

8756

BIBLIOTECA DE INFORMACION
SERVICIO DE LIBROS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

ELABORACIÓN DE ACUOSOMAS PARA
INDOMETACINA MEDIANTE NÚCLEOS INORGÁNICOS
DE FOSFATO DE CALCIO RECUBIERTOS CON
LACTOSA

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
P R E S E N T A

IBQ. RODRIGO DE ATOCHA SALAZAR LÓPEZ
MATRÍCULA: 202280412

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: DRA. IRMA ROJAS OVIEDO
ASESOR: DR. JOSÉ REYES GASGA
ASESOR: DR. CARLOS T. QUIRINO BARREDA



MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2004

Agradecimientos

A mi Dios, el Señor Soberano Jehová, por permitirme la vida.

A mi familia: Profr. Manuel Salazar Cruz (Padre), Sra. Mercedes López de Salazar (Madre); Lic. Manuel Salazar López, Lic. Enrique Salazar López, Lic. Ignacio Salazar López, Srta. Eréndira Salazar López (Hermanos); Lic. Anabelia Brito de Salazar, Profra. Blanca Liévano de Salazar (Cuñadas), y a mi pequeño sobrino Iker Salazar Liévano, por su amor y por ser la inspiración y el apoyo para seguir adelante.

A mis amigos y compañeros: Chucho, Carlos, Gaby, Erika, Luis Armando, Luigi, Mary, Zaida, Anita, Daniel, Paty, David, Adriana, Martín, Greco, y a todos los que de una u otra forma contribuyeron con su ánimo en todo momento de esta empresa.

A todos los profesores de la maestría, en especial al Dr. Carlos T. Quirino Barreda y Dra. Irma Rojas Oviedo, por su dedicación e interés en la realización de esta investigación, y a la Dra. Laura Castrillón Rivera, por su valioso apoyo.

A los investigadores de la UNAM: Dr. José Reyes Gasga, Tec. Pedro Mexia, M. en C. Jaqueline Cañetas, M. en C. Samuel Tehuacanero, M. en C. Manuel Aguilar, **del Instituto de Física**, y al I.Q. Carlos Flores, **del Instituto de Investigaciones en Materiales**, ya que gracias a su valiosa contribución y labor, fue posible la realización del presente trabajo de investigación.

A los sinodales: Dra. Raquel López Arellano y Dr. Ramiro García García, por sus oportunas observaciones y asistencia en la terminación de este proyecto.

Firmas de conformidad del Comité Tutorial

Dra. Irma Roas Oviedo
Tutor



Dr. José Reyes Gasga
Asesor



Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
Asesor

ÍNDICE

	Pág.
I. Introducción	1
II. Marco de Referencia	
2.1. Nanotecnología	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Nanopartículas	3
2.1.2.1. Métodos de Elaboración de nanomateriales	4
2.1.3. Estado del arte e Impacto actual	6
2.1.3.1. Aplicaciones en el área de la salud	10
III. Marco Teórico	
3.1. Nanomateriales moleculares	12
3.1.1. Electrónica molecular	12
3.2. Aspectos biológicos y farmacéuticos de las nanopartículas	13
3.3. Nanopartículas y toxicidad	14
3.4. Nanopartículas biodegradables	16
3.4.1. Métodos de preparación	17
3.5. Acuosomas	21
3.5.1. El núcleo Inorgánico de los acuosomas	23
3.5.2. La película polihidroxicarbonada en los acuosomas	24
3.6. El fármaco modelo de estudio: Indometacina	25
3.6.1. Usos terapéuticos	26
3.6.2. Vías de administración	27

	Pág.
3.6.3. Farmacodinamia	27
3.6.4. Farmacocinética	28
3.6.5. Interacciones medicamentosas	28
3.6.6. Reacciones secundarias y adversas	29
3.7. Métodos Instrumentales de Análisis	30
3.7.1. Generalidades de Métodos Espectroscópicos	30
3.7.2. Rayos X	31
3.7.3. Microscopía Electrónica	35
3.7.3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (M.E.T.)	39
3.7.3.2. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.)	41
IV. Hipótesis	43
V. Objetivos	
5.1. General	44
5.2. Específicos	44
VI. Metodología	
6.1. Materiales y Equipos	
6.1.1. Reactivos	45
6.1.1. Materiales y Equipos	45
6.1.2. Programas computacionales	46
6.2. Desarrollo experimental	46
6.2.1. Preparación de soluciones	48
6.2.2. Sonicación	48

	Pág.
6.2.3. Filtrado	48
6.2.4. Liofilización	52
6.2.5. Núcleos inorgánicos de fosfato de calcio recubiertos con lactosa	52
6.2.6. Adsorción del fármaco al núcleo recubierto con lactosa	52
6.2.7. Tratamiento de las Muestras para Análisis Instrumental	53
6.2.7.1. Difractometría de Rayos X	53
6.2.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (M.E.T.)	53
6.2.7.3. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.)	53
6.2.7.4. Análisis Granulométrico	54
VII. Resultados y Discusión	
7.1. Etapa 1. Obtención de los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio	55
7.1.1. Análisis estadístico de los núcleos inorgánicos	59
7.2. Etapa 2. Recubrimiento del núcleo con lactosa	66
7.2.1. Análisis estadístico de los núcleos recubiertos con lactosa	69
7.3. Etapa 3. Adsorción del fármaco modelo (indometacina) al núcleo recubierto con lactosa	72
7.3.1. Análisis estadístico de la adsorción del fármaco modelo	75
VIII. Conclusiones	76
IX. Bibliografía	77

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología permite diseñar formas farmacéuticas así como desarrollar y optimizar los equipos, instrumentos y cualquier técnica utilizada en el laboratorio, de los cuales dependen los procesos farmacéuticos a nivel industrial.

Para conseguir el objetivo, la Tecnología Farmacéutica se ha apoyado en diferentes áreas del conocimiento, y durante la última década se ha avocado a un área relativamente nueva que se enfoca en la producción y el estudio de partículas cuyos tamaños oscilan en el intervalo de 1 – 1000 nm, denominadas nanopartículas. A esta nueva ciencia se la ha llamado Nanotecnología, y ha encontrado gran aceptación así como grandes aplicaciones en las diversas áreas del conocimiento, ya que las nanopartículas presentan características y propiedades novedosas.

En el área de la salud, y principalmente en las ciencias farmacéuticas, la nanotecnología ha encontrado aplicaciones como el mapeo estructural del ADN, la obtención de marcadores biológicos, detección de proteínas y liberación de fármacos y genes, entre otras.

Por lo anterior, con este trabajo se pretende contribuir al desarrollo de la tecnología farmacéutica, habiendo aplicado la nanotecnología para obtener acuosomas mediante la síntesis de un transportador inerte, de tamaño nanométrico, que permita transportar fármacos muy poco solubles en medios acuosos, sin alterar su estructura química y sus propiedades farmacológicas, que además, faciliten su paso a través de las membranas celulares hacia el órgano o tejido diana, sin eventos adversos para el organismo. En este sentido, el fármaco utilizado como modelo fue la indometacina, y los resultados muestran que con la metodología desarrollada se logró obtener y caracterizar acuosomas con este principio activo.

II. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Nanotecnología

En sentido amplio, la Nanociencia (aunque se ha extendido mucho más el término Nanotecnología) es el conjunto de conocimientos y métodos dirigidos a estudiar, fabricar y caracterizar estructuras funcionales con dimensiones inferiores a unas pocas decenas de nanómetros¹, y en general se caracteriza por²:

- 1) Constituir una rama de la ciencia marcadamente interdisciplinar, donde la física, la química y la biología tienen un punto de encuentro a la escala del nanómetro (1 – 1000 nm).
- 2) Conjuntar diferentes visiones de investigación y de entender la naturaleza, así como diferentes metodologías científicas y técnicas experimentales para la creación y utilización de estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones novedosas debido a su pequeño tamaño^{1,2}.

El estudio de dichas estructuras incluye el análisis de propiedades estructurales, mecánicas, eléctricas, magnéticas y químicas, así como su interacción con otras nanoestructuras, con ondas electromagnéticas, medios biológicos, y así hasta completar un largo etcétera¹, ya que los nanomateriales se utilizan en la electrónica, el magnetismo y la optoelectrónica, las ciencias biomédicas y farmacéuticas, la industria cosmética, la energética y en aplicaciones de catálisis².

2.1.1. Generalidades

El interés por la miniaturización de los dispositivos electrónicos ha sido uno de los alicientes fundamentales para ir en busca de lo 'pequeño' y lo 'rápido'; así, la integración de circuitos electrónicos se duplica aproximadamente cada 18 meses, con diversas aplicaciones científicas y comerciales^{1,3}.

Otro impulso en la Nanociencia lo ha constituido el estudio de los fenómenos de escala molecular que tienen lugar dentro de las células o en determinados procesos químicos. Otro hito en este desarrollo ha sido el momento en que el hombre ha sido capaz de observar y manipular átomos y moléculas mediante herramientas tan sofisticadas como el microscopio de efecto túnel (STM) y todas las técnicas que de él se han derivado. Asimismo el desarrollo de la microscopía electrónica convencional ha permitido una mejor caracterización de los sistemas, llegando a la resolución atómica a lo largo de la última década⁴.

2.1.2. Nanopartículas

En la Tabla 1 se presenta una clasificación de las partículas de interés farmacéutico por tamaño, de modo que para estos fines, el concepto de nanopartícula hace referencia a un nanobiomaterial constituido por un núcleo cuya superficie puede utilizarse para ensamble molecular, y puede estar compuesto de materiales inorgánicos y poliméricos⁴. El núcleo puede presentarse de forma nano-vesicular, rodeado por una membrana o revestimiento⁵. La forma más frecuente es la esférica-cilíndrica, también la forma laminar y otras⁶. Asimismo, la medida y la distribución del tamaño de partícula son importantes en algunos casos en los que se requiere atravesar un poro de la membrana celular.

El núcleo de la partícula se puede proteger con una o varias mono capas de materiales inertes como la sílica y las moléculas orgánicas que se adsorben sobre la superficie. Sin embargo, cuando se requiere obtener una funcionalidad óptima, frecuentemente se le adsorbe una capa de una molécula enlazante específica. Esta última tiene dos grupos reactivos, uno en la parte inicial y el otro en la parte final de su estructura molecular, de modo que uno de los grupos se une a la superficie de la partícula y el otro es utilizado para enlazar varias entidades biocompatibles como dextrano, anticuerpos, etcétera, dependiendo de la aplicación.

Tabla 1. Clasificación de partículas por tamaño

Categoría de las partículas	Tamaño	
Gruesas	Partículas con diámetro promedio < 10 µm	
Finas	Partículas con diámetro promedio < 2,5 µm	
Nanopartículas o PUFs (partículas ultrafinas)	Partículas con diámetro promedio < 0.1 µm (< 100 nm)	
	<i>Tamaño aproximado:</i>	<i>Puntos potenciales de entrada:</i>
	70 nm	Superficies alveolares de los pulmones
	50 nm	Células
	30 nm	Sistema nervioso central
< 20 nm	Aún sin datos científicos probados	

Fuente: Grupo ETC, 2003

Actualmente se están desarrollando aplicaciones e investigaciones de las nanopartículas en los siguientes campos⁷:

- ◆ Ingeniería de tejidos.
- ◆ Terapia contra el cáncer.
- ◆ Codificación óptica multicolor para ensayos biológicos.
- ◆ Manipulación de células y de biomoléculas.
- ◆ Detección de proteínas.

2.1.2.1. Métodos de elaboración de nanomateriales¹

Dos son los aspectos claves relacionados con la síntesis de nanomateriales en las nuevas nanotecnologías que utilizan la aproximación “desde abajo” (“bottom-up”). En primer lugar, la síntesis precisa de las unidades elementales que van a configurar el nanomaterial. En la actualidad se dispone de diferentes métodos por vía húmeda (“química suave”) para preparar estas unidades elementales: formación de microemulsiones, de complejos organometálicos y tensoactivos, técnicas electroquímicas, copolímeros de bloque, entre otros. Estas técnicas permiten obtener partículas no sólo de una gran variedad de materiales (metales, óxidos, semiconductores, etcétera), y formas (esféricas, cilíndricas, cúbicas,

triangulares, piramidales, ...) sino que también permiten la obtención de partículas rodeadas de capas de diferentes materiales (conductores, aislantes, magnéticos, etcétera). La mayor parte de los métodos son únicamente a escala de laboratorio y el reto en este campo es lograr técnicas que permitan su fácil implementación a mayor escala, a la vez que se reduzcan el número de pasos necesarios para obtener las unidades elementales (por ejemplo, eliminando la precipitación fraccionada que se requiere en la mayor parte de las técnicas para disminuir la polidispersidad de las muestras). Dentro de este apartado es muy importante la pasivación/protección selectiva de las partículas, de forma que se puedan obtener dispersiones estables en diferentes tipos de disolventes y con funcionalidades adecuadas para las aplicaciones que se precisen. La combinación de técnicas fisicoquímicas con las tradicionales de síntesis orgánica/inorgánica será clave en este desarrollo.

Un segundo aspecto importante es el ensamblado o unión de las unidades elementales que constituirán la nanopartícula e independientemente de la técnica de ensamblado utilizada, la riqueza de comportamientos de los nanomateriales obtenidos es impresionante, por lo que es preciso el diseño de estrategias específicas para las aplicaciones que se deseen, si se quiere ir más allá de los puros estudios científicos. En esta fase de obtención de las nanopartículas hay dos estrategias fundamentales: el auto ensamblado y el ensamblado forzado. El primero de los métodos –de gran atractivo, pues es espontáneo- tiene de momento el problema de que solo se logran ensamblados de tamaño muy reducido (nanométrico) y los pocos casos en los que se han logrado tamaños macroscópicos (micrométricos) la reproducibilidad es muy difícil. El segundo de los métodos utiliza diferentes estrategias: mediante técnicas conocidas como Langmuir y Langmuir-Blodgett o bien, técnicas todavía en fase de desarrollo, como copolímeros de bloque, sílica mesoporosa, alúmina anodinada electroquímicamente, etcétera.

La utilización de las moléculas tensoactivas (anfífilas) es de particular interés, ya que éstas se autoagregan en solución mediante interacciones de tipo Van der Waals, iónicas, entre otras, dando lugar a nanoestructuras con distintos grados de curvatura y distintas morfologías y funcionalidades. Dichas nanoestructuras (micelas, microemulsiones, cristales líquidos, vesículas, nanoemulsiones, etcétera) se asocian (o disocian) en escalas de tiempo que pueden variar entre varios órdenes de magnitud y pueden solubilizar tanto compuestos hidrófilos como lipófilos, además de que poseen una gran área interfacial. Por todo ello constituyen medios de reacción idóneos para el control de la morfología de materiales nanoestructurados y la síntesis de productos de alto valor añadido. Actuando como nanoreactores, también pueden ampliar considerablemente la capacidad de síntesis de una gran variedad de moléculas, ya sea en procesos químicos o enzimáticos. Además, los procesos de autoagregación en sistemas tensoactivos, son procesos “limpios” en el sentido de que se pueden llevar a cabo en condiciones suaves de presión y temperatura, no se requiere el empleo de disolventes contaminantes y no se precisan equipos complejos y costosos.

2.1.3. Estado del arte e Impacto actual

La manufactura internacional de nanopartículas químicamente precisas y con ciertas características deseables, tomó importancia hasta la mitad de los años setenta del siglo XX, no obstante, en la actualidad existen más de 140 compañías en todo el mundo, involucradas en la manufactura de nanopartículas y al menos 44 elementos de la tabla periódica están disponibles comercialmente en su versión nanoescalar⁸.

En las Tablas 2 y 3, se puede observar una relación de compañías involucradas en el desarrollo y comercialización de nanopartículas de interés farmacéutico, principalmente para la liberación controlada de fármacos, la vehiculización de moléculas activas hacia el órgano diana en tratamientos como el cáncer, el transporte de proteínas biotecnológicas y plásmidos (terapia génica), así como a

sistemas de diagnóstico basados en moléculas complejas diseñadas para fines específicos⁷. Otras compañías exploran los efectos del tamaño cuántico en semiconductores nanocristalinos para marcado de biomoléculas, o nanopartículas bioconjugadas de oro para enmarcado de varias partes celulares; otras tantas, aplican materiales nanocerámicos a la ingeniería de tejidos y ortopedia.

Tabla 2. Relación de empresas y de nanomateriales para aplicaciones biomédicas

Compañía	Área de actividad	Tecnología
Advectus Life Sciences Inc.	Liberación de fármacos	Ingeniería de nanopartículas poliméricas para transportar fármacos anticancerígenos a través de la barrera de sangre del cerebro.
Alnis Biosciences, Inc.	Biofarmacéutica	Nanopartículas poliméricas biodegradables para liberación de fármacos.
Argonide	Filtración de Membrana	Materiales cerámicos nanoporosos para filtración de endotoxinas, implantes ortopédicos y dentales, separación de proteínas y ADN.
BASF	Pasta de dientes	Nanopartículas de hidroxiapatita para mejorar la superficie dental.
Biophan Technologies, Inc.	Protección MRI	Materiales compuestos de carbón imantado para proteger dispositivos médicos de los campos RF.
Capsolution NanoScience AG.	Recubrimientos farmacéuticos para mejorar la solubilidad de fármacos	Recubrimientos poli-electrolitos-capa-por-capa, 8 – 50 nm.
Eiffel Technologies	Liberación de fármacos	Reducción del tamaño de partícula de fármacos a 50 – 100 nm.
EnviroSystems, Inc.	Desinfectante de superficies	Nanoemulsiones.
Evident Technologies	Biomarcadores luminiscentes.	Puntos cuánticos semiconductores con grupos amino o carboxil sobre la superficie para emisión de 350 hasta 2500 nm.
Immunicon	Localización y separación de diferentes tipos de células	Núcleo magnético rodeado por una capa polimérica recubierta con anticuerpos para captura de células.

**Tabla 2. Relación de empresas y de nanomateriales para aplicaciones biomédicas
(continuación)**

Compañía	Área de actividad	Tecnología
KES Science & Tech., Inc.	Filtros AiroCide	Nano-TiO ₂ para destruir patógenos del aire.
NanoBio Corp.	Farmacéutica	Nano-emulsiones antimicrobianas.
NanoCarrier Co., Ltd.	Liberación de fármacos	Nanopartículas micelares para encapsulación de fármacos, proteínas y ADN.
NanoPharm AG.	Liberación de fármacos	Nanopartículas de polibutilcianoacrilato recubiertas con fármacos y con tensoactivos para atravesar la barrera de sangre del cerebro.
Nanoprobes, Inc.	Nanopartículas de oro para marcadores biológicos	Nanopartículas bio-conjugadas de oro para TEM y/o microscopía fluorescente.
Nanoshpere, Inc.	Biomarcadores de oro	Barras codificadas de ADN unidas a una nanosonda para propósitos de identificación, en PCR para amplificar la señal.
NanoMed Pharm., Inc.	Liberación de fármacos	Nanopartículas para liberación de fármacos.
Oxonica Ltd.	Protectores solares	Nanopartículas transparentes lubricadas para absorber afectivamente la radiación UV y convertirla en calor.
PSiVida, Ltd.	Ingeniería de tejidos, implantes, fármacos y liberación de genes, biofiltración	Aprovechamiento de las propiedades de los materiales de silicona porosa nano estructurada.
Smith & Nephew	Vendas autoadheribles	Nanocristales de plata para destruir patógenos.
QuantumDot Corporation	Biomarcadores luminiscentes	Semiconductores de puntos cuánticos bioconjugados.

Fuente: Salata, O.V., 2003

Hoy por hoy, casi todas las compañías farmacéuticas estables tienen programas internos de investigación para la liberación de fármacos que contienen compuestos con medidas nanométricas.

Tabla 3. Ejemplos de Nanopartículas, fabricantes y marcas, clasificadas por el perfil de utilización y activo que contienen

Nanopartículas	Fabricante	Marcas/Productos
Bloqueadores de sol y cosméticos		
Dióxido de titanio	Micronisers Nanophase	Microsun, Sunisorb, Nanosun. Vanicream, Skin Doctrine.
Oxido de zinc	Advanced Powder Technologies (ZinClear) Micronisers Nanophase/BASF « Z-Cote »	Bare Zone, Wet Dreams, Wild Child. Microsun, Sunisorb, Nanosun. Dermatone, Sun Smart, NuCelle, Sunsense.
Nanocápsulas rellenas con varios nutrientes (130 - 600 nm)	L'Oreal	Lancote Flash Bronzer, Future-E/humectante.
Descontaminación		
Dióxido de titanio	KES Science and Technology Inc. Altair	AiroCide/destruir patógenos del aire. Eliminar desechos nucleares y sensores para detectar agentes químicos y biológicos que se estén desarrollando.
Varios óxidos de metal	NanoScale Materials, Inc.	Remediación nanoactiva para desechos químicos peligrosos.
Usos Dentales		
Cristales de Hidroxiapatita	BASF	Pasta de dientes con esmalte (no comercializada aun).
Silsesquioxane poliedros oligoméricos	Irbid Plastics	NanoBond/pegamento.
Usos Médicos		
Plata	Nucryst (división de Westaim) Institute for New Materials	Acticoat /vendajes. Audio Service GmbH /protector antimicrobial para instrumentos auditivos

Fuente: Ocasional Paper Series. 2003.

Algunos ejemplos de esto son las formulaciones coloidales de plata que se usan ampliamente como antimicrobianos, la alta reactividad de las nanopartículas de titanio que se utilizan como bactericidas en los filtros, las propiedades catalíticas de las superficies de nanocerámicas o de metales como el platino que se usan para destruir toxinas y otros materiales orgánicos peligrosos.

