción en el tamaño de partícula hace posible la administración intravenosa de medicamentos poco solubles sin peligro de bloqueo de los capilares sanguíneos. Las nanosuspensiones también pueden ser liofilizadas o secadas por pulverización y las nanopartículas de una nanosuspensión también pueden ser incorporadas en una matriz sólida, como por ejemplo, una matriz polimérica o lipídica sólida. Aparte de esto, las nanosuspensiones tienen la ventaja sobre las formas de dosificación sólidas de ser formas de dosificación líquidas, las cuales presentan tiempos de absorción más rápidos y se hace posible la administración parenteral para un efecto mucho más rápido.

El ACMP (N-acetil-*p*-aminofenol), **Figura 14**, es un derivado del *p*-aminofenol. Fue usado por primera vez en medicina por Von Mering en 1893. Sin embargo, esta molécula ha ganado popularidad desde 1949, después de ser reconocida como el mayor metabolito activo de acetanilida y fenacetina las cuales han demostrado ser excesivamente tóxicas. A pesar de ser un metabolito de estas dos sustancias, el acetaminofén ha demostrado no poseer efectos tóxicos renales ni hematológicos a las dosis habitualmente administradas para su acción farmacológica.



**Figura 14:** Estructura molecular del Acetaminofén (N-acetil-*p*-aminofenol)

El ACMP es moderadamente soluble en agua, 17,39 mg/mL a 30°C<sup>69</sup>, es altamente liposoluble, es un ácido orgánico débil con un pKa de 9,5 y es ionizado en el pH fisiológico de la sangre. El grupo fenólico de la molécula de ACMP posee solubilidad en medio acuoso y forma puentes de hidrógeno<sup>70</sup>.

El ACMP posee acción antipirética y analgésica, pero no posee efectos antiinflamatorios significativos<sup>70</sup>, posee propiedades analgésicas y antipiréticas debido a que es más efectivo contra enzimas para la biosíntesis de prostaglandinas en el sistema nervioso central que en las de la periferia.

### **1.11.1. Propiedades farmacocinéticas de ACMP**

La absorción del ACMP es insignificante a nivel estomacal pero se absorbe de manera muy rápida desde el intestino delgado. La tasa de absorción promedio del ACMP es similar en las partes proximal y distal de intestino delgado. En ratas, la absorción ocurre lentamente desde el estómago y el colon, y es más rápida en el intestino delgado donde el 70% del fármaco es absorbido en los primeros 30 minutos<sup>71</sup>. Esta absorción se da por transporte pasivo con cinéticas de primer orden y el vaciamiento gástrico es el paso limitante de la tasa de absorción del ACMP<sup>70</sup>.

Aunque el ACMP es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal, éste no está completamente disponible en la circulación sistémica después de la administración oral, debido al metabolismo de primer paso. La concentración alcanza un pico en aproximadamente 30 a 60 minutos y la vida media en el plasma es de 2 horas aproximadamente después de la administración a dosis terapéuticas por vía oral<sup>70</sup>. Las dosis terapéuticas usuales producen concentraciones plasmáticas de 5 a 20 µg/mL. Después de 8 horas, solo una pequeña cantidad de ACMP es detectado sin cambios en plasma. La absorción del ACMP administrado por vía oral es predominantemente dependiente de la tasa de vaciamiento gástrico, enfermedades, u otros fármacos o condiciones que puedan alterar esta tasa de vaciamiento gástrico pueden alterar la absorción del mismo<sup>70</sup>.

Generalmente, el ACMP no presenta ningún efecto secundario perjudicial para el organismo, pero la hipersensibilidad o sobredosis en muy pocos casos conduce a la

formación de metabolitos hepatotóxicos y nefrotóxicos, es por esto también que se han propuesto nuevas estrategias de formulación para mejorar los perfiles farmacológicos en el uso de este analgésico.

### **1.12. Nanoprecipitación (solvente/antisolvente)**

La cristalización por la técnica de precipitación solvente/antisolvente es un método de purificación y separación el cual es usado de una manera efectiva para preparar nanopartículas de fármacos poco solubles, esta técnica produce cristales partiendo de soluciones y controla las propiedades cristalinas tales como tamaño de partícula y morfología. El uso de antisolvente en el proceso de cristalización reduce la solubilidad de un soluto en la solución e induce una rápida cristalización. Las propiedades físico-químicas del antisolvente pueden alterar la tasa de mezcla con la solución afectando la tasa de nucleación y el crecimiento de cristales durante la cristalización.

Generalmente, el antisolvente contiene un agente estabilizador, en muchos casos de tipo surfactante, el cual es absorbido en la superficie cristalina para inhibir el crecimiento del cristal. Esta técnica, sin embargo, tiene algunas limitaciones por ejemplo, la dificultad para mantener el tamaño de partícula producido después de la precipitación, usualmente se produce por una alta tasa de crecimiento la cual produce una amplia distribución del tamaño de partícula, por lo que se hace necesario tener en cuenta las proporciones adecuadas de agente estabilizante y fármaco a adicionar, en algunos casos se emplea un agente polimérico, el cual tiene dos funciones principales: la primera es que permite mantener el tamaño de partícula

después de la fase de precipitación, y la segunda es que este polímero puede otorgar un efecto de liberación prolongada en el producto terminado adicional a un posible aumento en la estabilidad del producto.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

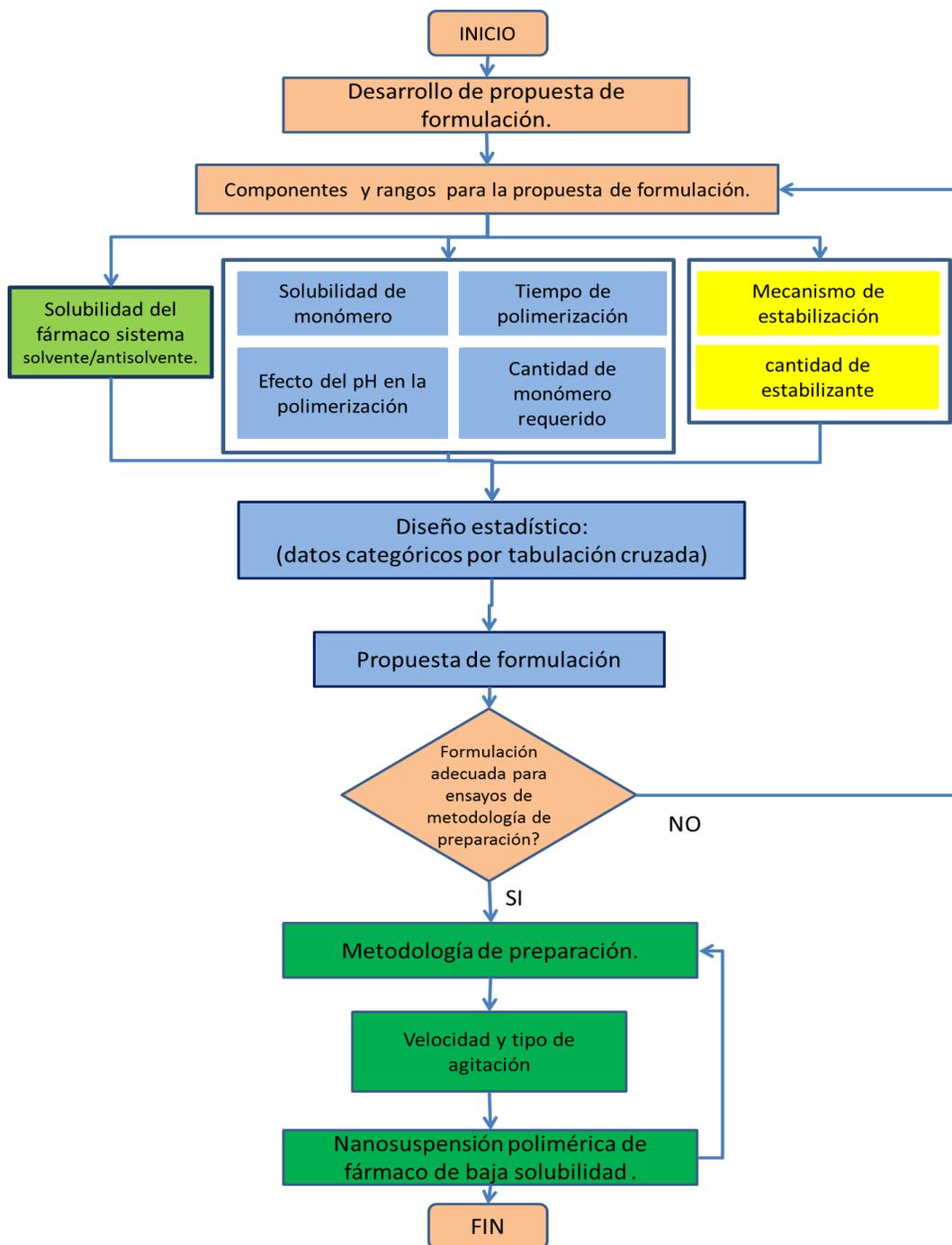
### **2.1. Materiales**

Para la realización de los diferentes ensayos de formulación se utilizaron los siguientes materiales: Acetaminofén USP, Mallinckrodt®, 99,5%; Alcohol etílico Extrapuro, Etanoles del Magdalena, 98,5%; Etil-cianoacrilato, Henkel®; Agua grado inyectable, Corpaul farmacéutica; Pluronic F127, Sigma®; Kolliphor P188, Sigma®; Polietilenglicol 400 GF, DOW®, 92%; Propilenglicol USP, DISAN; Tween 80, Merck®; Glicerina USP, Protokimica, 100%; Ácido Clorhídrico GR, Merck®, Acetonitrilo for HPLC, Merck®; Todos los materiales aquí mencionados fueron proporcionados por CORPAUL-farmacéutica.

### **2.2. Metodología**

Para poder llevar a cabo el presente trabajo es indispensable el desarrollo de un propuesta de formulación a la cual se le evaluarán diferentes parámetros, dicha propuesta estará basada en criterios que buscan proponer una formulación viable para uso farmacéutico por lo que la metodología de preparación estará enfocada hacia una técnica que pueda ser fácilmente escalable a nivel industrial en un futuro cercano.

A continuación se muestra un diagrama donde se esquematizan los procedimientos realizados para la obtención de la propuesta de formulación para la nanosuspensión, ver **Figura 15**.



**Figura 15:** Diagrama donde se esquematizan los procedimientos realizados para la obtención de la propuesta de formulación para la nanosuspensión.

En los siguientes numerales se describen con detalle cada uno de los procedimientos mostrados en el diagrama de la **Figura 15**, estos procedimientos hacen parte de los análisis exploratorios y se tuvieron en cuenta para la elaboración del diseño experimental; a partir de éste, se realizaron los ensayos de optimización de la metodología de preparación de la nanosuspensión.

### **2.2.1. Desarrollo de la propuesta de formulación**

Para el desarrollo de la propuesta de formulación, se tomó como fármaco de elección el acetaminofén debido a varios factores tales como: Baja solubilidad en medio acuoso: 17,39 mg/mL a 30°C<sup>69</sup>, tiempo de vida media estimado de 4 horas<sup>72</sup>, Absorción por vía oral muy baja<sup>73</sup>. Todo esto ha llevado a la búsqueda y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas para la administración del acetaminofén, un ejemplo de ello son las formulaciones de uso parenteral que mejoran la biodisponibilidad y evitan el paso de absorción en el tracto gastrointestinal; sin embargo, las formulaciones parenterales que se encuentran en el mercado: Paracel®, Traucet®, Aeknil®, entre otras, han sido pensadas más para un efecto rápido y no para una liberación modificada que permita mantener las concentraciones plasmáticas en el tiempo sin requerir dosificaciones tan frecuentes. También se debe mencionar el hecho de que son formulaciones con relativa alta concentración de acetaminofén, y como éste tiene baja solubilidad acuosa, se usan altas concentraciones de cosolventes para lograr la dosis requerida en solución pero pueden ser nocivos para el paciente. Adicionalmente se debe considerar que en muchos casos al administrar altas dosis de acetaminofén se alcanzan picos que están en un rango de toxicidad

y/o se aumentan la aparición de efectos adversos, pero por su corta vida media, luego se tienen largos períodos de concentraciones subterapéuticas que traen complicaciones y no es posible administrar mayores cantidades de principio activo porque no se debe superar la dosis máxima diaria; si se pudiera prolongar durante el tiempo la concentración plasmática en una dosis terapéutica y no en niveles tóxicos o subterapéuticos, serían mucho más efectivas y seguras las terapias. Por todo esto, se seleccionó el acetaminofén como modelo para estos ensayos pensando en que se continuarán estudios con el fin de obtener una forma farmacéutica que posiblemente pueda mejorar estas características. Se debe tener en cuenta que la FDA recientemente limitó el contenido de acetaminofén en las prescripciones de tabletas a 325 mg, para una dosis total diaria de 2.600 mg<sup>74</sup> lo que reafirma el hecho de que se deben buscar alternativas de formulaciones que permitan alcanzar las concentraciones terapéuticas sin causar efectos tóxicos en los pacientes.

#### **2.2.1.1. Componentes y rangos para la propuesta de formulación**

Para la selección de los demás componentes de la formulación se tuvieron en cuenta los componentes principales de nanosuspensiones poliméricas reportadas en la literatura tales como tipo y características del polímero que usaban, tipos de mecanismos y agentes de estabilización y sobretodo la metodología de preparación a fin de tener una propuesta de formulación que pudiera ser escalable y fácil de manufacturar a nivel industrial, es decir, una metodología de formulación en la que no se requiera el uso de equipos complejos o muy costosos para la producción de dicha nanosuspensión.

Una vez seleccionados los componentes deseados de la formulación se procede con los ensayos exploratorios de pre-formulación, formulación y optimización de los rangos y concentraciones de trabajo, estos ensayos de optimización se realizaron bajo el diseño estadístico de Datos categóricos por tabulación cruzada y del cual se habla con mayor profundidad en el numeral **2.2.2**.

#### **2.2.1.2. Solubilidad del fármaco en el sistema de solvente/antisolvente**

Para la selección del solvente más adecuado se realizó una revisión bibliográfica a fin de determinar las concentraciones a las cuales es posible solubilizar el principio activo en diferentes solventes. Para la selección del solvente se tomaron como criterios de selección: la solubilidad del fármaco en dicho solvente, ver **Tabla 2**; también se tuvo en cuenta si dicho solvente estaba aprobado por la FDA para su uso en soluciones parenterales<sup>75</sup>, también se tuvo en cuenta si dicho solvente es miscible con el agua y si es fácil de eliminar de la formulación debido a que no se deben superar las concentraciones permitidas en formulaciones parenterales.

Para la verificación de la presencia de cristales y su morfología se utilizó un microscopio invertido Nikon-Eclipse Ti-E, con modo de observación en campo claro,(resolución máxima hasta 1.0  $\mu\text{m}$  en campo claro). Fuentes de iluminación, luz reflejada (lámpara halógena 100W, 12 V), luz transmitida (lámpara halógena 100W, 12 V). Software Nis-elements imaging software, 64bit V 3.22.15; las muestras fueron observadas usando luz polarizada que permite observar mejor la estructura cristalina

de la muestras lo que es importante si se pretende estudiar el efecto de la forma cristalina sobre la solubilidad del fármaco.

**Tabla 2:** Solubilidad del Acetaminofén en diferentes solventes a 30°C<sup>69</sup>.

Solvente	Cs	s.d.	n	Ys
<b>Agua</b>	<b>17,39</b>	0,02	7	43,23
Metanol (Merck, p.a.)	371,61	0,73	5	1,23
<b>Etanol (Kemethyl AB, &gt; 99,5%)</b>	<b>232,75</b>	0,31	4	1,35
1,2-Etanediol (Merck, p.a.)	144,3	4,10	2	1,60
1-Propanol (Merck, p.a.)	132,77	0,21	4	1,78
2- Propanol (Merck, p.a.)	135,01	0,31	5	1,75
1- butanol (Merck, p.a.)	93,64	0,31	2	2,04
1-pentanol (Merck, p.a.)	67,82	0,22	2	2,35
1-hexanol (Merck, p.a.)	49,71	0,96	4	2,75
1-heptanol Sigma, p.a.)	37,43	0,24	4	3,20
1-octanol (Merck, p.a.)	27,47	0,30	3	3,87
acetona (Merck, p.a.)	111,65	0,37	7	2,17
2-butanona (Merck, p.a.)	69,99	0,39	4	2,77
4-metil-2-pentanona (Merck, p.a.)	17,81	0,54	3	7,66
tetrahidrofurano (JT Baker, p.a.)	155,37	3,95	4	1,30
1-4,dioxano (Merck, p.a.)	17,08	0,44	3	9,06
acetato de etilo (Merck, p.a.)	10,73	0,10	5	14,39
acetonitrilo (Merck, p.a.)	32,83	0,13	5	10,13
diethylamina (Sigma, 98%)	1316,9	5,05	2	0,23
N,N-dimetilformamida (merck, purum)	1012,02	10,43	3	0,27
dimetilsulfoxido (Riedel-De Haën, p.a.)	1132,56	38,18	5	0,24
ácido acético (Merck, p.a.)	82,72	3,34	3	2,81
diclorometano (Merck, p.a.)	0,32		1	503,58
cloroformo (Riedel-De Haën, p.a.)	1,54		1	73,71
tetracloruro de carbono (Merck, p.a.)	0,89		1	99,26
tolueno (Merck, p.a.)	0,34	0,00	2	431,62

**Cs:** Solubilidad, g/kg de solvente; **s.d.:** Desviación estándar de las mediciones; **n:** Número de mediciones; **Ys:** Coeficientes de actividad calculados a 30°C.

### **2.2.1.3. Solubilidad del monómero**

Se ha reportado en numerosos trabajos que los monómeros de cianoacrilato inician su proceso de polimerización inducidos por iniciadores tales como aniones, más específicamente iones hidroxilo <sup>42,76,77,44</sup>. Estos iones hidroxilo están presentes tanto en la fracción de solvente orgánicos como en la fase acuosa. Por tal motivo es fundamental encontrar las condiciones adecuadas para tener el monómero en el sistema solvente/antisolvente de forma homogénea y sin que ocurra rápidamente su polimerización.

Se realizaron ensayos adicionando monómero en diferentes cantidades a una mezcla de solvente/antisolvente y observando la formación de flóculos y su cantidad en las diferentes muestras. Las muestras fueron observadas por un Microscopio invertido Nikon-Eclipse Ti-E, modo de observación en campo claro (resolución máxima hasta 1.0  $\mu\text{m}$  en campo claro). Fuentes de iluminación, luz reflejada (lámpara halógena 100W, 12 V), luz transmitida (lámpara halógena 100W, 12 V). Software Nis-elements imaging software, 64bit V 3.22.15 y en el cual se pretendía observar la morfología del polímero formado, su tamaño y el estado de agregación que se pudiera presentar pues estos datos dan idea global de la velocidad de polimerización, la forma y el tamaño de las partículas formadas en el proceso de polimerización en la mezcla solvente/antisolvente.

#### **2.2.1.4. Efecto del pH en la polimerización**

Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar el pH en el cual se logra retardar el proceso de polimerización, para tal fin se prepararon una serie de muestras con la fracción solvente/antisolvente seleccionada y se varió el pH de cada muestra en un rango entre 1 y 7; posteriormente se adicionó el monómero y se evaluó la cantidad de “flóculos” formados para cada ensayo de polimerización realizado a cada pH en particular.

Las muestras fueron observadas por microscopía óptica, de la misma manera descrita los ensayos anteriores y utilizando el mismo equipo, con el fin de obtener información preliminar sobre el tamaño y morfología de las muestras preparadas en la mezcla solvente/antisolvente.

#### **2.2.1.5. Cantidad de monómero requerido**

Al igual que para los ensayos del efecto del pH, se realizaron ensayos para determinar la cantidad de monómero necesaria para entrapar o encapsular los cristales de fármaco formados en el sistema; en los ensayos realizados se adicionaron cantidades variables de monómero y se observó si se producían cristales en forma de sedimento y/o precipitado.

Se utilizó también la técnica de microscopía óptica para estimar la proporción de cristales formados Vs la cantidad de monómero adicionado, permitiendo obtener un

estimativo de la fracción fármaco: monómero necesaria para que no se presente formación de cristales.

#### **2.2.1.6. Tiempo de polimerización**

Otro factor determinante en el tamaño de partícula de estos sistemas poliméricos, según la literatura es el tiempo de polimerización. Se realizaron ensayos variando los tiempos de polimerización del monómero en el sistema (1, 2, 3 y 4 horas); es decir, que se varió el tiempo transcurrido desde la adición del monómero hasta que se finalizó la reacción ajustando el pH final a un pH neutro-básico con un agente de aporte de iones hidroxilo que desencadena una muy rápida polimerización si aún queda monómero libre. Se evalúa entonces el efecto de la adición de especies hidroxilo, y el aumento del pH y si éste verdaderamente contribuye a aumentar y/o finalizar el proceso de polimerización según lo descrito en la literatura<sup>41,42,43,59,53,78</sup>; a su vez, este ajuste de pH se realiza teniendo en cuenta que el pH de mayor estabilidad para formulaciones que contienen ACMP está en el rango de: (5,5 – 6,5), y por lo tanto los ensayos se realizaron hasta un rango de pH no muy superior a ese rango, ya que éste será el pH final de la formulación. Las muestras fueron observadas utilizando la misma técnica de microscopía óptica que las muestras anteriores y con el mismo equipo.

La estimación de la velocidad de polimerización es un factor sumamente relevante debido a que este tiempo de polimerización debe darse durante el mismo periodo de tiempo o más o menos a la misma velocidad que a la que se lleva a cabo la

nanoprecipitación o formación de los cristales de fármaco y poder conseguir de esta manera la formación de las nanocápsulas o nanoesferas.

#### **2.2.1.7. Mecanismo de estabilización**

En los ensayos de mecanismo de estabilización se pretendió establecer cuál de los estabilizantes propuestos era el más apropiado para las nanopartículas obtenidas por la metodología propuesta. Se realizaron ensayos con tres agentes estabilizantes los cuales proporcionaban mecanismos de estabilización electrostática, y estérica; el primer mecanismo de estabilización, electrostático, afecta de manera directa el parámetro de potencial Z del sistema, en este caso se empleó la sal de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ya que aporta mayores cargas eléctricas al sistema con menor cantidad de muestra que otras sales y adicionalmente está aprobado para uso en formulaciones para uso parenteral que es uno de los enfoques de este trabajo. Los otros dos agentes de estabilización seleccionados fueron dos agentes copolímeros de bloque de la familia de los poloxámeros: Kolliphor® P188 (Pluronic® F68) y Pluronic® F127 los cuales proporcionan un mecanismo de estabilización estérico que impide el acercamiento entre las partículas, disminuye las interacciones y colisiones entre ellas, evitando así el proceso de agregación o floculación, la diferencia entre estos dos copolímeros radica principalmente en la longitud de las cadenas poliméricas (peso molecular) y en el contenido de etilenoóxido<sup>79</sup> tal como se observa en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Características de peso y composición de los Pluronic® tipo F<sup>80</sup>.

Tipo de Pluronic F	Peso molecular	Porcentaje de Etilen oxido	Número de unidades de Etilen oxido
F-77	6.600	70	105
F-87	7.700	70	120
F-68	8.350	80	151
F-88	10.800	80	195
F-127	12.500	70	200
F-98	13.000	80	235
F-108	14.000	80	255

También es importante aclarar que el contenido de unidades de etilen-óxido en los copolímeros de bloque está directamente relacionado con el grado de hidrofiliidad del mismo y que existen parámetros clave para la selección de estos copolímeros dependiendo de la naturaleza de las nanopartículas y del medio en el que se encuentren<sup>81</sup>.

En estos ensayos se evaluaron los parámetros de formación de sedimento o cristales a fin de establecer cuál de estos mecanismos aportaba mejores propiedades de estabilidad al sistema. Las muestras fueron observadas utilizando la misma técnica de microscopía óptica que las muestras anteriores y con el mismo equipo.

#### **2.2.1.8. Cantidad de estabilizante**

Después de determinar cuál de los agentes estabilizantes propuestos era el más adecuado, se realizaron ensayos para determinar la cantidad de estabilizante requerida para lograr la estabilización del sistema. Para la evaluación de este

parámetro se prepararon varias muestras de la nanosuspensión con diferentes rangos de concentraciones de agente estabilizante y posteriormente se evaluaron en las muestras los factores de formación de sedimento o cristales en el tiempo. En los casos donde se presentaron sedimentos sin aparente formación de cristales, se evaluó si este sedimento resuspendía fácilmente. Las muestras fueron observadas utilizando la misma técnica de microscopía óptica que las muestras anteriores y con el mismo equipo.

### **2.2.2. Diseño estadístico (Datos categóricos por tabulación cruzada)**

Para la realización de los ensayos de optimización de la formulación se decidió trabajar con un diseño estadístico de datos categóricos con tabulación cruzada. Las variables, rangos y factores de respuesta tenidos en cuenta en este diseño fueron:

- Variables y rangos.
  - a) Cantidad de Etanol (mL): 3,0; 4,0 y 5,0
  - b) Cantidad de Monómero (Etil-Cianoacrilato) ( $\mu\text{L}$ ): 10, 20, 30, 40, 50, 60
  - c) Cantidad de estabilizante (Pluronic® F127) (mg/mL): 10, 20, 30, 40, 50, 60,
- Factores de respuesta.
  - a) Presencia o formación de cristales.
  - b) Presencia de flóculos o precipitado (no se deben observar cristales)
  - c) Cambios en la coloración final.

**NOTA:** Todos los valores se estimaron para un volumen final de nanosuspensión (sistema) de 5,0 mL.

Cada variable fue seleccionada teniendo en cuenta los resultados de los ensayos exploratorios, donde se observaron los efectos de éstas sobre cada factor de respuesta permitiendo analizar cada variable independientemente contra cada factor de respuesta. Y posteriormente evaluando su efecto combinado a fin de optimizar la composición de la propuesta de formulación.