En síntesis, se puede decir que el mercado actual de las nanopartículas no es muy grande comparado a otros productos, pero los analistas predicen que excederá los \$900 millones de dólares para el año 2005, representando éstas así, la primera fase de una nueva revolución industrial. También es llamada tecnología atómica, y algunas de las compañías más grandes que las utilizan en el mundo son: DuPont, L'Oreal, Hewlett-Packard, Mitsubishi, Toyota e IBM⁸.

2.1.3.1. Aplicaciones en el área de la salud

En cuanto a las aplicaciones de que pueden ser objeto los materiales nanoestructurados en el campo de la biología, la farmacia y la medicina, a continuación se mencionan las siguientes⁸:

- ◆ Marcadores biológicos fluorescentes.
- ◆ Liberación de fármacos y genes.
- ◆ Biodetección de agentes patógenos.
- ◆ Detección de proteínas.
- ◆ Mapeo estructural del ADN.
- ◆ Ingeniería de tejidos.
- ◆ Destrucción de tumores por calentamiento (hipertermia).
- ◆ Separación y purificación de moléculas biológicas y de células.
- ◆ MRI de alto contraste.
- ◆ Estudios fagocinéticos.

Aunque en fase experimental, existen ya numerosos artefactos de diminutas dimensiones, entre los cuales se pueden mencionar⁹:

Nanobomba. Se trata de una máquina experimental que es capaz de distinguir entre bacterias y células humanas. Una vez seleccionado su blanco, ataca a la bacteria hasta acabar con ella y respeta a la célula humana.

Fago T4. Su diseño está motivado en los virus, dando vida a una sorprendente máquina que tiene la capacidad de colocar sus patas sobre la superficie de las bacterias e inyectarles ADN.

Nanomotores. Ilustran un ejemplo de engranaje atómico realizado por ordenador. Aunque todavía es tan sólo una propuesta teórica, en un futuro no muy lejano podría ser parte integrante de una máquina microscópica diseñada para reparar células.

Nanotransportadores. Otra probable aplicación de la nanobiotecnología dentro del campo de la medicina se decantará por la creación de minúsculos transportadores de gran eficacia a la hora de transportar fármacos y ADN.

Nanolaboratorio. Constituyen otra apuesta de futuro y frente a los laboratorios convencionales que ocupan amplias salas, podrán diseñarse auténticos centros de investigación del tamaño de un microchip.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Nanomateriales moleculares

Bajo el término de nanomateriales moleculares se agrupan todos aquellos materiales de naturaleza molecular o polimérica en los que sus propiedades físicas, químicas, biológicas y/o farmacológicas dependen en gran medida de su nanoestructuración en dimensiones, como: 1) partículas, 2) fibras, 3) capas y 4) sólidos nanoestructurados. Estos materiales presentan propiedades, en muchos casos inéditas debido a sus características nanoscópicas, que no pueden alcanzarse mediante los materiales clásicos macroscópicos.

3.1.1. Electrónica molecular

Desde el punto de vista de la investigación básica destaca la posición especial del nanómetro con respecto a otras escalas físicas por dos razones fundamentales: por un lado está la transición de lo continuo a lo discreto y por otro, el hecho de que a esta escala la naturaleza se rige según los postulados relacionados con la incertidumbre de la medición de la mecánica cuántica que difieren fundamentalmente de los principios aplicables a sistemas macroscópicos. Por ello, a escala nanométrica, muchos sistemas presentan comportamientos nuevos e inesperados comparados con lo que se esperaría según las leyes que rigen a escalas mayores.

Muchos fenómenos físicos, químicos y biológicos están determinados por procesos que se originan a escala nanométrica. La forma en la que se seca una capa de pintura, el crecimiento de gotas, reacciones químicas y procesos biológicos y un sinnúmero de fenómenos dependen de las interacciones entre átomos, moléculas, agregados de tamaño nanométrico y superficies cercanas. La fricción, que genera pérdidas millonarias tanto por los efectos de desgaste como por la pérdida de energía asociada, ocurre entre millones de contactos de tamaño

nanométrico. Todos estos fenómenos tienen su “origen” a escala nanométrica aunque sus efectos se manifiesten también a escalas mucho mayores. Este tipo de fenómenos que cubre escalas muy amplias (tanto temporales como espaciales) son complejos y en general todavía no están entendidos en detalle.

Por lo anterior, una mejor comprensión a escala nanométrica de los procesos fundamentales que los determinan implicará en el futuro cercano, una mejor comprensión de sus efectos a escala micro y macroscópica con el consiguiente potencial tecnológico¹.

3.2. Aspectos biológicos y farmacéuticos de las nanopartículas

Se dice que los pulmones no están bien equipados para enfrentar partículas muy pequeñas de materia, por lo que, si las moléculas son lo suficientemente pequeñas, es posible que estas esquiven a los guardianes del sistema respiratorio, y en algunos otros casos crucen la barrera de sangre que protege al cerebro⁸. Otro posible puerto de entrada al cuerpo es la piel. Estudios recientes han demostrado que las partículas de hasta 1 μm de diámetro pueden llegar tan profundo en la piel que las absorba el sistema linfático, mientras que las partículas de mayor tamaño no tienen esta posibilidad de penetración¹⁰. Esta última circunstancia explica el éxito de estructuras nanoparticulares como los liposomas en dermocosmetología y dermofarmacia.

En el campo de la tecnología farmacéutica, el desarrollo de productos a partir de sistemas nanoparticulares ha crecido y se ha diversificado rápidamente en los años recientes, debido entre otros, a que es posible aplicarlos a distintos fármacos, así como a sistemas de liberación convencional o modificados, y porque entre las diferentes formas de dosificación existentes, las nano y micro partículas han ganado importancia debido a la tendencia a acumularse en las áreas inflamadas del cuerpo o en tejidos afectados por procesos patológicos como el cáncer^{11,12}.

Los sistemas de liberación modificados de fármacos obtenidos con nano y micro partículas son de importancia para prevenir numerosos inconvenientes relacionados con el propio fármaco, por ejemplo, la velocidad de degradación, y con operaciones unitarias involucradas en los procesos productivos como la purificación, esterilización y secado^{13,14}.

Por otra parte, las partículas nanométricas que son apreciadas por su reactividad química y otras características cuánticas, ya son de uso diario en bloqueadores de sol, cosméticos y aderezos para ensaladas junto con otros varios productos y procesos.

3.3. Nanopartículas y toxicidad

Aunque las nanopartículas presentan claras ventajas para lograr una administración controlada y específica de fármacos hacia órganos de “difícil” acceso, es necesario considerar la otra cara de la moneda: su potencial para provocar reacciones adversas o producir toxicidad en los organismos, debido principalmente a que la industria de la nanotecnología está inaugurando la producción masiva de las también denominadas partículas ultrafinas (PUFs) para aplicaciones de diversos productos como:

- Bloqueadores para el sol con PUFs de dióxido de titanio.
- “Bucky balls”, que son pelotas de tipo fútbol de 1 nm de diámetro, hechas con 60 átomos de carbono.
- Nanotubos de carbono que miden 1 nm de diámetro pero que pueden llegar a tener más de 1 μm de extensión.

Existe evidencia de que las partículas ultrafinas o nanopartículas pueden entrar al cuerpo por varias rutas, incluyendo la inhalación, ingestión y a través de la piel. Si bien es fácil apreciar cómo esto puede adecuarse para propósitos farmacéuticos

positivos, existe una necesidad urgente de frenar la generación de partículas ultrafinas innecesarias, principalmente las que son insolubles⁸.

Debe notarse que aparentemente hay un pasaje natural por el cual se introducen las partículas y subsecuentemente viajan alrededor del cuerpo¹⁵. Esto a través de las aberturas “caveolares”, canales o receptores de naturaleza protéica, que hay en las membranas naturales que separan los compartimientos del cuerpo. Algunos de estos canales o receptores miden entre 40 y 100 nm y se piensa que permiten el traslado de macromoléculas tales como proteínas, incluyendo en ocasiones algunos virus. También resulta que son del tamaño idóneo para permitir el traslado de las PUFs. En esencia, parece que hoy es posible diseñar partículas ultrafinas que al engañar ciertas membranas, pueden introducir “a cuevas” nuevos fármacos que de otra forma sería imposible¹¹ introducirlos en las células de distintos organismos uni o pluricelulares^{8,13}.

Se ha visto que las nanopartículas o PUFs pueden producir inflamación en los riñones después de una exposición de PUFs de aerosoles¹⁶. Por otra parte, existen estudios in vitro con células vivas que han confirmado la creciente capacidad de las PUFs para producir radicales libres que pueden causar daño celular¹⁷. Este daño puede manifestarse de diferentes formas, incluyendo la genotoxicidad y grados anormales de muerte celular incluyendo apoptosis¹⁸.

Es por esto que algunos productores de nanopartículas han alterado sus partículas para reducir o eliminar la producción de radicales libres, ya sea cubriendo las partículas con ingredientes orgánicos e inorgánicos tales como silicio, o mediante la adición de antioxidantes y vitaminas para “barrer” con los radicales libres¹⁹.

Finalmente habrá que tener en consideración que el uso de las nanopartículas no es una panacea, ya que la exposición de sistemas vivos a las nanopartículas por tiempos prolongados tiende a incrementar el estrés oxidativo¹⁶, y parece, a la luz

del conocimiento actual, que el efecto del tamaño es considerablemente más importante como factor tóxico que la composición del material de las partículas ultrafinas.

3.4. Nanopartículas biodegradables

La liberación de fármacos efectiva y segura implica el ponerlos a disposición en el sitio de acción adecuado, en general, un cambio en la composición química del principio activo es asociado con la degradación, alteración o pérdida de sus propiedades funcionales y estructurales¹⁹.

Durante las últimas tres décadas se han desarrollado distintos sistemas nanoparticulados con materiales biodegradables que ofrecen una gran variedad de aplicaciones, pero cuyo principal característica es el uso de materiales biodegradables que permitirán la conformación de sistemas de naturaleza coloidal, que a su vez serán utilizados como transportadores (carriers) bajo distintas formas: liposomas, niosomas, microemulsiones, acuosomas y otros sistemas nanoparticulares, que a su vez, pueden formar cápsulas o esferas matriciales, dependiendo respectivamente, de la existencia de un núcleo inerte recubierto por una película o más capas de otro material con o sin activo, o bien, de la formación de una partícula en la que todo el conjunto es el resultado de una matriz o mezcla íntima del activo y del material empleado como transportador²⁰.

Muchos vehículos se derivan de polímeros sintéticos (poliestireno o metacrilato) y otros de biopolímeros (ácido poliláctico, poli-β-hidroxibutirato, entre otros). Asimismo, se han utilizado macromoléculas orgánicas como la albúmina y polisacáridos como el dextrán, y lípidos como la lecitina en los liposomas²¹.

Las nanopartículas constituidas por polímeros biodegradables están siendo objeto de mucho más atención que los liposomas en farmacia, debido a su gran potencial en la terapéutica, así como a su estabilidad en fluidos biológicos y durante el

almacenamiento. Entre las áreas más promisorias de aplicación se pueden mencionar:

- 1) La vectorización de fármacos anticancerígenos y antibióticos para administración parenteral, a modo de conseguir una mayor selectividad en el órgano o tejido diana y un aumento del índice terapéutico.
- 2) La reducción de efectos colaterales de fármacos que administrados por la vía oral, como los antiinflamatorios no esteroideos tales como el diclofenaco y la indometacina, causan con frecuencia irritación gástrica.
- 3) La protección contra la degradación biológica en el tracto gastrointestinal y aumento de la biodisponibilidad de péptidos, proteínas y hormonas, administrados por vía oral.
- 4) El control de la liberación, la disminución de efectos colaterales debido a la absorción sistémica y aumento de la biodisponibilidad ocular de ciertos fármacos, mediante la administración oftálmica.

3.4.1. Métodos de preparación

En la literatura se pueden encontrar varios métodos para la obtención de nanopartículas biodegradables a partir de materiales poliméricos y, de una forma general, se pueden clasificar en²¹:

- 1) Métodos basados en una polimerización *in situ* de monómeros monodispersos y,
- 2) Métodos de precipitación de polímeros preformados

Los métodos de obtención de nanopartículas biodegradables a partir de polímeros preformados son los que más atención han tenido en los últimos años, debido a

que en el primer método, durante la polimerización de los monómeros dispersados, los productos no son totalmente biocompatibles y pueden quedar residuos tóxicos de monómeros, oligómeros y catalizadores, además que se ha observado reacciones de entrecruzamiento de los principios activos o la degradación de los componentes cuando se emplea la radiación para inducir la polimerización²².

Por su parte, las nanopartículas biodegradables obtenidas a partir de polímeros sintéticos-preformados como los poliésteres tales como el ácido poliláctico (PLA), el poli- β -hidroxibutirato (PBH), el poliláctido-co-glicólido (PLGA) y la poli- ϵ -caprolactona (PCL), están siendo objeto de mayor atención e incluso varios productos de liberación controlada a partir de ellas ya se han comercializado, debido entre otros factores a su demostrada buena histocompatibilidad, biodegradabilidad y por no generar subproductos tóxicos²⁰.

Para la obtención de nanopartículas con polímeros preformados existen distintos métodos que han sido clasificados principalmente en función de los procesos fisicoquímicos involucrados o del sistema de eliminación del disolvente²⁰⁻²², una forma de agruparlos es la que sigue:

- 1) Métodos de evaporación/extracción del disolvente.
- 2) Métodos de separación de fases (coacervación).
- 3) Métodos diversos (secado por atomización, fusión en caliente, entre otros).

La selección de un método dependerá de las propiedades del polímero y del principio activo a utilizar, así como de las características esperadas de las nanopartículas y la vía de administración prevista.

Entre los principales problemas para la aplicabilidad industrial y la comercialización de los productos con nanopartículas, está el que en la mayoría de los sistemas de obtención de las nanopartículas, se forman suspensiones

coloidales acuosas, las cuales durante su almacenamiento pueden dar lugar a fenómenos de agregación y a la formación final de precipitados difíciles de resuspender. De manera adicional, también ocurren problemas de estabilidad química tanto de los polímeros como de las demás materias primas, incluyendo al principio activo. Una forma de resolver dicha situación ha sido la aplicación de procesos de deshidratación o secado del sistema coloidal.

La liofilización ha sido uno de los procesos de deshidratación o de secado que más se han aplicado tanto a liposomas como a los demás tipos de nanopartículas. Para ello se ha recurrido al uso de lipo o crioprotectores como los carbohidratos, que actúan evitando la agregación de las partículas durante el congelamiento. Otro tipo de adyuvante empleado recientemente para el secado por dispersión (nebulización), ha sido el dióxido de silicio, como Aerosil 200®. De esta forma, los productos secos pueden ser formulados en distintas formas farmacéuticas, permitiendo asimismo, diversas opciones de desarrollo industrial²².

Como método de secado, hasta la fecha la liofilización ha sido más empleada en la elaboración de nanoesferas que de nanocápsulas, ya que se ha atribuido a la liofilización modificaciones en la liberación del principio activo debido principalmente a cambios que ocurren en la estructura de la película que cubre al núcleo de la nanocápsula, porque al cristalizar el agua, se generan tensiones internas que “quiebran” las nanocápsulas y liberan anticipadamente el activo.

No obstante lo anterior, para el caso de nanopartículas de PCL o de PLA, otros investigadores atribuyen dichos cambios a que más que una partícula con un núcleo y una película polimérica, las nanopartículas formadas son en realidad micelas poliméricas²².

Los crioprotectores o lipoprotectores más comunes son los mono y disacáridos, así como algunos oligosacáridos, tales como la glucosa; sacarosa, lactosa,

fructosa y celobiosa; sorbitol y manitol, respectivamente, que actúan formando una matriz amorfa alrededor de las nanopartículas para conferirles cohesividad y a la vez evitar la agregación interparticular durante el congelamiento²².

Una de las principales limitantes para el desarrollo comercial de las nanopartículas ha sido el hecho de que por su naturaleza coloidal, no ha sido sencillo desarrollar técnicas analíticas para su caracterización granulométrica, morfológica y fisicoquímica, además de la necesidad de cuantificar y evaluar la cinética o propiedades de liberación del principio activo y la estabilidad física, química y microbiológica de los productos durante el almacenamiento.

Entre las propiedades fisicoquímicas que se evalúan a las suspensiones de estas partículas coloidales se pueden mencionar: el potencial zeta y pH del sistema coloidal, la distribución de la masa molar del polímero y del principio activo en la nanopartícula, así como la cantidad de fármaco asociado a las nanoestructuras y la identificación de si el sistema corresponde al tipo cápsula o matriz.

Para la evaluación morfológica y la granulométrica de las nanopartículas se dispone actualmente de técnicas como la microscopía electrónica de barrido (MEB) y la microscopía electrónica de transmisión (MET), las cuales a su vez se apoyan en otras metodologías que hacen uso de programas computacionales como la digitalización de imágenes.

A su vez, la determinación de la masa molar de polímero suele realizarse mediante la cromatografía de exclusión y para determinar la forma de asociación del fármaco y de los otros materiales en las nanopartículas, se recurre a técnicas termoanalíticas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la difracción de rayos X de polvos y la espectroscopia infrarroja.

3.5. Acuosomas

Como parte de los sistemas nanoparticulares, en las dos últimas décadas, se ha venido desarrollando uno que se caracteriza por estar constituido por un núcleo de composición nanocristalina y un autoensamblaje de varios recubrimientos, el cual se ha denominado *acuosoma*.

Como su nombre lo indica, los acuosomas son descritos como "cuerpos de agua" o "cuerpos acuosos" y tienen entre sus propiedades o ventajas que permiten ser utilizados como vehículos de liberación controlada de distintas sustancias y para proteger, preservar y vectorizar moléculas biológicas frágiles como polipéptidos y proteínas.

La elaboración de acuosomas consiste en la obtención o síntesis de un núcleo nanocristalino inorgánico con una superficie modificada no covalentemente, una película de un polihidroxicompuesto, y a las partículas recubiertas se les adsorbe un fármaco o antígenos.

En los acuosomas, los núcleos tienen la característica de proveer, en primer término, estabilidad estructural, ya que se ha demostrado que utilizando un núcleo nano cristalino recubierto con una capa de celobiosa, se ha conseguido liberar antígenos, proteínas y anticuerpos policlonales para usos terapéuticos, industriales y de diagnóstico, y en segundo lugar, han posibilitado una efectiva liberación de fármacos en los órganos blanco, reduciendo la toxicidad de los mismos.

Ejemplos de lo anterior, son entre otros, que al utilizar un núcleo nanocristalino de fosfato de calcio recubierto con piridoxal-5-pirofosfato se ha liberado insulina en pacientes diabéticos, y también se ha logrado liberar la enzima DNasa. Por último, se ha logrado proteger efectivamente la liberación biomolecular de moléculas lábiles como la hemoglobina.

En general, estos sistemas de liberación nanoparticulados complejos constan de polímeros simples, mezclas de lípidos complejos o materiales cerámicos, que miden individualmente entre 30 - 50 nm de diámetro. Al ser sólidos o partículas recubiertas dispersas en medios acuosos, su mecanismo de acción es controlado por su superficie. Las modificaciones de la superficie crean una película de estabilización que adsorbe proteínas farmacéuticas con una desnaturalización estructural mínima. Así pues, estos sistemas pueden liberar distintos agentes mediante la combinación de blancos específicos, protección molecular y procesos de liberación lenta o controlada²³.

Debido a su tamaño y a su inherente actividad de superficie, los acuosomas pueden cargarse con cantidades sustanciales de distintos compuestos mediante procesos no covalentes. Adicionalmente, por su tamaño y relativa estabilidad estructural, también pueden encubrirse para evitar ser filtrados rápidamente por el sistema reticuloendotelial.

La importancia biológica y farmacéutica de los acuosomas, radica en el conocimiento de que las interacciones agua-proteínas son necesarias para mantener la conformación de las proteínas, que a su vez son vitales para las actividades biológicas¹¹. De igual forma, la presencia de agua afecta todas las conformaciones de las proteínas mediante interacciones electrostáticas entre grupos polares y cargados. También el agua actúa como un flexibilizante que lubrica la dinámica local de las proteínas y brinda la suficiente flexibilidad para asumir las conformaciones que caracterizan los sustratos, ligandos y antígenos.

De manera más general, a un nivel molecular, el agua facilita el reconocimiento espacial de una molécula por otra, de esta manera se transmite energía e información, se generan productos, se inician las respuestas y se construyen las estructuras biológicas. Por otra parte, e irónicamente, mientras que el agua es vital para la conservación de su forma molecular, en el estado acuoso las proteínas no pueden resistir por mucho tiempo sin sufrir una desnaturalización, ya que una

variedad de cambios en el medio, como la temperatura, el pH, y la presencia de sales y disolventes, pueden causar la inactivación de la proteína.

En general, las proteínas son estables al estado sólido, sin embargo, para lograr que éstas se acoplen a un vehículo de liberación, se requiere de un proceso realizado al estado líquido para posteriormente eliminar el disolvente. Asimismo, varios vehículos utilizados para la liberación de proteínas en estado sólido, al igual que las superficies de los contenedores de almacenamiento, tienden a inactivar o adsorber a éstas al igual que a otros fármacos, lo cual se ha asociado con la deshidratación o el secado, que tienden a producir cambios moleculares conformacionales significativos, por lo que la tecnología que ha conducido al desarrollo de los acuosomas tiene el propósito particular de lograr un sistema que permita preservar la integridad conformacional y actividad bioquímica de macromoléculas²³.