### **2.2.3. Propuesta de formulación**

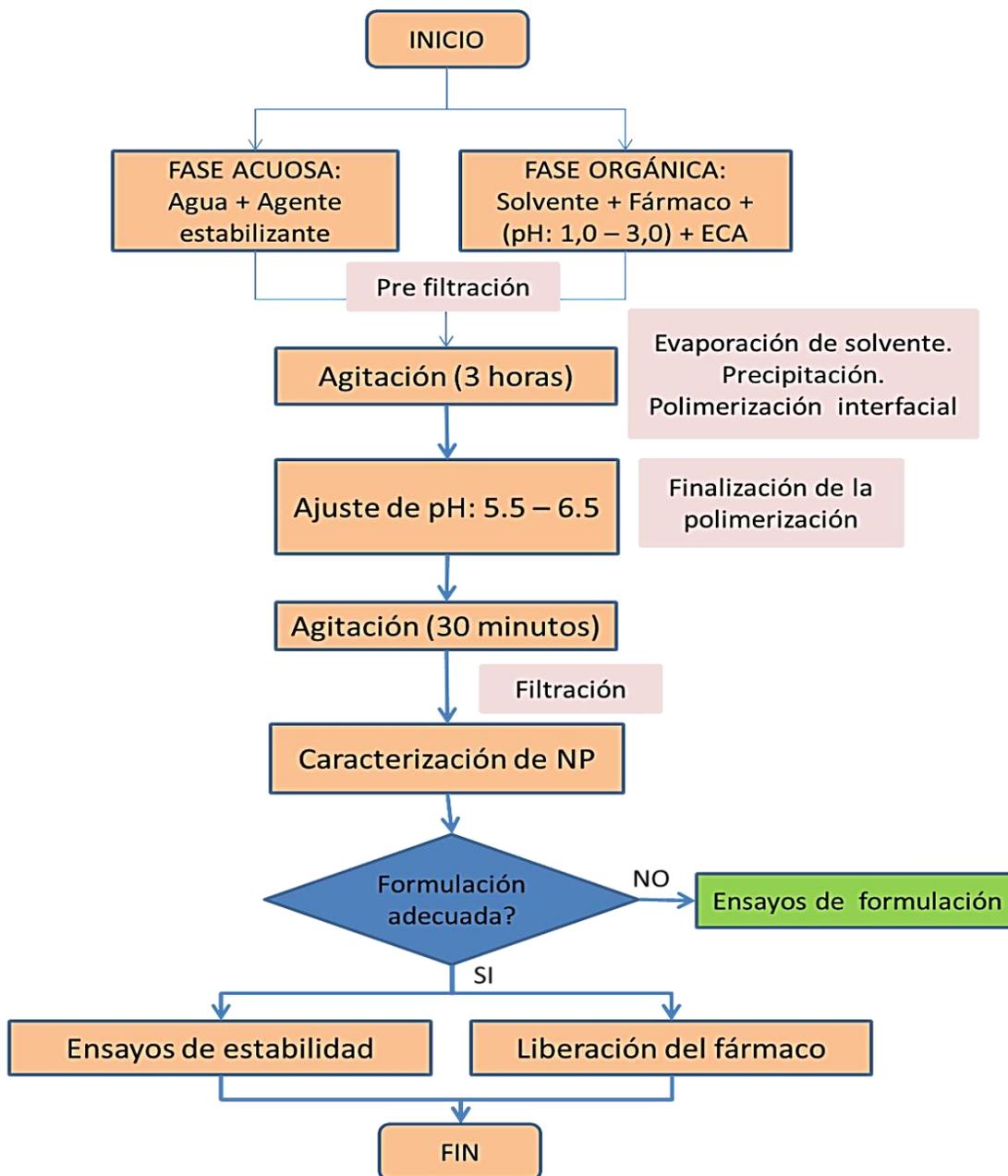
Como se mencionó anteriormente, la propuesta de formulación es el resultado de la realización y análisis de los ensayos tanto exploratorios como del diseño experimental propuesto y por tal motivo esta propuesta de formulación obtenida se describe en el numeral de resultados.

### **2.2.4. Metodología de preparación**

La formulación y el método de preparación se establecieron teniendo en cuenta los ensayos exploratorios y los resultados del diseño experimental en los cuales se determinó que los factores de pH, concentración de estabilizante, tiempo de polimerización, entre otros, son factores que inciden directamente en las características de las nanopartículas y del producto final. El método de preparación que se plantea está basado en las técnicas de nanoprecipitación o solvente/antisolvente, y polimerización aniónica y se esquematiza en la **Figura 16**.

A Todas las muestras y réplicas obtenidas en la realización de estos ensayos se les realizó determinación de la distribución del tamaño de partícula con el fin de

determinar la variabilidad y reproducibilidad del método en cuanto al tamaño de partícula final.



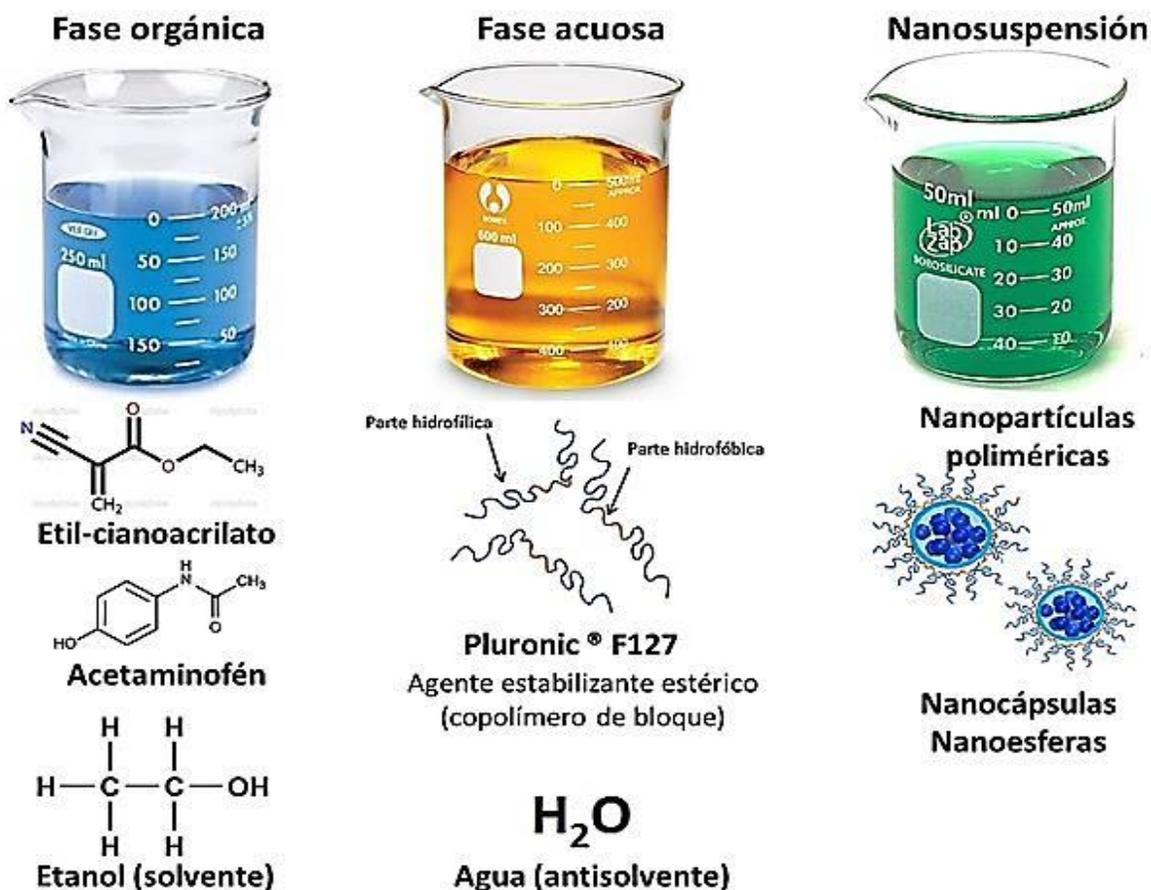
**Figura 16:** Metodología para la preparación de la nanosuspensión.

#### 2.2.4.1. Síntesis de Nanopartículas

La preparación y síntesis de las nanopartículas se realizó de la manera descrita en la **Figura 16** y comprende los siguientes pasos o etapas:

- a. Fase orgánica, (**Figura 17**): se denominó fase orgánica a la fase que contiene el solvente (Etanol) en el cual es totalmente soluble la cantidad adicionada de fármaco (acetaminofén), esto se hace con agitación lenta, posteriormente se acidifica el medio empleando Ácido clorhídrico 1N hasta lograr alcanzar un pH entre 1.0 a 3.0 y posteriormente adicionando el monómero (Etil-cianoacrilato) con agitación a alta velocidad.
- b. Fase acuosa, (**Figura 17**): en la preparación de la fase acuosa se utilizó agua grado inyectable como solvente para el agente estabilizante (Pluronic® F127) el cual se adiciona con agitación lenta y constante hasta que esté completamente solubilizado; el volúmen adicionado de agua se mantuvo constante en todos los ensayos realizados (5,0 mL) ya que este corresponde al volumen final de la nanosuspensión.
- c. Agitación y obtención de la nanosuspensión, (**Figura 17**): para la preparación de la nanosuspensión final se adiciona lentamente la fase acuosa sobre la orgánica con la ayuda de una jeringa y con agitación a alta velocidad, antes de iniciar con las 3 horas de agitación a alta velocidad se realiza una prefiltración del sistema completo haciéndola pasar por un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  previamente humectado con HCl, esta prefiltración tiene la finalidad de remover cualquier posible agregado de polímero o partículas de tamaño superior a 0,22  $\mu\text{m}$  que se

hubiese podido formar durante la mezcla de las dos fases al adherirse a las superficies, y también acercarlo a un proceso de escalado industrial donde se utilizarían procesos de filtración para lograr la esterilidad del producto ya que no se considera posible la esterilización de estos sistemas por medios convencionales como esterilización terminal por vapor. Adicionalmente, al final del proceso de polimerización se realiza una filtración por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  teniendo en cuenta que el tamaño final promedio obtenido es inferior a 220 nm según los resultados de las determinaciones de tamaño de partícula promedio.



**Figura 17:** Representación de la composición de las fases de la nanosuspensión.

#### **2.2.4.2. Velocidad y tipo de agitación.**

Con la realización de estos ensayos se pretendió identificar si la velocidad y el tipo de agitación influían de manera directa sobre el tamaño de partícula en la nanosuspensión final. Las técnicas de agitación utilizadas fueron: Agitación magnética y Agitación por espas, usadas a la misma velocidad de agitación y en recipientes de iguales dimensiones internas. Se seleccionó el mecanismo de agitación con el cual se obtuvo menor tamaño de partícula para realizar los ensayos posteriores del efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula final, comparando una velocidad de agitación a 1200 RPM con velocidad de agitación de 9500 RPM; a las muestras preparadas con estos sistemas de agitación se les determinó la distribución de tamaño de partícula y posteriormente se realizaron varias réplicas bajo la agitación a alta velocidad a fin de determinar la variabilidad y reproducibilidad del método en cuanto a la distribución y tamaño promedio de las nanopartículas en la nanosuspensión final.

#### **2.2.5. Caracterización de las nanopartículas**

Para los ensayos de caracterización de la nanosuspensión se emplearon varias técnicas analíticas e instrumentales las cuales se describen a continuación:

### **2.2.5.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La comprobación del estado cristalino o amorfo de las partículas y/o del fármaco antes y después del proceso de nanonización pueden ser determinados usando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)<sup>47</sup>.

Los ensayos de calorimetría diferencial de barrido se realizaron a cada uno de los componentes de la formulación que fueron recuperados después de ser adicionados al sistema de solvente/antisolvente y tratados de manera similar a lo realizado en la metodología de preparación de la nanosuspensión, a fin de determinar posibles cambios en los puntos de fusión e interacciones que se pueden presentar entre los componentes de la formulación propuesta.

Para la obtención de las muestras recuperadas del sistema de Pluronic® F127, polietil-cianoacriato, Acetaminofén y cada uno de sus componentes, los sistemas fueron elaborados bajo las condiciones del método de preparación, luego fueron separados del medio líquido por filtración y ultrafiltración, y fueron secados a temperatura baja hasta peso constante; posteriormente se obtuvieron los termogramas de cada uno de los componentes individuales recuperados, de mezclas de ellos y del sistema completo. Los termogramas fueron obtenidos utilizando un equipo DSC marca Mettler Toledo, Modelo DSC 1 STARe System, con rango de operación: 25 °C – 500 °C y en algunos casos se siguió la metodología propuesta por la USP.

### **2.2.5.2. Espectroscopía UV/VIS**

La espectrofotometría UV/VIS constituye una herramienta de fácil uso y que es primordial para conocer las concentraciones de fármaco en cada uno de los ensayos realizados, dicha metodología debe ser capaz de valorar el analito de interés sin interferencia de los demás componentes de la formulación a fin de obtener resultados confiables.

La valoración de fármaco en las diferentes muestras se realizó por UV, pero por la naturaleza y composición diversa de las nanopartículas se presentaban múltiples interferencias e inconvenientes que hicieron necesario el desarrollo de un método de valoración por UV/VIS que permitiera tener simultáneamente disueltos todos los componentes de las nanopartículas. El método se describe detalladamente en los resultados de este trabajo. La valoración de las muestras se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV/VIS, VARIAN®, Cary 50 Bio, con Software Cary WinUV.

### **2.2.5.3. Distribución de tamaño de partícula por Dispersión de Luz Dinámica, Dynamic Light Scattering (DLS)**

La técnica de DLS es la técnica instrumental más empleada para la determinación de tamaños de partícula en sistemas nanométricos, permite determinar no sólo la distribución de tamaño de partícula en estos sistemas sino también otros parámetros como el índice de polidispersidad de diversos tipos de muestras Incluyendo nanopartículas, coloides, geles, emulsiones, cristales, polímeros y proteínas entre otros<sup>82</sup>; El tamaño promedio de partícula y la distribución del tamaño son parámetros

muy importantes en la caracterización de nanomateriales porque influyen en la solubilidad de saturación, velocidad de disolución, estabilidad física y desempeño biológico de la nanosuspensión, se ha demostrado que la solubilidad de saturación y la velocidad de disolución presentan variaciones considerables con el cambio del tamaño de partícula<sup>47</sup>.

Las muestras para la determinación del tamaño de partícula se diluyeron en una proporción de 1 en 20 en agua grado inyectable debido a la alta concentración de partículas en la suspensión final. Las muestras se leyeron sin filtrar y a una temperatura de 25 °C en la celda del detector, sólo se tuvieron en cuenta resultados con un Count Rate<sup>82</sup> mayor a 200 Kpcs; para estos ensayos se utilizaron equipos Zetasizer Nano ZS y Zetasier Nano ZS90 de Malvern Instruments utilizando Software Zetasizer 7.11. También se caracterizaron algunas muestras utilizando un NanoSight NS300 de Malvern Instruments, con software de Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).

#### **2.2.5.4. Potencial Z**

La determinación del potencial zeta de una nanosuspensión permite conocer la carga superficial de las nanopartículas<sup>83</sup> y puede proveer una idea sobre la estabilidad electrostática de la nanosuspensión.

Las muestras para la determinación de potencial Z se diluyeron en una proporción de 1 en 20 en agua grado inyectable, a estas muestras no se les adicionó ninguna sal

antes de las lecturas, la temperatura en el compartimiento de la celda fue de 25 °C y a las muestras se les permitió estabilizar su temperatura antes de realizar las lecturas. Para estos ensayos se utilizaron equipos Zetasizer Nano ZS y Zetasier Nano ZS90 de Marlvern Instruments utilizando Software Zetasizer 7.11.

#### **2.2.5.5. Microscopía Electrónica de Transmisión de Electrones (TEM)**

En términos generales, el Microscopio electrónico de transmisión de electrones es un tipo especial de microscopio electrónico que permite lograr Imágenes del interior de las nanopartículas debido a que utiliza un haz de electrones que pasa a través de la muestra e interactúa con sus átomos logrando la diferenciación de los componentes de la NP en su interior por la diferencia en contraste debida a la diferencia en densidades electrónicas de los diferentes materiales constituyentes, así es posible diferenciar por ejemplo los cristales de fármaco, de la matriz de polímero en el caso de nanocápsulas o nanoesferas. Igualmente, es una técnica que permite determinar el tamaño y la morfología de las nanopartículas.

Estos ensayos se plantearon con dos objetivos principales: el primero, corroborar la información obtenida respecto al tamaño de partícula en los diferentes ensayos realizados por DLS; el segundo es determinar la naturaleza y el tipo de nanopartículas presentes en formulación, es decir, su morfología y establecer también si las nanopartículas obtenidas son del tipo nanocápsulas o nanoesferas.

La preparación de estas muestras se llevó a cabo empleando una pequeña gota de muestra que fue depositada sobre la rejilla, posteriormente se deja secar la muestra

y se procede con el análisis, en la preparación de la muestra no se usaron agentes de contraste pues se consideró que la diferencia de densidades entre las partículas del fármaco y el polímero era lo suficientemente alta para poder distinguir una de otra. Para la caracterización por Microscopía de Transmisión de electrones se utilizó un sistema Tecnai F20 con campo de emisión de 200kV S/TEM con un lente X-TWIN y cañón de electrones de emisión de campo de alta luminosidad (FEG), la muestra diluida fue montada sobre una rejilla tipo Lacey carbon® la cual tiene un mayor porcentaje de área abierta en comparación con otras rejillas con película de carbono, proporciona un soporte más delgado y en la cual prácticamente no hay interferencia del fondo en el TEM. Las láminas de carbón Lacey son particularmente adecuadas para el estudio de cristales y materiales biológicos.

#### **2.2.5.6. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación**

Idealmente, un sistema nanoparticulado óptimo debe tener una alta capacidad de carga de fármaco, para reducir la cantidad de materiales de la matriz que se administrarán al paciente. La carga de fármacos en la matriz o transportador se puede llevar a cabo usando dos metodologías<sup>84</sup>:

- Incorporación en el momento de la producción o síntesis de la nanopartículas (método de incorporación)
- Absorción o adsorción del fármaco después de la formación de nanopartículas mediante la incubación del transportador en una solución concentrada de fármaco (adsorción / Técnica de absorción).

La carga de fármacos y la eficiencia de encapsulación dependen altamente de la afinidad del fármaco por el polímero<sup>84</sup>, cabe anotar que esta afinidad no debe ser tan alta que no permita la liberación del fármaco desde la matriz del polímero, como ocurriría si se presentan interacciones del tipo covalentes entre el fármaco y el transportador.

Para la determinación de estos parámetros en el sistema final se realizaron dos tipos de ensayos:

- Eficiencia de Encapsulación (*%EE*): Para este ensayo se realizó la valoración por UV/VIS a una muestra seleccionada de la formulación propuesta para determinar la concentración total de fármaco en el sistema y conociendo con antelación la cantidad adicionada de fármaco se puede calcular este parámetro. Se debe anotar que a la cantidad de fármaco presente en las nanopartículas se le debe restar la cantidad de fármaco que puede estar soluble en el medio; por lo tanto, también es necesario determinar cuánto fármaco está en solución en el medio o fase continua de la nanosuspensión final. Para tal fin se separaron las partículas del medio líquido utilizando membranas de ultrafiltración con un cutoff de 10 KDa y se cuantificó la cantidad de fármaco en el líquido filtrado que pasó a través de la membrana de ultrafiltración.
- Capacidad de Carga (*%CC*): Corresponde al porcentaje de fármaco contenido en las nanopartículas. Para este ensayo se tomó una alícuota de muestra y se secó hasta peso constante; luego se determinó la concentración de fármaco por

UV/VIS y se calculó la cantidad de muestra que corresponde a fármaco, a este valor se le restó la cantidad de fármaco libre (que estaba presente en solución) aportada por la alícuota de muestra tomada. La cantidad de fármaco libre por mL de nanosuspensión fue calculado después de ultrafiltrar una alícuota de la nanosuspensión y determinar por UV/VIS la concentración del fármaco en la fracción filtrada de la nanosuspensión.

En términos cuantitativos la eficiencia de encapsulación está definida como:

$$\% EE = \frac{\text{Cantidad de fármaco presente en las NP}}{\text{Cantidad de fármaco adicionado inicialmente}} \times 100$$

En cuanto a la capacidad de carga, se puede establecer con el siguiente cálculo:

$$\% CC = \frac{\text{Peso del fármaco presente en la NP}}{\text{Peso de la NP}} \times 100$$

### **2.2.6. Liberación del fármaco**

Al llegar al sitio de destino, un nanotransportador debe entregar su contenido de una manera eficaz para conseguir una respuesta terapéutica suficiente, por lo cual es necesario realizar ensayos de liberación *in vitro* a fin de estimar un perfil de liberación que pueda brindar un acercamiento al perfil de liberación real desde el nanotransportador al medio.

Entre las técnicas más utilizadas en ensayos de liberación a partir de nanopartículas se encuentra la diálisis que se puede definir como un proceso simple en el cual los

solutos de tamaño relativamente pequeño se difunden desde una solución de concentración alta hasta una solución de baja concentración pasando a través de una membrana semipermeable, esto sucede hasta que se alcanza un punto de equilibrio en términos de concentración y la concentración en ambas soluciones se iguala<sup>63</sup>. Para los ensayos de liberación del fármaco se utilizó la metodología de difusión en membrana de diálisis, la cual es una de las más empleadas para estimar perfiles de liberación en sistemas de NP<sup>63</sup>, con este ensayo se pretende determinar si el perfil de liberación del fármaco encapsulado cambia con respecto al perfil para el fármaco en estado libre o en solución.

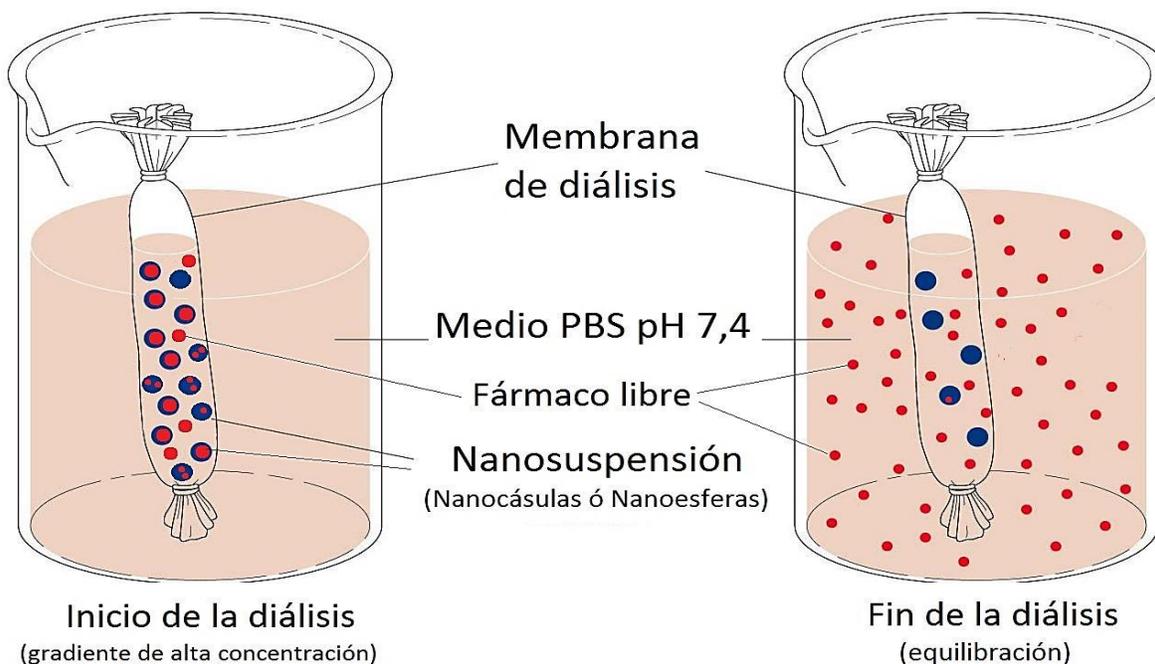
La metodología para la realización de este ensayo se describe a continuación:

1. Se tomó una alícuota de la muestra de la nanosuspensión previamente caracterizada en tamaño y concentración inicial de fármaco; dicha muestra se introdujo en una membrana de diálisis hecha de celulosa regenerada con un MWCO de 12,000 a 14,000 Daltons previamente humectada, y se introdujo en un recipiente que contenía una solución de Buffer fosfato (PBS) pH 7,4, a una temperatura de 37°C y bajo agitación magnética suave; dicho buffer es similar en pH, osmolaridad, isotonicidad y concentración de iones (Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) al líquido extracelular del organismo y simula las condiciones fisiológicas<sup>85</sup>, este montaje se describe esquemáticamente en la **Figura 18**.
2. Después de realizar el montaje descrito anteriormente, se tomaron muestras de una alícuota de volumen conocido del medio PBS pH 7,4 en los tiempos de toma de muestra: 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 12h, 18h, 24h, y 36 horas, el volumen

tomado cada vez fue repuesto con el mismo volumen de buffer, posteriormente estas muestras fueron valoradas para la determinación de la concentración de fármaco en cada uno de los tiempos de toma de muestra usando la metodología por UV-VIS descrita en la metodología para la valoración del fármaco por UV/VIS. En estos ensayos se utilizó una membrana de diálisis marca Fisherbrand®, de celulosa regenerada, MWCO de 12,000 a 14,000 Da y espesor de pared de 20µm. Buffer PBS pH 7,4<sup>86</sup>: Cloruro de Sodio USP, K+S KALI GmbH, 100,1%; Cloruro de potasio, Merck®, 99,5%; Fosfato dibásico de Sodio, J.T.Baker, 99,86%; Fosfato monobásico de potasio, Carlo Erba®, 98-105%.

Luego de verificar el perfil de liberación del fármaco desde la nanosuspensión se realiza el mismo ensayo para una muestra que contiene la misma cantidad de fármaco en forma de suspensión en medio acuoso y tomando alícuotas de muestra del mismo volumen, en los mismos tiempos y bajo las mismas condiciones que las descritas para la nanosuspensión.