3.5.1. El Núcleo inorgánico de los acuosomas

Para producir los núcleos de los acuosomas, en la literatura científica publicada hasta la fecha se ha notificado del uso de tres tipos de materiales: óxido de estaño, carbón cerámico nanocristalino (diamantes) y brushita (fosfato de calcio dihidratado)²⁴. Este último es el núcleo de mayor interés biológico debido a su presencia natural en el cuerpo. La brushita, sin embargo, es inestable y se convierte en hidroxiapatita por un almacenamiento prolongado.

Aunado a lo anterior, la vinculación de la hidroxiapatita con los órganos dentarios, explican su amplio uso en la preparación de implantes para liberación de fármacos y al parecer sería un mejor núcleo para la preparación de acuosomas. No obstante, para la preparación de la hidroxiapatita se requiere utilizar la técnica de precipitación-calcinación directa o por auto precipitación lenta de fluidos corporales simulados²⁰.

3.5.2. La película polihidroxicarbonada en los acuosomas

Una serie de experimentos microbiológicos han revelado que la familia de moléculas denominadas comúnmente como compuestos hidrocarbonados o polihidroxicompuestos, poseen propiedades antideshidratantes y de conservación de conformación molecular en el estado sólido y en el estado acuoso, de moléculas bioquímicamente activas²³. Así pues, los azúcares proveen de estabilidad estructural a las proteínas contra los cambios conformacionales que se pueden suscitar durante procesos de secado como la liofilización²⁰.

El mecanismo sugerido para explicar la estabilidad que proveen los azúcares a las proteínas, es que el carbohidrato forma una capa pseudo-hidratada con la superficie del agua de la proteína circundante y estabiliza la estructura de la molécula²⁵.

En general, los datos aportados hasta ahora apoyan la hipótesis de que la actividad bioquímica conformacional específica se conserva cuando una molécula bioquímicamente activa es inmovilizada sobre núcleos cerámicos recubiertos con polihidroxicompuestos²³.

La familia de los azúcares que exhiben propiedades anti-deshidratantes es extensa, mono, di y oligosacáridos como los ejemplos ya mencionados con anterioridad, también se les correlaciona por su habilidad para formar capas²⁶.

En la liberación de fármacos en general, la película polihidroxicarbonada se utiliza para retener las propiedades espaciales del fármaco, lo que sugiere un alto grado de conservación molecular y de actividad biológica²⁷.

3.6. El fármaco modelo de estudio: Indometacina

Para este estudio, se seleccionó a la Indometacina como modelo de estudio para la obtención de acuosomas cargados, debido a dos factores principales, el primero, porque en la literatura científica existen antecedentes sobre el interés de desarrollar nanopartículas para este antiinflamatorio no esteroideo, tanto por su baja solubilidad, como por su irritabilidad gástrica. En segundo término, su selección se basó en que resultaba ser una molécula sencilla y relativamente estable, para poder utilizarla para los fines del presente proyecto - que fue el de desarrollar una metodología para obtener acuosomas con y sin carga de moléculas farmacológicamente activas, factible de ser escalada a nivel industrial.

La Indometacina (Figura 1), es un polvo blanco-amarillento; presenta policristalinidad, es insoluble en agua y en hidrocarburos, pero soluble en alcoholes, acetona, dicloruro de etileno y acetonitrilo. Asimismo, se han reportado los siguientes polimorfos con sus puntos de fusión: Polimorfo I (160 – 161 °C), Polimorfo II (152 – 154 °C). Polimorfo III (148 – 149 °C), Polimorfo IV (134 °C), Polimorfo V (95 °C) y un Amorfo (55 – 57 °C), de los cuales, el Polimorfo I es el que termodinámicamente presenta mayor estabilidad, aunque el Polimorfo II fue el primero en sintetizarse y emplearse en formulaciones farmacéuticas.

Con los alcoholes forma solvatos cristalinos estables. Es soluble pero inestable en soluciones alcalinas. Tanto la forma sólida como sus soluciones se deben proteger de la luz solar. Su masa molecular es de 357.80. Su nombre químico es ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético y su fórmula molecular: $C_{19}H_{16}ClNO_4$ ²⁸:

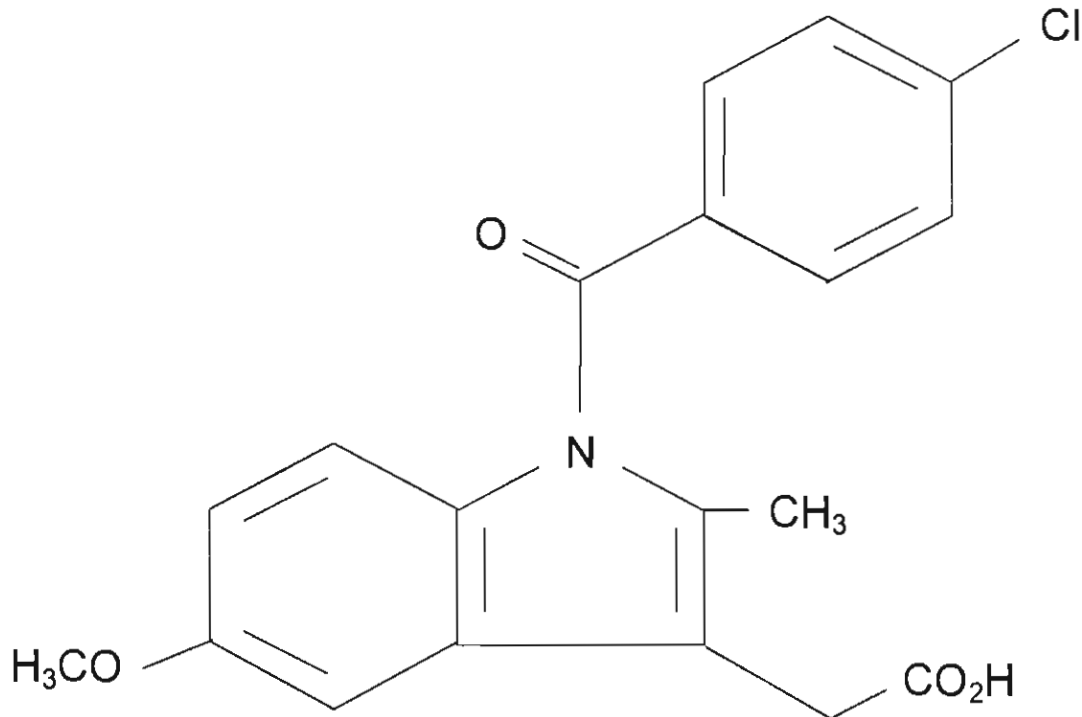


Figura 1. Estructura química de la Indometacina

3.6.1. Usos terapéuticos

La indometacina pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, y se utiliza en:

- Enfermedades reumáticas crónicas inflamatorias como la artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, etcétera.
- Inflamación no reumática (bursitis, capsulitis, tendinitis), dolor (especialmente el asociado a inflamación).
- Inflamación consecutiva a intervenciones ortopédicas.
- Dolor, debido principalmente a procesos inflamatorios.
- También actúa aliviando y reduciendo la fiebre.

3.6.2. Vías de administración

Existen comercializadas varias formas de administración del fármaco: oral, rectal, tópica y oftálmica²⁹.

Vía de administración	Dosis*
Oral (grageas y cápsulas).	50 – 200 mg cada 24 horas.
Rectal (supositorios).	100 mg cada 24 horas.
Tópica (gel, pomada, spray).	3 ó 4 aplicaciones cada 24 horas.
Oftálmica (colirio).	1 gota cada 6 horas el día previo a la operación. 1 gota cada 45 minutos antes de la intervención 1 gota cada 6 horas durante 10 a 12 días después de la cirugía.

*Enfermedades crónicas: inicialmente 25 mg cada 8 ó 12 horas, incrementando la dosis semanalmente hasta conseguir el efecto deseado o hasta una dosis máxima de 200 mg cada 24 horas.

En la literatura científica existe información sobre propuestas de elaboración de nanocápsulas y nanoesferas de indometacina preparadas con PLA o PCL para administración oral²², así como liofilizados para uso oftálmico³⁰.

3.6.3. Farmacodinamia

Es un inhibidor de la ciclooxigenasa formadora de prostaglandinas que proporciona una eficacia analgésica, antipirética y antiinflamatoria, también inhibe la motilidad de los leucocitos polimorfonucleares. Las prostaglandinas se producen en respuesta a una lesión o a ciertas enfermedades que provocan inflamación y dolor³¹.

3.6.4. Farmacocinética

Absorción: Se absorbe bien por el tracto digestivo. Después de una dosis única oral de 25, 50 y 75 mg, la concentración máxima en plasma es de 1,54; 2,65 y 4,92 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y se alcanza en dos horas. La vida media como fármaco no metabolizado es de 2 a 3 horas.

Distribución: Las concentraciones plasmáticas requeridas para lograr el efecto terapéutico son de 1 $\mu\text{g/mL}$ y las tóxicas a partir de 6 $\mu\text{g/mL}$. Se liga a las proteínas en un 90 a 95%. Se difunde bien por todos los líquidos corporales y pasa en forma lenta al líquido sinovial y 5 horas después de la administración, las concentraciones en líquido sinovial son iguales a las plasmáticas para posteriormente ir aumentando en el líquido sinovial y disminuir en el plasmático. Se encuentra en baja concentración en la leche materna, tejido cerebral, saliva y placenta.

Biotransformación: La indometacina se convierte en gran parte en metabolitos inactivos, incluyendo los formados por O-desmetilación (cerca del 50%), conjugación con ácido glucurónico (cerca del 10%) y N-desacilación.

Excreción: Se elimina por vía renal e intestinal. Después de una dosis única oral de 60% se elimina por vía renal (20% en forma activa y 40% metabolizada) y el 33% con las heces (1.5 a 2% en forma activa y 31 a 31.5% metabolizada). La vida media de eliminación varía de 2 a 22 horas, debido a la circulación enterohepática²⁸.

3.6.5. Interacciones medicamentosas

Algunos medicamentos que interaccionan con la indometacina son: antihipertensivos antagonistas de la angiotensina convertasa (captoprilo, cilazaprilo, enalaprilo, lisinoprilo, perindoprilo), antiácidos (hidróxido de magnesio y

de aluminio), antidiabéticos orales (tolbutamida), betabloqueantes (atenolol, propranolol), bupivacaína, cimetidina, digoxina, diuréticos (furosemida, torasemida, triamtereno), haloperidol y fenilpropanolamina, entre otros²⁹.

La concentración plasmática de indometacina y sus metabolitos inactivos aumenta con la administración concurrente de probenecid. Se ha informado insuficiencia renal aguda con la administración concomitante de indometacina y triamtereno.

3.6.6. Reacciones secundarias y adversas

Administración oral. Dolor de cabeza, mareos y alteraciones digestivas como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Raramente puede producir otros efectos como somnolencia, malestar general y debilidad, entre otros efectos.

Administración rectal. Dolor de cabeza (cefalea), mareos, nerviosismo, malestar estomacal, dolor de estómago o calambres, vómitos, diarrea y estreñimiento (constipación).

Administración tópica. Sequedad de piel, eritema, picor y sensación de quemazón cutánea. Excepcionalmente puede producir fotodermatitis.

Administración oftálmica. Ardor ocular al aplicar las gotas, enrojecimiento ocular, alteraciones del epitelio corneal (abrasión corneal, queratitis punteada), aumento de la presión intraocular, molestias oculares (dolor, irritación), edema palpebral, edema corneal y queratopatía estriada, prurito²⁹.

3.7. Métodos Instrumentales de Análisis

Desempeñan un papel determinante en el campo farmacéutico utilizándose en cada etapa de la existencia del fármaco, es decir, en la investigación y desarrollo de un nuevo compuesto, en la formulación galénica del mismo, en las etapas de producción y control, y en su estado de conservación a lo largo del tiempo.

De esta forma, estos métodos proporcionan información precisa y completa de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias medicinales en cualquier estadio de su vida. Esta información se consigue principalmente en cuatro formas: 1) identificación y determinación de la química del fármaco, 2) determinación de su homogeneidad y pureza, 3) valoración cuantitativa del mismo y, 4) determinación de constantes físicas y fisicoquímicas³².

3.7.1. Generalidades de Métodos Espectroscópicos

Cuando un haz de electrones de suficiente energía interacciona con la materia, se producen diferentes señales, siendo las más importantes: electrones dispersados (e1), electrones expulsados (e2) y rayos X del átomo (RX), que recogidas con detectores adecuados nos proporcionan información acerca de la zona de interacción de dicho haz con los átomos.

e1. Son los electrones del haz primario que se dispersan en la muestra. Proporcionan información acerca del número atómico medio de la zona bombardeada. Se denominan electrones retrodispersados.

e2. Son los electrones expulsados de los átomos de la muestra por la acción del bombardeo de electrones del haz primario. Proporcionan información acerca de la topografía superficial. Es la señal con la que comúnmente se obtienen imágenes de la muestra. Se denominan electrones secundarios.

RX. Son los rayos X característicos del átomo que los ha producido. Proporcionan información química elemental de la zona de la muestra de la que proceden. Con esta señal se obtienen los análisis químicos cuantitativos y cualitativos de la composición de la muestra.

El proceso físico mediante el cual se producen las tres señales anteriores en un átomo de la muestra es el siguiente: un electrón 1 del haz primario choca con un electrón 2 de una capa interna del átomo y expulsa a éste de dicho átomo. El átomo queda entonces en un estado excitado ya que el electrón 2 deja una vacante en el nivel energético del que procede.

El átomo, para volver a su estado fundamental, de mínima energía, desplaza un electrón 3 de un orbital más energético a la vacante dejada por el electrón 2. Para que tenga lugar este proceso, el electrón 3 se tiene que liberar de una cierta cantidad de energía, igual a la diferencia de los dos niveles energéticos involucrados en el proceso. Esta energía la libera en forma de rayos X.

3.7.2. Rayos X

Constituyen un pequeño intervalo de frecuencias del espectro general de radiaciones electromagnéticas. Puede asignárseles longitudes de onda comprendidas entre 0,1 y 100 Å³².

Algunos minerales radiactivos y ciertos radioisótopos emiten espontáneamente rayos X; esta emisión constituye un fenómeno secundario provocado por la liberación de partículas α , β o de radiación γ , durante el proceso de desintegración radiactiva. Por otra parte, la propia radiación X procedente de un emisor primario, puede excitar a su vez la radiación X de un emisor secundario (muestra), denominándose esta última radiación de fluorescencia.

Ley de Moseley

Moseley encontró que las frecuencias o las longitudes de onda de las líneas homólogas de una misma serie espectral, aumentan directamente con el número atómico, de acuerdo con la relación: $\sqrt{\nu} = a(Z - \delta)$, donde a y ν son constantes y Z el número atómico.

Esta ley lleva implícitos los fundamentos del análisis químico por espectroscopía de rayos X; identificando la longitud de onda de la línea característica se identifica el elemento Z , y midiendo su intensidad, puede conocerse la concentración atómica de dicho elemento.

Absorción de los rayos X por la materia

Este fenómeno es de cierta complejidad, ya que al mismo contribuyen no sólo la naturaleza del absorbente (composición atómica), sino también la energía o longitud de onda de la radiación incidente sobre el mismo. Suponiendo una radiación monocromática, la atenuación de su intensidad al atravesar el absorbente es proporcional al espesor del mismo, b , cumpliendo una ley análoga a la de Beer que rige los procesos de absorción de la radiación electromagnética.

En este caso, la ley adopta la expresión: $I = I_0 e^{-\mu b}$, donde I es la intensidad de la radiación transmitida, I_0 la de la radiación incidente y μ una constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absorción lineal. La utilización de este coeficiente presenta dificultades en la práctica. Como su magnitud está determinada por la cantidad de materia atravesada (o por el número de átomos), es más conveniente expresarlo en función de la densidad (ρ) del absorbente: $I = I_0 e^{-(\mu/\rho)\rho b} = I_0 e^{-\mu_0 \rho b}$. El nuevo coeficiente, $\mu_0 = \mu/\rho$, se denomina coeficiente de absorción másico (cm^2g^{-1}). Contrariamente al coeficiente de absorción lineal, μ_0 es una magnitud atómica, posibilitando la comparación de las propiedades

absorbentes de las sustancias en función del contenido de los átomos de las mismas.

Ley de Bragg

La ley de Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$) establece que cualquier radiación que incida sobre un cristal formando un ángulo θ , se difracta o refleja en una dirección que forma con la dirección del haz incidente un ángulo 2θ (Figura 2). En esta dirección se hallan situados el colimador S_2 y el detector. Los movimientos de rotación del cristal y del conjunto S_2 con el detector están sincronizados, de forma que cuando el cristal gira un ángulo θ , dicho conjunto gira 2θ , al objeto de satisfacer la condición de difracción de Bragg. Como d es conocido y 2θ se mide experimentalmente en el goniómetro, puede deducirse el valor de λ de la línea difractada. Una vez conocido λ , puede caracterizarse el elemento emisor (análisis cualitativo), y midiendo la intensidad de la radiación se deduce la concentración atómica (análisis cuantitativo).

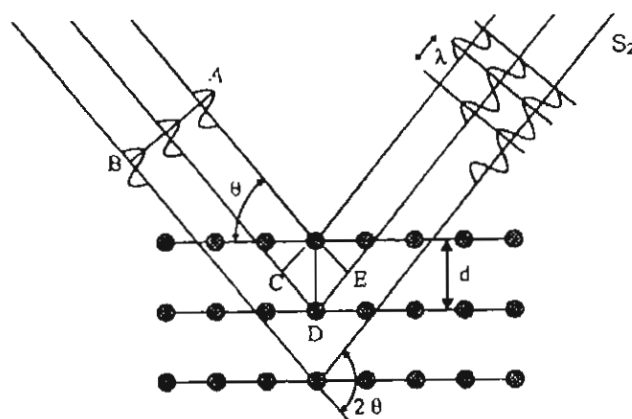


Figura 2. Ley de Bragg

Detectores de Rayos X

Todos los métodos para la detección de los rayos X en los espectrómetros, están basados en el empleo de detectores electrónicos. Estos pueden clasificarse en

dos grupos: 1) detectores de ionización gaseosa y 2) detectores de estado sólido; un tercer grupo lo constituyen los detectores de semiconductores (Si o Ge).

En los detectores de ionización gaseosa, la energía de los rayos X incidentes se invierte en producir ionizaciones en los átomos de un gas inerte; los electrones originados son atraídos por un ánodo o colector, produciéndose débiles corrientes eléctricas, representativas de la intensidad de los fotones incidentes.

El detector de estado sólido más empleado es el de centelleo. Su modo de operación está basado en la propiedad que tienen algunas sustancias (antraceno, terfenilos, estilbeno, xileno, etc.) de producir luminiscencia por la acción de los rayos X, los fotones luminosos que produce cada rayo X, actúan sobre un fotocátodo, liberando electrones del mismo; estos electrones son amplificados en número a través de un tubo fotomultiplicador, manifestándose pequeñas señales eléctricas.

Análisis cualitativo

Mediante el uso de la ley de Bragg, se realiza muy sencillamente barriendo con el goniómetro una zona angular suficientemente amplia (por ejemplo, $10^\circ - 120^\circ 2\theta$). Valores normales de la velocidad angular del goniómetro son $0,5^\circ$, $1,0^\circ$, $2,0^\circ 2\theta/\text{min}$. Los máximos de las líneas características detectados aparecen registrados en función de los valores angulares 2θ correspondientes al cristal analizador empleado.

Este análisis presenta las siguientes ventajas e inconvenientes:

- Técnica no destructiva y aplicable a muestras sólidas, líquidas y gaseosas.
- Escasas interferencias espectrales.
- El espectrograma proporciona información semicuantitativa.
- El análisis de los elementos más ligeros presenta serias dificultades.

- Sensibilidad relativamente baja.

Análisis cuantitativo

Se realiza situando el goniómetro en la posición angular de una línea convenientemente elegida del elemento que se desea determinar. La intensidad de esta línea es, en principio, proporcional a la concentración, en cuyo caso los resultados analíticos se obtienen utilizando muestras patrones.

Este análisis presenta las siguientes ventajas e inconvenientes³²:

- Aplicabilidad a todos los elementos del sistema periódico.
- Facilidad de preparación de muestras (líquidas y sólidas).
- Elevada precisión de los resultados.
- Baja sensibilidad para los elementos de menor número atómico.

3.7.3. Microscopía Electrónica

Con la microscopía electrónica es posible conocer qué elementos contiene la muestra, en qué porcentaje y cómo están distribuidos. Antes de ver una muestra, esta debe pasar por uno o varios procesos de preparación para estar en posibilidad de ser analizada, ya que se trabaja al vacío. Cuando el objeto es metálico se le hace un corte con un ultramicrotomo, de manera que se pueda colocar en una rejilla de aproximadamente 1 mm de diámetro. Si se trata de materia orgánica (piel, sangre, fruta, etcétera), debe pasar, entre otros, el proceso de deshidratación, el de microtomía, y aplicársele un recubrimiento metálico con un dispositivo denominado Sputtering.

La imagen obtenida y amplificada puede ser vista en una pantalla que forma parte del microscopio o imprimirse. Otra posibilidad es digitalizar las imágenes para

poder trabajar con ella en una computadora. De esta manera es posible darle color a los contornos o resaltar las zonas de mayor interés³³.

Cuando los rayos de luz emanados de una fuente puntual, atraviesan una lente de semiapertura angular α , la imagen no es puntual, sino que por fenómenos de difracción se obtiene un conjunto de discos de intensidad decreciente, conocidos como discos de Airy. En el disco central se encuentra el 84% de la intensidad incidente.

El poder de resolución de un microscopio viene impuesto por la longitud de onda de la fuente de iluminación. El microscopio electrónico permite alcanzar un límite de resolución que en ciertas condiciones, llega a ser inferior al doble del átomo de uranio (5 Å aproximadamente).

Puesto que los electrones del haz poseen las características ondulatorias, es posible utilizarlos para construir microscopios. Si el haz de electrones es acelerado por una diferencia de potencial V , la energía cinética que adquieren los electrones es: $\frac{1}{2} m v^2 = eV$, siendo m la masa y e la carga del electrón. La velocidad v que adquieren es, por lo tanto: $v = \sqrt{(2eV/m)}$. Esta velocidad determina la longitud de onda correspondiente, dependiendo del potencial acelerante. $\lambda = h/\sqrt{2meV} \approx 0,1\sqrt{(150/V)}$

Potenciales acelerantes de 50 – 60 kV son frecuentes en microscopía electrónica, siendo por lo tanto la longitud de onda asociada del orden de picómetros. Teóricamente, la resolución de un microscopio electrónico caería dentro de unos niveles similares a las distancias existentes entre los átomos de una molécula. Sin embargo, técnicamente es difícil lograr resoluciones superiores a 0,10 – 0,12 nm, casi imposibles de lograr en muestras biológicas.

Interacción electrón – muestra

Las formas más importantes de interacción entre un haz de electrones de alta energía y la muestra a estudiar (Figura 3), descendiendo a nivel atómico, pueden explicarse según tres patrones.

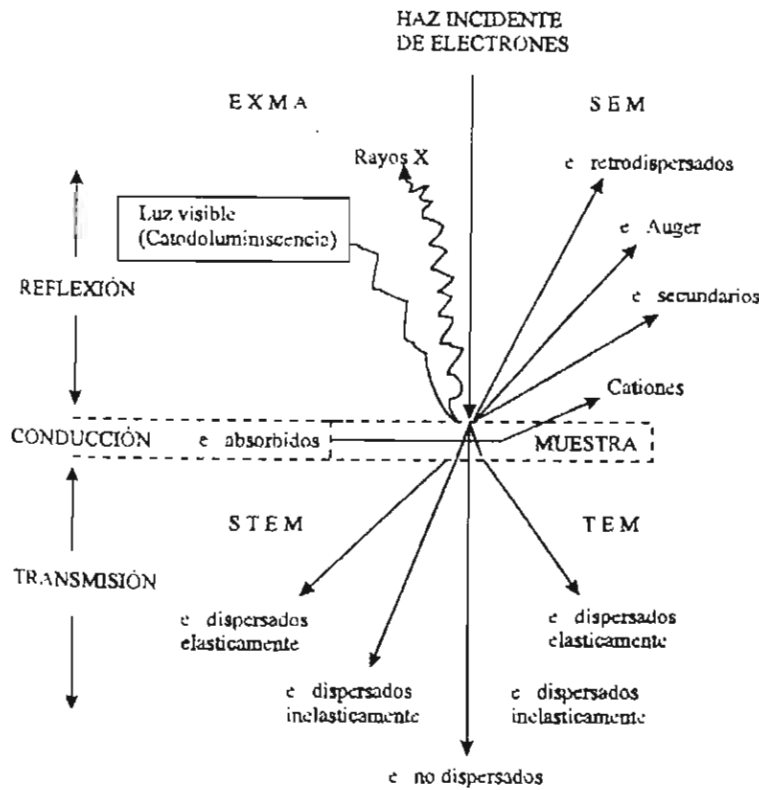


Figura 3. Interacción entre un haz de electrones y la muestra

- El electrón incidente no choca con ningún átomo de la preparación, transmitiéndose sin sufrir dispersión.
- El electrón choca (interacción) con el núcleo atómico. La gran diferencia de masas entre ambos, hace que el electrón sea dispersado sin que haya intercambio de energía. La dispersión es, por tanto, de tipo elástico. El ángulo de dispersión puede ser pequeño, transmitiéndose el electrón, o muy grande, reflejándose.

c) El electrón incidente colisiona con un electrón de la muestra (preparación). Al tener la misma masa, tienden a intercambiar su energía, la dispersión es inelástica, en consecuencia el electrón incidente pierde velocidad, aumentando la longitud de onda. El ángulo de dispersión es menor que en el caso anterior, y por tanto, todos los electrones son transmitidos.

Durante la dispersión inelástica tienen lugar otros fenómenos, como son la emisión de radiación electromagnética y de electrones. La primera es fundamentalmente de rayos X, aunque hay también emisión dentro del espectro visible, la cual se debe a la energía que pierde el electrón incidente durante su frenado y por la energía liberada por los electrones de la muestra en sus saltos de orbital, como resultado del bombardeo por el haz incidente. Si el electrón bombardeado se encuentra en el orbital más extremo, la ganancia energética no se empleará para emitir radiación electromagnética, sino para ser expulsado del átomo. El haz incidente es capaz de desplazar a un electrón de la preparación, que siempre se emite. Se denominan electrones secundarios porque no son los incidentes, sino emitidos por la preparación.

Los electrones dispersados inelásticamente pierden velocidad. Junto con los no dispersados nos encontramos con un haz transmitido, que no se encuentra en fase. El resultado es que el haz sufrirá aberración cromática, es decir, que la imagen se formará en más de un plano, siendo de baja calidad. La probabilidad de dispersión será tanto mayor como mayor sea el grosor de la preparación. La dispersión será además directamente proporcional al número atómico, dado que el número de electrones es mayor.

Según la Figura 3, algunos electrones son absorbidos por la muestra; ésta tiene lugar tras una serie de colisiones inelásticas que reducen la velocidad del electrón hasta que puede ser atrapado. La transferencia de energía a la preparación se traduce en su calentamiento. El material biológico es mal conductor del calor, por lo que en las zonas donde la masa-grosor es alta, se producirá un

sobrecalentamiento, que se traduce en vibraciones e incluso ruptura de la muestra.

3.7.3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Con la ayuda de la microscopía de transmisión se pueden analizar muestras de cualquier elemento, desde el Hidrógeno hasta los elementos sintéticos. Es posible discernir el interior de la muestra con una definición de hasta 0,14 nm³³.

Este sistema consiste en la obtención de imágenes mediante la recolección de los electrones difractados por la muestra, el haz de electrones es condensado por campos electromagnéticos creados por imanes y atraviesa la muestra, la imagen resultante es plana, en dos dimensiones³².

Patrón de Difracción

Cualquier especie cristalina produce siempre un diagrama de difracción característico, y si la muestra está constituida por una mezcla de diferentes especies, el diagrama correspondiente manifestará la suma de efectos de difracción de cada una de ellas. El diagrama de difracción puede ser considerado, por lo tanto, como la huella dactilar de la fase cristalina que lo ha producido, pudiendo ser usado para su inequívoca identificación. La característica más interesante deriva del hecho de que la información que proporciona se refiere en exclusiva a la fase cristalina íntegramente considerada, independientemente de los elementos que la integran.

El fenómeno de la difracción es esencialmente un proceso de dispersión de las radiaciones por un conjunto de átomos, como ocurre en un cristal, dispuestos regularmente en el espacio. Los rayos dispersados por cada átomo se refuerzan en determinadas direcciones del espacio, produciéndose interferencias

constructivas de ondas, originándose una onda resultante reforzada, cuya amplitud es la suma de las amplitudes parciales de cada componente.

Índices de Miller

En cristalografía es conveniente caracterizar a un cristal en términos de una serie de planos. Pueden trazarse varios planos con orientaciones diferentes (AA' , BB' , CC' , etc.) procurando que cada plano contenga algunos de los puntos reticulares. Paralela a cualquier plano existe una serie completa de planos que pueden generarse a partir de éste aplicando la traslación del retículo unitario. Los planos AA' , BB' , ... se marcan de acuerdo con sus intersecciones sobre los ejes a , b y c medidos a partir de un origen seleccionado en forma arbitraria. Por ejemplo, el plano CC' interfecta los ejes en a , $4b$ e ∞ . A continuación se toman los recíprocos de las intersecciones. Entonces las fracciones se simplifican multiplicando cada cantidad por el mínimo común denominador, el cual, en este caso, es 4 (se excluye el infinito). Esto da lugar a tres números $(4,1,0)$, los cuales se conocen como índices de Miller del plano. Por lo general, los índices de Miller (h,k,l) de cualquier plano dan la orientación del mismo en el cristal con referencia a sus tres ejes internos (Figura 4)³⁴.

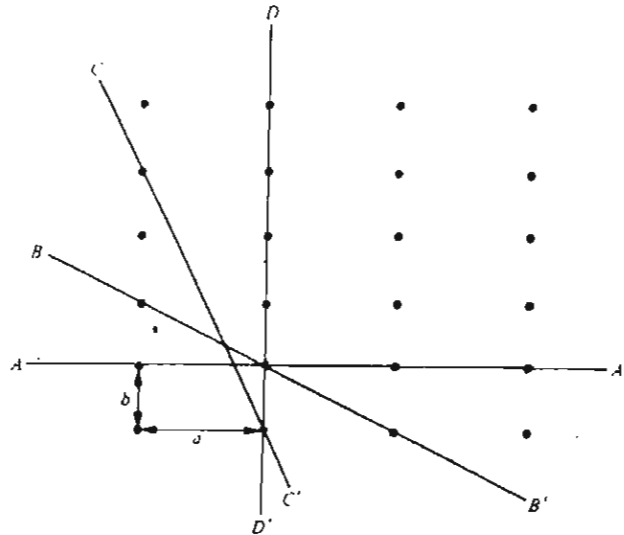


Figura 4. Retículo bidimensional de una serie de planos para calcular los índices de Miller

3.7.3.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Es una de las técnicas más versátiles para la visualización y el análisis de las características microestructurales de muestras sólidas, debido, principalmente, a su elevada resolución (alrededor de 2 nm) y a su gran profundidad de campo, lo que permite una observación tridimensional³².

La imagen se forma de manera secuencial por tratamiento de las informaciones suministradas al interaccionar un haz de electrones que barre el objeto. Estos microscopios forman la imagen por reflexión o por transmisión, pero sobre todo por emisión secundaria. En este último tipo la imagen puede ser formada no solamente por los electrones emitidos sino por los secundarios, rayos X, infrarrojos, iones y hasta ondas sonoras.

Este microscopio es parecido a la sonda electrónica. La parte más importante es el sistema de formación de imágenes gracias al haz de electrones muy fino, al dispositivo de barrido y a la ubicación de los detectores. La muestra barrida por la sonda electrónica es la fuente de los diversos fenómenos ya descritos. Algunos de estos efectos pueden dar lugar a la formación de imagen si se dispone del detector correspondiente capaz de transformar el efecto obtenido del objeto en señal eléctrica. La operación de barrido está sincronizada con la plana en donde está situado el objeto. La intensidad del haz es proporcional a la intensidad de la señal proporcionada por el detector que a su vez depende del objeto.

En el sistema de barrido la sonda se desplaza sobre el objeto por un sistema de deflexión, bobinas electromagnéticas, alimentadas por un generador de barrido en un gran intervalo de períodos. El aumento está determinado por la relación entre la amplitud del barrido de imágenes que está fijo y aquella del barrido del objeto que es regulable. El instrumento lleva dos tubos de imágenes, cuyo barrido está sincronizado con el objeto.

Para la visualización de las imágenes se dispone de una pantalla de resolución y dimensiones grandes. Los microscopios llevan un sistema de barrido según las adaptaciones a televisión para la observación de los distintos aumentos a distancia en un monitor.

La formación de imágenes por los electrones secundarios es la manera de formación de imágenes base en los microscopios más utilizados. Los electrones secundarios emitidos sufren en su alrededor pérdidas de energías aleatorias a lo largo de su trayecto en la superficie. Se dispersan emitiendo un espectro extenso con un máximo hacia energías más débiles del orden de 50 eV. Las afirmaciones que lleva no se pueden utilizar para caracterizar los átomos que los emiten, pero dan una sección transversal grande, la relación señal ruido es muy favorable a la formación de imágenes. La detección se realiza mediante escintilación acoplado a un fotomultiplicador.

Para la observación de la muestra es necesario disponer de una técnica preparativa que dependerá del tipo de muestra, para el caso de muestras orgánicas como material granular y/o cristalino de las materias primas o preparados farmacéuticos, se suele dispersar la muestra sobre una película adhesiva colocada en un soporte metálico, a la que posteriormente se le aplica una película de oro o carbón como medio conductor y de contraste mediante condensación de vapor al vacío.

Así pues, el grosor de la muestra será variable, de tal forma que para una resolución de 10 nm el espesor debe ser como máximo de 0,1 μm , y de 5 nm a 10 nm de espesor si se requiere una resolución de 1 nm³².

IV. HIPÓTESIS

El cambio de las variables en el proceso de obtención de nanopartículas, tales como: intensidad de sonicación, velocidad de agitación y condiciones de precipitación, determinarán el tamaño y morfología de los acuosomas, así como la adsorción del principio activo en los mismos.

IV. OBJETIVOS

5.1. General

- ✓ Elaborar nanopartículas en forma de acuosomas para su uso como transportador de fármacos muy poco solubles en medios acuosos.

5.2. Específicos.

- ✓ Obtener nanopartículas de fosfato de calcio como núcleo inorgánico para elaborar acuosomas.
- ✓ Recubrir los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio con una película superficial de lactosa.
- ✓ Adsorber Indometacina a la película superficial de lactosa que recubre el núcleo inorgánico de fosfato de calcio.
- ✓ Determinar la composición química, estructura, morfología y granulometría de los acuosomas obtenidos con y sin principio activo.

METODOLOGÍA

6.1. Materiales y Equipos

6.1.1. Reactivos

- ✓ Cloruro de Calcio (J. T. Baker).
- ✓ Fosfato monobásico de Sodio (J. T. Baker).
- ✓ Lactosa (Helm de México, S. A.).
- ✓ Indometacina ($C_{19}H_{16}ClNO_4$)
- ✓ H_2O bidestilada.
- ✓ Acetona industrial (J. T. Baker).
- ✓ Etanol (J. T. Baker).
- ✓ Cloroformo (J. T. Baker).
- ✓ Reactivo de Butvar (Terpolímero de butil, alcohol y acetato de polivinilo) (EMS).
- ✓ Hielo y hielo seco.

6.1.2. Materiales y Equipos

- ✓ Liofilizadora Labconco Serie 67974.
- ✓ Difractómetro de Polvos de Rayos X Brooker Modelo AXS-D8 Advance.
- ✓ Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL, Modelo JEM-100CX y Modelo JEM-1200EX.
- ✓ Mallas de cobre de 300 orificios de 3 mm diámetro.
- ✓ Porta mallas de cobre de 3 mm de diámetro.
- ✓ Microscopio Electrónico de Barrido, JEOL Modelo JSM-5200.
- ✓ Sonicador Vibracell Sonics Modelo VC600-2.
- ✓ Agitador mecánico Termolyne Modelo SP46925.
- ✓ Balanza Analítica Ohaus Explorer.
- ✓ Balanza granataria Ohaus Serie AA 53369.
- ✓ Evaporadora de carbón, Fullam Inc. Modelo 12560-1189-203.

- ✓ Ultrafiltradora Millipore Modelo 166865.
- ✓ Membranas Millipore de nitrocelulosa 0,22 μm de diámetro de poro.
- ✓ Rotavapor con baño, Büchi Modelo R110.
- ✓ Estereoscopio Bausch & Lomb Modelo Stereo Zoom5.
- ✓ Bomba de vacío de ¼ HP, General Electric Modelo 2C48GAX, Serie KC.
- ✓ Estufa bacteriológica Blue M Electric Co., Modelo 200A Serie C-4008-Q.
- ✓ Termómetro (-20 a 110°C) Taylor Sama CT1S.

6.1.3. Programas computacionales

- ✓ SPSS® versión 10.0
- ✓ Adobe Photoshop®.
- ✓ pStyler®.
- ✓ AnalySIS Image Processing®.

6.2. Desarrollo experimental

Para el desarrollo de las diferentes actividades realizadas durante el presente trabajo de investigación se dispuso de la infraestructura y apoyo académico del personal de los Laboratorios de Farmacia Molecular y Liberación Controlada y de Fármacos Huérfanos de la Planta Piloto de la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, así como del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física y del Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo experimental de la investigación se efectuó en tres diferentes etapas para obtener acuosomas de indometacina, como sigue: en la primera etapa, se obtuvieron los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio, en la segunda etapa, se recubrieron los núcleos inorgánicos con una película de lactosa, y en la tercera etapa, se adsorbió el fármaco modelo (indometacina) a la película de lactosa que recubre los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio.

Etapa 1. Se prepararon núcleos inorgánicos por precipitación de una solución de CaCl_2 0,75 M con una solución de Na_2HPO_4 0,25 M, de conformidad a las condiciones establecidas en el esquema de la Tabla 6.1.

Variable	Lote1	Lote2	Lote3	Lote4	Lote5	Lote6
Agitación	2	2	4	4	6	6
Sonicación (pulsos)	30	30	60	60	90	90
Precipitación	A.S.	D.S.	A.S.	D.S.	A.S.	D.S.

A.S. = Antes de sonicar.

D.S. = Durante sonicación.

Tabla 6.1. Condiciones de elaboración de los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio.

Durante la obtención de la dispersión de fosfato de calcio, el proceso estuvo sometido a tres condiciones de sonicación; suave (30), media (60) e intensa (90), durante 90 minutos a 4°C, así como de agitación (2, 4 y 6). El producto se filtró al vacío con membrana de 0,22 μm y se liofilizó para obtener los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio (Figura 6.1). Cabe mencionar que el residuo de partículas mayores a 0,22 μm de fosfato de calcio retenido en la membrana, se cuantificó para estimar el rendimiento del proceso.

Etapa 2. Los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio se recubrieron con una película superficial de lactosa (Figura 6.2), mediante soluciones de lactosa al 0,03 M; 0,06 M y 0,09 M, respectivamente, que se adicionaron a dispersiones de 1 mg/mL de los núcleos inorgánicos. Se aplicó agitación mecánica media (4) durante 90 minutos para formar la película superficial sobre éstos, se filtró al vacío y la solución filtrada se secó por evaporación a presión reducida.

Etapa 3. Para la adsorción de la indometacina sobre la película superficial de lactosa depositada en los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio, se elaboraron soluciones saturadas de indometacina con acetona, cloroformo y éter etílico (Figura 6.3). Las soluciones de indometacina se mezclaron con dispersiones de 1

mg/mL de los núcleos inorgánicos recubiertos con lactosa, agitando mecánicamente (velocidad 6) durante 90 minutos para adsorber el fármaco a éstos, y se secó por evaporación a presión reducida.

Cabe mencionar que en cada una de las etapas se realizaron estudios de Difractometría de Rayos X de Polvos, Microscopía Electrónica de Transmisión y de Barrido y análisis de granulometría para conocer la composición, tamaño y morfología de las nanopartículas. Los resultados obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS® versión 10.0.

6.2.1. Preparación de soluciones

Se llevaron al aforo de 500 mL con agua bidestilada: 55,13 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 44,77 g de Na_2HPO_4 , para obtener soluciones de 0,75 M y 0,25 M, respectivamente. Cabe mencionar que estas soluciones se precipitaron por goteo a razón de 150 – 160 gotas por minuto, utilizando equipos de venoclisis.

6.2.2. Sonicación

Durante y después de la precipitación a 4°C de las soluciones anteriores, se aplicó ultrasonido durante 90 minutos, utilizando frecuencias de sonicación de 3, 6 y 9 para los lotes 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, respectivamente, con agitación mecánica durante todo el proceso.

6.2.3. Filtrado

Después de sonicar, la dispersión resultante se filtró al vacío utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,22 μm de diámetro de poro, de esta manera se obtiene la solución con los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio y se elimina el exceso de material, el cual se secó y pesó para calcular el rendimiento de la reacción.

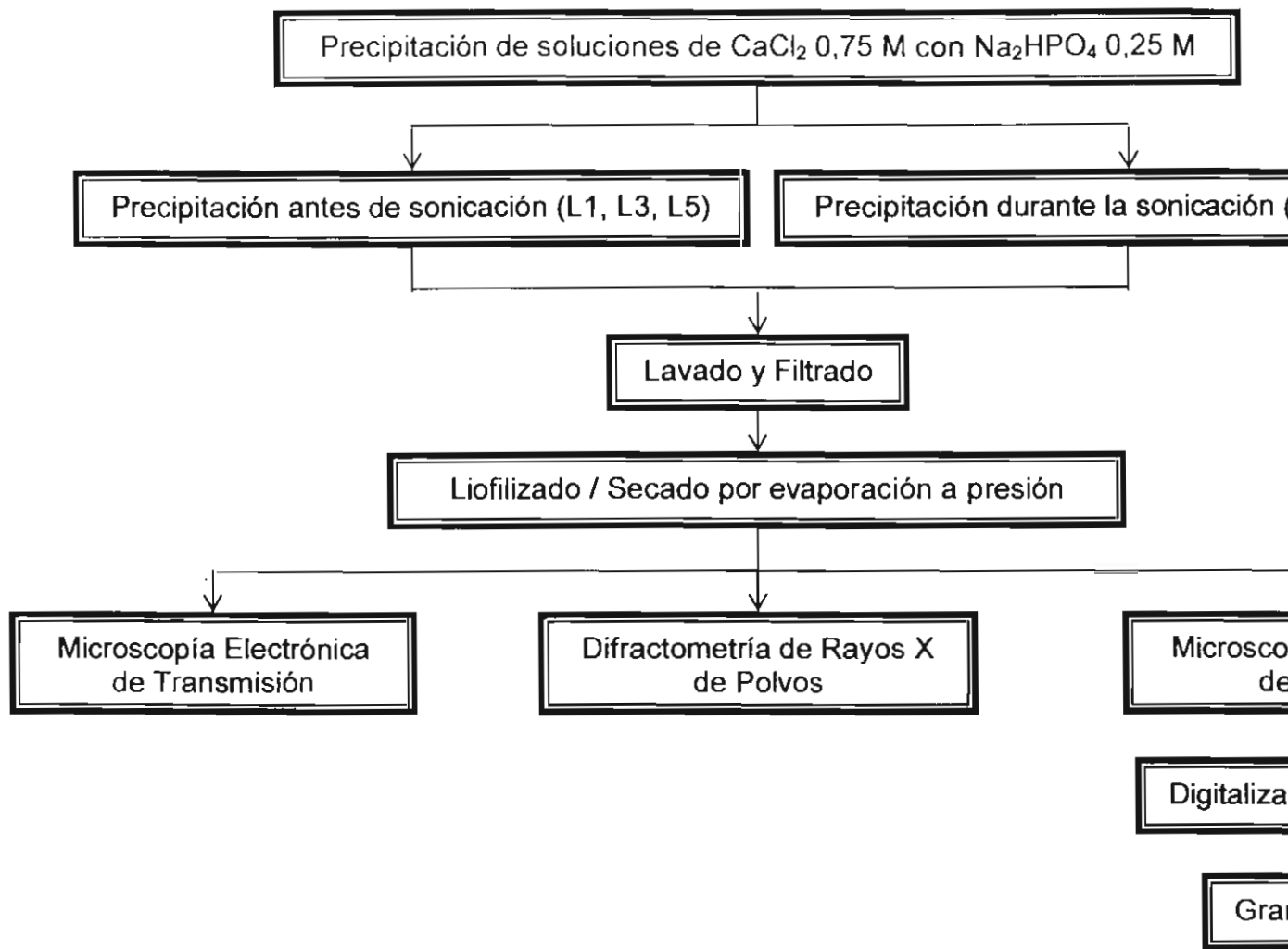


Figura 6.1. Diagrama de elaboración de núcleos inorgánicos de fosfato de calcio.