Con este ensayo se pretende determinar si el perfil de liberación del fármaco encapsulado cambia con respecto al del fármaco en estado libre o en solución lo cual indicaría que se presenta una liberación modificada.



**Figura 18:** Representación esquemática del montaje de diálisis para la prueba de liberación del fármaco<sup>b</sup>.

### 2.2.7. Estabilidad de la Formulación propuesta

Durante cuatro meses se realizaron ensayos de seguimiento a los parámetros descritos en la **Tabla 4**. Las muestras fueron almacenadas a temperatura entre 20 y 25°C, en recipientes translúcidos y algunas fueron expuestas a condiciones de iluminación.

<sup>b</sup> Imagen tomada y adaptada de: <http://schoolworkhelper.net/selective-permeability-of-dialysis-tubing-lab-explained/> Agosto de 2016.

**Tabla 4:** Especificaciones para evaluación de la estabilidad.

<b>ATRIBUTO</b>	<b>Especificación</b>
<b>Tamaño de partícula promedio (nm)</b>	El tamaño no debe superar los 300 nm
<b>Potencial Z (mV)</b>	Informativo
<b>pH</b>	Entre 5,5 - 6,5
<b>Valoración de ACMP (mg) , (calculados para 5 mL de muestra)</b>	No menos 337,5 mg
<b>Valoración de ACMP (%)</b>	No menos del 90% de la cantidad nominal (375 mg)
<b>Aspecto</b>	No se deben presentar cambios en la coloración inicial ni presencia de cristales, floculos o agregados que no sean fácilmente redispersables al agitar la muestra.

\*Los parámetros de seguimiento fueron evaluados siguiendo las metodologías de análisis descritas para cada ensayo.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación de maestría se afrontaron varios retos antes de poder abordar el objetivo principal: el desarrollo de la metodología para la preparación de la nanosuspensión del fármaco de baja solubilidad. Primero fue necesario conocer el comportamiento de los componentes seleccionados para llegar a la propuesta de formulación, porque los materiales propuestos no hacen parte del quehacer diario del profesional Químico Farmacéutico; por lo tanto, debió invertirse una gran cantidad de tiempo en el conocimiento y adaptación a los nuevos materiales o materias primas, y para tal fin se realizaron varios ensayos exploratorios que buscaban dar una idea de su comportamiento e interacción al ser incorporados en una formulación para uso farmacéutico. Posteriormente se desarrolló un diseño experimental para evaluar el efecto de las variables seleccionadas sobre el sistema y se utilizaron factores de respuesta cualitativos porque el tiempo y el uso de recursos analíticos para su cuantificación estaba limitado por la gran cantidad de ensayos que se debieron realizar antes de llegar a una propuesta de formulación. Este diseño experimental permitió la obtención de una propuesta de formulación con la cual posteriormente se realizaron diferentes ensayos para el desarrollo de la metodología de preparación de la nanosuspensión.

#### **3.1. Desarrollo de la propuesta de formulación**

Para la selección de los componentes de formulación se tuvieron en cuenta diversos factores tales como la naturaleza del fármaco, tipo y naturaleza del polímero que

actuará como encapsulante o matriz<sup>87</sup>, mecanismo de polimerización de dicho polímero, compatibilidad biológica del mismo<sup>27,88</sup>, tipo de agente estabilizante a ser usado y la concentración del fármaco en el producto final.

Después de definir los componentes a usar, se realizaron diversos ensayos exploratorios y experimentales. Para los ensayos experimentales de formulación se seleccionó un diseño experimental de varios factores categóricos con tabulación cruzada, el cual permite construir diseños experimentales para situaciones donde el interés primario se centra en la comparación de niveles de dos o más factores categóricos<sup>89</sup>, esto, con el fin de definir los rangos y concentraciones de trabajo más adecuadas de cada componente y lograr la optimización de la formulación propuesta.

Los componentes seleccionados para la realización de los ensayos exploratorios de pre-formulación fueron los que se indican en la **Tabla 5** según la función que cumplen en la formulación:

**Tabla 5:** Componentes seleccionados para la pre-formulación según su función.

Componente	Función propuesta
Acetaminofén	Fármaco o principio activo.
Etanol	Solvente (Se elimina de la formulación por evaporación)
HCl	Agente para ajuste de pH en el control de la polimerización.
Etil-cianoacrilato	Monómero que formará el polímero, agente encapsulante o matriz.
Agua (grado inyectable)	Antisolvente, fase acuosa, agente de suspensión.
Pluronic® F127	Copolimero de bloque, Agente estabilizante estérico.
Pluronic® F68	Copolimero de bloque, Agente estabilizante estérico.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Agente estabilizante electrostático. (Regulador de pH)
NaOH	Agente regulador de pH. (Finaliza el proceso de polimerización)

### 3.1.1. Solubilidad del fármaco en el sistema solvente/antisolvente.

Se decidió trabajar con etanol como solvente ya que el fármaco según lo reportado en la literatura tiene una alta solubilidad en este solvente, suficiente para solubilizar la cantidad de fármaco que se quiere adicionar a la formulación, se descartaron otros solventes donde el fármaco también presenta alta solubilidad debido a que son altamente tóxicos, difíciles de eliminar de la formulación y no están aprobados para su uso en medicamentos parenterales para uso en humanos, por todo esto, se tomó el etanol como solvente de elección y se determinó la solubilidad del fármaco en diferentes mezclas de solvente (etanol) antisolvente (agua) a diferentes proporciones, para determinar cuál es la proporción en la que se pierde la solubilidad del fármaco adicionado y se inicia el proceso de nucleación y formación de cristales (nanoprecipitación); tal y como se muestra en la **Imagen 1** donde se observa la presencia de cristales a partir del ensayo F7, el cual tiene una proporción de Agua:Etanol (70:30 V/V). La proporción adicionada de agua en la imagen va aumentando de izquierda a derecha, donde F11 corresponde a la muestra de fármaco en 100% de etanol, F1 a una proporción Etanol:Agua (90:10), y va aumentando un 10% en cada muestra hasta llegar al 100% de agua en la Muestra F10.

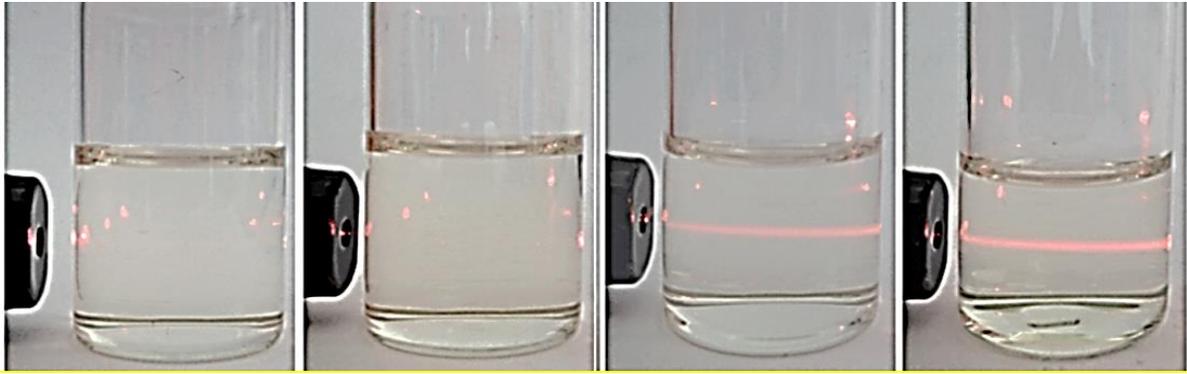
Luego de encontrar un proporción de solvente/antisolvente en la que se observó formación de cristales, se determinó dicha proporción de forma más precisa aprovechando el efecto de dispersión de luz denominado efecto Tyndall que es un fenómeno físico que causa que partículas en suspensión, al exponerse a un haz de

luz (láser) produzcan una dispersión de la luz donde se puede observar la trayectoria de la luz láser; en una solución verdadera no ocurre esta dispersión y por lo tanto, no se observa la trayectoria del láser.



**Imagen 1:** Solubilidad de Acetaminofén en diferentes proporciones de Solvente/Antisolvente.

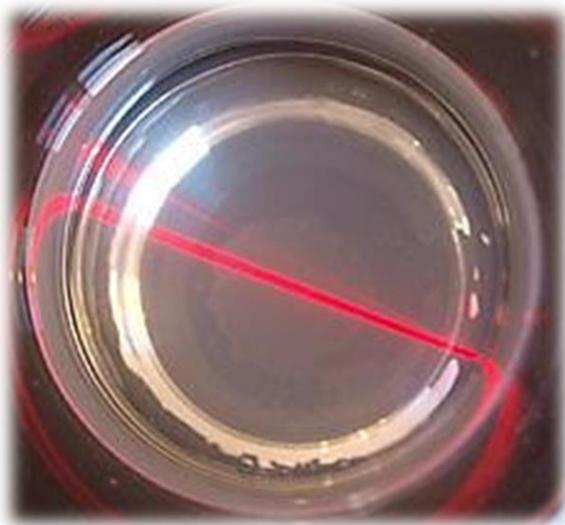
Este ensayo de dispersión de luz se realizó solubilizando una cantidad conocida de fármaco (acetaminofén) en una cantidad determinada de solvente (Etanol) y posteriormente adicionando con una bureta fracciones de antisolvente (agua grado inyectable) cada 60 segundos, la luz láser se hace pasar a través de la solución de ACMP en EtOH a medida que se va adicionando agua; se observó que cuando se inicia la nucleación o formación de cristales se puede ver la trayectoria del haz de luz del láser, lo que indica que hay partículas (cristales de fármaco) en suspensión que dispersan la luz, al aprovechar el efecto Tyndall se obtienen resultados mucho más precisos porque se puede determinar la formación de una suspensión que incluso no es visible con el ojo desnudo porque son partículas submicrométricas. En la **Imagen 2**, se observa como a medida que se va adicionando agua (antisolvente) a la mezcla (Etanol-fármaco) se hace visible el haz de luz del láser, en la imagen la cantidad adicionada de antisolvente aumenta de izquierda a derecha.



**Imagen 2:** Dispersión de la luz láser.

Los ensayos de solubilidad del fármaco en la mezcla solvente/antisolvente permitieron determinar que para la cantidad de fármaco utilizada, a una proporción aproximada de Agua:Etanol de 70:30 se sobrepasaba la solubilidad de saturación del acetaminofén en la mezcla solvente/antisolvente y se daba inicio a la formación de cristales; posteriormente, se determinó con una prueba de “Dispersión de la luz” (efecto Tyndall) que el inicio de la nucleación y formación de cristales en la mezcla solvente/antisolvente se da cuando se tiene una proporción de Agua:Etanol de 69:31 %V/V aproximadamente, (**Imagen 3**).

La determinación de estas proporciones es importante ya que se sabe de manera más precisa en qué proporción de solvente/antisolvente inicia el proceso de nucleación, el cual debe sincronizarse con el proceso de polimerización y así lograr la mayor eficiencia de encapsulación y una mayor capacidad de carga en las nanopartículas.

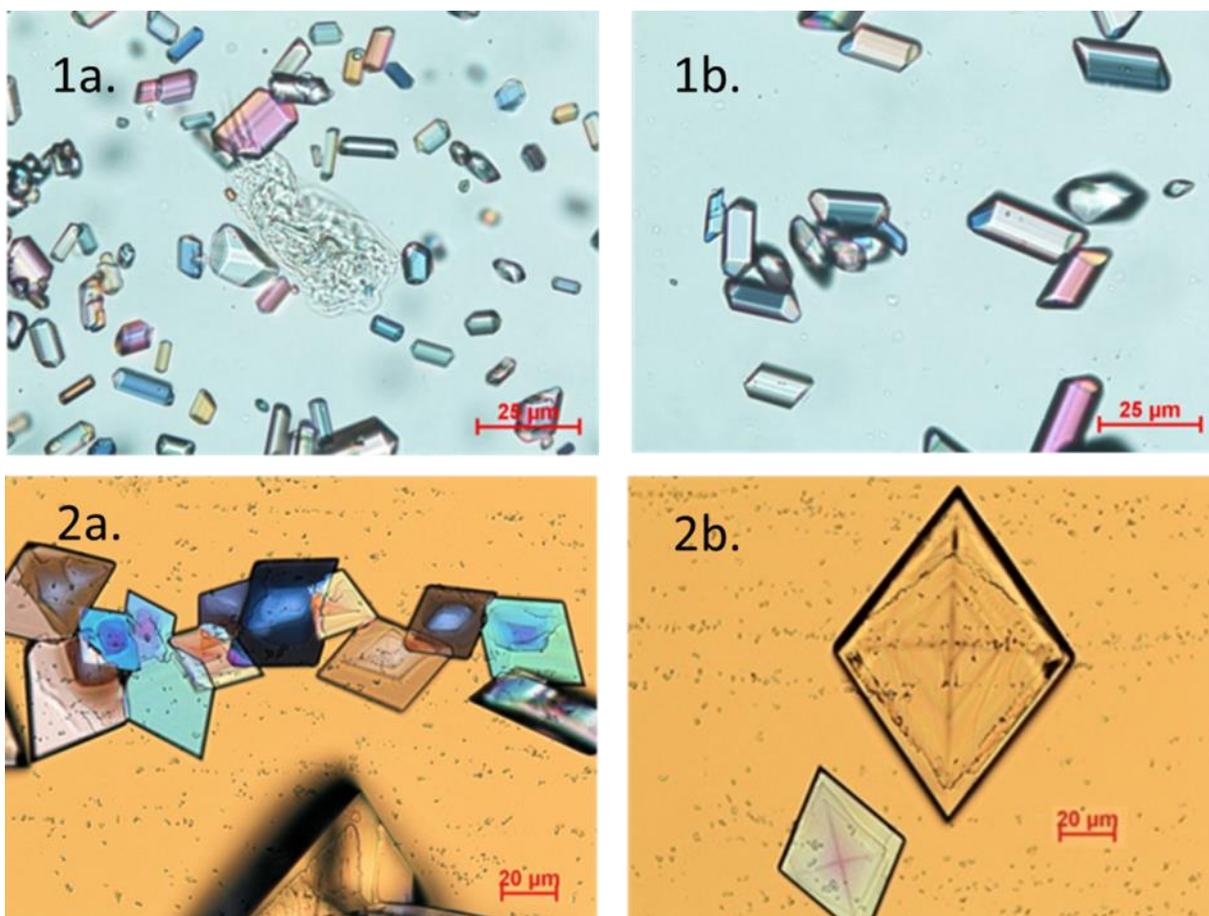


**Imagen 3:** Solubilidad del fármaco en solvente/antisolvente (dispersión de luz).

De estos ensayos de solubilidad se tomaron muestras que fueron observadas por microscopía óptica de campo invertido con luz polarizada y como resultado de estas pruebas se observó que el fármaco recristaliza en el sistema de solvente/antisolvente presentado dos formas de hábitos cristalinos: *triclínica* y *tetragonal* como se puede observar en la **Imagen 4: 1a y 1b:** cristales con morfología triclínica, y en la **Imagen 4: 2a. y 2b.:** cristales con morfología tetragonal; con este ensayo se puede determinar adicionalmente que la maduración de Ostwald o crecimiento de los cristales continuaba debido a la falta de un agente estabilizante que impida que dicha maduración se siga dando; las muestras fueron observadas por microscopio de campo invertido con luz polarizada.

El resultado de microscopía de esta prueba se comparará con los resultados obtenidos para los ensayos de microscopía electrónica TEM y determinar los posibles cambios en la morfología de los cristales formados al alcanzar el tamaño nanométrico, la determinación de la morfología es de especial interés sobre todo

para futuros estudios que posteriormente se adelantarán en lo referente a parámetros de solubilidad, velocidad de disolución y biodisponibilidad<sup>90</sup>.



**Imagen 4:** Imágenes de microscopía óptica de cristales de fármaco.

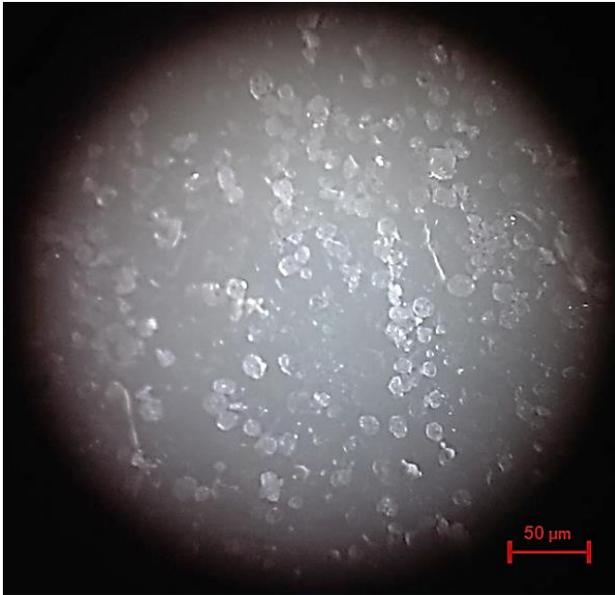
### 3.1.2. Solubilidad del monómero

Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar la solubilidad aparente del monómero en el sistema solvente/antisolvente, durante su realización se presentaron grandes dificultades pues se requería de la “solubilización” del monómero en la mezcla de solvente/antisolvente sin que se diera inicio al proceso de polimerización;

al inicio de los ensayos exploratorios se observó que al adicionar el monómero en el sistema sin importar la cantidad adicionada, inmediatamente se daba lugar a la formación de flóculos y agregados de tamaño macroscópico y algunos de tamaño microscópico, en la **Imagen 5** se puede observar como el incremento en la cantidad adicionada de monómero produce una mayor formación de flóculos y agregados, las concentraciones de monómero se incrementan de izquierda a derecha, a la muestra **CNA1** se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de monómero, **CNA2**: 100  $\mu\text{L}$ , **CNA3**: 200  $\mu\text{L}$  y 300  $\mu\text{L}$  para la muestra **CNA4**; en la **Imagen 6** se pueden observar las partículas de polímero de gran tamaño formadas en el sistema solvente/antisolvente a los pocos minutos de ser adicionado el monómero en el sistema, esto indica que el proceso de polimerización transcurre muy rápidamente y que se deberían realizar modificaciones al medio para que la polimerización se diera de una forma más lenta y controlada evitando la formación de flóculos y agregados de tamaño macroscópico.



**Imagen 5:** Muestras con diferentes cantidades de etil-cianoacrilato en el sistema.



**Imagen 6:** Partículas de polímero en el sistema.

En estos ensayos de incorporación del monómero en el sistema solvente/antisolvente se observó que se requiere modificar las condiciones del medio, para disminuir la velocidad de polimerización porque es tan alta que da lugar a la formación de partículas y agregados de gran tamaño y más aún, la polimerización se da muchísimo antes de que se dé la nucleación y formación de cristales y no se daría efectivamente la polimerización del monómero sobre la superficie de los nanocristales para su estabilización.

### **3.1.3. Efecto del pH en la polimerización**

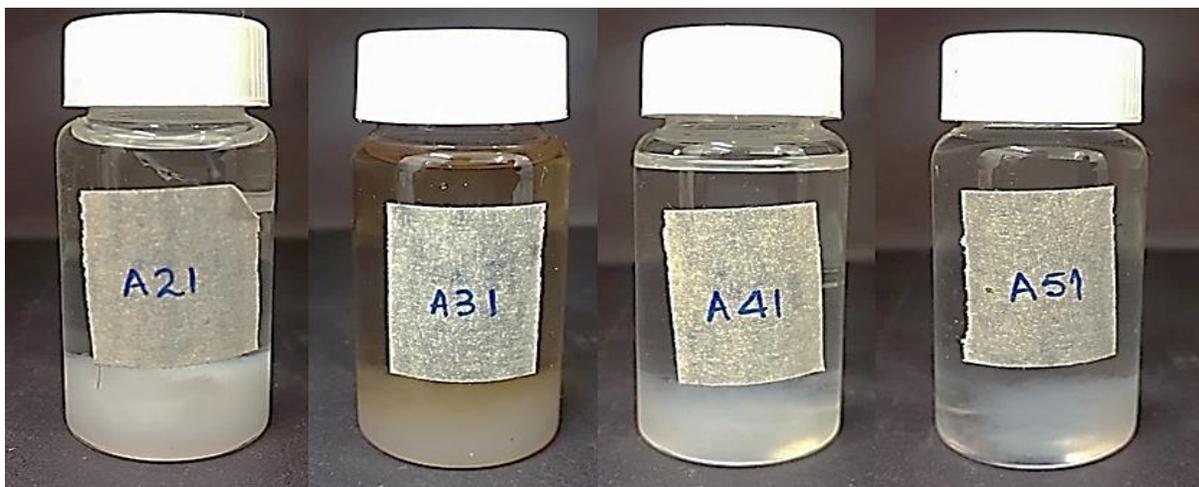
Para disminuir la velocidad de polimerización se evaluaron dos estrategias, disminución de la temperatura y disminución del pH. Se observó que aunque el efecto de la disminución de la temperatura era significativo en retrasar la velocidad de polimerización (datos no mostrados), esta estrategia dificultaría los procesos de preparación y posible escalado haciéndolos más extensos, complejos y costosos.

Adicionalmente, la estrategia de modificación del pH del medio demostró ser más efectiva para el control de la velocidad de polimerización pues según las revisiones bibliográficas de sistemas similares donde se usan monómeros de cianoacrilato, es necesario adicionar un agente modificador de pH ya que se ha reportado que los monómeros de cianoacrilato disminuyen su velocidad de polimerización a un pH ácido, preferiblemente por debajo de 3<sup>27,45,43,46</sup>.

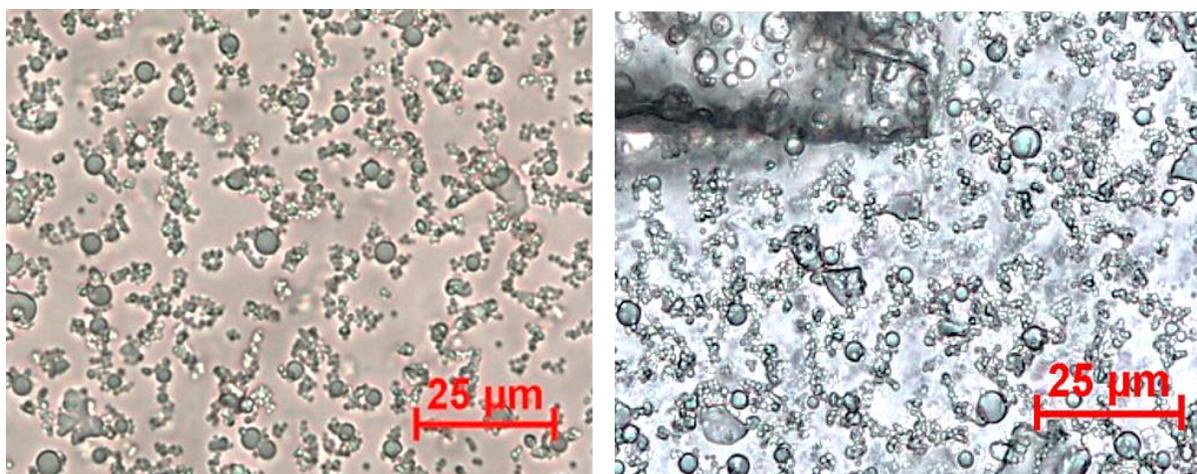
Una vez acidificado el medio se observa que la polimerización a diferentes concentraciones de monómero forma floculados menos densos como se ve en la **Imagen 7** donde se adicionaron las mismas cantidades de monómero lo que sugiere la presencia de partículas de tamaño más pequeño, mientras que en el sistema sin modificaciones de pH se observa un floculado más denso y mayor turbidez como lo muestra la **Imagen 5**. Las cantidades adicionadas de monómero fueron: muestra **A21**: 300 µL de monómero, **A31**: 200 µL, **A41**: 100 µL y **A51**: 10 µL, el volumen final de muestra fue de 5,0 mL.

Al realizar la modificación del pH del sistema se observa un cambio significativo en el tiempo de polimerización y en la formación de partículas poliméricas de menor tamaño (**Imagen 8**) que las obtenidas en el sistema sin modificaciones de pH (**Imagen 6**), con lo cual se logró comprobar que el pH es un factor determinante tanto en la solubilidad aparente del monómero como en la velocidad de polimerización del mismo; el efecto del pH es determinante debido a que el mecanismo de polimerización en los monómeros de cianoacrilato es desencadenado por la presencia de iones, específicamente iones hidroxilo ya sea por estar presentes en el agua del

sistema, aportados por la fase orgánica (Etanol) o por la adición de bases que aporten radicales hidroxilo como el Hidróxido de sodio<sup>41,42,43,53,59,78</sup>.



**Imagen 7:** Muestras con diferentes cantidades de etil-cianoacrilato, sistema a pH ácido.



**Imagen 8:** Partículas de polímero en el sistema con ajuste previo de pH.

Los ensayos mostraron que es posible disminuir la velocidad de polimerización del monómero mediante la modificación del pH del medio hasta el punto en el cual se favorezca la formación progresiva de los nanocristales de fármaco y

simultáneamente vaya ocurriendo el proceso de polimerización del monómero adicionado, esto permite que se dé la formación de nanocápsulas y/o nanoesferas cargadas con cristales del fármaco.

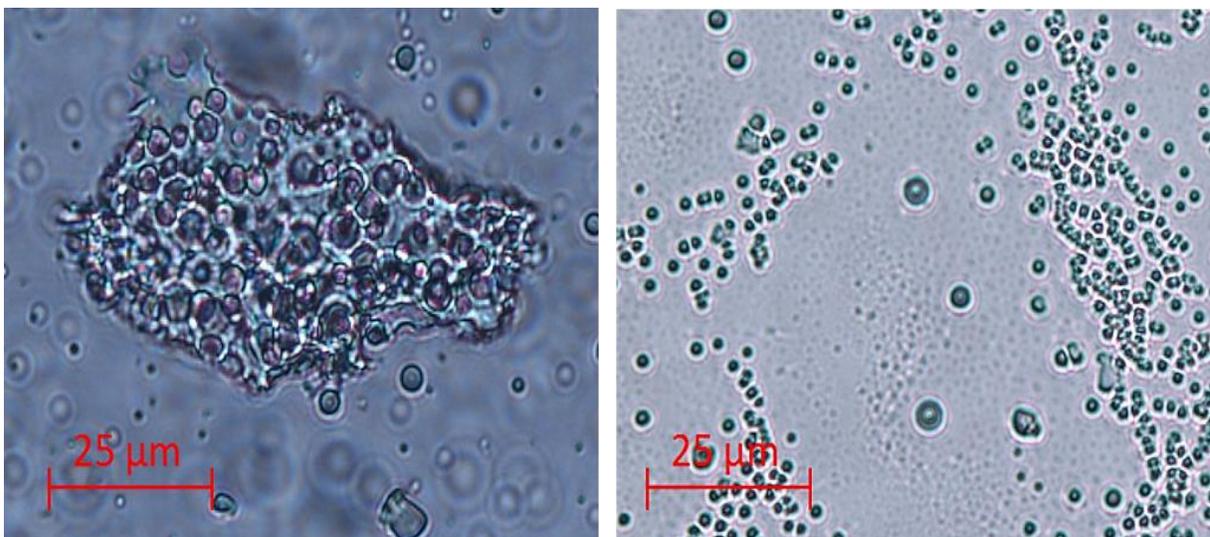
#### **3.1.4. Tiempo de polimerización**

Para determinar el tiempo necesario para lograr la polimerización total del monómero a pH ácido se dejó transcurrir la polimerización del monómero a tiempos establecidos y al cabo de ese tiempo se aceleró y terminó la polimerización al aumentar el pH del medio a un pH cercano a 7 utilizando una solución de NaOH, posteriormente se comparan la muestras obtenidas a los diferentes tiempos de polimerización, (0, 1, 2 y 3 horas).

Se observa que a mayor tiempo de polimerización menor puede ser el tamaño de las partículas para una concentración establecida de monómero, esto indica que el factor de tiempo de polimerización influye en el tamaño de las partículas de polímero y que el proceso de polimerización no se detiene totalmente con la modificación del pH del medio a pH ácido, si no que continua lentamente hasta que se agotan las unidades monoméricas necesarias para la formación del polímero, en la **Imagen 9** se puede observar la comparación de 2 de estas muestras: A la **Izquierda** se observa la presencia de agregados y la diferencia en el tamaño de partículas de polímero para un tiempo de polimerización de 1 hora comparado con un tiempo de polimerización de 3 horas para la imagen de la **derecha**, este aumento en el tamaño de las partículas de monómero se da posiblemente debido al aumento de iones hidroxilo

cuando se adiciona NaOH lo que acelera en alto grado la velocidad de polimerización causando el crecimiento de las partículas casi que de una forma no controlada, esto explica por qué a menores tiempos de polimerización se obtuvieron mayores tamaños de partícula, puesto que a menores tiempos de polimerización es mayor la cantidad de monómero residual aún sin reaccionar y que reacciona muy rápidamente al adicionar exceso de iones hidroxilo.

Se encontró que la polimerización de monómero adicionado transcurre durante aproximadamente 3 horas hasta agotar el monómero, transcurridas las 3 horas, la adición de NaOH aparentemente no tiene ningún efecto en la polimerización ni en el tamaño de partícula porque ya no hay monómero disponible para continuar la reacción de polimerización.



**Imagen 9:** Tiempo de polimerización del monómero en el sistema con ajuste de pH.

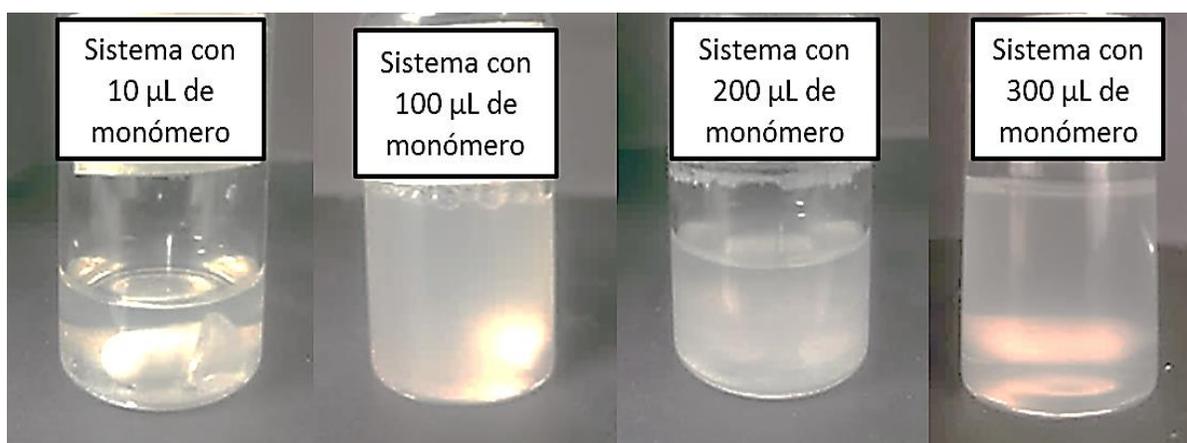
### 3.1.5. Cantidad de monómero requerido

Se realizaron ensayos del sistema con una cantidad establecida de fármaco y con diferentes cantidades de monómero, para la determinación de la cantidad de polímero (adicionado como monómero) necesaria para estabilizar y encapsular o entrapar los cristales del fármaco.

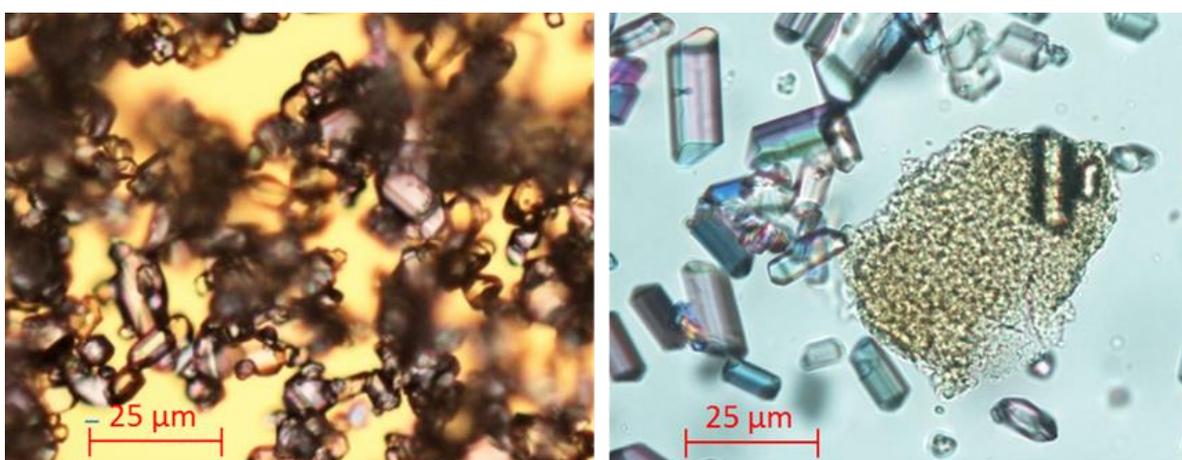
Se pudo determinar que al adicionar al sistema cantidades de monómero mayores a 100  $\mu\text{L}$  (**Imagen 10**: Sistema con 100  $\mu\text{L}$  de monómero), no se observa presencia de cristales, y por la tanto se asume que a concentraciones de monómero cercanas o superiores a ese valor se logra estabilizar, encapsular y/o entrapar toda la cantidad de cristales y/o de fármaco no soluble presentes en el sistema (**Imagen 12** Izquierda: muestra con 100  $\mu\text{L}$  de monómero) bajo las condiciones establecidas de pH, velocidad de agitación y tiempo de polimerización.

Se observó también que cuando se adicionan cantidades de monómero inferiores a 100  $\mu\text{L}$ , se forman cristales del fármaco de gran tamaño, **Imagen 10**: Sistema con 10  $\mu\text{L}$  de monómero, posiblemente debido que no son estabilizados, entrapados y/o encapsulados en su totalidad porque el monómero adicionado (polímero formado) no es suficiente, también se observó que cuando se adicionaron cantidades de monómero de 200  $\mu\text{L}$  y 300  $\mu\text{L}$  no se observa la formación de cristales, pero se observa presencia de sedimento lo que indica que hay inestabilidad y presencia de partículas de gran tamaño en el sistema como se puede ver en la **Imagen 10** correspondiente a dichas muestras, en la **Imagen 12: derecha** se observan

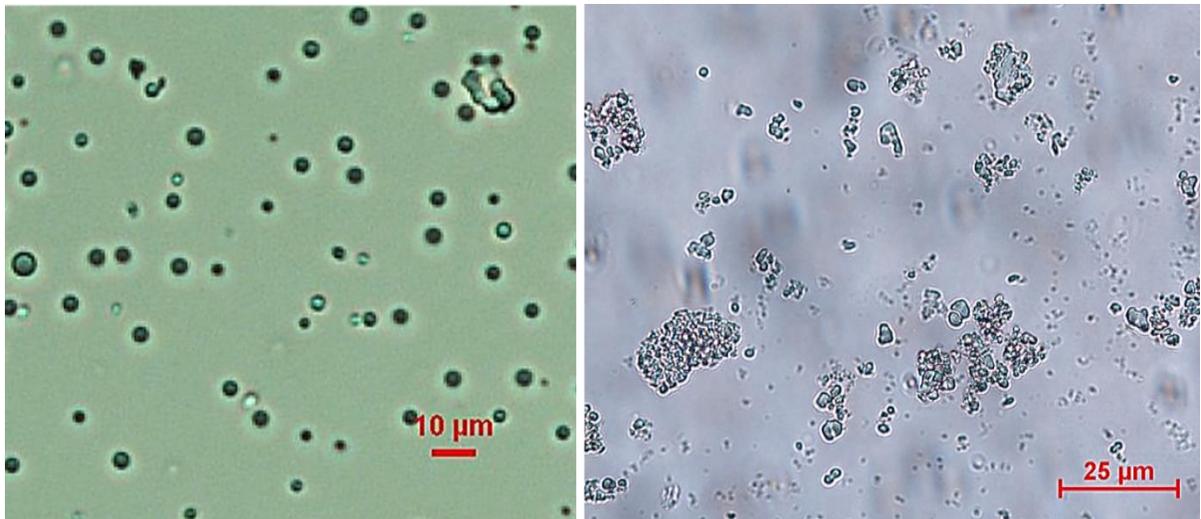
agregados de polímero de gran tamaño, esto posiblemente debido a un exceso de polímero y ausencia de un mecanismo de estabilización adecuado. En la muestra donde se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de monómero **Imagen 10** e **imagen 11**, se observa la formación de cristales debido al efecto de maduración de Ostwald, posiblemente porque la cantidad de polímero formado no es suficiente para estabilizar los cristales formados. Las imágenes de las muestras fueron tomadas después de 24 horas de preparadas las muestras.



**Imagen 10:** Muestras de ensayos de cantidad de monómero requerido.



**Imagen 11:** Cristales formados en el sistema: insuficiente cantidad de polímero.



**Imagen 12:** Muestra con 100 µL de monómero (**izquierda**); Muestra con 300 µL de monómero (**derecha**).

En estos ensayos se pudo observar inestabilidad tanto por el incremento en el tamaño de los cristales como por la presencia de sedimentos en las diferentes muestras, esto indica que en las muestras donde se presentó crecimiento de cristales no se adicionó una cantidad suficiente de monómero para impedir la maduración de Ostwald y el posterior incremento en el tamaño de dichos cristales del fármaco; en las muestras donde se observó presencia de sedimento sin formación de cristales es posiblemente debido a que la cantidad de monómero adicionada es suficiente para estabilizar los cristales pero el sistema por sí mismo no posee buenas características de estabilidad para las nanopartículas formadas ya sea por mecanismos de cargas electrostáticas o por mecanismos estéricos y se concluye entonces que también se requiere de la adición de un agente estabilizante para las nanopartículas del sistema que permita mantenerlas en suspensión durante largo tiempo.

### 3.1.6. Mecanismo de estabilización

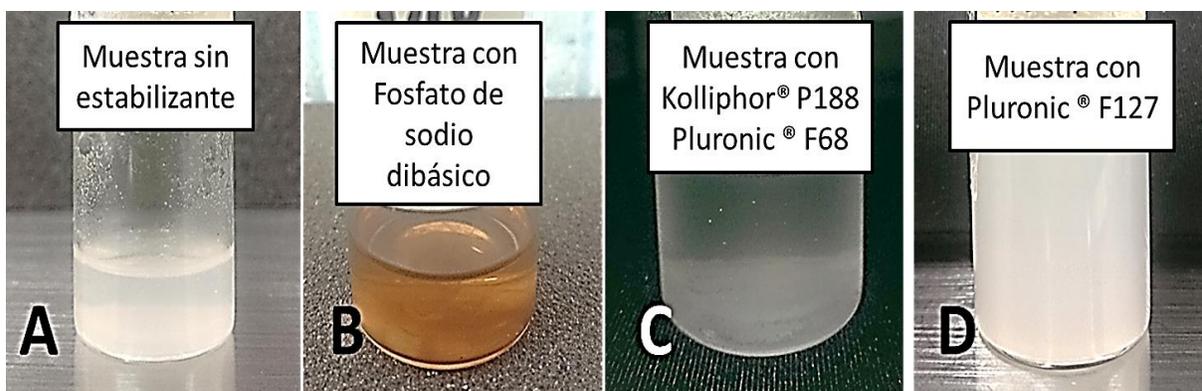
Existen tres tipos diferentes de mecanismos de estabilización de NP: electrostático, estérico y electroestérico. Para la realización de los ensayos de estabilización se seleccionaron tres agentes estabilizantes que fueron adicionados al sistema fármaco-polímero; el primero de ellos fue el fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), que por ser una sal actúa afectando directamente la carga y el potencial Z de las nanopartículas y proporciona un mecanismo de estabilización electrostático. Con esta sal no se obtuvieron buenos resultados en cuanto al parámetro de estabilidad tal como se puede ver en la **Tabla 6**, no se logra superar el valor mínimo teórico para que se dé la estabilidad electrostática (-30 mV) para una concentración de 43 mg/mL y a la cual se llega a un pH de sistema de 6,5, el cuál es el máximo establecido para la formulación.

Adicionalmente, se observó que al poco tiempo después de la adición de la sal de fosfato se producían fenómenos de agregación y sedimentación de las partículas de la nanosuspensión; además se notaba un aumento de pH que no permitía adicionar más cantidad porque ya eran valores superiores al pH de estabilidad del fármaco, y también a partir del segundo día de preparadas las muestras se comenzaba a observar un cambio de coloración de la suspensión hacia un amarillo casi ocre (**Imagen 13, B**), el cual puede presentarse posiblemente por un proceso de degradación del polímero ya que este es sensible a la degradación causada por agentes basificantes<sup>41,91,92</sup>, por lo cual se deben realizar futuros ensayos de determinación de productos de degradación del polímero. También se debe tener en cuenta que el uso de estas sales de fosfato en productos parenterales de pequeño

volumen a altas concentraciones está limitado por el ente regulatorio de medicamentos (INVIMA) ya que puede producir efectos indeseables en el paciente. Adicionalmente, cuando las partículas tienen poca carga superficial, la adición de sales puede aumentar la polaridad del medio y favorecer que las partículas “no polares” se agreguen para estabilizarse. Por todo lo anteriormente expuesto, se decide entonces no realizar nuevos ensayos con la sal de fosfato de sodio dibásico.

Los otros dos agentes estabilizantes utilizados fueron copolímeros de bloque los cuales brindan un mecanismo de estabilización estérica, se utilizaron Pluronic® F127 y Kolliphor® P188 (Pluronic® F68), se adicionaron 300 mg de cada uno de ellos (60mg/mL) a las muestras preparadas. Con estos agentes se observó que si bien el potencial Z del sistema fármaco-polímero no se ve afectado de manera significativa por la adición de estos estabilizantes estéricos tipo copolímeros de bloque (**Tabla 6**); sí se lograban mayores tiempos de estabilización que en los sistemas que no los tenían, (**Imagen 13**, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. **A**) y que en los sistemas con la sal de fosfato; esto demuestra que el mecanismo de estabilización es de tipo estérico y no electrostático. Entre los dos copolímeros utilizados, se pudo observar que se lograban mejores propiedades de estabilización usando el copolímero de bloque Pluronic® F127 debido a que la formación de sedimento en el tiempo es muy baja en comparación con el formado con Kolliphor® P188 (Pluronic® F68), (**Imagen 13, C y D**), posiblemente debido a que el Pluronic® F127 posee un mayor peso molecular (**Tabla 3**Tabla 3) y una longitud de cadenas más larga en las “colas” hidrofílicas de polietilen-óxido que hace que las distancias de acercamiento e interacción entre las nanopartículas sean mayores, siendo menos probable que se produzcan choques entre ellas y también disminuyendo los procesos de floculación y

sedimentación, por lo cual se decide realizar los ensayos de preformulación con el Pluronic® F127 por brindar mayor estabilidad estérica.



**Imagen 13:** Imágenes de los ensayos de mecanismo de estabilización.

**Tabla 6:** Resultados de la determinación del potencial Z de diferentes muestras.

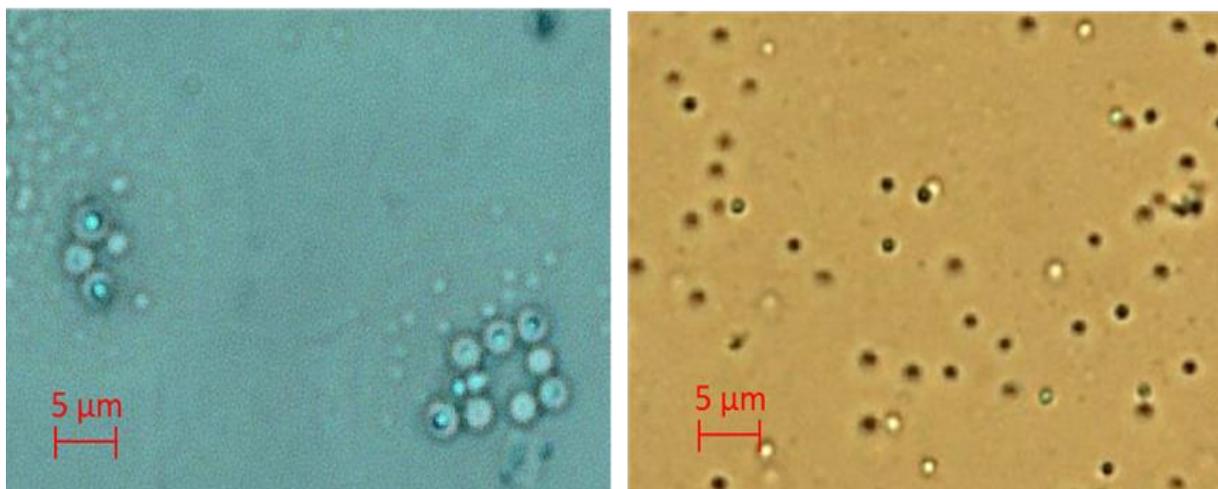
	Blanco			Fosfato de Sodio Dibásico		
Muestra	E1	E2	E3	14F-01	14F-02	14F-03
<b>Potencial Z (mV)</b>	-4,59	-3,70	-4,32	-16,8	-17,60	-18,1
	Kolliphor P188 (Pluronic F68)			Puronic F127		
Muestra	14K-01	14K-02	14K-03	15P-01	15P-02	15P-03
<b>Potencial Z (mV)</b>	-6,93	-5,44	-5,48	-5,96	-5,63	-5,63

### 3.1.7. Cantidad de estabilizante

Después de determinar que el mejor agente estabilizante para el sistema es el copolímero de Pluronic® F127, se observa que a unas concentraciones iguales o superiores a 60 mg/mL se logra la estabilización de las partículas del sistema, ver **Imagen 14: Derecha**, donde se pueden apreciar partículas esféricas de un tamaño relativamente pequeño sin aparente formación de agregados o partículas de gran tamaño en comparación con los que se observó para muestras del sistema sin

adición de agente estabilizante donde se aprecia la formación de agregados de partículas y sedimentación **Imagen 14: Izquierda**; las imágenes corresponden a muestras preparadas en los ensayos de preformulación.

Para comprobar si el mecanismo de estabilización y el agente estabilizante son los más adecuados, se realizó un seguimiento al tamaño de partícula a dos réplicas de la formulación propuesta durante cuatro meses, se observó una buena estabilidad durante tres meses, sin presencia de fenómenos de agregación y/o sedimentación, presentándose inestabilidad a partir del cuarto mes según se puede observar en la **Tabla 16** del numeral **3.5.8.**, dónde se observa que el tamaño de partícula se incrementa considerablemente.



**Imagen 14: Izquierda:** Muestra si agente estabilizante, **Derecha:** Muestra con estabilizante: Pluronic® F127.

Con estos ensayos se evidenció que tanto la selección del mecanismo de estabilización como la del agente estabilizante debe estar basada no solo en el conocimiento del sistema, sino que también es necesario realizar ensayos de seguimiento a la estabilidad del sistema mismo y a todos sus componentes.

### **3.2. Diseño estadístico (Datos categóricos con tabulación cruzada)**

Con el fin de obtener una formulación para los ensayos de la metodología de preparación, se definió que se debía trabajar con datos categóricos con tabulación cruzada para optimizar algunos de los parámetros de la formulación, dado que es un diseño que permite el análisis de variables que tienen factores de respuesta cualitativos y permite obtener resultados valiosos antes de la realización de otros diseños de optimización. Los resultados de los factores de respuesta se tomaron de manera cualitativa y las variables se presentaron en forma de rangos cuantitativos.

Para la selección de este diseño estadístico se tuvieron en cuenta varios aspectos importantes para los ensayos de laboratorio:

- a. Previamente se realizaron análisis exploratorios para determinar los rangos experimentales de las cantidades de los componentes de la formulación a ser usada en los ensayos de la metodología de preparación.
- b. Los factores de respuesta de estos ensayos para el diseño estadístico fueron cualitativos dado que no se contaba con las herramientas para el análisis cuantitativo de los factores de respuesta seleccionados.
- c. Por la naturaleza del diseño, se deben realizar a futuro estudios y ensayos adicionales bajo un modelo estadístico factorial a fin de optimizar más la formulación y la metodología de preparación propuesta que pretende ser llevada a un nivel industrial.

Para la creación de este diseño se utilizó el programa STAT Graphics® el cual arrojó que para las variables y factores de respuesta seleccionados se debían realizar un

total de 108 ensayos para cada bloque. Para determinar cuáles variables y a qué concentraciones afectaban directamente los factores de respuesta se realizó el análisis de los resultados obtenidos por medio de un análisis de varianzas con una prueba de ANOVA multifactorial teniendo en cuenta el efecto de cada una de las variables sobre: La presencia o formación de cristales, presencia de sedimento o flóculos (sin presencia de cristales) y el cambio en la coloración en el producto final. A continuación se describen las variables y rangos tomados y los factores de respuesta para el diseño experimental propuesto.

- Variables y rangos.
  - d) Cantidad de Etanol (mL): 3,0; 4,0 y 5,0
  - e) Cantidad de Monómero (Etil-Cianoacrilato) ( $\mu\text{L}$ ): 10, 20, 30, 40, 50, 60
  - f) Cantidad de estabilizante (Pluronic® F127) (mg/mL): 10, 20, 30, 40, 50, 60
- Factores de respuesta.
  - d) Presencia o formación de cristales.
  - e) Presencia de flóculos o precipitado.
  - f) Cambios en la coloración final.

Por ejemplo, la cantidad de etanol adicionado inicialmente está relacionado principalmente con la formación de los cristales en la nanoprecipitación debido al efecto de la evaporación del solvente, modificando la proporción de solvente/antisolvente inicial se afecta la velocidad de formación de los nanocristales; se debe tener en cuenta que la cantidad adicionada de agua (antisolvente) es de 5,0 mL y se mantuvo constante en todos los ensayos ya que el solvente orgánico es evaporado de la suspensión durante el proceso de preparación y el volumen final de

la nanosuspensión será de 5,0 mL por lo cual las cantidades adicionadas de los componentes de la formulación están calculados para un volumen final de 5,0 mL.