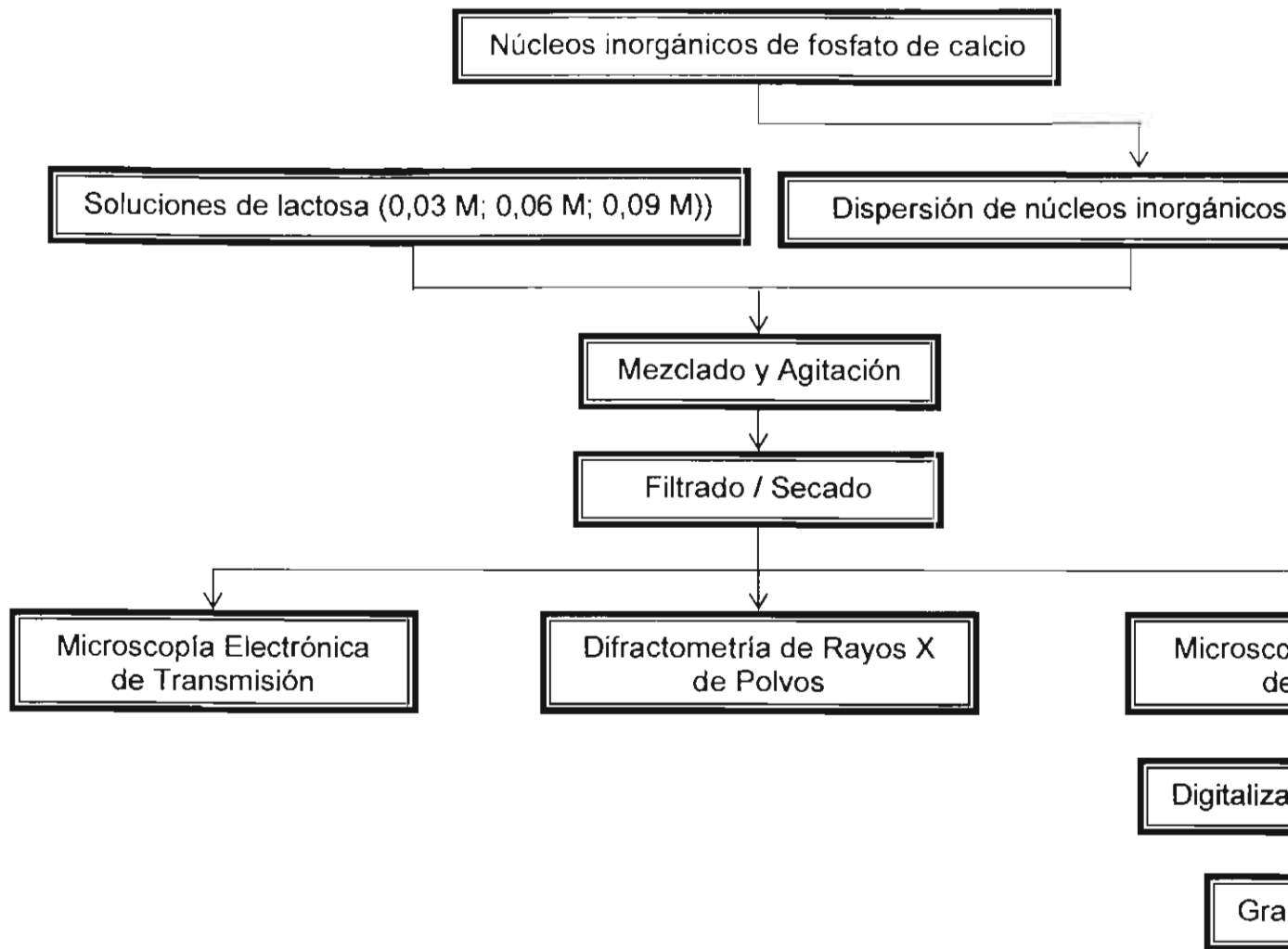


Figura 6.2. Diagrama de recubrimiento de los núcleos inorgánicos de calcio con la película superficial.

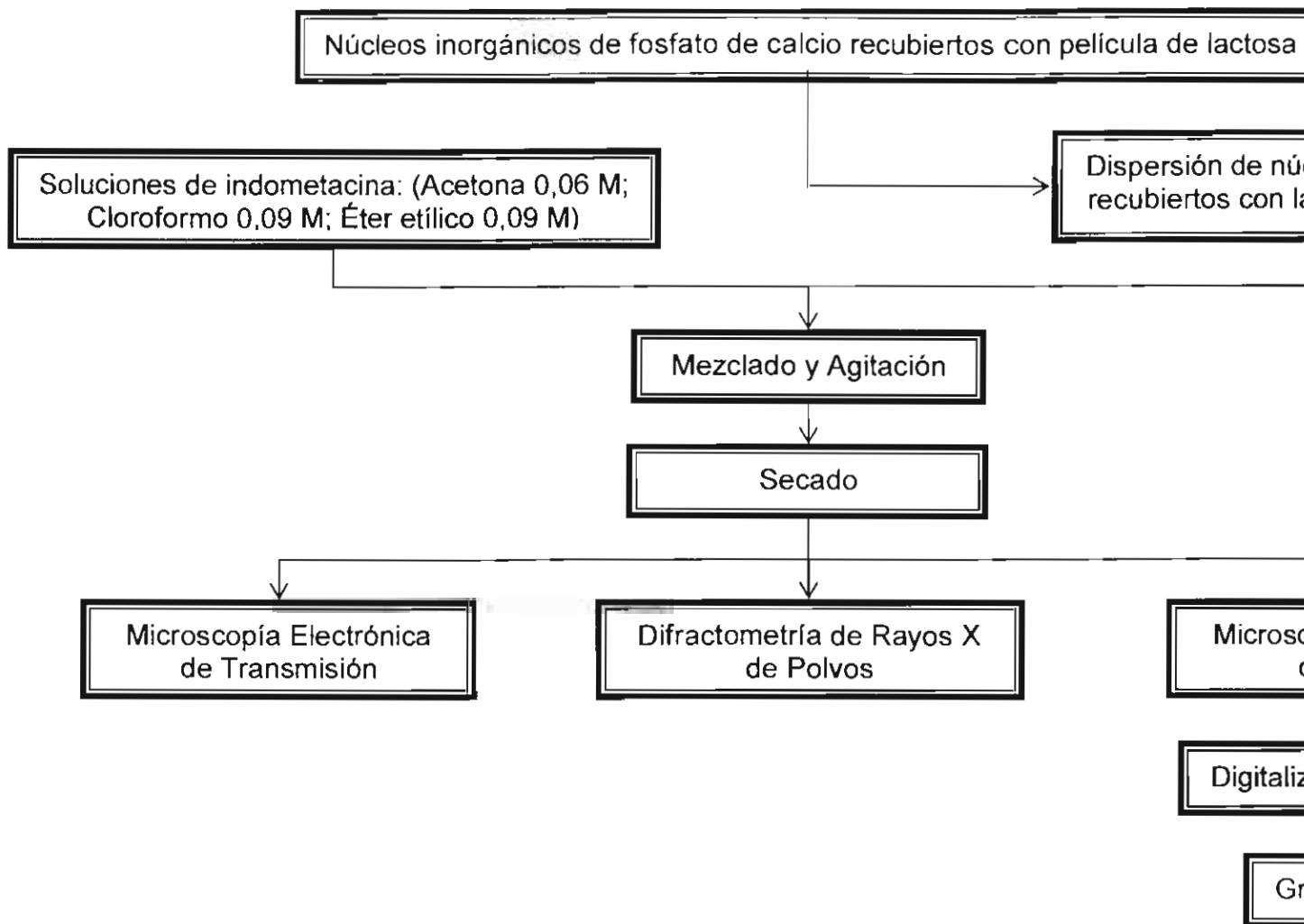


Figura 6.3. Diagrama de adsorción del fármaco modelo (indometacina) a la película de lactosa que recubre a los fosfato de calcio.

6.2.4. Liofilización

Esta operación unitaria de secado por sublimación, se realizó para separar los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio de la solución filtrada y efectuar los estudios de identificación y granulometría. Se colocaron 3 mL de cada muestra o lote en frascos para inyectables, las cuales fueron congeladas utilizando hielo seco disuelto en acetona industrial, para posteriormente colocarlas en el liofilizador.

En este apartado es preciso mencionar que se realizó una prueba separada de dos lotes, la cual consistió en secar estos por evaporación a presión reducida. Posteriormente, en la etapa 2 y etapa 3 se utilizó el secado por evaporación para obtener las nanopartículas.

6.2.5. Núcleos inorgánicos de fosfato de calcio recubiertos con lactosa

Para formar una película superficial polihidroxicarbonada sobre los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio, se prepararon dispersiones de núcleos inorgánicos de 1 mg/mL, a las cuales se les agregaron 100 mL de lactosa 0,03 M, 0,06 M y 0,09 M con agitación mecánica durante 90 minutos. La dispersión resultante se filtró al vacío con membranas de nitrocelulosa de 0,22 μm de diámetro de poro, secando ésta por evaporación a presión reducida para obtener las nanopartículas.

6.2.6. Adsorción del fármaco modelo al núcleo recubierto con lactosa

Se prepararon soluciones de indometacina en tres diferentes concentraciones y disolventes (acetona 0,06 M, cloroformo 0,09 M, éter etílico 0,09 M), a las que se le agregaron los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio recubiertos con lactosa en concentración de 1 mg/mL, agitando mecánicamente durante 90 minutos y se

secó por evaporación a presión reducida la dispersión resultante para obtener las nanopartículas.

6.2.7. Tratamiento de las Muestras para Análisis Instrumental

6.2.7.1. Difractometría de Rayos X

Las muestras se colocaron en el porta muestras del difractómetro de rayos X de polvos para determinar la composición química de cada una de éstas.

6.2.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (M.E.T.)

En este estudio se obtuvieron los campos claro y oscuro para determinar la presencia de los tres componentes de los acuosomas (un núcleo de fosfato de calcio recubierto con una película superficial de lactosa y la indometacina adsorbida a ésta última). Los negativos obtenidos fueron digitalizados mediante el paquete Adobe Photoshop®, y las imágenes resultantes mediante el paquete pStyler® aplicando la técnica de falso color.

Asimismo, por medio del patrón de difracción se determinó la estructura de los cristales, y de los campos claro y oscuro y se obtuvo un aproximado del intervalo del tamaño de partícula (< 200 nm). Mediante los campos claro y oscuro se observó la presencia del núcleo de calcio recubierto con lactosa e indometacina. Las muestras fueron colocadas en una malla de cobre de 3 mm de diámetro y posteriormente en el microscopio para su observación.

6.2.7.3. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.)

Se llevó a cabo para observar la morfología y distribución de las nanopartículas, así como para determinar el tamaño de partícula. Cada una de las muestras

fueron colocadas en el porta muestras mediante una cinta adhesiva de doble cara e introducidas en una cámara al vacío del microscopio para obtener la imagen.

6.2.7.4. Análisis *Granulométrico*

Se realizó a partir de las fotografías obtenidas por la M.E.B. para conocer el intervalo de tamaño de las nanopartículas. Las fotografías se digitalizaron por medio del paquete Adobe Photoshop® y las mediciones para obtener la distribución de tamaño se realizaron mediante el paquete AnalySIS Image Processing®.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación, el cual fue dividido en tres etapas, en la etapa 1 se obtuvieron seis lotes de núcleos inorgánicos de fosfato de calcio (L1, L2, L3, L4, L5 y L6), tres lotes de núcleos en la etapa 2 (NL1, NL2 y NL3), y tres lotes en la etapa 3 (NLI-A, NLI-C y NLI-E). Asimismo, se realizaron dos experimentos más, el primero para comprobar la reproducibilidad en el escalamiento del proceso de síntesis de las nanopartículas, y el segundo para analizar si existía homogeneidad en los resultados de obtención de las nanopartículas, entre la operación unitaria de liofilización y el secado por evaporación a presión reducida.

La caracterización se realizó por medio de la determinación de la composición química, la estructura, la morfología y la granulometría de las nanopartículas, para lo cual se emplearon las técnicas instrumentales complementarias de microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X de polvos, así como la digitalización de las imágenes obtenidas mediante las técnicas mencionadas.

7.1. Etapa 1. Obtención de los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio

Durante esta etapa, en primer lugar se empleó la microscopía electrónica de transmisión, por medio de la cual se obtuvieron los patrones de difracción de los seis lotes (Figura 7.1). Con estos primeros resultados se determinó la estructura de los cristales de fosfato de calcio formados. En los patrones de difracción se observan los nodos (puntos) característicos de la geometría de los cristales, mediante los cuales se calcularon los índices de Miller, que permiten identificar al cristal mediante los ángulos formados por los nodos que se interfectan entre sí. En este sentido, aparecen los discos de Airy, que conforme se van alejando del centro, va decreciendo su intensidad, y esto proporciona información en cuanto al tamaño de partícula de la muestra.

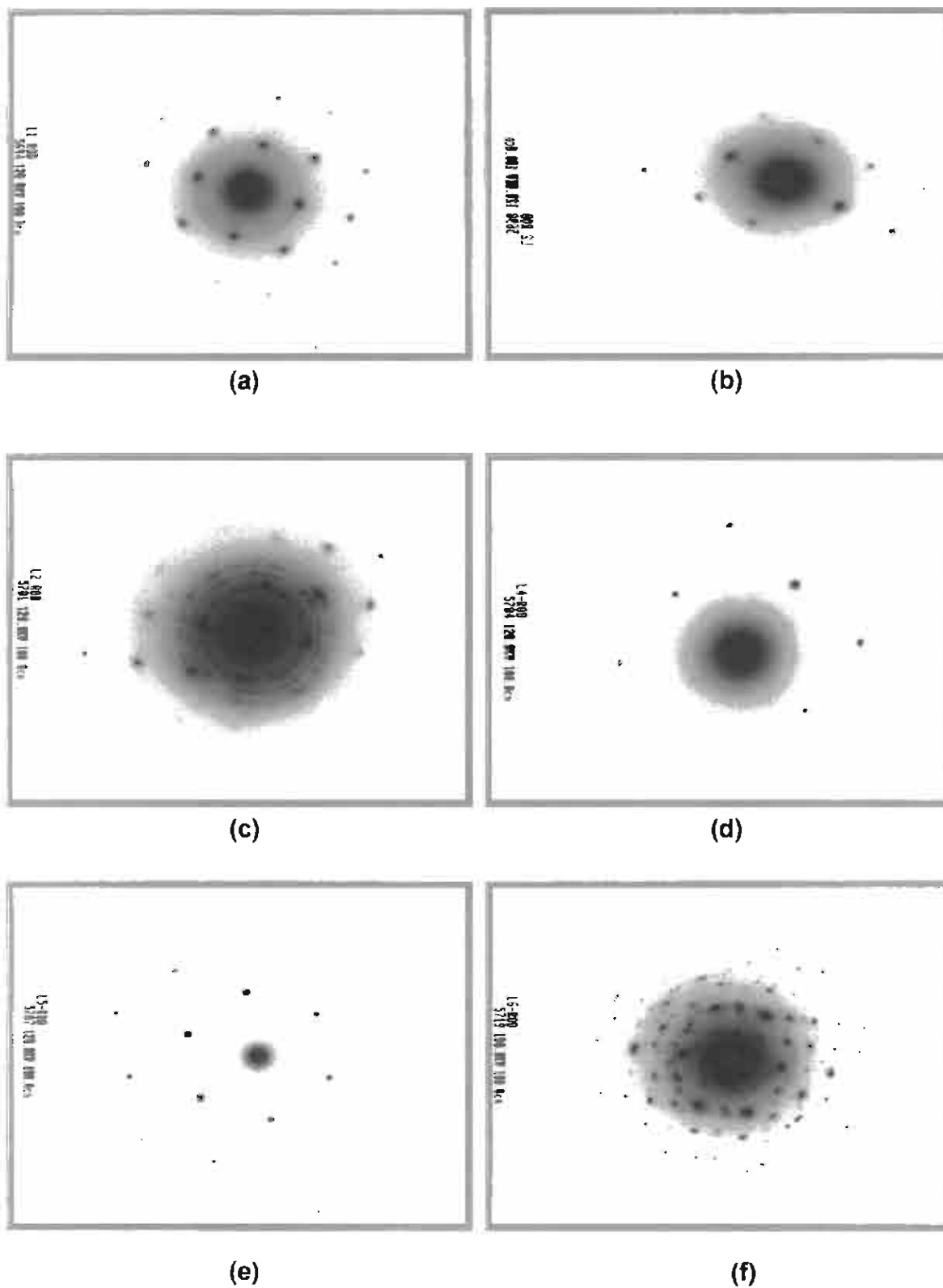


Fig. 7.1. Patrones de difracción de: a) lote 1, b) lote 2, c) lote 3, d) lote 4, e) lote 5, f) lote 6

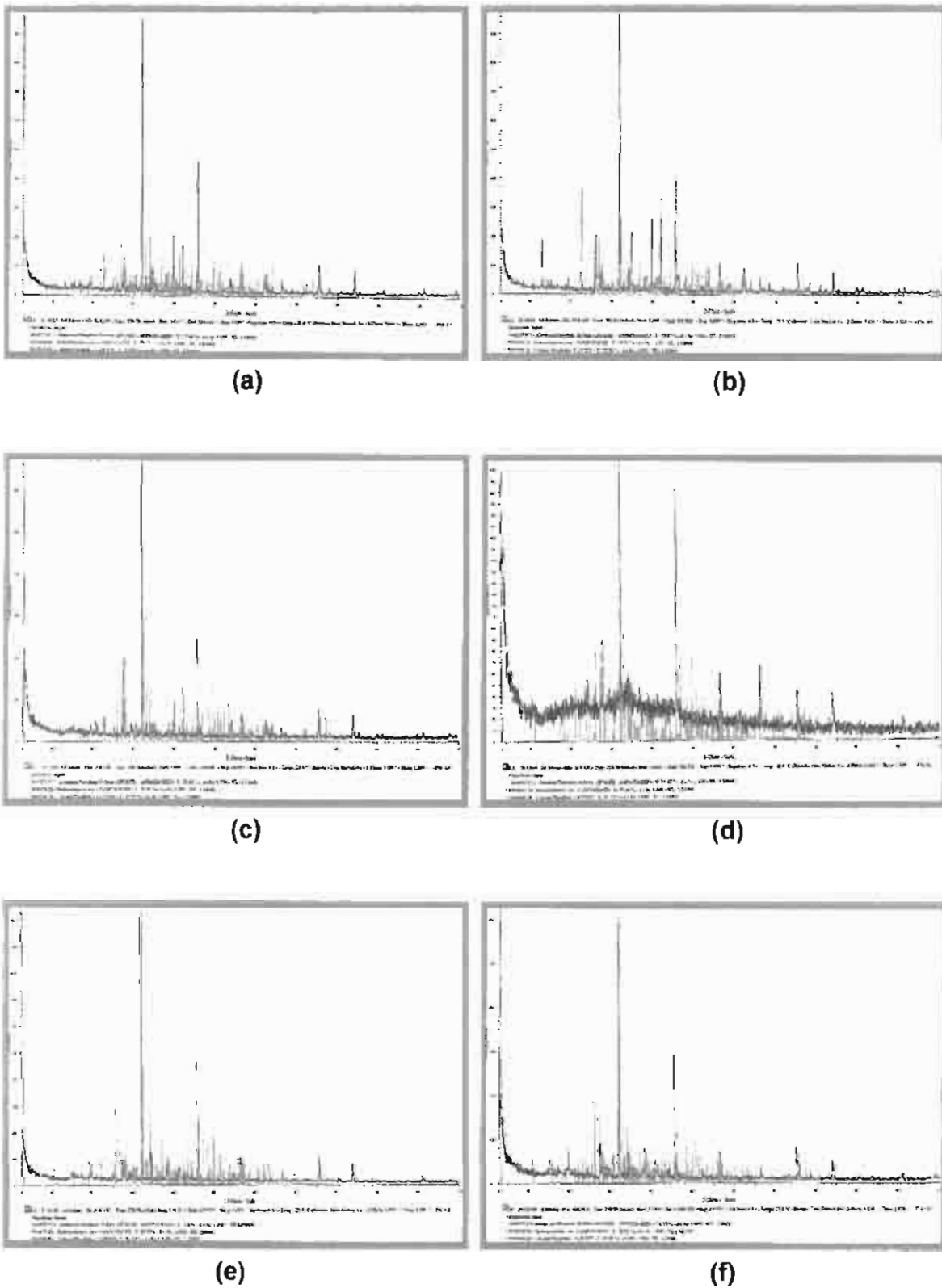


Fig. 7.2. Difractogramas de los núcleos: a) lote 1, b) lote 2, c) lote 3, d) lote 4, e) lote 5, f) lote 6