Después de realizar los 108 ensayos propuestos por el diseño experimental, se obtuvieron los resultados del efecto de cada variable sobre los factores de respuesta mostrados en las tablas 7, 8 y 9, con estos resultados se realizó posteriormente un análisis de varianza multifactorial (ANOVA multifactorial) utilizando como método de cálculo para la suma de cuadrados el tipo III, ver: **Tablas 10, 11 y 12.**

**Tabla 7:** Efecto del volumen de etanol sobre los factores de respuesta.

Etanol (mL)	Cristales		Sedim o Floc		Coloración	
	SI (%)	NO (%)	SI (%)	NO (%)	SI (%)	NO (%)
3	33,33	0,00	16,67	16,67	27,78	5,56
4	25,93	7,41	7,41	<b>25,93</b>	33,33	0
5	19,44	<b>13,89</b>	11,11	<b>22,22</b>	22,22	<b>11,11</b>
TOTAL	78,70	21,30	35,19	64,82	83,33	16,67

**Tabla 8:** Efecto del volumen de monómero sobre los factores de respuesta.

CNA (uL)	Cristales		Sedim o Floc		Coloración	
	SI (%)	NO (%)	SI (%)	NO (%)	SI (%)	NO (%)
10	13,89	2,78	0	<b>16,67</b>	16,67	0
20	16,67	0	0	<b>16,67</b>	16,67	0
30	16,67	0	2,78	13,89	16,67	0
40	16,67	0	8,33	8,33	16,67	0
50	7,40	<b>9,26</b>	10,19	6,48	5,56	<b>11,11</b>
60	7,40	<b>9,26</b>	13,89	2,78	11,11	5,56
TOTAL	78,70	21,30	35,19	64,82	83,35	16,67

**Tabla 9:** Efecto de la cantidad de estabilizante sobre los factores de respuesta.

PF127 (mg/mL)	Cristales		Sedim o Floc		Coloración	
	SI (%)	NO (%)	SI (%)	NO (%)	SI (%)	NO (%)
10	13,89	2,78	9,26	7,41	13,89	<b>2,78</b>
20	13,89	2,78	9,26	7,41	13,89	<b>2,78</b>
30	12,04	3,70	8,33	8,33	13,89	<b>2,78</b>
40	12,96	3,70	3,7	12,96	13,89	<b>2,78</b>
50	12,96	<b>4,64</b>	2,78	13,89	13,89	<b>2,78</b>
60	12,96	3,70	1,85	<b>14,81</b>	13,89	<b>2,78</b>
TOTAL	78,70	21,30	35,18	64,81	83,34	16,68

Resultados obtenidos para el análisis de varianza multifactorial:

**Tabla 10:** Análisis de Varianza para Floculación o Sedimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	1,40741	2	0,703704	7,85	0,0007
B:CNA	10,8519	5	2,17037	24,20	<b>0,0000</b>
C:PF127	3,85185	5	0,77037	8,59	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	8,51852	95	0,0896686		
TOTAL (CORREGIDO)	24,6296	107			

**Tabla 11:** Análisis de Varianza para Cristales.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	3,12963	2	1,56481	18,35	<b>0,0000</b>
B:CNA	6,71296	5	1,34259	15,74	<b>0,0000</b>
C:PF127	0,157407	5	0,0314815	0,37	0,8686
RESIDUOS	8,10185	95	0,0852827		
TOTAL (CORREGIDO)	18,1019	107			

**Tabla 12:** Análisis de Varianza para Coloración.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	2,0	2	1,0	15,83	<b>0,0000</b>
B:CNA	7,0	5	1,4	22,17	<b>0,0000</b>
C:PF127	0,0	5	0,0	0,00	1,0000
RESIDUOS	6,0	95	0,0631579		
TOTAL (CORREGIDO)	15,0	107			

Este diseño se planteó teniendo en cuenta los resultados cualitativos del efecto de las variables sobre los factores de respuesta para los diferentes ensayos, esto debido a las limitaciones de tiempo y la disponibilidad de los equipos requeridos para cuantificación, sin embargo, los resultados permitieron obtener una propuesta de formulación adecuada para los ensayos de la metodología de preparación. Se pudo observar que las variables seleccionadas tenían efecto y estaban relacionadas en alguna medida con los factores de respuesta como formación de cristales, presencia de floculación o sedimentos y cambios en la coloración final de la muestra tal como se puede ver en las tablas de frecuencias **tablas 7, 8 y 9**, en la **tabla 7** por ejemplo, se puede ver que cuando se adicionan 5,0 mL de etanol (por cada 5 mL de fase acuosa) se obtienen los mejores resultados porque el porcentaje de muestras donde se presenta la formación de cristales y ocurren cambios en la coloración es el más bajo, mientras que para el parámetro de formación de sedimento hay un porcentaje muy similar al adicionar 4,0 mL o 5,0 mL (por cada 5 mL de fase acuosa), teniendo en cuenta esto, se decide trabajar con **5,0 mL** como el volumen más adecuado para la propuesta de formulación final. Para la cantidad adicionada de monómero (**Tabla 8**), se puede observar que para cantidades adicionadas de 50  $\mu\text{L}$  o 60  $\mu\text{L}$  de monómero se obtiene el mayor porcentaje de muestras sin formación de cristales y de cambios en la coloración final, pero la menor formación de sedimento o flóculos sin formación de cristales se da cuando se adicionan 10  $\mu\text{L}$  o 20  $\mu\text{L}$ , debido posiblemente a una deficiencia en la concentración de monómero (polímero), por esto se decide que la cantidad más adecuada para la propuesta de formulación es de **60  $\mu\text{L}$** . En los ensayos sobre el efecto de cantidad de agente estabilizante (**Tabla 9**), también se observó que a concentraciones de 50 mg/mL se obtiene menor

porcentaje de muestras con formación de cristales; y para concentraciones de 50 mg/mL y 60 mg/mL se observa menor formación de sedimento o flóculos y se observa que el porcentaje de muestras en la que se presenta el cambio en la coloración es idéntico, lo cual indica que la cantidad adicionada de estabilizante (Pluronic® F127) no tiene ningún efecto sobre el parámetro de cambio en la coloración final de las muestras se decide entonces trabajar a una concentración de estabilizante de **50 mg/mL** ya que se considera que la menor formación de cristales es esencial en este tipo de sistemas porque éstos causarían mayor inestabilidad que la formación de sedimento, ya que la formación de sedimento puede estar también influenciada por la cantidad adicionada de estabilizante, mientras que la formación de cristales indica que no se ha adicionado un cantidad suficiente de monómero para encapsular o entrapar los cristales formados de fármaco.

Si bien el análisis de frecuencias arrojó resultados que permitieron estimar las concentraciones y cantidades más adecuadas de los componentes propuestos de la formulación basado en el efecto de cada variable sobre los tres factores de respuesta seleccionados; se realizó un análisis de varianzas con el cual se analizó el efecto de las tres variables en conjunto sobre cada factor de respuesta **Tablas 10, 11 y 12**, se observó de acuerdo al valor P obtenido que las variables de cantidad adicionada de monómero y la concentración de agente estabilizante tienen un efecto significativo sobre la formación de flóculos o sedimento **Tabla 10**, mientras que la cantidad adicionada de etanol y de monómero **Tablas 11 y 12**, tienen un efecto significativo sobre los factores de respuesta de formación de cristales y los cambios en la coloración final de la muestra.

### 3.3. Propuesta de formulación

Después de realizar los ensayos correspondientes al diseño experimental y analizar los resultados obtenidos, se tomó como propuesta de formulación la que se describe a en la **Tabla 13**. Se estableció el rango de pH de la formulación propuesta en un rango de 5,5, a 6,5 pues es el pH de mayor estabilidad del fármaco en medios acuosos, como se ha demostrado en estudios de estabilidad a soluciones parenterales que contienen acetaminofén como: Traucet® infusión y Traucet® ampolla fabricados por Corpaul Farmacéutica, quiénes proporcionaron todos los materiales necesarios para la realización este trabajo de investigación de maestría.

**Tabla 13:** Composición cuantitativa de la formulación propuesta.

Componente	Cantidad
Acetaminofén	375 mg
Alcohol etílico	5,0 mL
HCl	c.s.p. pH 1,0 -3.0
Etil-cianoacrilato	50.0 µL
Pluronic PF127®	60 mg /mL
NaOH	c.s.p. pH 5,5 – 6,5
Agua USP	c.s.p. 5,0 mL

### 3.4. Metodología para preparación, velocidad y tipo de agitación

La metodología se desarrolló en base a la preparación de una fase orgánica y una fase acuosa en las cuales se incorporan los componentes de la formulación propuesta dependiendo de su solubilidad y afinidad y de lo observado en los

ensayos de pre-formulación; a continuación se describe detalladamente la preparación de estas fases y la metodología de preparación de la nanosuspensión:

*Preparación de la fase orgánica:* en esta etapa de la preparación se da la disolución completa del fármaco en el solvente orgánico (5 mL de etanol), luego se adiciona el monómero con previo ajuste de pH con el fin de disminuir la velocidad de polimerización para que ésta se dé simultáneamente con la formación de cristales de fármaco producidos por nanoprecipitación durante la evaporación del solvente en la etapa de mezcla y agitación.

*Preparación de la fase acuosa:* en esta fase se produce la disolución del agente estabilizante (Pluronic® F127) el cual estará en forma de micelas antes de ser mezclado con la fase orgánica donde se reordenará alrededor de las nanopartículas formadas por los cristales de fármaco y el polietil-cianoacrilato, el volumen de agua tomado para la preparación de la fase acuosa fue de 5,0 mL para todas las muestras.

*Agitación y obtención de la nanosuspensión final:* durante esta etapa se mezclan las dos fases y se inicia el proceso de agitación; se producen entonces con el paso del tiempo los fenómenos de nanoprecipitación y polimerización. La nanoprecipitación ocurre a medida que se va evaporando el solvente orgánico en el cual está solubilizado previamente el fármaco, al evaporarse el solvente, el agua en el sistema actúa como un antisolvente y se produce entonces la nucleación y formación de cristales; simultáneamente, a medida que se van formando los cristales del fármaco

va transcurriendo la polimerización lenta del monómero en el medio ácido de la fase orgánica, este proceso de polimerización estabiliza los cristales por dos posibles mecanismos: 1. Los pequeños fragmentos (oligómeros) de polietil-cianoacrilato que se van formando, por afinidad se van depositando en la superficie de los cristales de fármaco estabilizándolos e impidiendo el posterior crecimiento cristalino, formando una cápsula con cristales dentro de ella (nanocápsulas). 2. En el caso de no darse la formación de estas nanocápsulas se puede dar entonces la formación de nanoesferas, debido a que posiblemente se da inicio a la polimerización y formación de partículas de polietil-cianoacrilato antes de iniciarse la formación de cristales del fármaco y las cuales a medida que se va dando esta nucleación o formación de cristales, los van atrapando dentro de la matriz polimérica debido a interacciones hidrofóbicas y se continúa llevando a cabo la polimerización en la interfase del cristal de fármaco hasta el agotamiento del monómero adicionado. También puede suceder que a medida que se va evaporando el solvente orgánico, el fármaco va perdiendo solubilidad y por afinidad e interacciones hidrofóbicas con el polietil-cianoacrilato va quedando atrapado en éste sin formar directamente cristales de fármaco pero sí atrapado y distribuido en la matriz de acrilato.

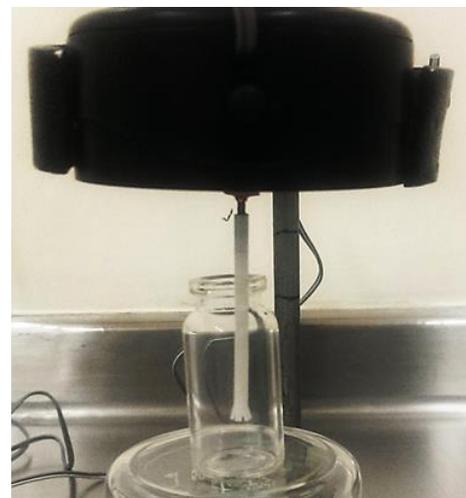
Después de la formación de las nanopartículas de fármaco con el polietil-cianoacrilato (nanopartículas poliméricas), éstas son estabilizadas, debido a la interacción con el agente estabilizante Pluronic® F127 que les otorga estabilización estérica; cabe decir que este agente estabilizante, presente desde el inicio de la mezcla y agitación, puede tener un efecto estabilizante sobre los nanocristales de fármaco que se puedan formar antes del inicio de la polimerización del cianoacrilato;

pero al comenzar la polimerización y formarse fragmentos de polietil-cianoacrilato, éstos desplazan al Pluronic® de la superficie de los cristales de fármaco debido a que el polietil-cianoacrilato presenta mayor afinidad por el fármaco que el estabilizante estérico. Al final del proceso de agitación se tiene una nanosuspensión polimérica conformada por una fase continua (acuosa), sin presencia de solvente orgánico (etanol), con una fracción de fármaco en solución, y como fase discontinua están las nanopartículas poliméricas constituidas de nanocristales de Acetaminofén recubiertos o entrapados con polietil-cianoacrilato, dichas nanocápsulas o nanoesferas están estabilizadas estéricamente por el Pluronic® F127.

Para la selección del tipo de agitación se tuvo en cuenta que dicho mecanismo de agitación debía ser una técnica que se pudiera emplear a nivel industrial, es decir, que fuera fácilmente escalable. Para tal fin se evaluaron la agitación magnética y la agitación tipo aspas (**Imagen 15**) ya que estas dos técnicas tienen una gran versatilidad para ser usadas a nivel industrial y existen en el mercado un gran número de reactores que utilizan este tipo de agitación mecánica, además la empresa Corpaul Farmacéutica posee sistemas de agitación similares para la producción industrial.

Las muestras fueron preparadas usando las técnicas de agitación magnética y agitación tipo aspas, y adicionalmente se evaluó el efecto del cambio de velocidad en el sistema de agitación, esta comparación se realizó para evaluar si el sistema presenta variaciones de tamaño comparando los dos tipos de agitación (**Imagen 15**).

Según los resultados obtenidos se puede observar que tanto la velocidad como el tipo de sistema de agitación tienen un efecto directo y significativo sobre el tamaño de las partículas obtenidas tal y como se muestra en la **Tabla 14: Tamaño de partícula: efecto del tipo y velocidad de agitación.**, donde se observa que el tamaño de partícula es menor en las muestras donde se usa agitación por espas (**373,5 nm**) que en las muestras preparadas por agitación magnética (**608,8 nm**) y a su vez se observa que el tamaño es mucho menor en las muestras preparadas por agitación con espas a 9500 RPM, mayor velocidad (**166,1 nm**). De igual manera se compararon los resultados del índice de polidispersidad y se pudo ver que para las muestras preparadas con agitación por espas a 9500 RPM el promedio es de **0,087**, lo cual es mucho más bajo que lo obtenido en las muestras de agitación por espas y agitación magnética a 1200 RPM, donde el promedio estimado fue de **0,211** y **0,276** respectivamente. A menor índice de polidispersidad, es más homogéneo y estrecho el tamaño de las partículas y se espera que el sistema sea más estable.



**Imagen 15:** Sistemas de agitación utilizados. **Izquierda:** agitador magnético, velocidad máxima 1200 RPM. **Derecha:** agitador tipo espas, velocidad máxima 9500 RPM.

Los resultados obtenidos de promedio de tamaño de partícula y polidispersidad para muestras sometidas a diferentes tipos y velocidades de agitación se pueden observar en la **Tabla 14** la cual se muestra a continuación.

**Tabla 14: Tamaño de partícula: efecto del tipo y velocidad de agitación.**

Muestra	A. magnética (1200 RPM)		A. aspas (1200 RPM)		A. aspas (9500 RPM)	
	d.nm	Pdl	d.nm	Pdl	d.nm	Pdl
1	616,6	0,411	373,0	0,382	147,4	0,012
2	626,9	0,457	400,3	0,323	150,9	0,006
3	647,5	0,421	368,1	0,353	161,6	0,103
4	725,2	0,23	420,0	0,356	160,3	0,127
5	707,5	0,222	333,1	0,219	204,5	0,052
6	737,2	0,226	359,6	0,36	207,7	0,044
7	574,4	0,589	358,9	0,239	206,8	0,058
8	559,2	0,318	354,7	0,246	159,8	0,171
9	558,9	0,231	411,4	0,129	160,7	0,096
10	543,1	0,273	411,5	0,153	163,3	0,076
11	668,2	0,565	425,1	0,126	146,9	0,04
12	626,8	0,542	389,2	0,162	146,1	0,086
13	632,3	0,224	375,3	0,18	148,9	0,042
14	636,5	0,218	378,2	0,201	188,0	0,093
15	643,7	0,261	335,7	0,342	188,4	0,08
16	701,2	0,194	347,2	0,297	188,6	0,116
17	709,0	0,194	338,4	0,037	121,7	0,279
18	551,4	0,088	341,2	0,027	117,6	0,265
19	555,2	0,052	423,9	0,189	171,0	0,005
20	519,5	0,116	356,0	0,169	170,6	0,06
21	525,3	0,152	363,8	0,176	167,9	0,09
22	536,8	0,209	362,0	0,152	170,5	0,07
23	524,3	0,176	368,1	0,175	166,8	0,079
24	552,1	0,229	369,7	0,174	167,7	0,069
25	541,4	0,293	373,3	0,117	168,2	0,044
26					166,5	0,073
27					165,8	0,086
28					165,6	0,082
29					167,0	0,005
30					164,6	0,043
31					167,1	0,084
32					170,4	0,026
33					167,1	0,064
34					166,8	0,064
35					168,3	0,01
36					166,8	0,071
37					170,5	0,036
38					167,7	0,051
39					167,6	0,055
40					154,4	0,166
41					154,4	0,122
42					218,5	0,206
43					223,6	0,181
44					218,4	0,19
45					220,8	0,176
46					104,1	0,124
47					104,4	0,116
Promedio	608,8	0,276	373,5	0,211	166,1	0,087
STD	70,2	0,144	27,9	0,099	22,8	0,067

### 3.5. Caracterización de las Nanopartículas

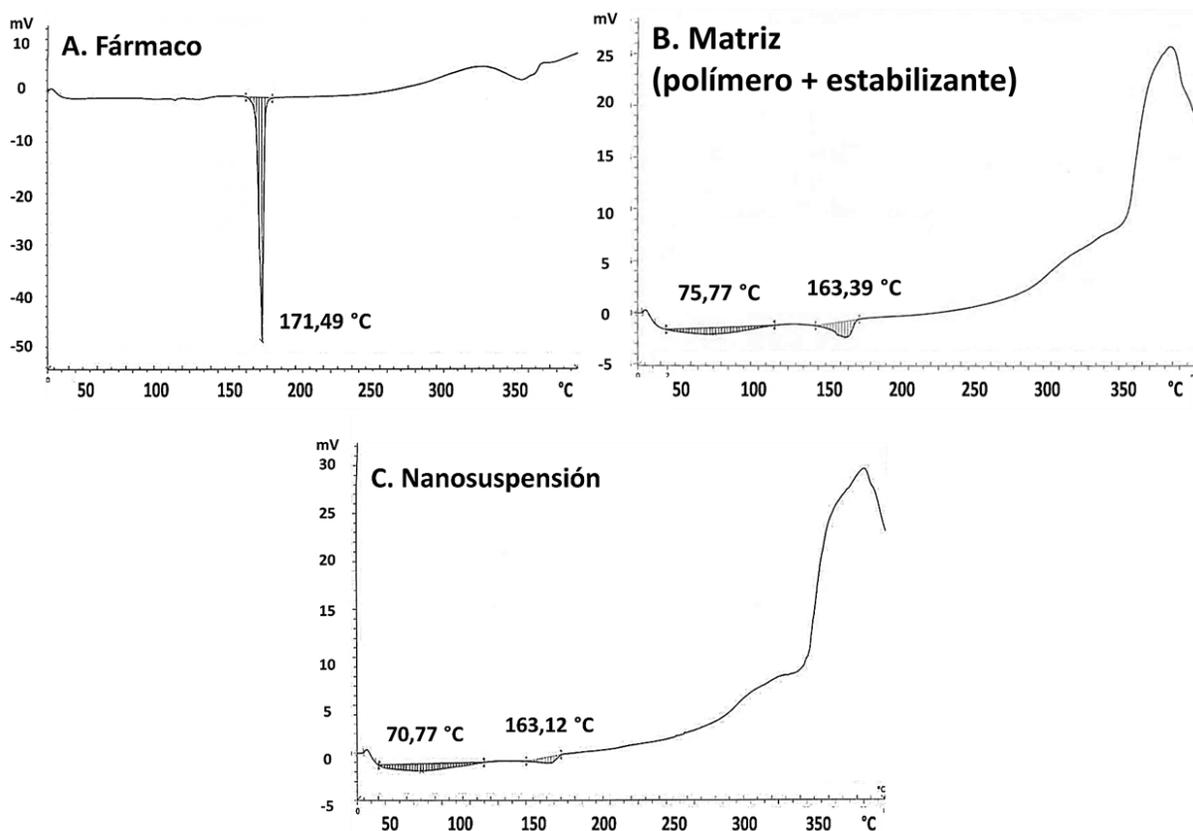
La importancia de la caracterización de las nanosuspensiones obtenidas se basa en la importancia de la comprensión del sistema y sus mecanismos de formación, también para predecir su comportamiento biológico ya que esto es fundamental si se piensa en escalar el proceso y llevarlo a una formulación farmacéutica de uso en humanos. A continuación se presentan los resultados obtenidos para la caracterización de las NP y de algunos de sus componentes en cada uno de los análisis:

### 3.5.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Estos análisis se realizaron con el objetivo de evaluar las posibles interacciones entre el fármaco y los componentes de la formulación o matriz lo cual es de vital importancia para establecer los posibles mecanismos de formación de las nanopartículas y liberación del fármaco.

En el termograma obtenido para la nanosuspensión (Sistema completo de nanopartículas de fármaco, polímero acrílico y estabilizante) **Figura 19: C**, se observa que los picos endotérmicos (70,77 °C y 163,12 °C) son muy similares a los que presenta la matriz (nanopartículas de polímero y estabilizante sin fármaco) **Figura 19 B:** (75,77 °C y 163,39 °C), pero en ninguna de estas muestras se observa algún pico cercano la temperatura donde se presenta el pico endotérmico mostrado por el fármaco **Figura 19 A:** (171,49 °C); lo cual sugiere que el fármaco no se encuentra en forma cristalina en las partículas de la nanosuspensión, si no que se encuentra dentro de la matriz en un estado amorfo o como una dispersión

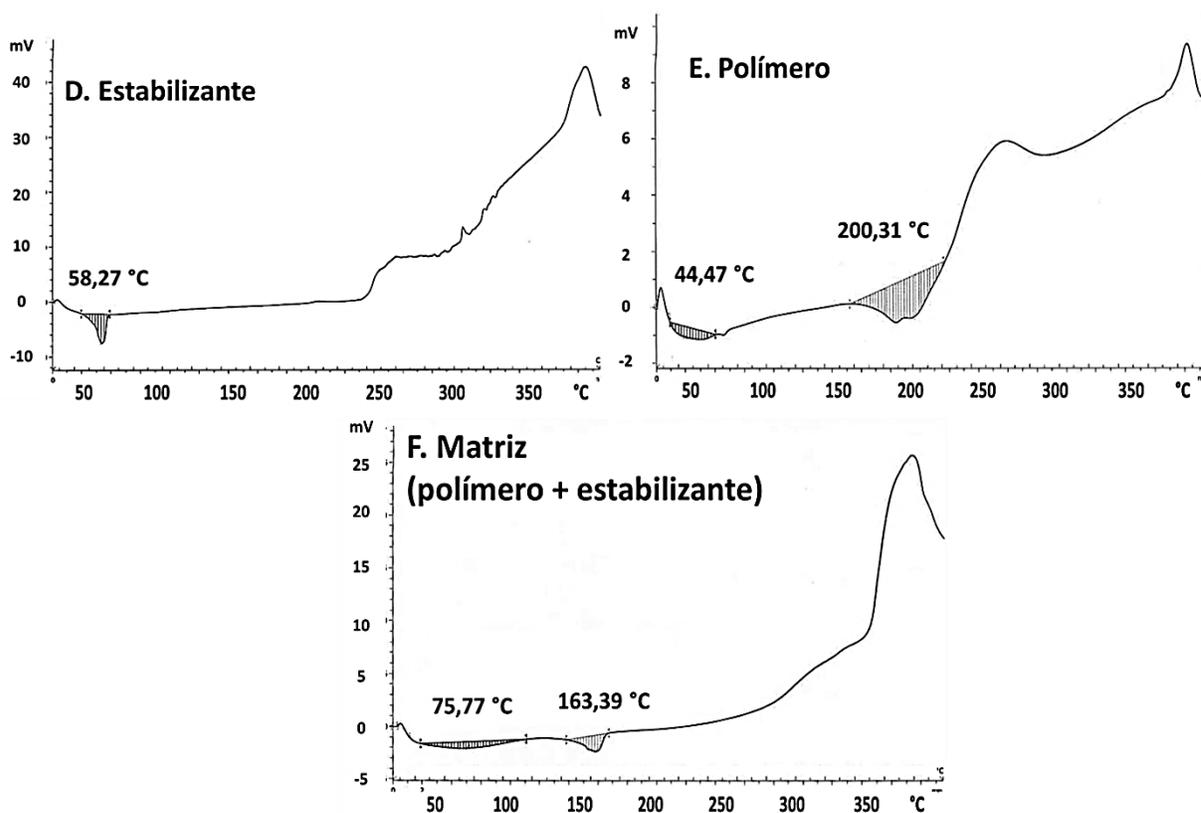
moléculas<sup>93</sup>.



**Figura 19:** Termogramas del fármaco (A), matriz (B), y nanosuspensión (C).

En los termogramas obtenidos para las muestras de estabilizante (Pluronic® F127) **Figura 20: D**, y polímero (polietil-cianoacriato) **Figura 20: E**, se pueden ver máximos endotérmicos tanto en el estabilizante (58,27 °C) como en el polímero (44,47 °C y 200,31 °C) y al compararlos con los presentados por la muestra de matriz (nanopartículas de polímero y estabilizante sin fármaco) **Figura 20: F**, (75,77 °C y 163,39 °C) estos valores obtenidos son muy diferentes, lo cual sugiere que hay una interacción entre el agente estabilizante y el polímero ya sea por afinidad de superficie o por interacción química.