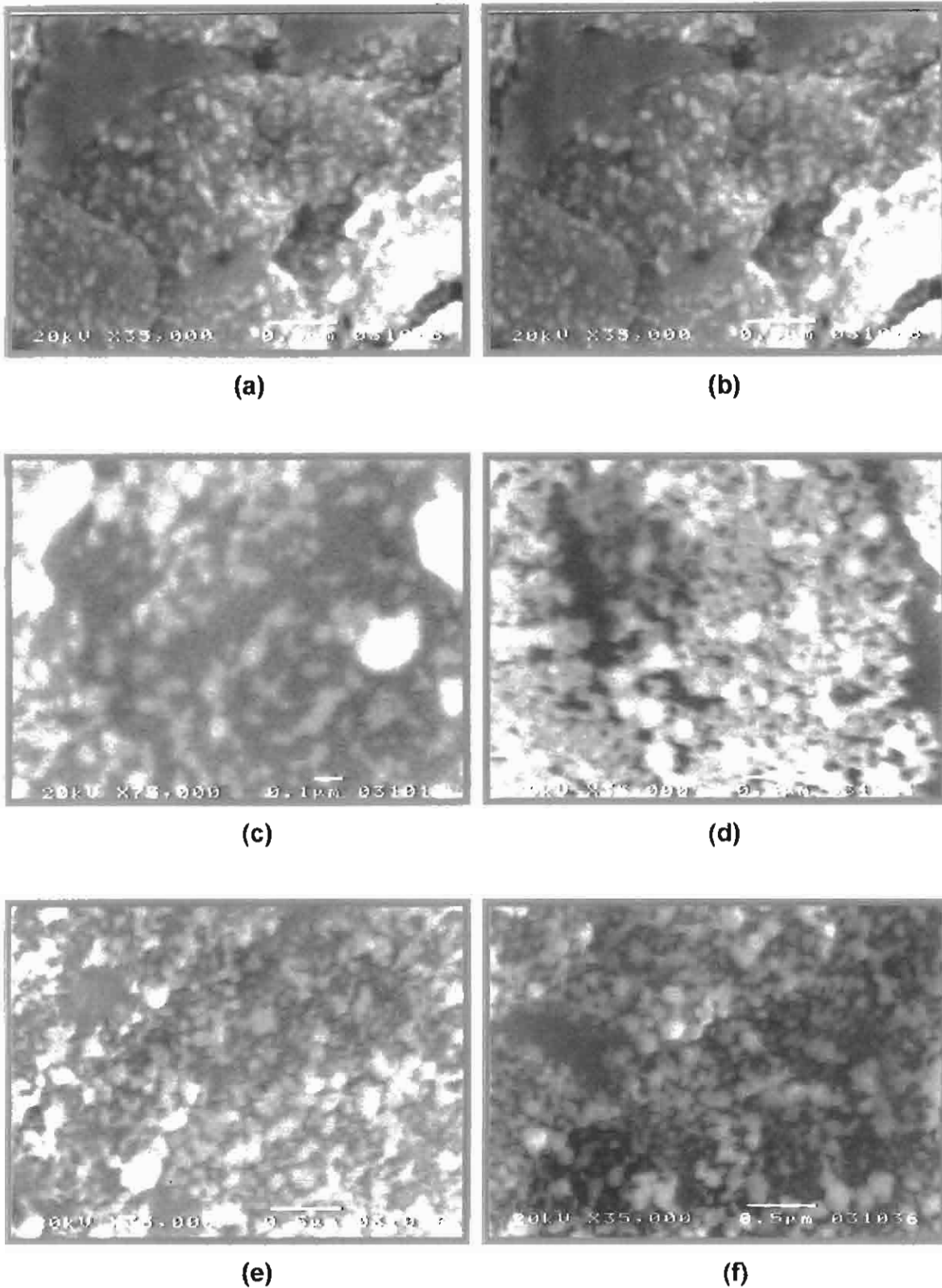


Fig. 7.3. Imágenes de barrido de: a) lote 1, b) lote 2, c) lote 3, d) lote 4, e) lote 5, f) lote 6

En segundo lugar, la determinación de la composición química de las muestras se realizó mediante difracción de rayos X de polvos, obteniéndose los difractogramas correspondientes (Figura 7.2). En estos se observan los picos más representativos del fosfato de calcio, ubicados en los valores 27, 28 y 45 de la escala 2θ del difractograma. Cabe señalar que estos resultados se respaldaron al comparar los índices de Miller obtenidos del fosfato de calcio mediante microscopía electrónica de transmisión.

Con la información obtenida al aplicar la microscopía electrónica de transmisión, de barrido y la difracción de rayos X de polvos, se demostró que estaban constituidas por fosfato de calcio, en un sistema cristalino ortorrómbico con morfología esférica y ovoide y con un intervalo de tamaño de partícula entre 30 – 200 nm.

En tercer lugar, la morfología de las nanopartículas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido, para esto se obtuvieron las imágenes tridimensionales de los seis lotes (Figura 7.3), en las cuales se observan formas esféricas y ovoides en su gran mayoría, diferenciables por un color más claro con respecto al color del soporte de fondo.

La granulometría, así como la distribución de tamaño de las muestras, se obtuvieron al digitalizar las imágenes obtenidas por medio de la microscopía electrónica de barrido.

7.1.1. Análisis estadístico de los núcleos inorgánicos

Con los datos granulométricos se obtuvieron histogramas de frecuencia de cada uno de los seis lotes de nanopartículas, encontrándose que en todos ellos se presenta un sesgo hacia la izquierda (Figura 7.4).

De esta forma, en el lote 1, se observó que la mayor proporción de partículas se agrupó en los valores de tamaño de partícula 90 a 100 nm; en el lote 2, de 70 a 90 nm; en el lote 3 y el lote 4, se observa que el tamaño fue de de 90 a 100 nm; en el lote 5, de 60 a 90 nm, y en el lote 6, de 60 a 70 nm.

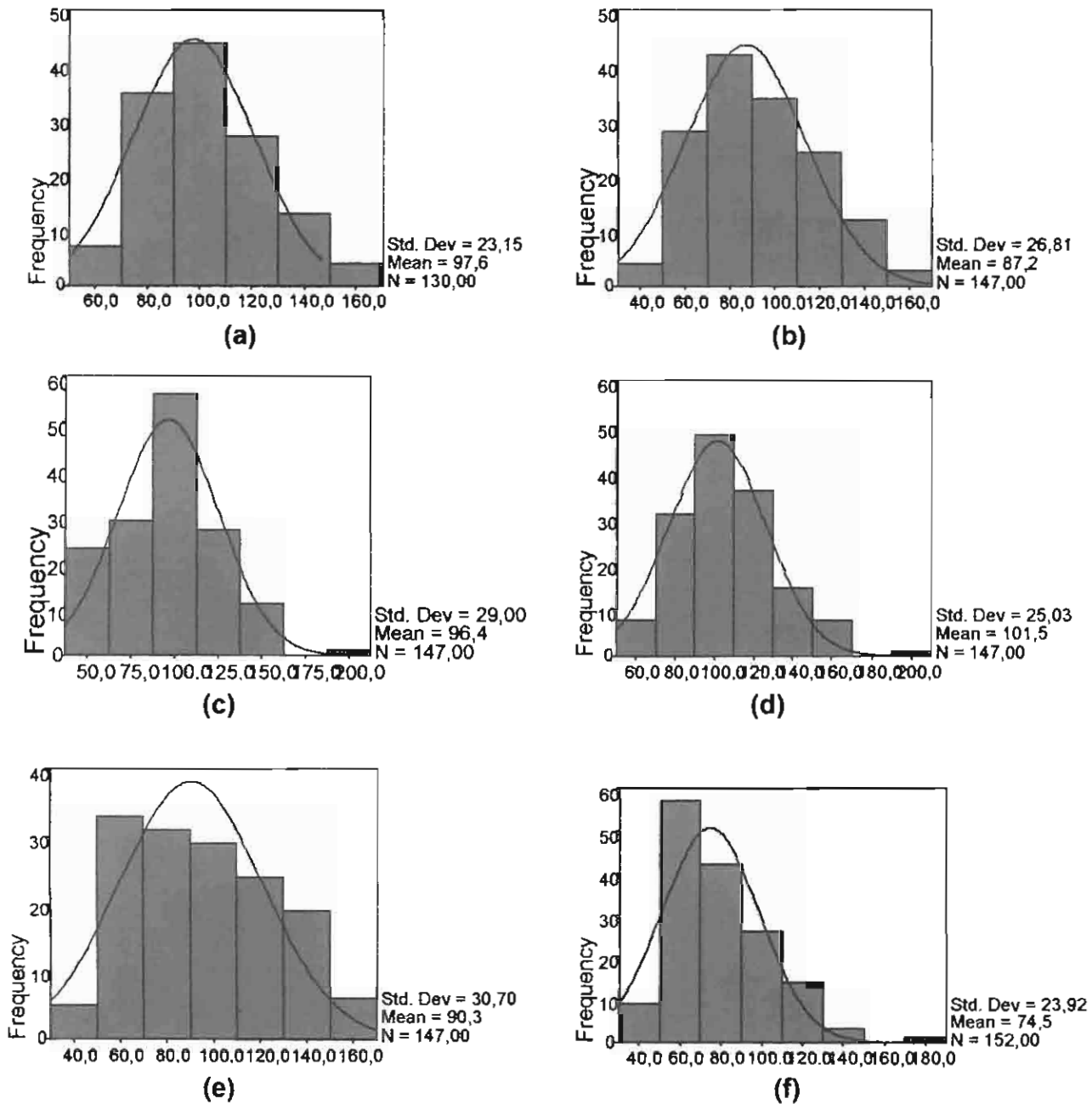


Fig. 7.4. Distribución de tamaño de partícula de: a) lote 1, b) lote 2, c) lote 3, d) lote 4, e) lote 5, f) lote 6

Para fines de elección del lote con menor tamaño de partícula, se realizó un análisis de varianza con los datos de los tamaños individuales de partícula de los seis lotes. Los resultados se presentan en la Tabla 7.1, y de acuerdo con estos, se seleccionaron las condiciones del lote seis como las adecuadas para la obtención de los núcleos inorgánicos, tomando como base el intervalo de tamaño, la frecuencia, la media y el error estándar.

Tabla 7.1. Anova de la granulometría de los seis lotes de núcleos inorgánicos

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
Agitación	2	2	4	4	6	6
Sonicación (pulsos)	30	30	60	60	90	90
Precipitación	A.S.	D.S.	A.S.	D.S.	A.S.	D.S.
Tam. Partícula (nm)	60 – 160	30 – 150	40 – 200	50 – 200	30 – 160	30 – 170
Desviación estándar	23,15	26,81	29,00	25,03	30,70	23,92
Media	97,62	87,21	84,67	83,93	84,54	74,54
Error estándar	2,02	2,21	3,09	4,25	2,43	1,94
ANOVA						
Fuente	Suma de Cuadrados	df	Cuadrado Medio	F	Sig.	
Precipitación	9736,33	1	9736,33	14,22	0,0002	
Agitación	24983,9	1	24983,9	36,50	0,0000	
Total	462088,0	675	684,574			
Residual	497072,0	677				

Con el análisis de varianza se prueba el grado de significancia estadística entre cada uno de los factores (precipitación, agitación, sonicación) sobre la variable respuesta (tamaño de partícula), con un nivel de confianza del 99%, y según estos datos, cuya significancia es menor de 0,01, se demuestra estadísticamente que los lotes difieren significativamente entre sí, por lo que el tamaño de partícula de los núcleos depende de los condiciones utilizadas en su elaboración (Figura 7.5).

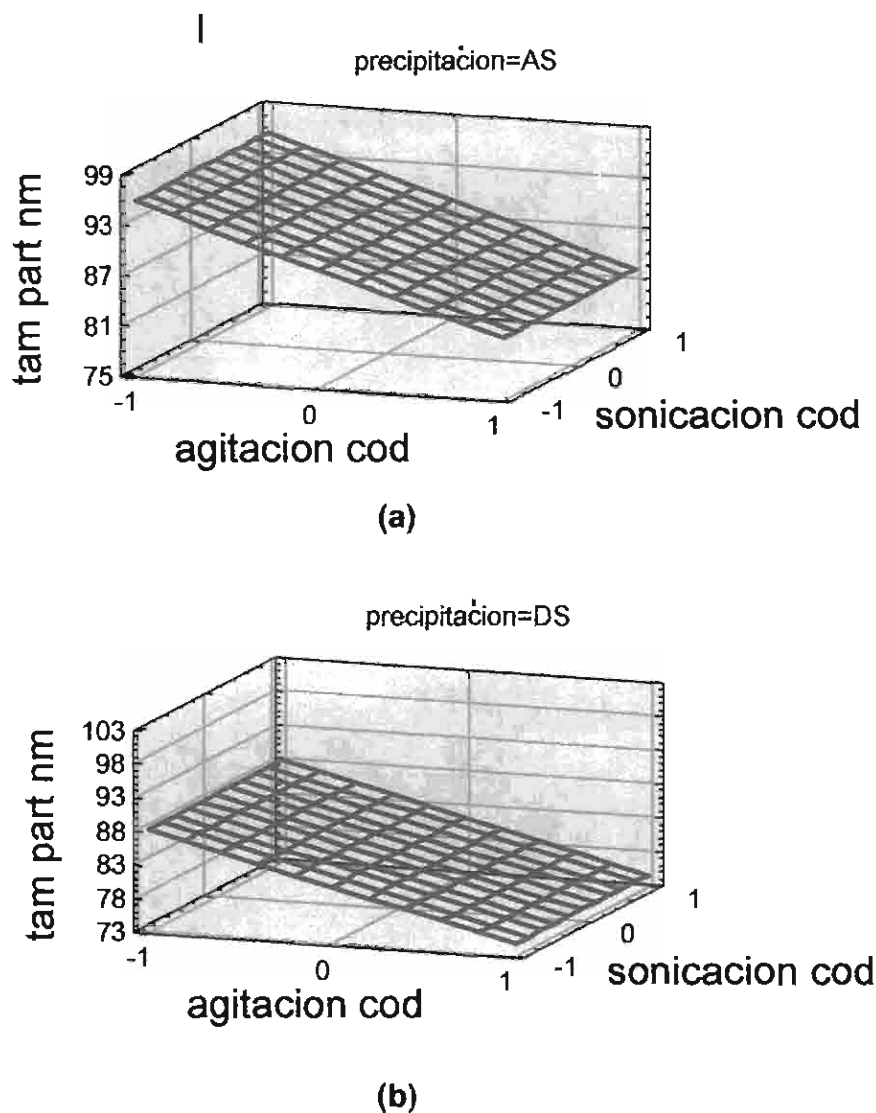


Fig. 7.5. Superficie de respuesta estimada de los factores sobre la variable respuesta: a) antes de la precipitación, b) durante la precipitación

Asimismo, cabe mencionar que se realizó el análisis de varianza sobre las medias de cada uno de los seis lotes, encontrándose que el modelo se ajustó, con un nivel de confianza del 95%, a una ecuación de la forma: $85,4183 + 3,525 \cdot I_1(1) - 6,4375 \cdot \text{sonicación}$, es decir, que según esta ecuación y la Figura 7.5, a mayor velocidad de agitación e intensidad de sonicación, y con la precipitación durante ésta última, menor es el tamaño de partícula obtenido, de esta forma, el modelo es explicado en un 87,7156% según el valor de R^2 , con un error estándar estimado de 3,34943.

Para conocer la variabilidad y/o reproducibilidad del proceso de obtención de los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio ante un escalamiento, se elaboraron dos lotes más, bajo las condiciones del lote seis, un lote (L61N) con condiciones idénticas al L6, y otro lote (L62N) incrementando la masa al doble.

En la Figura 7.6 se presentan los histogramas de frecuencia de los lotes L61N y L62N, habiéndose observado una distribución de tamaño semejante al lote seis, y para verificar que no existe diferencia significativa entre el tamaño de partícula por el escalamiento (entre los lotes L61N y L62N), se aplicó una prueba de hipótesis sobre las medias de ambos (Tabla 7.2). Para los dos lotes, el tamaño de partícula fue de 100 a 120 nm.

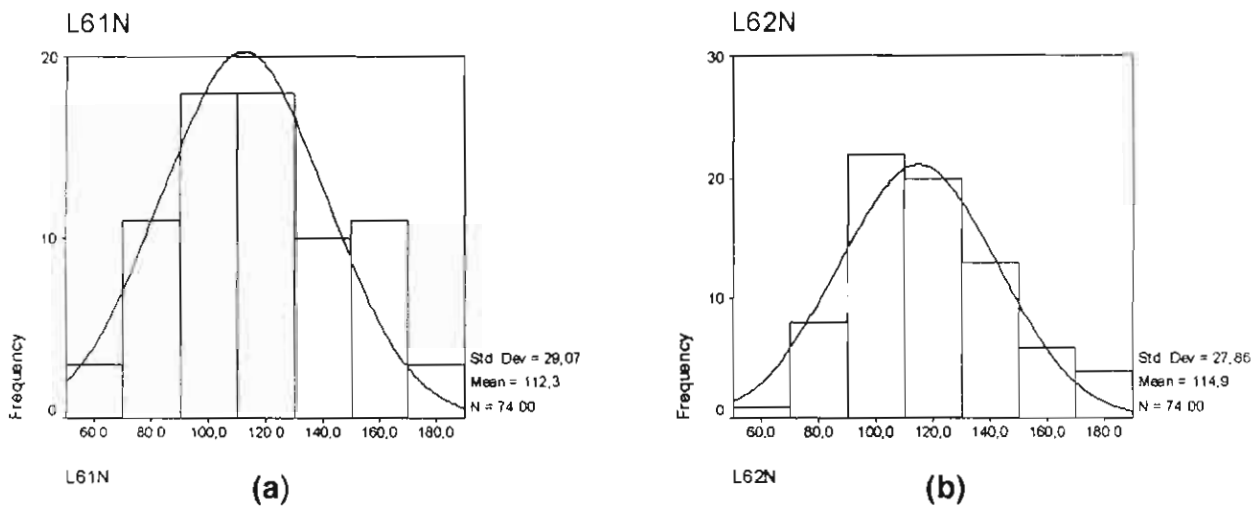


Fig. 7.6. Distribución de tamaño de partícula de: a) lote L61N, b) lote L62N

De la prueba de hipótesis entre medias, se prueba el grado de significancia estadística entre los dos lotes, con un nivel de confianza del 95%, y de acuerdo con los datos aportados, la significancia es mayor de 0,05, por lo que se estableció que no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos o lotes, es decir, que el proceso se puede escalar a una mayor producción y que es reproducible, obteniendo tamaños de partícula de 100 a 120 nm, siempre que se efectúe la síntesis de las nanopartículas de acuerdo con la metodología establecida.

Tabla 7.2. Prueba de hipótesis entre medias de lotes L61N y L62N

Variable	L61N	L62N			
Tamaño de Partícula (nm)	50 – 190	50 – 180			
Frecuencia	100 – 120	100 – 120			
Media	112,2973	114,8649			
Moda	100	120			
Desviación estándar	29,0746	27,8569			
Error estándar	3,3799	3,2383			
Prueba de t para igualdad de medias					
	t	df	Sig. (2-tallos)	Diferencia de medias	Error Std. de la diferencia
Igualdad de varianzas	-,549	146	,584	-2,5676	4,6808
Desigualdad de varianzas	-,549	145,734	,584	-2,5676	4,6808

De igual forma, y debido a que se requería economizar en el proceso de obtención de los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio, se efectuó un experimento en el cual se compararon dos lotes, el primero (L6L), contenía nanopartículas obtenidas mediante secado por sublimación o liofilización, y el segundo lote (L6R), contenía núcleos inorgánicos obtenidos por medio de secado por evaporación a presión reducida, esto para comparar la variabilidad entre los dos métodos de secado.

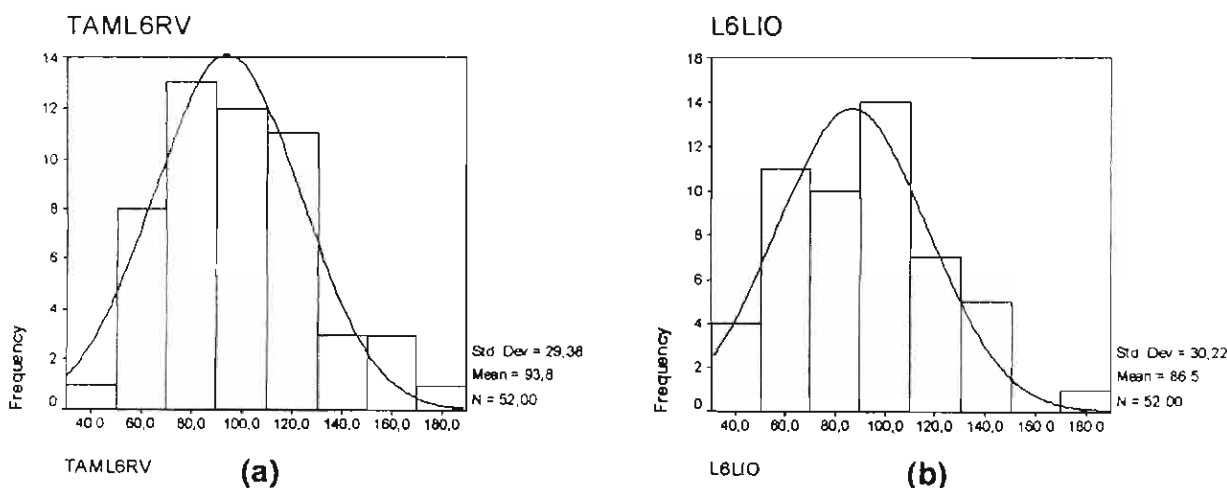


Fig. 7.7. Distribución de tamaño de partícula de: a) lote L6L, b) lote L6R

En este sentido, con los datos se obtuvieron histogramas de frecuencia (Figura 7.7) para conocer la distribución de tamaño de partícula, así como realizar una prueba de hipótesis entre medias (Tabla 7.3) para conocer la variabilidad entre el tamaño de partícula de los lotes.

Tabla 7.3. Prueba de hipótesis entre medias de lotes L6L y L6R

Variable	L6L	L6R			
Tamaño de Partícula (nm)	30 – 170	30 – 170			
Frecuencia	60 – 90	70 – 90			
Media	86,5385	93,8462			
Moda	90	90			
Desviación estándar	30,2204	29,3828			
Error estándar	4,1908	4,0747			
Prueba de t para igualdad de medias					
	t	df	Sig. (2-tallos)	Diferencia de medias	Error Std. de la diferencia
Igualdad de varianzas	1,250	102	,214	7,3077	5,8452
Desigualdad de varianzas	1,250	101,920	,214	7,3077	5,8452

De acuerdo con los datos del análisis granulométrico, se encontró que la mayor proporción de partículas del lote L6L se agrupó en los valores de 60 a 90 nm y que en el lote L6R de 70 a 90 nm.

Asimismo, de acuerdo con la prueba estadística de hipótesis entre medias, cuya significancia es mayor a 0,05, se establece que no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos, es decir, que la operación de secado puede realizarse tanto con secado por sublimación o liofilización, como por evaporación a presión reducida, sin mostrar efecto alguno sobre el tamaño, y como se verá más adelante, sobre la morfología de las nanopartículas.

7.2. Etapa 2. Recubrimiento del núcleo inorgánico de fosfato de calcio con una película superficial de lactosa

En el desarrollo de esta etapa, se prepararon tres lotes de núcleos inorgánicos: LNL1, LNL2 y LNL3, que se identifican respectivamente con diferentes concentraciones de lactosa (0,03, 0,06 y 0,09 M) empleadas para recubrir los núcleos. Una vez obtenidas las partículas de los tres lotes, además de la lactosa materia prima pura, se analizaron por difracción de rayos X de polvos, los lotes obtenidos.

En la Figura 7.8a se presenta el espectro de difracción de rayos X de la lactosa materia prima pura, en donde se observan los picos representativos de ésta en 13, 19, 20 y 21 grados en la escala 2θ . Por otra parte, los espectros de difracción de rayos X (Figura 7.8b, 7.8c y 7.8d), corresponden respectivamente, a los lotes LNL1, LNL2 y LNL3.

La comparación de estos difractogramas con el de la lactosa pura y a su vez con el de los núcleos de la Figura 7.2, permitió observar en primer término que, al desaparecer los picos característicos del fosfato de calcio en los tres lotes, el material obtenido presentó un cambio en la superficie expuesta a los rayos X, mostrándose, de manera particular por los lotes LNL2 y LNL3, el comportamiento característico de un sólido amorfo, y por el lote LNL1 (Figura 7.8b) de concentración más baja de lactosa de los tres, en el difractograma se observó la presencia de picos de lactosa cristalina junto con un comportamiento parcial amorfo.

Las imágenes tridimensionales de microscopía electrónica de barrido de los tres lotes (Figura 7,9), permitieron comprobar la existencia de nanopartículas con morfología esférico-ovoide, y con la microscopía electrónica de transmisión se pudo comprobar la presencia de la capa de lactosa sobre los núcleos en los tres lotes.

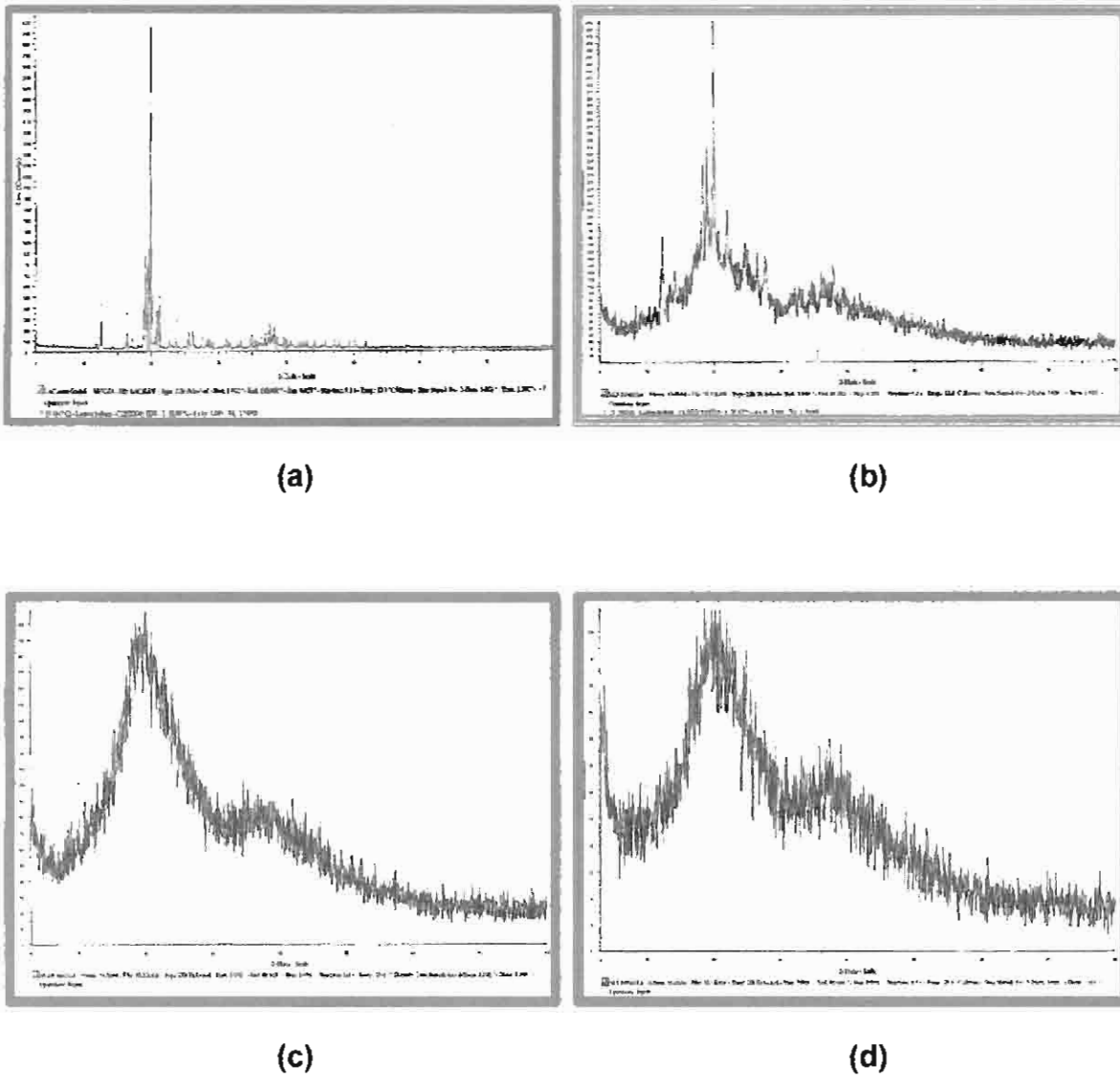


Fig. 7.8. Difractogramas de: a) lactosa, b) lote LNL1, c) lote LNL2, d) lote LNL3

Para poder observar con claridad la película de lactosa sobre los núcleos, las imágenes de las muestras se obtuvieron en campos claro y oscuro mediante la microscopía electrónica de transmisión (Figura 7.10). Aunado a esto, las imágenes se digitalizaron mediante la técnica del falso color para resaltar la presencia del núcleo y de la película de lactosa que lo recubre.

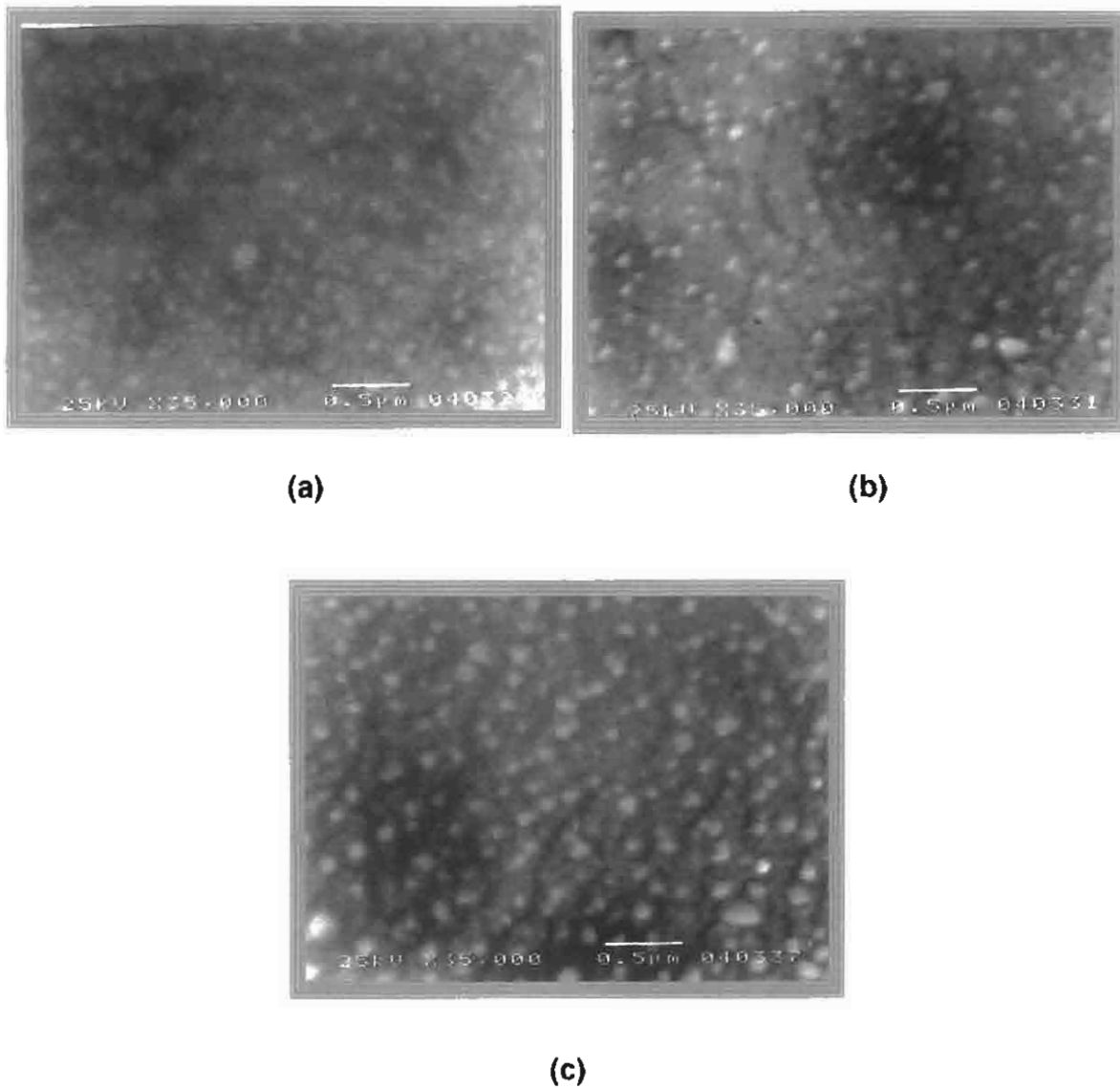


Fig. 7.9. Imágenes de barrido de: a) lote LNL1, b) lote LNL2, c) lote LNL3

Con las imágenes de microscopía electrónica de barrido, mediante la digitalización, se determinó la granulometría de los tres lotes de núcleos recubiertos, para posteriormente obtener los histogramas de frecuencia y realizar el análisis estadístico correspondiente.

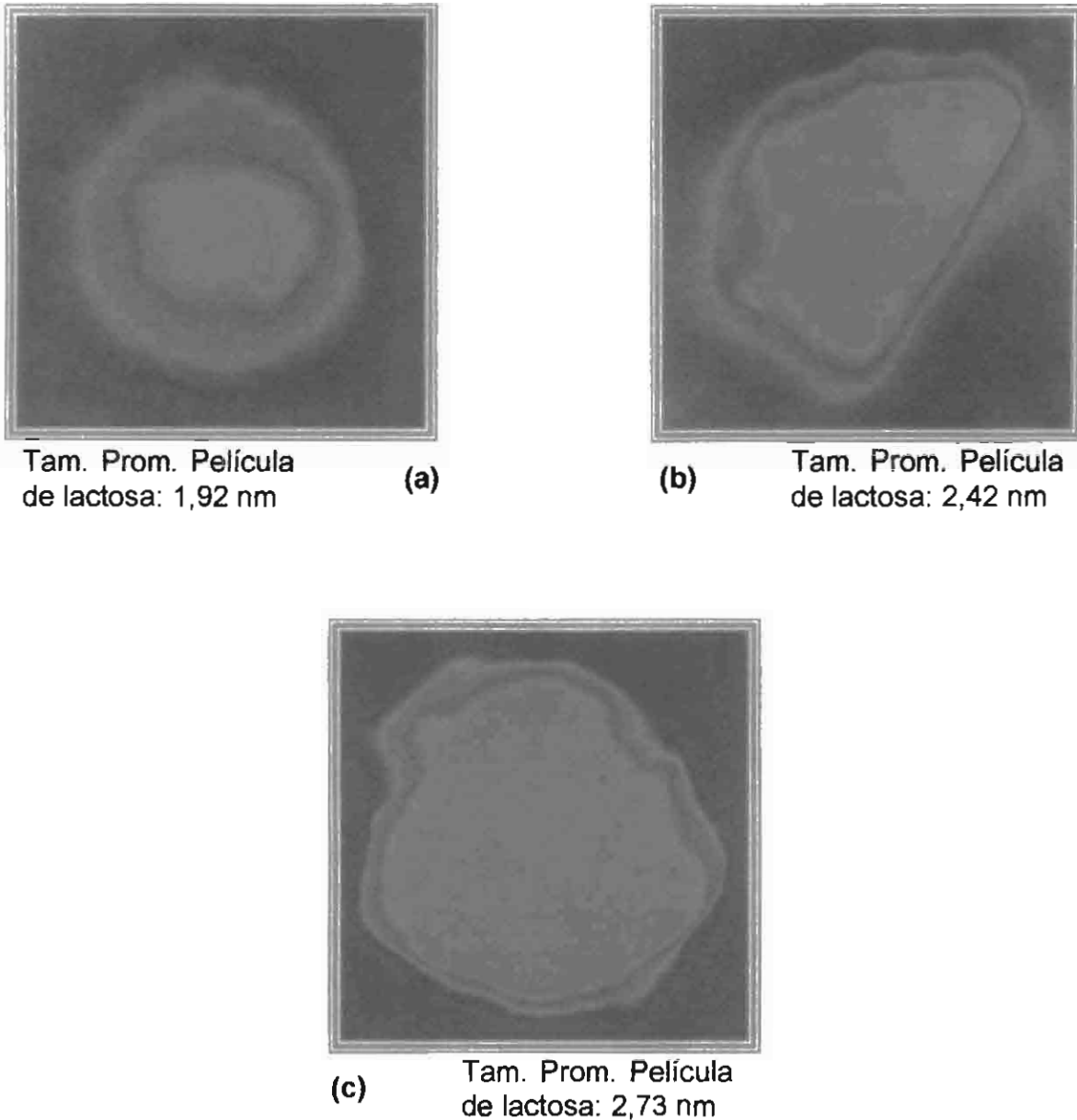


Fig. 7.10. Campos claro y oscuro digitalizados en falso color de: a) lote LNL1, b) lote LNL2, c) lote LNL3

7.2.1. Análisis estadístico de los núcleos recubiertos con lactosa

En la Figura 7.11, se muestra la distribución de tamaño de partícula de cada uno de los tres lotes de núcleos recubiertos con lactosa, observándose un sesgo a la izquierda en los tres casos.

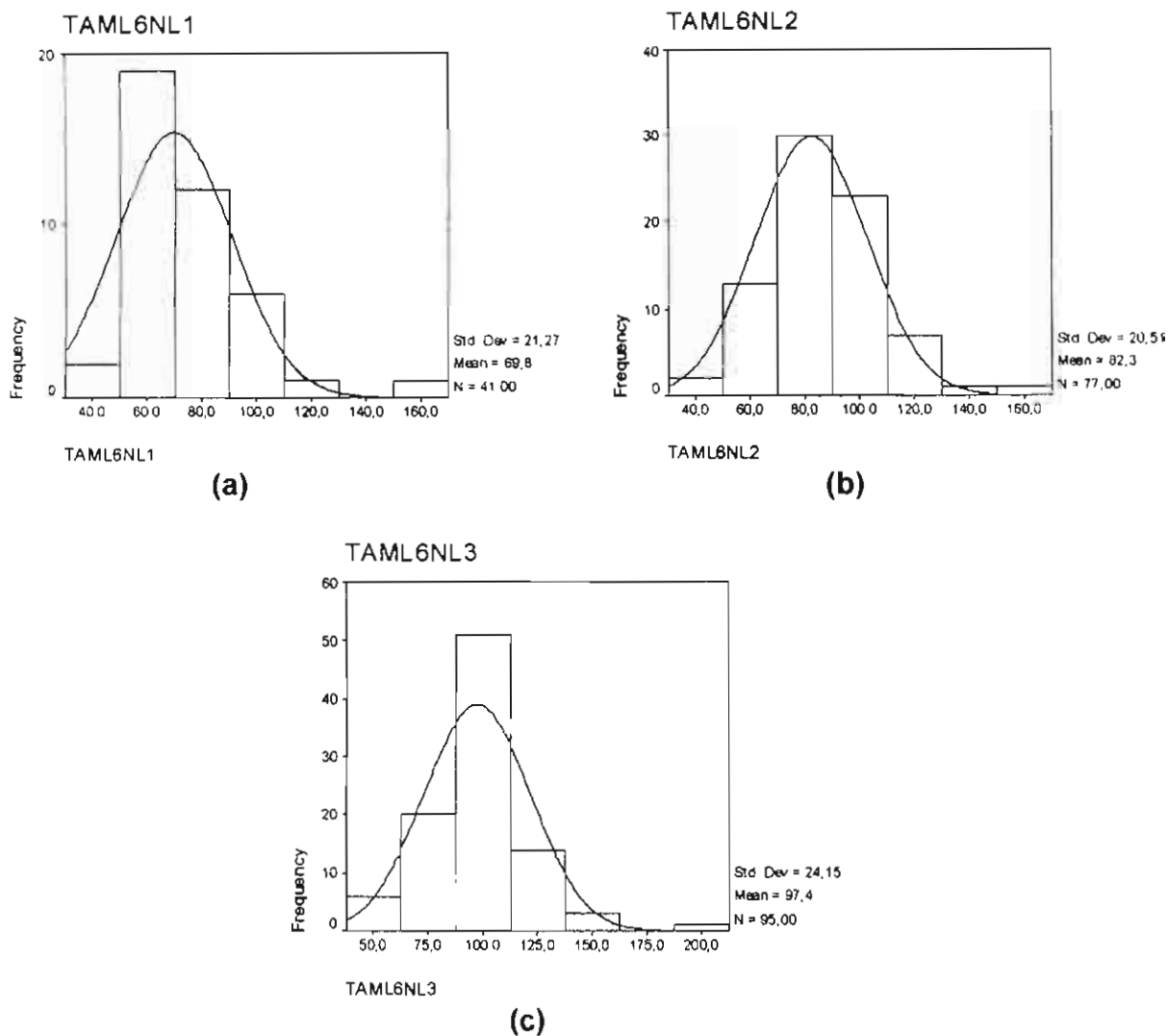


Fig. 7.11. Distribución de tamaño de partícula de: a) lote LNL1, b) lote LNL2, c) lote LNL3

Ahora bien, en el tratamiento estadístico se emplearon los tamaños individuales de las partículas de cada uno de los tres lotes. Los resultados del análisis de varianza correspondiente se presentan en la Tabla 7.4, con un nivel de confianza del 99% y con una significancia menor a 0,01, lo que permitió concluir que el tratamiento (concentración de lactosa) en cada uno de los tres lotes influye significativamente en el tamaño de las nanopartículas obtenidas (Figura 7.12), en donde se encontró que a mayor concentración de lactosa, mayor tamaño de partícula.