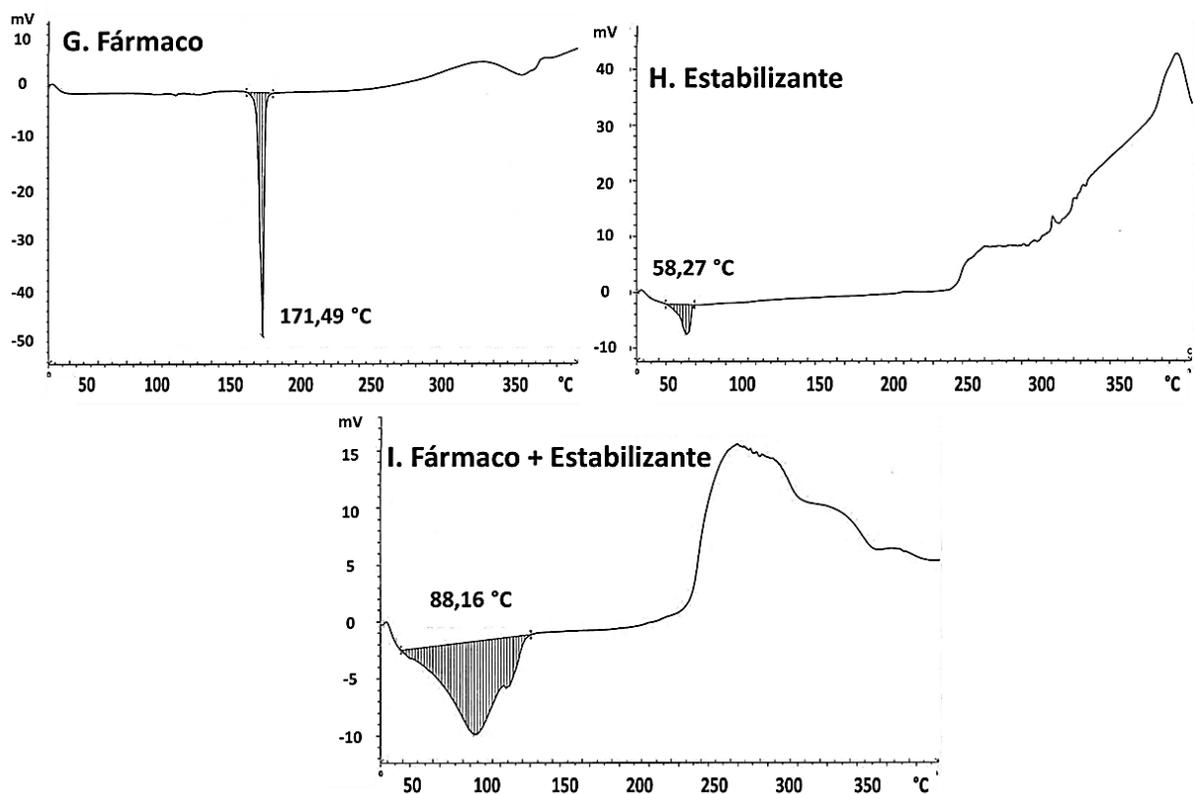
La interacción entre el agente estabilizante y el polímero que conforma la matriz de las nanopartículas de la nanosuspensión debe existir para que se pueda dar el efecto estabilizante estérico en este caso específico y dicha interacción se da seguramente por la adhesión de la fracción hidrofóbica de polipropileno-óxido del estabilizante sobre la superficie polimérica hidrofóbica del polímero acrílico que conforma la matriz de la nanopartícula.



**Figura 20:** Termogramas de agente estabilizante (D), polímero (E), y matriz (polímero más agente estabilizante) (C).

También se compararon los resultados de los termogramas obtenidos para el fármaco **Figura 21: G** que presenta un pico endotérmico a 171,49 °C, el agente estabilizante **Figura 21: H** con un pico endotérmico a 58,27°C, y una muestra

elaborada con los dos (**Figura 21: I**) la cual presenta un pico endotérmico a 88,16 °C, y que fue preparada con el mismo protocolo de elaboración de nanopartículas como se indicó en la metodología de la preparación de muestras para DSC.



**Figura 21:** Termogramas de fármaco (**G**), estabilizante (**H**), y fármaco más agente estabilizante (**I**).

Según lo observado, como no aparecen los picos individuales del fármaco o el estabilizante en la muestra que fue elaborada con los dos ingredientes, se interpreta que existe interacción entre el fármaco y el agente estabilizante, lo cual es favorable para nuestro sistema ya que esta interacción puede ayudar a estabilizar las partículas de fármaco que se puedan formar antes de ser estabilizadas por el polímero, y puede permitir obtener cristales o partículas de fármaco de menor tamaño.

La técnica de evaporación de solvente es utilizada para formular sistemas en forma de partículas, la fase orgánica consiste en polímero y fármaco disueltos en un disolvente orgánico y una fase continua que contiene un estabilizante para estabilizar la nanosuspensión formada. La suspensión se agita para favorecer la evaporación del disolvente orgánico, lo que da lugar a la nucleación y formación de cristales de fármaco y mientras se inicia la polimerización con la formación de pequeñas fracciones de polímero (oligómeros) que atrapan el fármaco debido a su afinidad polar, posteriormente dichas fracciones de polímero continúan el proceso de polimerización para formar partículas duras de polímero con cavidades en su interior que contienen fármaco que puede estar en forma de cristales, partículas amorfas o como una dispersión molecular<sup>93,94,95</sup>.

Dependiendo de la energía utilizada durante el proceso de agitación y las características del sistema, se forman nano o micropartículas. El solvente se evapora del sistema, y el fármaco se distribuye entre las partículas poliméricas (matriz) y el estabilizante circundante presente en la fase acuosa o continua.

Si el estabilizante utilizado está presente en una concentración mayor que su concentración crítica micelar, también están presentes en la fase continua micelas del agente estabilizante, que pueden “solubilizar” al fármaco en la fase continua de la suspensión.

El solvente orgánico usado para incorporar el polímero puede difundirse en la fase continua debido a su miscibilidad en la fase acuosa, lo que puede aumentar

temporalmente la solubilidad del fármaco en la fase acuosa o continua. Sin embargo, el fármaco difundido en la fase continua puede precipitarse una vez que el disolvente orgánico se evapora completamente y luego depositarse sobre la superficie de los oligómeros o las nanopartículas de polímero que ya se están formando.

Basándose en el modelo anterior, la carga de fármaco en sistemas de partículas preparados por la técnica de evaporación de disolvente dependerá: (1) de la afinidad del fármaco por la fase polimérica, (2) de la solubilidad del fármaco en la fase acuosa o continua y (3) que el fármaco que podría separarse como un sólido en la fase continua y depositarse sobre la superficie de las nanopartículas.

Debido a que la solubilidad del fármaco en el sistema acuoso que contiene el agente estabilizante no es significativamente diferente a la solubilidad que presenta el fármaco en una fase acuosa sola; puede descartarse la hipótesis en la cual se pensaba que la fase continua cargada de agente estabilizante podría afectar la carga del fármaco en las nanopartículas debido a una solubilización micelar. En otras palabras, la carga de fármaco en las partículas parece estar gobernada por la división del fármaco entre la fase polimérica y la fase acuosa y su subsiguiente separación de la fase continua y la deposición sobre la superficie de las nanopartículas<sup>93,94,95</sup>.

Por lo tanto, para un volumen y concentración de fase continua dada, la carga del fármaco en las nanopartículas debe gobernarse principalmente por la distribución del fármaco en la fase polimérica. Esta distribución en la fase polimérica estaría

influenciada por la solubilidad en estado sólido del fármaco y por la capacidad de la matriz polimérica para atrapar el fármaco en estado disperso<sup>93,94,95</sup>.

### **3.5.2. Valoración por UV/VIS**

Para la valoración del fármaco se desarrolló y estandarizó una metodología basada en un sistema de solventes con una proporción de Etanol: Acetonitrilo (50:50) que fue determinada experimentalmente y para la cual se realizó una curva de calibración con estándares a concentraciones que no superaran valores de absorbancia mayores a 1.5, para garantizar que se cumpla la ley de Beer (linealidad de respuesta entre absorbancia vs concentración) y con los parámetros y estándares descritos en Figura 23; esta curva de calibración se realizó con un patrón secundario valorado contra un patrón USP después de determinar el máximo de absorbancia del fármaco (248 nm) en la mezcla de solventes mencionados anteriormente y comprobando que no se presentan interferencias causadas por el polietil-cianoacrilato (polímero) ni por el copolímero de bloque Pluronic® F127 (agente estabilizante), o alguno de los componentes de la formulación propuesta.

El método de solubilización basado en mezcla de solventes (Etanol:Acetonitrilo) se desarrolló teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- i. Asegurar la liberación total del fármaco desde las nanocápsulas o nanoesferas.

- ii. Garantizar la solubilidad total del fármaco y de los constituyentes de las nanopartículas en el solvente o sistema de solventes seleccionados para las lecturas en el UV/VIS.
- iii. Lograr la cuantificación del fármaco sin interferencia de los componentes de la formulación o los solventes empleados.
- iv. El solvente o solventes usados para esta prueba debe tener una absorbancia (cutoff) muy baja o nula en el UV/VIS para que no se presenten interferencias o enmascaramientos de las lecturas.
- v. Obtener una curva de calibración que permita la valoración de muestras en un rango amplio de concentraciones de fármaco.
- vi. La metodología de la preparación de la muestra para estas lecturas no debe afectar la integridad química o degradar el fármaco a ser cuantificado, en el caso de requerir ajustes de pH.
- vii. Para la preparación de los diferentes niveles de la curva de calibración se debe tomar como referencia el nivel del 100 % que corresponde a la concentración nominal final a la cual se desea obtener el producto en la formulación propuesta.

Las condiciones y resultados del desarrollo de este método se muestran a continuación.

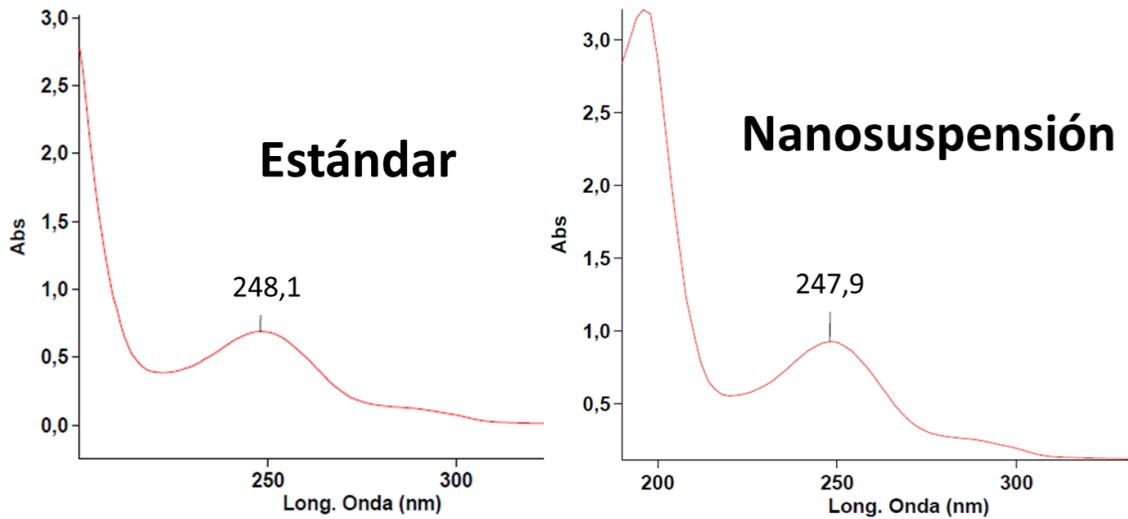
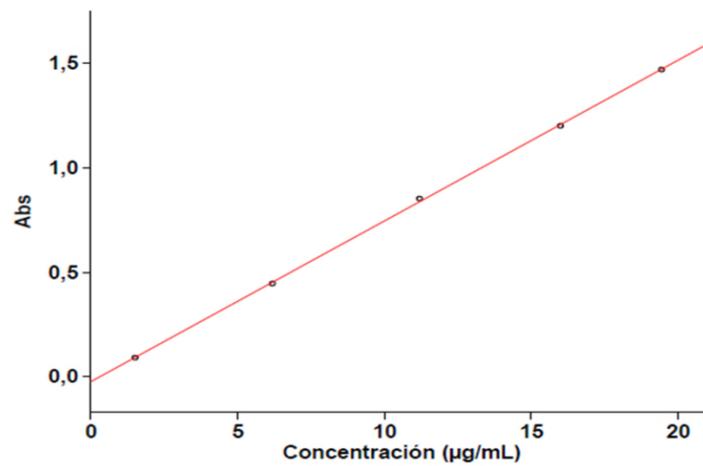


Figura 22: Espectros UV-VIS de muestra de Estándar 100% y Nanosuspensión.



Curva de Calibración					
Patrón	Concentración (µg/mL)	Media	SD	%RSD	Lecturas
Patrón1	1,5	0,0915	0,0002	0,26	0,0917 0,0913
Patrón2	6,18	0,4461	0,0007	0,16	0,4456 0,4466
Patrón3	11,19	0,8528	0,001	0,12	0,8535 0,8521
Patrón4	15,99	1,2012	0,0009	0,07	1,2018 1,2006
Patrón5	19,44	1,4705	0,0045	0,31	1,4673 1,4737
Ecuación Calib.		Abs = 0,07691*Conc - 0,02280			
Coef. Correlación		0,99976			

Figura 23: Curva de calibración y estándares

### 3.5.3. Potencial Z

El potencial Z de la nanosuspensión es dependiente de los componentes de la formulación y está determinado por la naturaleza química que conforma la superficie de las nanopartículas y de los componentes del medio que las rodea. Si se desea obtener una nanosuspensión electroestáticamente estabilizada, el potencial zeta mínimo debe ser de  $\pm 30$  mV<sup>47</sup>. Para el caso de nanosuspensiones estéricamente estabilizadas el potencial zeta puede variar por debajo de ese rango o ser cercano o igual a cero.

Las nanopartículas con un potencial zeta en un rango superior de + 30 mV o inferior a - 30 mV han demostrado ser estables en forma de suspensiones ya que poseen suficiente carga superficial que hace que las partículas se rechacen entre sí evitando que se agreguen. El potencial zeta también se puede utilizar como un indicador para determinar si un fármaco que posee carga electrostática definida está encapsulado, embebido dentro de una matriz, o si simplemente está adsorbido sobre la superficie, de la nanopartícula, en este caso, habría un cambio en el potencial Z de la matriz comparado con el potencial Z de la matriz cargada con el fármaco; estas variaciones de potencial zeta de un sistema de nanopartículas también pueden dar una idea de que un agente estabilizante definido está o no interactuando con la superficie de las nanopartículas, tal como se puede observar en la **Figura 24** donde se puede ver la diferencia de potencial zeta entre la matriz polimérica donde no hay presencia de estabilizante, comparado con el potencial zeta de la nanosuspensión donde hay presencia de fármaco y agente estabilizante; se puede ver que presentan una

diferencia relativamente significativa pero al compararlo con una mezcla de estabilizante en medio acuoso se puede ver que dichos valores de potencial zeta son muy similares, lo cual indica que el agente estabilizante estérico en este caso está interactuando con la superficie de las nanopartículas poliméricas de la nanosuspensión obtenida.

Para los ensayos realizados de la nanosuspensión se encontraron valores de potencial zeta negativos y cercanos a cero (-8,44 mV) los cuales no son una medida representativa de estabilidad de la nanosuspensión dado que se eligió un mecanismo de estabilización estérico, sin embargo, estos valores bajos de potencial zeta están acordes con la literatura que reporta que el Pluronic® F127 no aporta grandes diferencias de carga ya que es un estabilizante estérico y a pesar de variar las concentraciones del mismo, el potencial zeta de nanopartículas donde es usado por lo general no supera el rango de estabilización electrostática<sup>96,97,98</sup>. Los valores de potencial zeta de la matriz polimérica (sin estabilizante) corroboran la hidrofobicidad del polímero acrílico y sugieren la buena afinidad que se puede dar entre el fármaco y el polímero y entre el polímero y el agente estabilizante, pero según esto, también puede darse afinidad entre el fármaco y el estabilizante; sin embargo, los resultados experimentales muestran que es mucho más afín en fármaco con el polímero acrílico dado que el potencial zeta encontrado en las nanopartículas con fármaco (-8,44 mV), es muy similar al encontrado en las muestras del estabilizante solo (-7,53 mV), indicando que posiblemente el agente estabilizante posee una muy alta afinidad por la superficie de las nanopartículas poliméricas. Mientras que el potencial zeta para la matriz polimérica sin estabilizante

presentó un potencial zeta mucho menor (-2,50 mV) el cual es muy similar a lo reportado en la literatura para este tipo de nanopartículas de polietilcianoacrilato<sup>99,100</sup>.

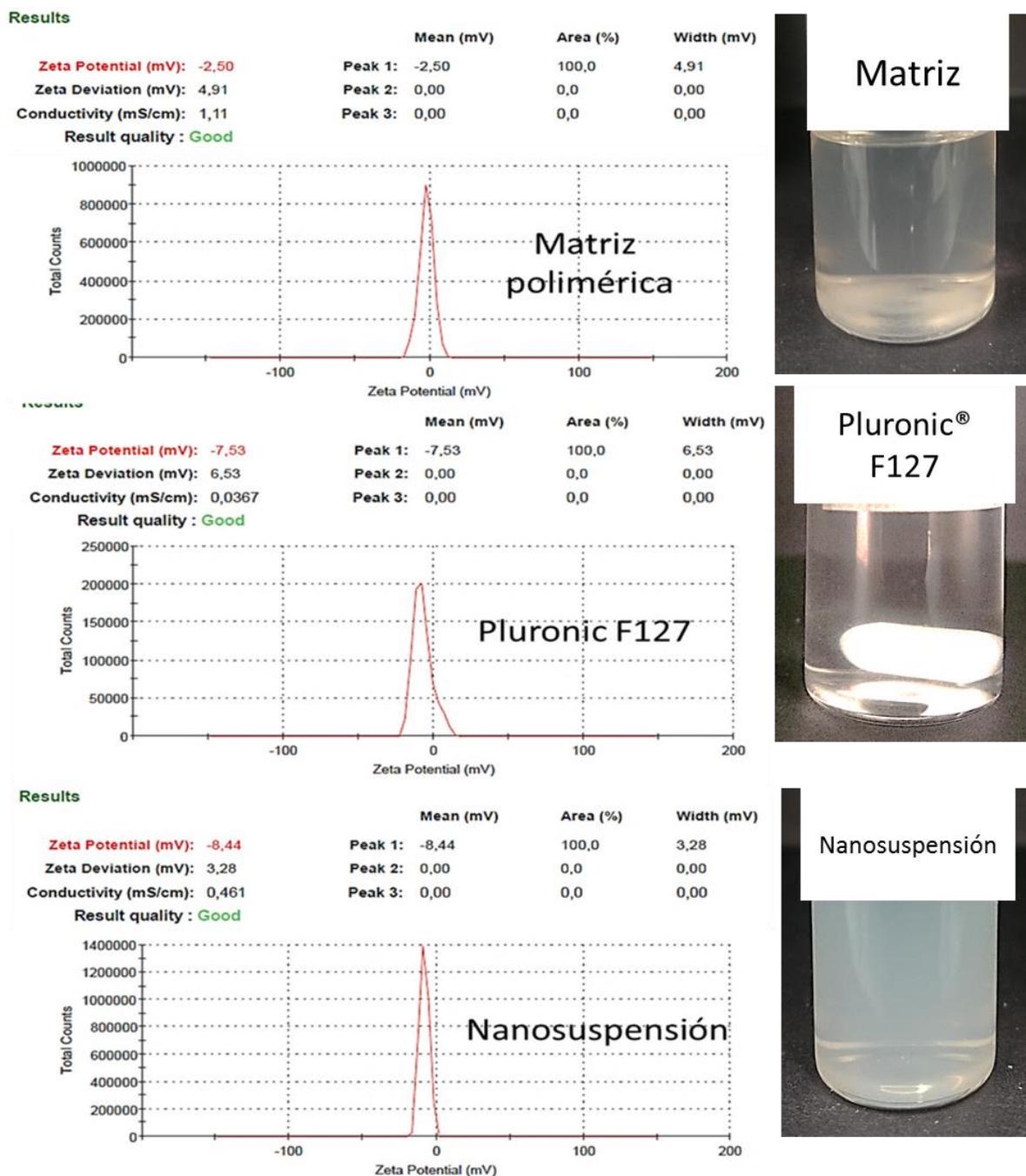


Figura 24: Potencial Z de Matriz sin estabilizante, Pluronic® F127 y nanosuspensión.

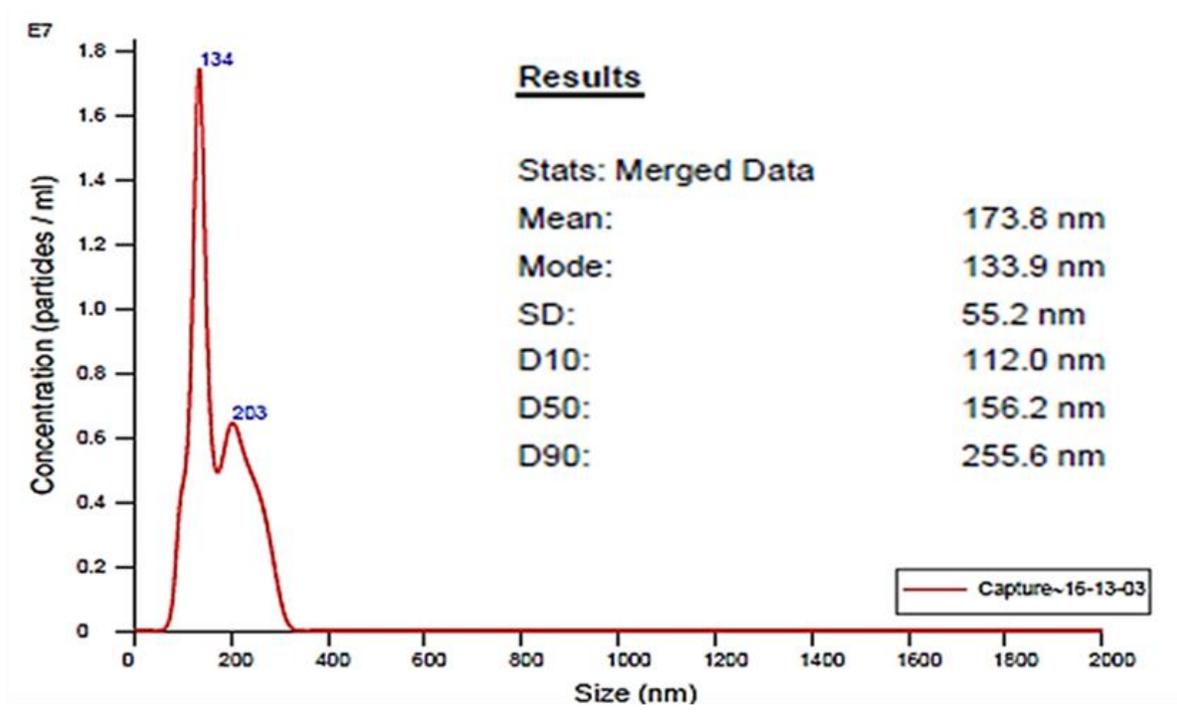
Adicionalmente se observó que la formación de sedimento en las muestras de matriz sin adición de agente estabilizante se da mucho más rápido (tiempo muy corto, aproximadamente 24 horas), mientras que las muestras que contenían agente estabilizante presentaron un tiempo de formación de sedimento mucho mayor según lo que se pudo observar en el seguimiento de los parámetros de estabilidad: (aproximadamente 4 meses).

#### **3.5.4. Distribución del tamaño de partícula por DLS**

Los ensayos de caracterización de tamaño por DLS permitieron determinar el tamaño de las nanopartículas obtenidas, estos ensayos de caracterización se realizaron a varias réplicas preparadas con los diferentes sistemas de agitación, ver **Tabla 14**. Se obtuvieron tamaños de partícula promedio de  $608,8 \pm 70,2$  nm para las muestras preparadas bajo agitación magnética a 1200 RPM,  $373,5 \pm 27,9$  nm para las muestras con agitación tipo aspas a 1200 RPM, y de  $166,1 \pm 22,8$  nm para las muestras con agitación tipo aspas a 9500 RPM indicando que el método que permite obtener menores de tamaño de partícula y menor polidispersidad es la agitación tipo aspas a 9500 RPM.

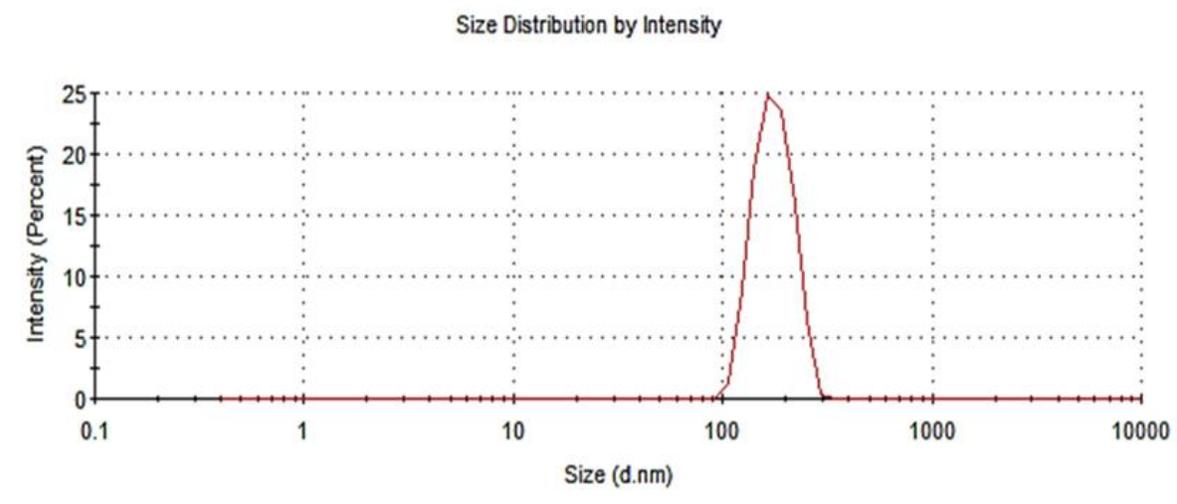
El tamaño promedio del tamaño de partícula obtenido después de optimizar la metodología de preparación (agitación tipo aspas a 9500 RPM) fue de  $166,1 \pm 22,8$  nm determinado por DLS y utilizando el equipo NanoSizer Nano ZS®, ver **Tabla 14**, lo cual es similar al resultado promedio de  $173,8 \pm 55,2$  nm determinado a una de las muestras utilizando también la técnica de DLS pero con un equipo de Tracking

(NanoSighth®) también de Malvern Instruments, el cual a diferencia del NanoSizer Nano ZS®, permitió determinar la existencia de una población bimodal con tamaños entre 134 nm y 203 nm siendo la moda de 133,9 nm, es decir que es el tamaño de las partículas que más se presentan en la muestra analizada, tal y como se muestra en la **Figura 25** donde se presenta adicionalmente la gráfica de tamaño promedio obtenida para la misma muestra pero utilizando el equipo NanoSizer Nano ZS® donde el tamaño promedio es de  $177,0 \pm 37,26$  nm (el cual es muy similar al de  $173,8 \pm 55,2$  nm obtenido con el NanoSighth®) lo que indica que no hay una diferencia marcada en los resultados del tamaño promedio de las muestras analizadas y que los datos son consistentes.



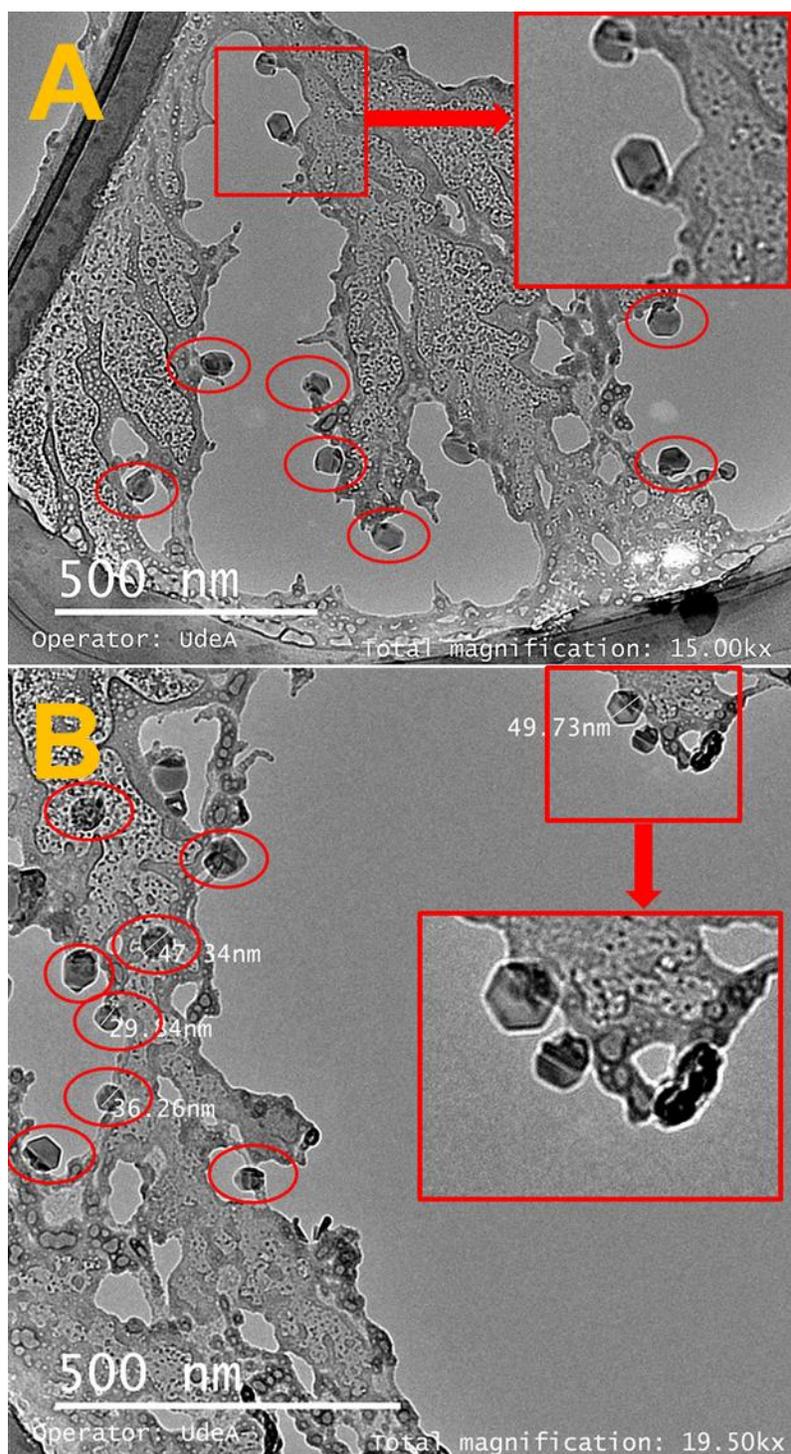
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 171,0	Peak 1: 177,0	100,0	37,26
Pdl: 0,005	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,952	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**



**Figura 25: Gráficos de determinación de tamaño con NanoSight® (arriba) y Nano ZS® (abajo).**

### 3.5.5. Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM)

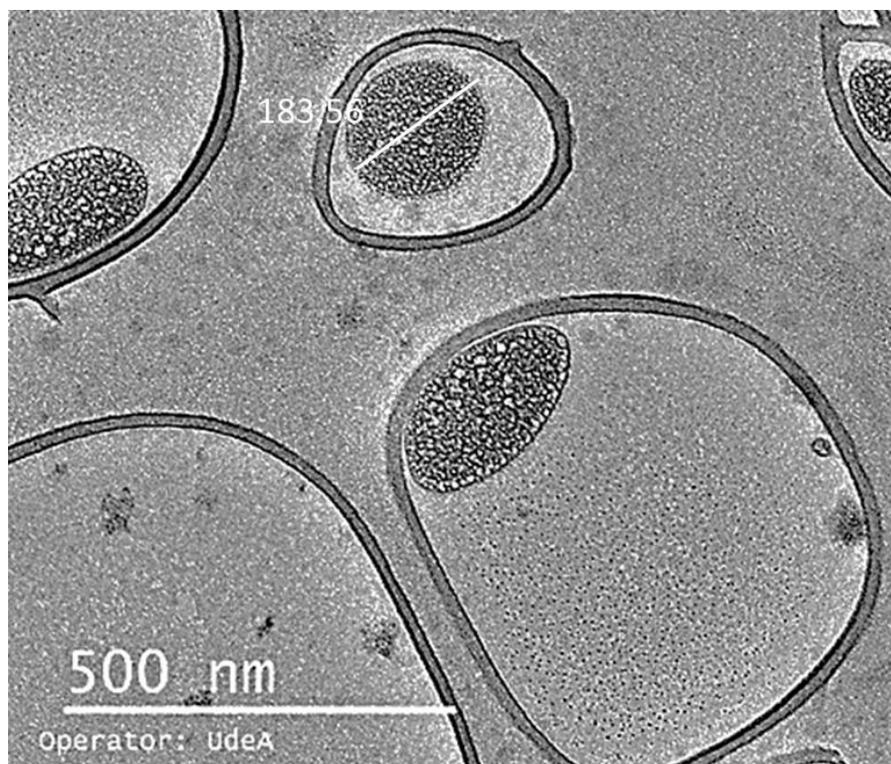


**Figura 26:** Micrografía TEM de cristales de Acetaminofén en el sistema solvente anti-solvente sin Etil-cianoacrilato y con estabilizante estérico Pluronic® F127.

En la **Figura 26 A** y **B** se pueden observar cristales de fármaco con tamaños inferiores a los 50 nm según se puede observar en la micrografía **B** de la **Figura 26**. La presencia de cristales en esta muestra corrobora lo que se observó en los ensayos exploratorios: que el agente estabilizante sólo y sin presencia de polímero no es capaz de estabilizar los cristales de fármaco formados durante la evaporación del solvente orgánico dando lugar a inestabilidad por la maduración de Ostwald y a formación en el tiempo de cristales de tamaño micro y macroscópico.

También se debe indicar que parte de estos cristales pueden ser originados a partir de la fracción de fármaco que es soluble en el medio acuoso y que se pueden formar al evaporarse el medio líquido durante la preparación de la muestra, por ejemplo, debido a que durante la preparación de la muestra para la caracterización por esta técnica (TEM) la suspensión debió ser diluida a un factor de dilución alto, es probable que el agente estabilizante a esa nueva concentración no alcance a estar en una concentración lo suficientemente alta para estabilizar los cristales que se forman durante el secado de la muestra sembrada en la rejilla para observación por TEM.

En la **Figura 27** se puede ver una muestra de la matriz polimérica de la nanosuspensión (que no posee fármaco), se observan agregados de oligómeros formando una matriz casi esférica y porosa en donde se alojará el fármaco debido a su afinidad por polaridad y se irá concentrando lentamente con la evaporación del solvente orgánico.

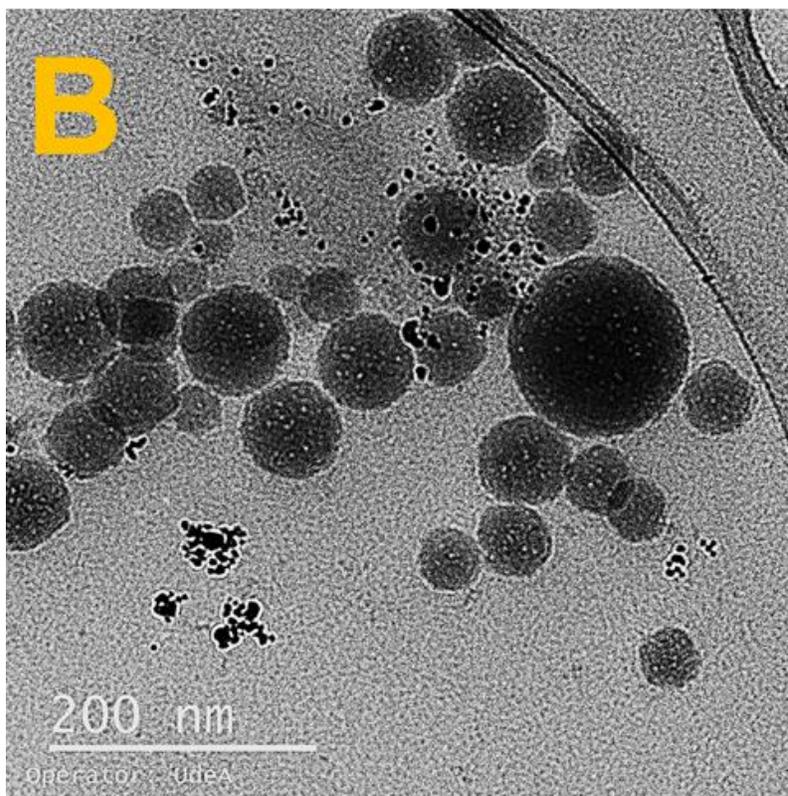
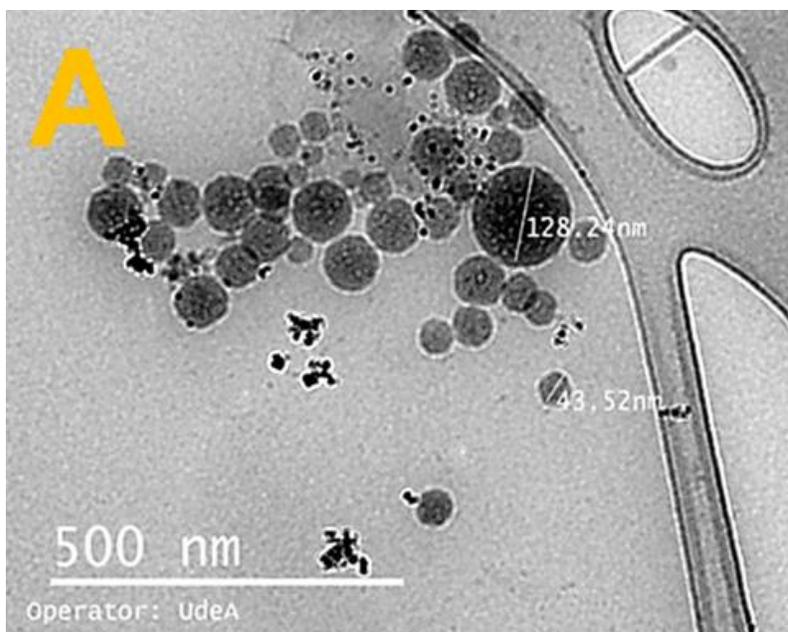


**Figura 27:** Micrografía TEM de partículas de PECA sin carga de fármaco y con agente estabilizante (Matriz).

Se debe considerar que el tamaño de las nanopartículas de la matriz (sin fármaco) preparadas por agitación tipo aspas y a 9500 RPM fue muy similar o en muchos casos mayor que el obtenido para las muestras de matriz más fármaco; lo cual se corroboró al comparar los resultados de los análisis por DLS con las imágenes de Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM). Por ejemplo, en la **Figura 27** se observa que el tamaño es de 183,56 nm, un tamaño mayor al promedio obtenido para las muestras de las réplicas preparadas bajo las mismas condiciones donde el tamaño promedio fue de  $166,1 \pm 22,8$  nm, esto posiblemente debido a que el fármaco al interactuar con los oligómeros del polímero impide que se adicione más cadenas y partículas de polímero en forma de oligómero y por ende se obtenga un menor tamaño de partícula en las muestras cargadas con fármaco. La muestra de la

**Figura 27** corresponde una muestra de matriz (sin fármaco), donde se observan nanopartículas que pueden ser consideradas como nanoesferas a pesar de ser realmente nanopartículas de oligómeros de tamaño muy pequeño, estos oligómeros al agregarse forman nanopartículas muy porosas que poseen pequeñas cavidades en su superficie y/o en su interior que podrían permitir la carga de fármaco en ellas.

En la **Figura 28 A y B** se muestran micrografías de una muestra de nanosuspensión (matriz cargada con fármaco y en presencia de agente estabilizante), se pueden observar nanopartículas con forma de nanoesferas las cuales parecen estar erosionadas en su superficie (la superficie presenta irregularidades) y en su interior se aprecia una mayor densidad en dichas nanoesferas en comparación con lo observado en la muestra de matriz (sin fármaco) donde se observaron cavidades vacías y esferas de menor densidad; esto corrobora que estas esferas están cargadas con el fármaco el cual se encuentra dentro de las nanopartículas pero muestra que el fármaco no está en forma de cristales, sino como una dispersión molecular, tal y como se había indicado anteriormente en los resultados por DSC; pues en esos resultados no se observaron picos endotérmicos que pudieran demostrar la presencia de cristales de fármaco en la nanosuspensión final. También se puede observar en la **Figura 28**, la presencia de cristales en los alrededores de las nanopartículas lo cual es un indicio de que el fármaco es liberado por un mecanismo de gradiente de concentración hacia el exterior de las nanoesferas de matriz y a falta de un mecanismo de estabilización adecuado presentan maduración y formación de pequeñísimos cristales en el exterior de las nanoesferas.



**Figura 28 A y B:** Micrografía TEM de una muestra de matriz cargada con fármaco. Durante la observación de estas muestras por microscopía TEM, al momento de exponer las NP al haz de electrones, dichas NP parecían disolverse y empezar a

liberar el fármaco embebido en su interior lo cual es un indicio más de la conformación oligomérica de la matriz indicando que dichas nanoesferas no son de una conformación rígida como se esperaría sino que son agregados de oligómeros que presentan cierta flexibilidad y que están unidos por enlaces débiles o por afinidad de polaridades estabilizados entre sí en presencia de moléculas de fármaco y estabilizados estos agregados a su vez por el agente estabilizante estérico que como se indicó, presenta menor afinidad por el fármaco que el polímero en sí mismo.

### **3.5.6. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación**

La capacidad de carga de fármaco de una matriz (porcentaje de fármaco en las nanopartículas) y la eficiencia de encapsulación (cantidad de fármaco que fue efectivamente encapsulado) están relacionadas en gran medida con la afinidad del fármaco por la matriz y por sus componentes; el cálculo de estos dos parámetros dará una idea sobre esta afinidad del fármaco por la matriz y de la eficiencia del proceso, lo cual es también importante al momento de la realización de las pruebas de funcionalidad del sistema nanoparticulado y su eficacia terapéutica. A continuación se presentan los cálculos y resultados obtenidos.

- **Cálculo de la Capacidad de carga:**

*Cantidad inicial adicionada de fármaco = 376,1 mg, equivalente a 75,22 mg/mL*

*Concentración final de fármaco = 74,14 mg/mL equivalente a 370,7 mg*

***Porcentaje de pérdida en el proceso: 1,44%, para un rendimiento del proceso del 98,56 %***

Luego de determinar la concentración final de la nanosuspensión, esta se filtra por una serie de filtros 0,45 micras y 10 kDa, se mezcla el material sólido retenido en ambos filtros y se seca hasta peso constante, posteriormente se toma un peso conocido de esta muestra y se valora el contenido de fármaco en el peso tomado.

Peso tomado de muestra seca (*peso tomado de las NP*) = **20,07 mg**

Concentración del fármaco en la muestra seca = **19,17 µg/mL**

Cantidad del fármaco en la muestra tomada =  $19,17 \times F.D.$  = **11.981 mg**

Entonces, el %CC según la ecuación será:

$$\% CC = \frac{\text{Peso del fármaco presente en la NP}}{\text{Peso de las NP}} \times 100$$

$$\% CC = \frac{11,98 \text{ mg}}{20,07 \text{ mg}} \times 100;$$

Luego, el porcentaje de capacidad de carga :

$$\% CC = \mathbf{59,69\%}$$

Es decir, que del peso total de una Nanoesfera, el 59,69 % corresponde al peso del fármaco.

- **Cálculo del porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE):**

Los datos obtenidos para el cálculo de la eficiencia de encapsulación en una de las muestras valoradas fueron los siguientes:

Cantidad inicial adicionada de fármaco = **375,6 mg**

Concentración final del fármaco = **73,91 mg/mL** equivalente a **369,55 mg en 5 mL**

Luego, para hacer el cálculo real teniendo en cuenta sólo el fármaco que queda encapsulado durante el proceso, se debe restar la cantidad de fármaco que se encuentra solubilizado en la fase continua de la nanosuspensión: (agua).

*Concentración del fármaco en la fase continua (Filtrado por 10 kDa) = **13,91 mg/mL***

*Luego, Cantidad de fármaco en el volumen de agua de la fase continua = **69,55 mg***

Entonces, el %EE según la ecuación será:

$$\% EE = \frac{\text{Cantidad de fármaco adicionado y presente en las NP (mg)}}{\text{Cantidad real del fármaco en la Nanosuspensión (mg)}} \times 100$$

$$\% EE = \frac{369,55 \text{ mg} - 69,55 \text{ mg}}{369,55 \text{ mg}} \times 100; \text{ entonces:}$$

$$\% EE = \frac{369,55 \text{ mg} - 69,55 \text{ mg}}{369,55 \text{ mg}} \times 100$$

Lo que da como resultado un **% EE = 81,18 %**

Es decir que del 100% de la cantidad adicionada de fármaco el 81,18% está embebido dentro de las nanoesferas y el 18,82% estará en forma libre solubilizado en la fase continua de la nanosuspensión.

Los valores obtenidos para estos dos parámetros: porcentaje de capacidad de carga **%CC= 59,69%** y porcentaje de eficiencia de encapsulación **%EE= 81,18%** permiten establecer que en términos de capacidad de carga el sistema presenta un valor aceptable, la eficiencia de encapsulación por otra parte arrojó un resultado muy alto y el cual sería de esperarse con este tipo de sistemas poliméricos. Sin embargo se

deben continuar los ensayos de optimización de la formulación a fin de mejorar parámetros con el aumento de la eficiencia del proceso y reducir las posibles pérdidas aunque se puede considerar en términos generales que los rendimientos son muy altos teniendo en cuenta la naturaleza de este proceso de evaporación de solvente y precipitación o concentración del fármaco.

También se debe tener en cuenta que aunque no todo el fármaco que se adiciona en el proceso queda encapsulado, por la forma de realizar el proceso, realmente el rendimiento es mayor al 98%, es decir que no se pierde fármaco durante el proceso. Adicionalmente, la cantidad de fármaco libre puede ser útil para dar rápidamente la dosis inicial de carga que se requiere para llegar a tener concentraciones en el rango terapéutico y que se requieren rápidamente cuando se busca administrar este tipo de principio activo.

### **3.5.7. Ensayos de estabilidad**

Al realizar seguimiento a dos muestras de nanosuspensiones preparadas en forma independiente y utilizando la metodología de preparación definida experimentalmente (agitación tipo aspas a 9500 RPM), se observó que el tamaño de partícula y la concentración de fármaco variaban ligeramente con el paso del tiempo, pero se mantuvieron dentro de los criterios de aceptación establecidos en la **Tabla 15** hasta el tercer mes después de haber sido preparadas. Al cuarto mes de análisis, tres parámetros se encontraron por fuera de los criterios de aceptación: se presentó simultáneamente un cambio en la coloración al compararla con la coloración inicial

de la muestra, una disminución en la concentración del fármaco, y un aumento en el tamaño de partícula acompañado de un aumento en el índice de polidispersidad, ver **Tabla 16**. Se recomienda realizar más ensayos a fin de determinar la naturaleza de esta inestabilidad y determinar los posibles mecanismos y/o productos de degradación que se pudieran presentar en el tiempo, sin embargo, se observa que el porcentaje de degradación de fármaco es muy bajo: 8,35 % y 9,33 % si se tiene en cuenta que el fármaco (acetaminofén) es inestable en solución y que es sensible a la oxidación y a la exposición a la luz, lo cual indica que el polímero (cianoacrilato) y el estabilizante son capaces de mantener las características fisicoquímicas del fármaco y de evitar su degradación por lo menos durante tres meses almacenado a condiciones de temperatura ambiente y sin protección de la luz y/o la oxidación. Muchas de las formulaciones comerciales de acetaminofén para uso parenteral deben ser protegidas de la luz, se les debe agregar un antioxidante y deben ser envasadas bajo atmósfera inerte, es decir, se debe adicionar nitrógeno durante el envasado y asegurar atmósferas con bajo contenido de oxígeno en el producto final, todas estas observaciones han surgido del trabajo de Corpaul Farmacéutica en el desarrollo de su formulación de acetaminofén infusión y acetaminofén inyectable (Traucet®).

Por otra parte se observa que a pesar de que el incremento de tamaño es notable pues se pasa de 117,6 nm y 118,3 nm al tiempo cero a 397,8 nm y 412,1 nm respectivamente al cuarto mes de seguimiento, lo que indica un incremento de tamaño del 338,26 % y 384,43 %, a pesar de esto, el tamaño sigue estando dentro de un rango aceptable para ser administrado por vía parenteral porque las partículas

siguen siendo mucho más pequeñas que los capilares sanguíneos más pequeños del cuerpo que tienen un tamaño de alrededor de 5000 – 7000 nm; sin embargo para efectos de este trabajo se definió que este incremento marcado de tamaño es un indicativo de inestabilidad del sistema.

**Tabla 15:** Especificaciones para evaluación de la estabilidad.

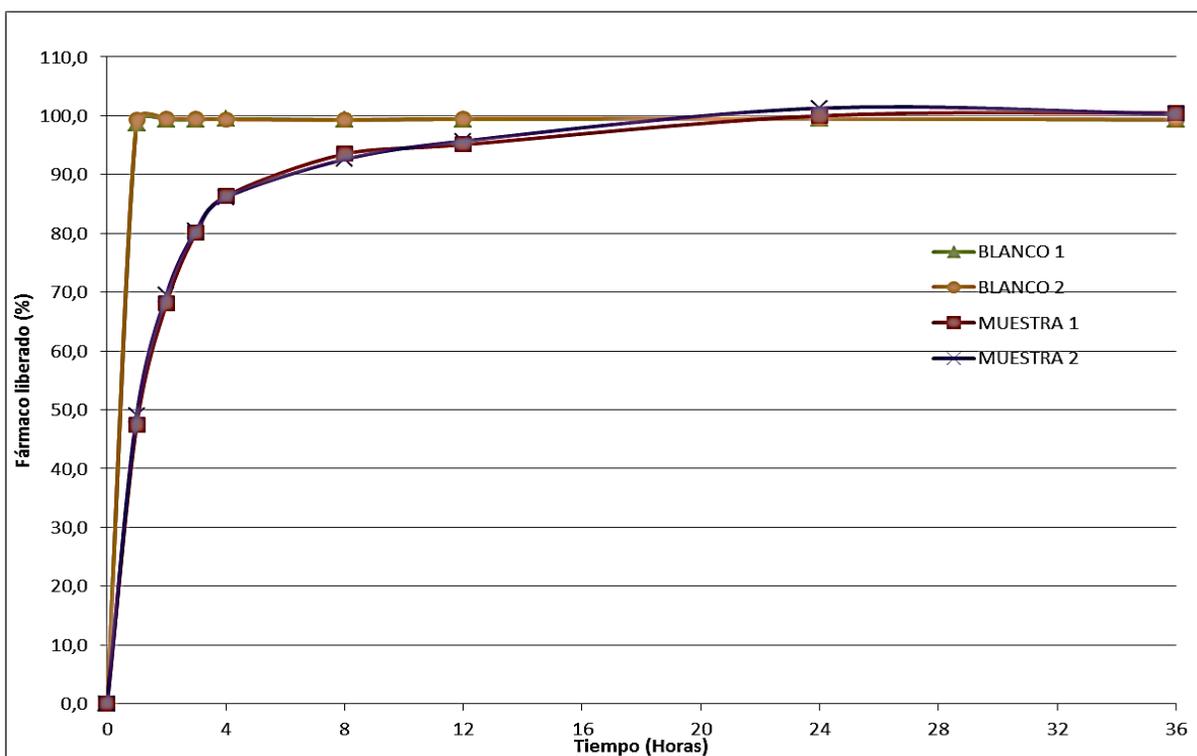
ATRIBUTO	Especificación
Tamaño de partícula promedio (nm)	El tamaño no debe superar los 300 nm
Potencial Z (mV)	Informativo
pH	Entre 5,5 - 6,5
Valoración de ACMP (mg) , (calculados para 5 mL de muestra)	No menos del 95% de la cantidad inicial calculada
Valoración de ACMP (%)	No menos del 95% de la cantidad inicial calculada
Aspecto	No se deben presentar cambios en la coloración inicial ni presencia de cristales, floculos o agregados que no sean fácilmente redispersables al agitar la muestra.