Tabla 7.4. Anova de granulometría de núcleos recubiertos

Variable	Lote LNL1	Lote LNL2	Lote LNL3
Concentración (M)	0,03	0,06	0,09
Tamaño de Partícula (nm)	40 – 160	40 – 150	50 – 160
Frecuencia	50 – 90	70 – 100	80 – 110
Media	69,76	82,34	96,17
Moda	60	80	90
Desviación estándar	21,27	20,51	21,26
Error estándar	3,32	2,34	2,19

ANOVA					
Fuente	Suma de Cuadrados	df	Cuadrado Medio	F	Sig.
Lote	21573,6	2	10786,8	24,48	0,0000
Residual	92098,1	209	440,661		
Total	113672,0	211			

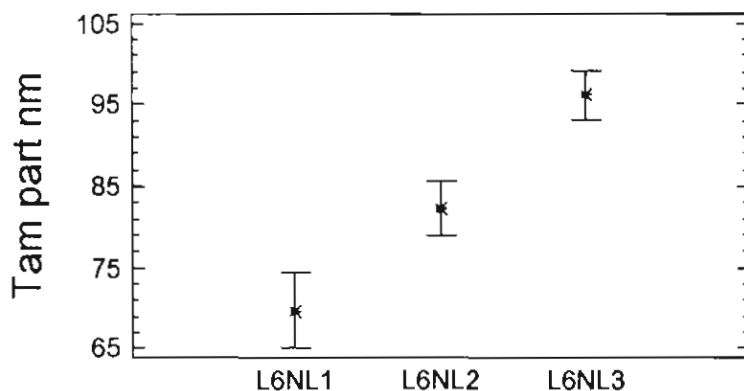


Fig. 7.12. Efecto de la concentración de lactosa sobre el tamaño de las nanopartículas

Posteriormente, se decidió proseguir con la adsorción del fármaco en el lote LNL2, para posteriormente determinar si había efecto de la proporción de lactosa que recubre el núcleo sobre la adsorción del principio activo en estudio.

7.3. Etapa 3. Adsorción del fármaco modelo (indometacina) al núcleo recubierto con lactosa.

Para depositar la indometacina sobre los núcleos recubiertos con lactosa, se analizó el efecto de tres disolventes (acetona, cloroformo y éter etílico) en los que se solubilizó el principio activo. De tal forma, se prepararon soluciones saturadas de indometacina y se elaboraron los lotes NLI-A, NLI-C y NLI-E, que identifican el disolvente utilizado (acetona, cloroformo y éter, respectivamente), siguiendo el procedimiento establecido en la Figura 6.3.

La evaluación de estos tres lotes se realizó en primer término, para constatar que la indometacina estuviera recubriendo a los núcleos, y para ello se analizaron las muestras de cada lote por difracción de rayos X de polvos, junto con la muestra de la materia prima utilizada en este estudio, que corresponde al polimorfo I de la indometacina. Los resultados se muestran en la Figura 7.13, y en cada difractograma las líneas rojas identifican al polimorfo I de indometacina, de conformidad a los valores publicados y registrados de este polimorfo en el software del difractor de rayos X.

En dicha figura, se observó que los difractogramas de los lotes NLI-C y NLI-E, muestran diferentes estructuras cristalinas, y que sólo en el lote NLI-A se observan los picos representativos del polimorfo I de indometacina, por lo que se considera que en los lotes NLI-C y NLI-E, se obtuvo el depósito de una capa constituida por una mezcla de polimorfos de indometacina, situación que sería objeto de otro estudio, debido a que este fenómeno podría haber sido ocasionado ya sea por el sistema disolvente empleado o por el proceso de secado, o bien, por ambos factores.

Por otra parte, la microscopía electrónica de barrido confirmó la presencia del polimorfismo entre los tres lotes (Figura 7.14), ya que como se puede observar en la imagen de superficie de los lotes NLI-C [Figura 7.14(b)] y NLI-E [Figura 7.14(c)],

se obtuvieron cristales con hábito laminar o de placa y formas aciculares (agujas), respectivamente, mientras que en el lote NLI-A [Figura 7.14(a)], se aprecia, junto con los acuosomas cargados (partículas esféricas u ovoides), placas cristalinas que según la información publicada²⁸, corresponde al hábito del polimorfo I de la indometacina.

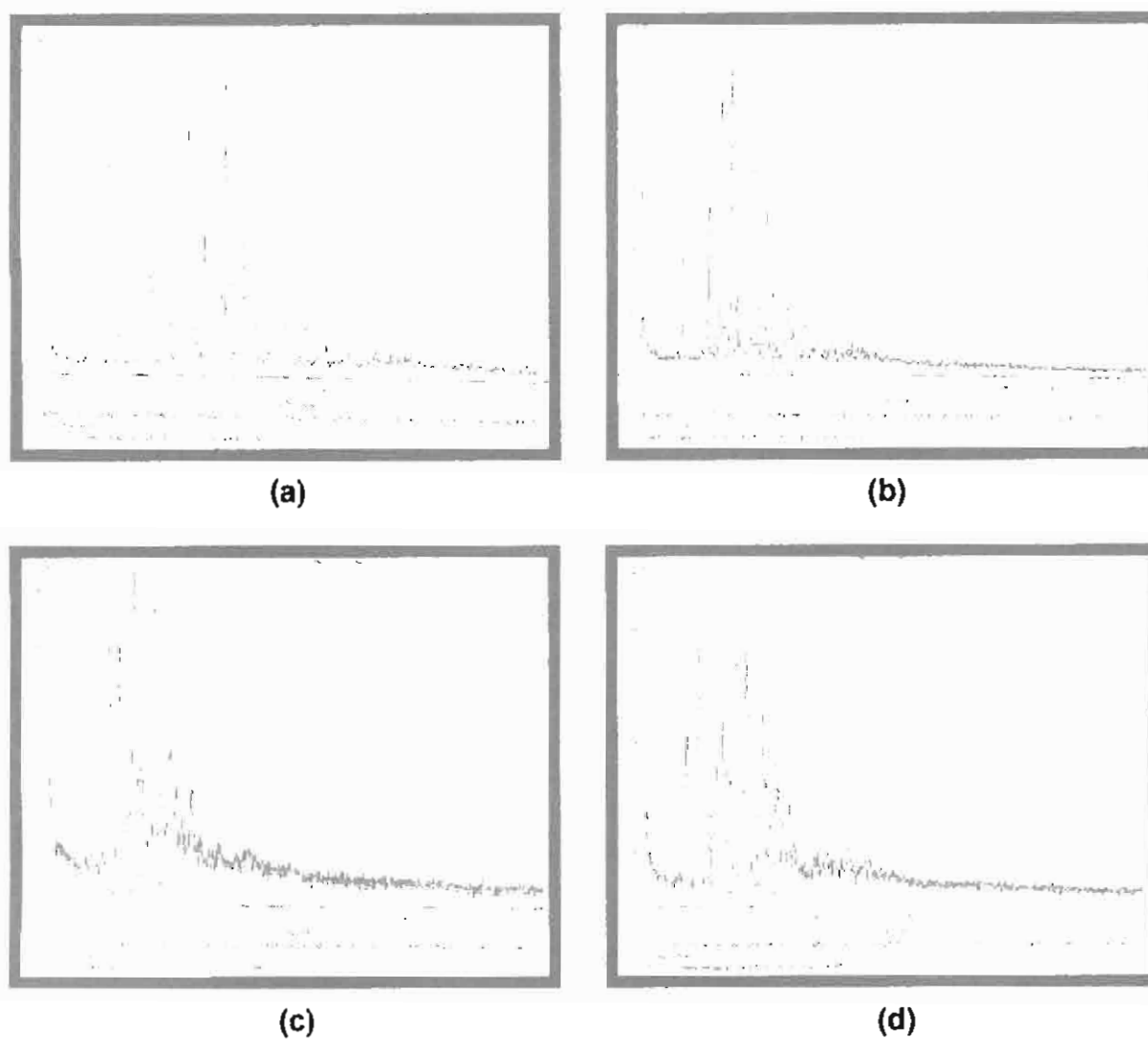


Fig. 7.13. Difractogramas de: a) indometacina polimorfo I, b) lote NLI-A, c) lote NLI-C, d) lote NLI-E

Cabe señalar que las imágenes de la Figura 7.14 indican asimismo, que cristalizó un exceso del principio activo, por lo que se sugiere la realización de estudios

posteriores que permitan optimizar el proceso para ajustar la proporción de indometacina con relación a la masa y superficie a recubrir de los acuosomas.

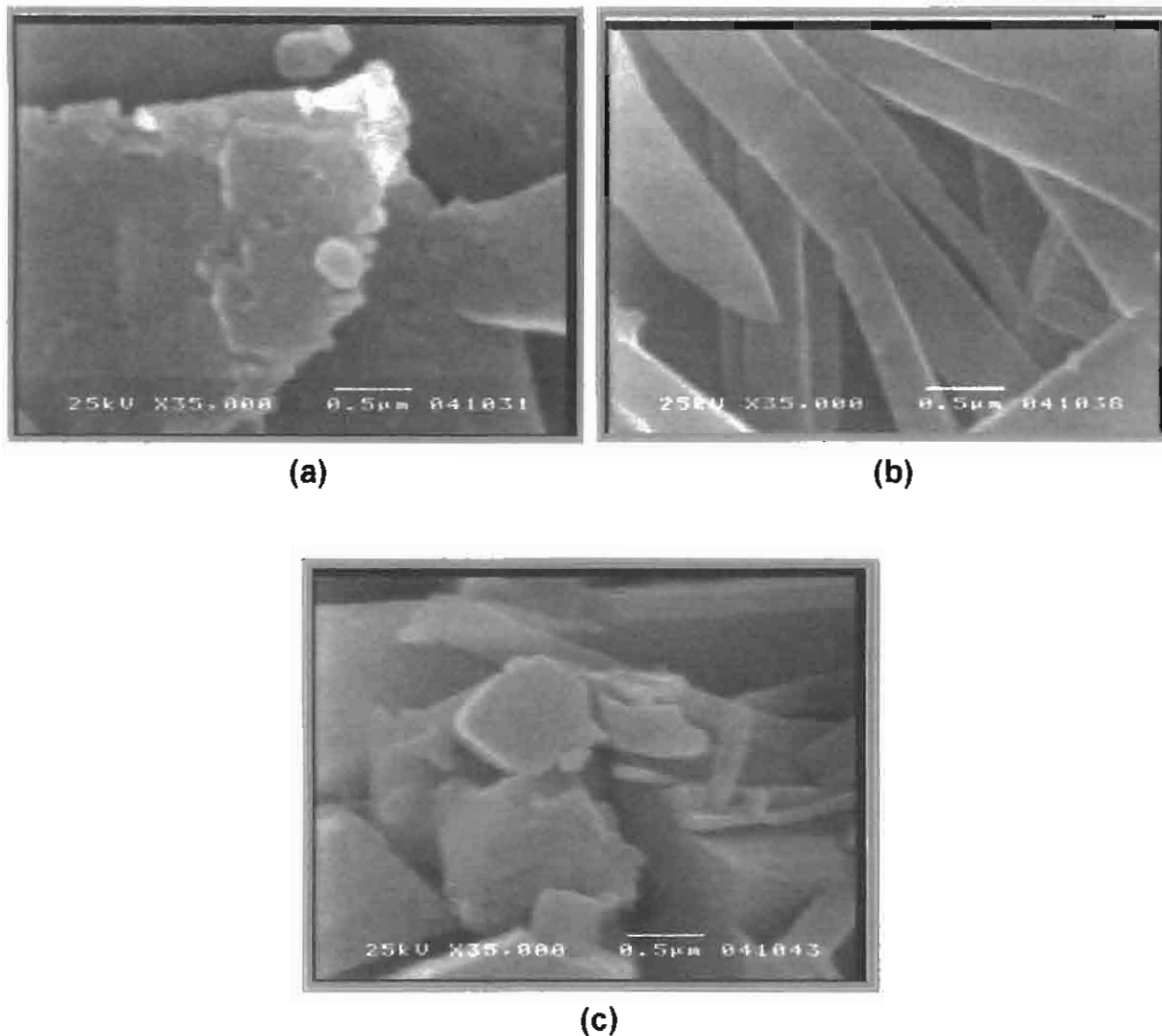


Figura 7.14. Imágenes de barrido de: a) lote NLI-A, b) lote NLI-C, c) lote NLI-E

La Figura 7.15 corresponde a un acuosoma cargado con indometacina del lote NLI-A, obtenido por microscopía electrónica de transmisión mediante campos claro-oscuro y con la digitalización de la imagen. Con esta técnica analítica se pudo corroborar la presencia de los tres componentes de los acuosomas de indometacina: el núcleo inorgánico de fosfato de calcio (amarillo), la película de lactosa (roja) y la indometacina (verde).

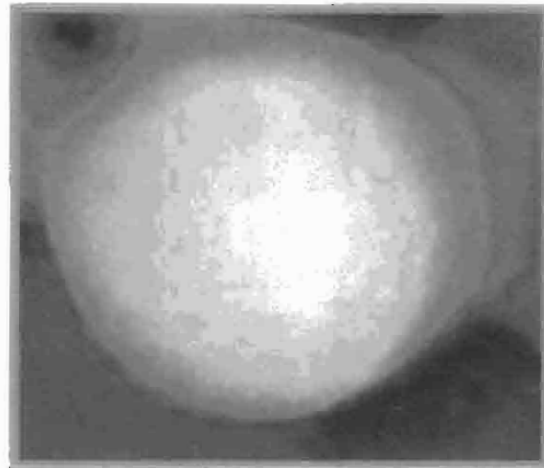


Figura 7.15. Campos claro y oscuro digitalizados en falso color del lote NLI-A

7.3.1. Análisis estadístico de la adsorción del fármaco modelo

De manera semejante a los estudios realizados en las dos etapas previas, mediante la microscopía electrónica de transmisión, también se realizó el análisis granulométrico de la muestra, habiéndose obtenido el histograma de frecuencia con la distribución de tamaño de partícula (Figura 7.16). Los datos mostraron que los acuosomas con indometacina tuvieron un intervalo de tamaño de partícula de 60 a 120 nm, una media de 90 nm, una moda de 84 nm, una desviación estándar de 18,0234 y un error estándar de la media de 4,1348.

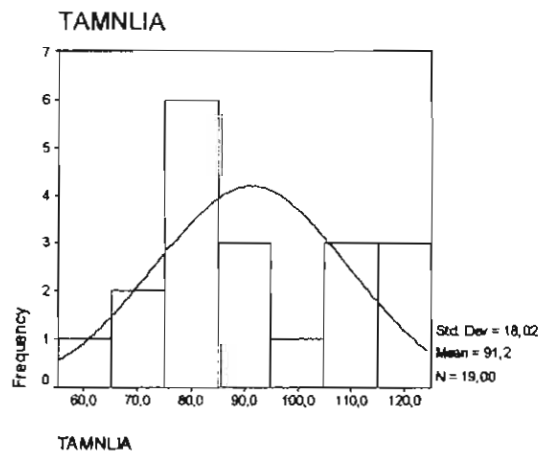


Figura 7.16. Distribución de tamaño de partícula del lote NLIA

VIII. CONCLUSIONES

- Las condiciones de elaboración propuestas en este estudio, permitieron obtener acuosomas de fosfato de calcio recubiertos de lactosa e indometacina para utilizarlos como transportadores de fármacos.
- La distribución de tamaño de los núcleos inorgánicos de fosfato de calcio son dependientes de la velocidad de agitación y de la intensidad de la sonicación, resultando que a mayor agitación y sonicación, el tamaño de las partículas disminuye a razón del 16 – 17 % por tratamiento, mientras que al realizar la precipitación durante la sonicación, se obtuvieron tamaños de partícula menores que al precipitar antes de esta.
- El secado por liofilización o por presión reducida no tiene efecto significativo sobre la estructura física ni el tamaño de partícula de los núcleos de fosfato de calcio.
- La formación de la película de recubrimiento de lactosa sobre los núcleos de fosfato de calcio resultantes, es dependiente de la concentración de lactosa en el sistema, de tal forma que conforme aumenta la concentración de lactosa, se incrementa el grosor de la película sobre los núcleos.
- El disolvente empleado para disolver el principio activo y depositarlo sobre el acuosoma, influye en la adsorción de la indometacina al acuosoma, y al parecer, determina también su estructura cristalina.
- Las técnicas analíticas instrumentales empleadas en este estudio, como la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, y la difracción de Rayos X de polvos, demostraron ser herramientas indispensables y complementarias entre sí, para la caracterización y el diseño de nanopartículas como los acuosomas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Comité Científico de la Red NanoSpain. 2003. Informe sobre la situación de la Nanociencia y de la nanotecnología en España y propuesta de acción estratégica dentro del Plan Nacional de I+D+I (2004 – 2007). NanoSpain. pp. 1 – 39.
2. <http://www.nanoproducts.com>. 2004.
3. Whitesides, G.H. 2003. The “right” size in Nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*. 21, 1161 – 1165.
4. Murray, C.B., Kagan, C.R., Bawendi, M.G. 2000. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 20, 454 – 610.
5. Mazzola, L. 2003. Commercializing nanotechnology. *Nature Biotechnology*. 21, 1137 – 1143.
6. Paull, R., Wolfe, J., Hebert, P., Sinkula, M. 2003. Investing in nanotechnology. *Nature Biotechnology*. 21, 1134 – 1147.
7. Salata, O.V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology*. 2:3.
8. Grupo ETC. 2003. No es poca cosa II: El caso de una moratoria global. ¡El tamaño sí importa! Occasional Paper Series. Vol. 7.
9. <http://www.bioteecnologica.com/articulos6.htm>. 2004.

10. Tinkle, S.S., Antonini, J.M., Rich, B.A., Roberts, J.R., Salmon, R., DePree, K., Adkins, E.J. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic Beryllium disease. *Environ. Health Perspect.* (disponible en <http://dx.doi.org/>).
11. Kim, I.S., Kim, S.H., 2002. Development of a polymeric nanoparticulate drug delivery system. In vitro characterization of nanoparticles based on sugar-containing conjugates. *Int. J. Pharm.* 245, 67 – 73.
12. Illum, L., Wright, J., Davis, S.S., 1989. Targeting of microspheres to sites of inflammation. *Int. J. Pharm.* 52, 221 – 224.
13. Alleman, E., Gurny, R., Doelker, E., 1993. Drug-loaded nanoparticles preparation method and drug targeting tissues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39, 173 – 191.
14. Tinkle, S.S., Antonini, J.M., Rich, B.A., Roberts, J.R., Salmon, R., DePree, K., Adkins, E.J. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic Beryllium disease. *Environ. Health Perspect.* (disponible en <http://dx.doi.org/>).
15. Flores, R.G. y López, O.E. *Comunicación Celular*. UNAM. México. 2003. pp. 9 – 68.
16. Donaldson, K., Stone, V. & MacNee, W. 1999. The toxicology of ultrafine particles. In: *Particulate Matter: properties and effects upon health*. BIOS Scientific Publishers Ltd. (ISBN 185996172X). pp115 – 129.
17. Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M. & Utsumi, H. 2002. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂ – UVA treatment. *Toxicology in vitro*. 16: 629 – 635.

18. Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D.G. & Schiffmann, D. 2002. Evidence that ultrafine Titanium Dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian Hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* 110(8): 797 – 800.
19. Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Ekimoto, H., Shibazaki, C., Kataoka, K., 1991. Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res.* 51, 3229 – 3236.
20. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. 1998. Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24(12). 113 – 1128.
21. Rezende, S. Scheila e Stanisçuaski, G.S. 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova.* 26 (5). 726 – 737.
22. Ramos-Picos D, Gómez-Carril M. y Fernández-Mena D. 2001. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Rev. Cubana Farm.* 35 (2): 126-35.
23. Chow, G-M., Gonsalves, K.E. 1996. Nanotechnology. Molecularly designed materials. *J. Ame. Chem. Soc.* 622: 335 – 348.
24. Khopade A.J., Khopade, S., Jain, N.K. 2002. Development of haemoglobin aquasomes from spherical hydroxyapatite cores precipitated in the presence of half-generation poly(amidoamine) dendrimer. *Int. J. Pharm.* 241: 145 – 154.
25. Masatoshi, I., Yongning, Z., 1998. Influence of saccharides on the stabilization of frozen hemeprotein. *Chem. Abs.* 45, 539 – 544.

26. Levine, H., Slade, L. 1992. Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials. *BioPharm.* May 36 – 40.
27. Kossovsky, N., Gelman, A., Rajguru, S., Nguyen, R., Sponler, E., Hnatyszyn, H.J., Chow, K., Chung, A., Torres, M., Zemanovich, J., Crowder, J., Barnajian, P., Ly, K., Philipose, J., Ammons, D., Anderson, S., Goodwin, C., Soliemanzadeh, P., Yao, G., Wei, K., 1996. Control of molecular polymorphism by a structured carbohydrate/ceramic delivery vehicle – aquasomes. *J. Control. Release.* 39, 383 – 388.
28. Del Río, LA. 2002. Estudio de preformulación para el desarrollo de comprimidos de indometacina como sustancia policristalina. *Ars Pharmaceutica.* 43: 1 – 2. 147 – 171.
29. <http://www.viatusalud.com/documento.asp?id=2068>. 2004.
30. Dictionaire Vidal. (1995). 71 edición. Ed. Vidal. Francia.
31. Vademécum Académico de Medicamentos. (1995). Segunda edición. Ed. Interamericana – McGraw-Hill. México.
32. Valls, O., Del Castillo, B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. (2002). Cuarta edición. Ed. UAM – X. México.
33. <http://www.comsoc.udg.mx/gaceta/paginas/37/3-37.pdf>. 1996.
34. Martin, P.N., Swabrick, J., Cammarata, A. (1983). *Physical Pharmacy*. Tercera edición. Ed. Lea & Febiger. USA.