**Tabla 16:** Resultados de estabilidad.

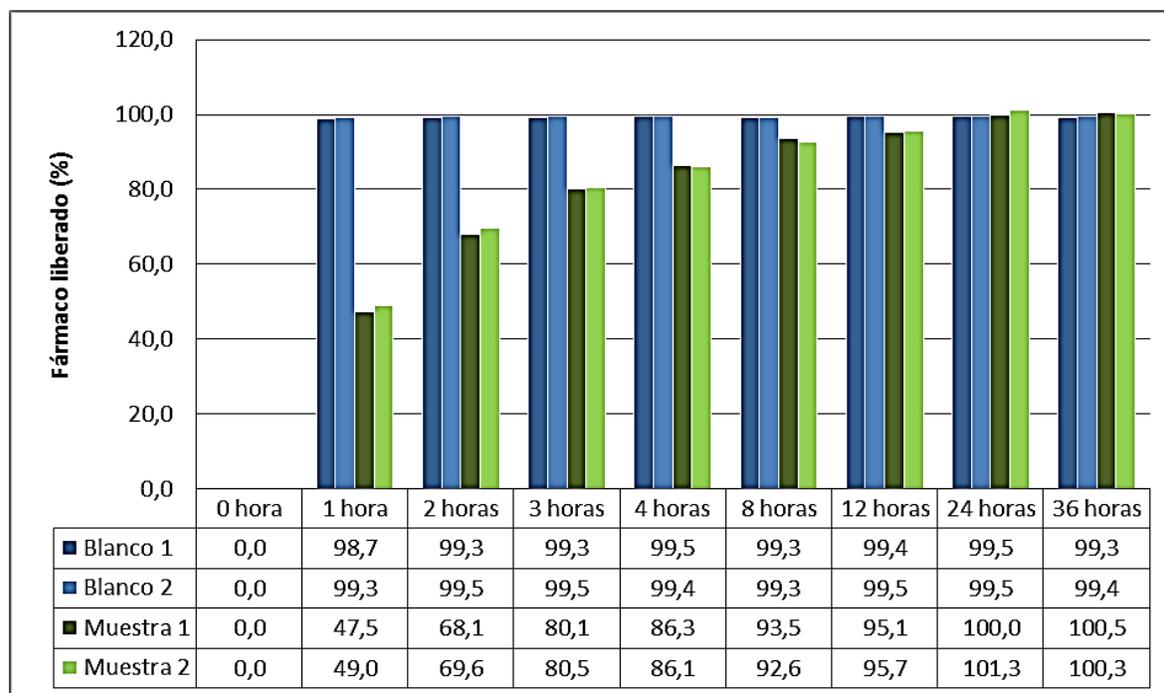
ATRIBUTO	T0 (0 meses)		T1 (1 mes)		T2 (2 meses)		T3 (3 meses)		T4 (4 meses)	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Tamaño de partícula promedio (nm)	117,6	118,3	120,4	121,5	134,4	130,6	146,4	153,9	397,8	412,1
Pdi	0,027	0,015	0,031	0,029	0,067	0,089	0,097	0,082	0,305	0,366
Potencial Z (mV)	-11,4	-12,3	-10,01	-11,53	-10,99	-11,72	-9,89	-9,93	-9,29	-9,53
pH	5,8	5,6	5,6	5,8	5,9	5,8	5,6	5,8	6,1	6,1
Valoración de ACMP (mg/mL)	72,5	72,35	71,30	71,65	70,80	71,05	70,30	70,55	66,45	65,60
Valoración de ACMP (mg en 5 mL)	362,5	361,75	356,50	358,25	354,00	355,25	351,50	352,75	332,25	328,00
Porcentaje de ACMP	100%	100%	98,34%	99,16%	97,65%	98,20%	96,96%	97,51%	91,65%	90,67%
Aspecto (Muestra de aspecto blanco lechoso con material en suspensión sin aparente presencia de sedimento).	Conforme		Conforme		Conforme		Conforme		Muestras con coloración amarilla y presencia de sedimento	

### 3.5.8. Liberación de fármaco

Por duplicado se le realizaron ensayos de liberación *in vitro* a una muestra de la nanosuspensión y a un blanco que contenía una concentración cercana al 100% de fármaco (fármaco sin matriz); para tal fin las pruebas se realizaron bajo condiciones de pH, osmolaridad, y temperatura similares a las fisiológicas (Buffer fosfato pH 7,4 a 37 °C durante 36 horas). Esta prueba arrojó los siguientes resultados:



**Figura 29:** Gráfico de liberación de fármaco: muestra y blanco en PBS 7,4.



**Figura 30:** Porcentaje de liberación de fármaco en el tiempo (36 horas).

Al realizar las pruebas de liberación del fármaco desde la nanosuspensión de nanopartículas en un medio PBS pH 7,4 y comparar los resultados con los obtenidos para un blanco de principio activo sin matriz en el mismo medio **Figura 29** y **Figura 30**, se observa que el tiempo de liberación del fármaco se modifica al ser administrado en nanopartículas poliméricas, para la muestra blanco el tiempo de liberación es de aproximadamente una hora, mientras que en la nanosuspensión polimérica es de aproximadamente 24 horas, tiempo en el cual se alcanza una concentración del 100% de fármaco liberado en el medio PBS pH 7,4. Estos resultados permiten establecer que el fármaco efectivamente se encuentra incorporado dentro de las nanoesferas y que éstas modifican la entrega del fármaco por medio de un mecanismo de liberación pasiva que permite prolongar y/o retardar su liberación y posterior paso desde el interior de la membrana de diálisis al medio

PBS pH 7,4. Las pruebas de liberación de fármaco permiten corroborar que la matriz de cianoacrilato (con agente estabilizante) se puede usar para realizar un perfil de liberación modificada del fármaco y que dicha modificación puede ser usada convenientemente en la terapéutica convencional del fármaco. Incluso sería muy benéfica por vía parenteral puesto que permitiría reducir las frecuencias de administración pero manteniendo niveles plasmáticos de fármaco en el rango terapéutico además de las ya mencionadas ventajas y mejoras en los parámetros de estabilidad. Adicionalmente, al estar la nanosuspensión con alta concentración de fármaco y poco volumen, se tiene la ventaja adicional de no tener que usar infusiones continuas durante largos períodos de tiempo que obligan a ser administradas únicamente en hospitales, sino que pueden ser administradas fácilmente por vía parenteral como intramuscular, subcutánea o incluso intravenosa (entre otras) pero sin los inconvenientes y efectos adversos que causan el exceso de surfactantes y/o de cosolventes que poseen otras formulaciones líquidas. También puede ser administrado por vía oral con mayor facilidad que deglutir una tableta o por sondas enterales nasogástricas o nasoyeyunales sin los inconvenientes que causa hacer una suspensión grosera de una tableta, práctica bastante habitual en nuestro sistema de salud, pero que causa en muchos casos taponamientos de las sondas y pérdida de principio activo y especialmente mayor estrés en los pacientes y el personal de enfermería.

#### 4. CONCLUSIONES

Después de haber realizado este trabajo de investigación y de analizar los resultados obtenidos se puede concluir que:

Se desarrolló un método reproducible por medio del cual es posible obtener una nanosuspensión polimérica con liberación modificada empleando Acetaminofén como fármaco de interés, Polietil-cianoacrilato como matriz polimérica y copolímero de bloque Pluronic® F127 como agente estabilizante.

Para realizar satisfactoriamente la nanosuspensión, el pH y el tiempo de polimerización son parámetros claves y determinantes que influyen directamente en el tamaño final de las NP de la nanosuspensión y en su estabilidad.

El tipo y velocidad de agitación también son determinantes en el tamaño de partícula final, a mayor velocidad de agitación se pueden obtener menores tamaños de partícula; adicionalmente existen diferencias significativas en cuanto al tipo de sistema de agitación empleado para la preparación de la nanosuspensión, se logran menores tamaños de partícula con la agitación tipo aspas que con la agitación magnética.

El tipo de sistema de agitación tipo aspas es uno de los más usados a nivel industrial y por lo tanto uno de los más fácilmente escalables y que permite obtener productos viables para su manufactura a nivel industrial y posterior comercialización; esto es

importante si se pretende tener en el mercado productos con principios activos ya conocidos pero con perfiles farmacoterapéuticos mejorados como es el caso de muchos de los productos farmacéuticos basados en nanotecnología.

Con la metodología empleada, es posible obtener nanosuspensiones con características adecuadas para su manufactura a nivel industrial ya que las muestras preparadas pueden ser filtradas por membranas de filtración de 0,22 micras, las cuales son ampliamente utilizadas en la industria porque permiten la obtención de soluciones estériles para uso parenteral cuando no pueden ser esterilizadas por mecanismos convencionales como esterilización final por vapor húmedo.

Con la metodología desarrollada se obtiene una nanosuspensión acuosa que permite una alta dosis de acetaminofén en un pequeño volumen y que es estable por más de tres meses sin que quede la formulación final con antioxidantes, cosolventes, exceso de surfactantes o que sea necesaria la adición de una atmósfera modificada que encarecen los costos o generan efectos adversos. En la formulación propuesta el tiempo de degradación del principio activo es amplio si se tiene en cuenta que el porcentaje de degradación de una solución de acetaminofén es muy corto debido a que es una molécula sensible a la degradación por oxidación causada por el oxígeno del ambiente y por efecto de la luz.

Se pudo comprobar que es posible obtener una nanosuspensión polimérica combinando las técnicas de nanoprecipitación y de polimerización, y también se comprobó que el resultado final estará determinado por el conocimiento que se tenga

sobre los diferentes componentes del sistema, su comportamiento en el sistema de solventes, sus posibles interacciones y la estandarización y estudio de los factores que pueden afectar el resultado de la metodología empleada para la preparación. La variación de estos parámetros puede dar lugar a la obtención de resultados favorables o indeseables según sea el parámetro modificado durante la preparación, por lo tanto, la estandarización del método de preparación es altamente importante a la hora de escalar los procesos desde el nivel de laboratorio a nivel industrial pues si bien la estandarización a nivel de laboratorio es importante, a la hora de escalar dichas metodologías es necesario realizar nuevos ensayos de estandarización de la metodología de preparación y asegurar un método robusto capaz de generar resultados reproducibles y confiables, lo cual es vital en la industria farmacéutica para asegurar la calidad del producto y garantizar la calidad del mismo.

El uso de polietil-cianoacrilato puede dar lugar a la obtención de nanosuspensiones poliméricas con perfiles de liberación modificados, lo cual es de suma importancia y de gran valor farmacoterapéutico y comercial pues puede mejorarse enormemente la terapéutica convencional y presentar mejor eficacia y adherencia a los tratamientos debido a la modificación en dichos perfiles y también puede ser usado como una matriz o nanotransportador para la administración de otros fármacos dependiendo de su naturaleza.

Se logró obtener una nanosuspensión polimérica en la cual el fármaco se encuentra en forma de dispersión molecular dentro de la matriz, que puede presentar a nivel fisiológico un comportamiento diferente al que podría presentar una nanosuspensión

polimérica tradicional en la cual el fármaco se encuentre encapsulado dentro de la matriz en forma de cristales o embebido en una fase oleosa. Por lo tanto se deben realizar más ensayos *in vitro* y otros ensayos que permitan caracterizar mejor el comportamiento de esta nanosuspensión y que permitan comprobar las posibles bondades de su uso terapéutico.

Se deben realizar ensayos adicionales sobre el mecanismo de estabilización y el agente estabilizante porque aunque el mecanismo de estabilización propuesto cumple con el objetivo principal, las variaciones en cuanto al estabilizante pueden afectar la estabilidad final de la formulación. En nuevos ensayos se podría evaluar la posibilidad de un mecanismo de estabilización electroestérico que prolongue aún más el tiempo de estabilidad del producto final, la adición de una pequeña proporción de un cosurfactante o estudiar la viabilidad de la liofilización y rehidratación del producto final lo cual aumentaría enormemente el tiempo de vida útil del producto.

Se deben continuar los ensayos de optimización de la formulación y la metodología de preparación y realizar ensayos de escalado a nivel industrial ya que esta metodología promete ser fácilmente escalable debido a que no genera pérdida de principio activo, es simple, sencilla y fácilmente llevada a nivel industrial para la preparación comercial de productos parenterales en forma de nanosuspensiones.

Para COPAUL-Farmacéutica es importante realizar este tipo de estudios ya que le permiten obtener el *know-how* y la experiencia necesaria para la fabricación de nanomedicinas que puedan ser producidas a nivel industrial y que le permitan a la

empresa convertirse en pionera en el uso de tecnologías basadas en nanotecnología para finalmente continuar cumpliendo con la misión social de aportar a la mejora en la salud de los pacientes y en el apoyo a la misión de San Vicente Fundación que es un oferente en la atención en salud a los pacientes de escasos recursos de la región y el país.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lamprecht A. *Nanotherapeutics: Drug Delivery Concepts in Nanoscience*. First edit. (Lamprecht A, ed.). Singapore: Pan Stanford Publishing Pte.; 2007.
2. Montoyako J, Obregón N, César OJO, William S. Definición de Nanomateriales para Colombia. *Colomb Quim*. 2016;45:15-20.
3. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):MR17-R71.
4. Chou LYT, Ming K, Chan WCW. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2011;40(1):233-245.
5. Katteboinaa S, Dist G, Pradesh A. Drug nanocrystals : a novel formulation approach for poorly. 2009;1(3):682-694.
6. Liu P. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs. *ACADEMIC DISSERTATION*, University of Helsinki Finland, Faculty of Pharmacy, 2013.
7. Shah DA, Murdande SB, Dave RH. A Review: Pharmaceutical and Pharmacokinetic Aspect of Nanocrystalline Suspensions. *J Pharm Sci*. 2016;105(1):10-24.
8. Nekkanti V, Vabalaboina V, Pillai R. Drug Nanoparticles – An Overview. In: *The Delivery of Nanoparticles*. India; 2008:111-132. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).
9. Kesisoglou F, Mitra A. Crystalline Nanosuspensions as Potential Toxicology and Clinical Oral Formulations for BCS II/IV Compounds. *AAPS J*. 2012;14(4):677-687.
10. Junghanns J-U a H, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(3):295-309.
11. Buckton G, Beezer AE. The relationship between particle size and solubility. *Int J Pharm*. 1992;82(3):R7-R10.
12. Mosharraf M, Nyström C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. *Int J Pharm*. 1995;122(1-2):35-47.
13. Bisrat M, Nyström C. Physicochemical aspects of drug release. VIII. The relation between particle size and surface specific dissolution rate in agitated suspensions. *Int J Pharm*. 1988;47(1):223-231.
14. Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(1):1-9.
15. Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10(1):13-23.

16. Ponchel G, Durrer C. Mucoadhesión of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. *Eur J Pharm Biopharm.* 1997;44:25-31.
17. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X. Drug nanocrystals: In vivo performances. *J Control Release.* 2012;160(3):418-430.
18. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech.* 2015;5(2):123-127.
19. S.Doyle G. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *R Soc Chem.* 2016;4(8):1166-1169.
20. Ajay JY, Gajula P, N VHB; Sustained release nanosuspension of acetaminophen- formulation and in-vitro evaluation. *Int J Res Pharm Sci.* 2012;3:67-71.
21. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illm L, Davis S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release.* 1999;57(2):171-185.
22. Hashem M S and HT. Preparation and Characterization of Poly- (methyl ethyl cyanoacrylate) Particles Containing 5-Aminosalicylic acid. *Iran J Pharm Res.* 2005;1(April 2004):21-27.
23. Simone R. Saturation Solubility Determination of a Drug in Thin Polymer Films and its Influence on Permeation. 2011.
24. Bindal MC. Nanosuspensions: Advantages and disadvantages. *Indian J Nov Drug Deliv.* 2012;4(3):179-188.
25. Che E, Zheng X, Sun C, Chang D, Jiang T, Wang S. Drug nanocrystals : a state of the art formulation strategy for preparing the poorly water-soluble drugs. 2012;7(2):85-95.
26. Schubert S, Delaney, Jr T, Schubert U. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter.* 2011;7(5):1581.
27. Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera S a, Plaza RC, Delgado a V. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J Control Release.* 2001;77:309-321.
28. Date A, Patravale V. Current strategies for engineering drug nanoparticles. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2004;9(3-4):222-235.
29. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.* 2006;2(1):8-21.
30. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. 2010;75:1-18.
31. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for

- site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology*. 2011;9(1):55.
32. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari a. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):113-142.
  33. Mora-huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. 2009;385(2010):113-142.
  34. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules of cutaneous aplicattion\_Drug Target Insights \_2007. 2007:147-157.
  35. Fessi, Curt; Devissaguet, Jean-Philippe; Puisieux, Francis; Thies C. Precipitation of film-forming material and biologically active substance from solvent-non-solvent mixture. 1992.
  36. Radtchenko IL, Sukhorukov GB, Möhwald H. A novel method for encapsulation of poorly water-soluble drugs: Precipitation in polyelectrolyte multilayer shells. *Int J Pharm*. 2002;242(1-2):219-223.
  37. Khoee S, Yaghoobian M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur J Med Chem*. 2009;44(6):2392-2399.
  38. Valente I, del Valle J, Casas T, et al. Nanospheres and nanocapsules of amphiphilic copolymers constituted by methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate and hexadecyl cyanoacrylate units. *Express Polym Lett*. 2013;7(1):2-20.
  39. Singh A, Garg G, Sharma PK. Review Article Nanospheres : a novel approach for targeted drug delivery system. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010;5(3):84-88.
  40. Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Colloidal formulations of etoposide based on poly ( butyl cyanoacrylate ) nanoparticles : Preparation , physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;101:215-222.
  41. Nicolas J, Couvreur P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1(1):111-127.
  42. Yordanov G. Poly ( alkyl cyanoacrylate ) nanoparticles as drug carriers : 33 years later. 2012;1(2):61-73.
  43. G. Yordanov C. Recent Advances in the Preparation of Drug-Loaded Poly(Alkyl Cyanoacrylate) Colloidal Particles for Cancer Treatment: Nanoprecipitation Vs. Polymerization. *Nanosci Nanotechnol*. 2011;11(i):186-190.
  44. Nicolas J, Couvreur P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1(1):111-127.
  45. Huang C, Lee Y. Core-shell type of nanoparticles composed of copolymers for

- drug delivery application : Synthesis , characterization and in vitro degradation. 2006;325:132-139.
46. Harivardhan R. Estudio de la influencia de los factores de polimerización en la formación de nanopartículas de polibutil-cianoacrilato y la cinética de liberación de fármaco in vitro. *Ars Pharm.* 2004;45(3):211-234.
  47. Patravale V, Date A, Kulkarni R. Nanosuspensions : a promising drug delivery strategy. 2004;(1992):827-840.
  48. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):456-469.
  49. Mitchnick M. Particles Science. *Drug Dev Serv Tech Br.* 2009;1:2.
  50. Maria A, Cerdeira M, Lisboa. Production and Stabilization of Nanosuspensions of Poorly Soluble Drug Substances. 2012;(20759).
  51. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari a. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;385(1-2):113-142.
  52. Khoee S, Yaghoobian M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur J Med Chem.* 2009;44(6):2392-2399.
  53. Yordanov. Recent advances in the preparation of drug-loaded poly(alkyl cyanoacrylate) colloidal particles for cancer treatment: nanoprecipitation vs. Polymerization. *Nanosci Nanotechnol.* 2011;11:186-190.
  54. Zhulina EB, Borisov O V., Priamitsyn VA. Theory of steric stabilization of colloid dispersions by grafted polymers. *J Colloid Interface Sci.* 1990;137(2):495-511.
  55. Shi JC. Steric Stabilization. OHIO; 2002.
  56. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001;70:1-20.
  57. Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Colloidal formulations of etoposide based on poly ( butyl cyanoacrylate ) nanoparticles : Preparation , physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013;101:215-222.
  58. Acid LP, Biggs S, Healy TW. Electrosteric Stabilisation of Colloidal Zirconia with Low-molecular-weight Polyacrylic Acid. *J Chem. Soc. Faraday Trans.* 1994;90(22):3415-3421.
  59. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001;70:1-20
  60. Walker JM. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. (Mc Neil SE, Wiker JM, eds.). Hertfordshire, UK: Humana Press; 2011.
  61. Mittal V. Advanced polymer: Synthesis Ans Surface Modifications. Boca Ratón:

CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an informa business; 2011.

62. Masuo H, Yokoyama, Toyokazu ; Nogi, Kiyoshi; Naito M, eds. Nanoparticle technology handbook. In: First edit. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2007:453-457.
63. Souza SD. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Adv Pharm.* 2014;2014(304757):1-12.
64. Liliana GAÁMVPE. GUIAS SOBRE EL MANEJO FARMACOLÓGICO DEL DOLOR. Primera Ed. (Editorial Universidad del Rosario, ed.). Bogotá-Colombia; 2007.
65. Jozwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2014;71(1):11-23.
66. Koch-Weser J. Medical Intelligence. *New Engl J Med* Copyr © 2009 Massachusetts Med Soc. 1976;295(23):1297-1300.
67. MINSALUD. Listado Vigente de Registros de Acetaminofén En Colombia-INVIMA. Bogotá-Colombia; 2015.
68. Gómez RA. *Industria Farmacéutica En Colombia.* Bogotá-Colombia; 2012.
69. Granberg RA, Rasmuson C. Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *Solubility of Paracetamol in Pure Solvents.* 1999;44(November):1391-1395.
70. Roberts, L. J., and Morrow JD. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: J. G. Hardman and L. E. Limbird E, ed. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York: McGraw-Hill; 2001:687-731.
71. Prescott LF. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol.* 1980;10:291S-298S.
72. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: New vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 2006;12(3-4):250-275.
73. Rawlins M, Henderson D, Hijab a R. Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 1977;11(4):283-286.
74. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology.* 2013;21(3):201-232.
75. Administration USF and D. U.S. Food and Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products.
76. Leonard F, Kulkarni RK, Brandes G, Nelson J, Cameron JJ. Synthesis and degradation of poly (alkyl  $\alpha$ -cyanoacrylates). *J Appl Polym Sci.* 1966;10(2):259-272.

77. Dossi M, Storti G, Moscatelli D. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylates) as biodegradable polymers for drug delivery applications. *Macromol Symp.* 2010;289(1):124-128.
78. Han M, Kim S, Liu SX. Synthesis and degradation behavior of poly(ethyl cyanoacrylate). *Polym Degrad Stab.* 2008;93(7):1243-1251.
79. Alexandridis P, Alan H. Poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide)poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 1995;96(1-2):1-46.
80. Seymour M. European Patent Specification: Coal-aqueous mixtures having a particular coal particle size distribution. 1986;99:19.
81. James-Smith MA, Shekhawat D, Cheung S, Moudgil BM, Shah DO. Role of ethylene oxide and propylene oxide groups of pluronics in binding of fatty acid to pluronics in microemulsions. *J Surfactants Deterg.* 2008;11(3):237-242.
82. Instruments M. Dynamic Light Scattering Common Terms Defined. *Malvern Guid.* 2011:1-6.
83. Couvreur P. *Nanocapsule Technology: A Review.* Begell House; 2002.
84. Mohanraj V, Chen Y, Chen M&. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res Trop J Pharm Res.* 2006;5(June):561-573.
85. Soluci L, Amortiguada S, Pbs E, Clorh A, Biol S. Preparación de Phosphate Buffered Saline ( PBS ) Procedimiento: Tabla de preparación: Notas: Referencias : *Fac Med UASLP.* 2008:9-10.
86. *Fac Med UASLP; Soluci L, Amortiguada S, Pbs E, Clorh A, Biol S. Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS):2008:9-10.* [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_Buffer\\_PBS.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf).
87. Bennet D, Kim S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. In: *Application of Nanotechnology in Drug Delivery.* ; 2014:257-310.
88. Montanaro L, Arciola CR, Cenni E, et al. Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use. *Biomaterials.* 2001;22(1):59-66.
89. *STATGRAPHICS.* 2006:1-16.
90. Maghsoodi M. Role of solvents in improvement of dissolution rate of drugs: Crystal habit and crystal agglomeration. *Adv Pharm Bull.* 2015;5(1):13-18.
91. Donnelly E, Pepper D. Solubilities, Viscosities and Unperturbed Dimensions of Poly(ethy cyanoacry1ate)s and Poly(buty cyanoacry1ate)s. *Makromol Chem, Rapid Commun.* 1981;442:439-442.
92. Robello D, Eldridge T, Swanson M. Degradation and stabilization of polycyanoacrylates. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 1999;37(24):4570-4581.
93. Ha E, Kim J, Baek I, et al. Development of megestrol acetate solid dispersion

nanoparticles for enhanced oral delivery by using a supercritical antisolvent process. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4269-4277.

94. Mulik R, Mahadik K, Paradkar A. Development of curcuminoids loaded poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles: Physicochemical characterization and stability study. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37(3-4):395-404.
95. Mogal A, Gurjar P, Yamgar DS, Kamod A. Solid dispersion technique for improving solubility of some poorly soluble drugs. *Der Pharm Lett.* 2012;4(5):1574-1586.
96. Sezgin Z, Yüksel N, Baykara T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;64(3):261-268.
97. Abdelbary A, Li X, El-Nabarawi M, Ellassasy A, Jasti B. Effect of fixed aqueous layer thickness of polymeric stabilizers on zeta potential and stability of aripiprazole nanosuspensions. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(3):730-735.
98. Butt A, Amin M, Katas H, Sarisuta N, Witoonsaridsilp W, Benjakul R. In vitro characterization of pluronic F127 and D-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles as nanocarriers for targeted anticancer-drug delivery. *J Nanomater.* 2012;2012.
99. Yordanov G, Bedzhova Z. Poly(ethyl cyanoacrylate) Colloidal Particles Tagged with Rhodamine 6G: Preparation and Physicochemical Characterization. *Open Chem.* 2011;9(6):1062-1070. doi:10.2478/s11532-011-0090-y.
100. Miiller RH, Blunk T. Alkylcyanoacrylate drug carriers: I . Physicochemical characterization of nanoparticles with different alkyl chain length. 1992;84:1-11.