

T  
680

 ARCHIVO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

03866

103859

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD 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

“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ACUOSOMAS DE  
INDOMETACINA “

COMUNICACIÓN IDONEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA


Q.F.B. ADRIANA LÓPEZ TORRES  
MATRÍCULA 205182443

COMITÉ TUTORAL:  
Tutor: Dra. Irma Rojas Oviedo  
Asesor: Dr. Ramiro García García  
Asesor: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda


OCTUBRE, 2007

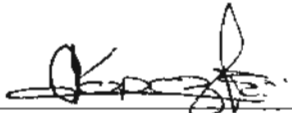
“Optimización del proceso de obtención de acuosomas de indometacina.”

Vo. Bo.

  
Dra. Irma Rojas Oviedo  
Tutora

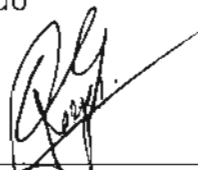
  
Dr. Ramiro García García  
Asesor externo

  
Dr. Carlos T. Quirino Barreda  
Asesor interno

  
Q.F.B. Adriana López Torres  
Matrícula 205182443

“Optimización del proceso de obtención de acuosomas de indometacina”

Jurado



Dr. José Reyes Gasga  
Presidente



Dr. Efrén Hernández Baltazar  
Vocal



Dra. Irma Rojas Oviedo  
Secretario.

## Resumen.

En el presente trabajo se elaboraron acuosomas de indometacina, empleando tres diseños factoriales  $2^2$ . Se obtuvieron a partir de núcleos de fosfato de calcio formados a tres velocidades de precipitación (V1, V2 y V3) y dos formas de secado (conducción y liofilización). Los núcleos se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), determinándose el tamaño de partícula mediante el programa Digital Micrograph. La velocidad identificada como V3 fue descartada por que no se obtuvieron núcleos de tamaño esperado y por el bajo rendimiento. Los núcleos obtenidos con las velocidades identificadas como V1 y V2 se recubrieron utilizando dos concentraciones de la lactosa:  $3 \times 10^{-3}$  M (+) y  $9.4 \times 10^{-5}$  M (-). Las muestras recubiertas de lactosa fueron nuevamente recubiertas con dos concentraciones del fármaco modelo (indometacina):  $1.5 \times 10^{-3}$  M (+) y  $3.57 \times 10^{-5}$  M (-) para formar así los acuosomas. Estos fueron caracterizados mediante MEB, espectrofotometría infrarroja (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). También se realizaron ensayos por espectrofotometría de ultravioleta para evaluar contenido de Indometacina, estabilidad fotoquímica, solubilidad en mezclas de etanol:agua y determinar el disolvente a emplear para la solubilización y liofilización del fármaco, así como su cuantificación al realizar diálisis por membrana. De manera paralela se hizo ésta última determinación con una mezcla física de núcleos, lactosa e indometacina.

Los resultados obtenidos mediante MEB indican que existe un efecto de la velocidad y mecanismo de secado, así como de la concentración de lactosa e indometacina sobre el tamaño de partícula.

Para el caso de la estabilidad fotoquímica de la indometacina bajo las condiciones de trabajo empleadas, ésta no fue mayor a 30 min. La mezcla de disolventes que presentó mejores resultados en cuanto a solubilidad y liofilización fue la proporción etanol : agua (1:5).

En cuanto al proceso de diálisis, la cuantificación de indometacina en los acuosomas fue mayor en comparación con la mezcla física y el fármaco solo.

### **Agradecimientos institucionales:**

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por brindarme la oportunidad de desarrollarme y adquirir mis conocimientos a través de su planta docente tanto en licenciatura, así como ahora en el grado de Maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Instituto de Física y al Laboratorio de Microscopía Electrónica y al Laboratorio de Materiales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido para el sustento de mis estudios, de conformidad con el convenio de asignación de apoyo para la formación de científicos y tecnólogos, No. Reg. 194800.

## **Agradecimientos personales.**

A mi madre, Maricela Torres Cuevas por su enorme apoyo y cariño en cada paso de mi vida, gracias por todo lo que soy y lo que no soy. A la memoria de mi padre, Mauro López Cabello, gracias a tu ejemplo estoy donde tú siempre quisiste que estuviera. A mi fortaleza, mi hija, Yuliana, todo lo que hago, lo hago para ella. A mis hermanas, Marcela e Irma, gracias por entenderme, quererme y apoyarme, mis eternas amigas. Gracias Katia, Azul y Uriel.

A ti, que sin necesidad de nombrarte, mi eterno amigo y compañero sigues ahí, apoyándome cada día. Gracias.

A mis amigos Claudia, Ángeles y Alex, a mis compañeros de la maestría, mil gracias por su apoyo y amistad. Lo logramos !!!.

A la Dra. Irma Rojas Oviedo, gracias por soportarme, por ayudarme, por darme la oportunidad de trabajar y crecer como profesionalista. Por ser mi guía y ejemplo a seguir. La quiero y la respeto mucho.

### **Símbolos.**

nm	Nanómetro
µm	Micrómetro/micra
eV	Electro-Volts
cm <sup>-1</sup>	Número de onda
ppm	Partes por millón
Hz	Hertz
°C	Grado Celsius
LD <sub>50</sub>	Dosis letal 50
M	Molaridad
mL	Mililitros
Min	Minutos
µg	Microgramos
mg	Miligramos
gl	Grados de libertad
H - O	Enlace Hidrógeno-Oxígeno
C-O	Enlace Carbono-Oxígeno
v/v	Concentración expresada en Volumen/Volumen
Da	Daltons
kJ/mol	KiloJoules/mol

### **Abreviaturas.**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
MEB	Microscopia electrónica de barrido
IR	Espectroscopia infrarroja
H <sup>1</sup> RMN	Resonancia magnética de protón
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta y visible
IMC	Indometacina
pH	Potencial hidrógeno
P	Nivel de significancia al 95% de confianza
N	Número de datos



	Pág.
<b>Capítulo 1. Introducción.</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes.	2
1.1.1. Nanotecnología.	4
1.1.2. Definición.	5
1.1.3. Métodos de preparación.	6
1.1.4. Aplicaciones.	6
1.2. Sistemas de liberación de fármacos.	10
1.2.1. Generalidades.	11
1.2.2. Acuosomas.	12
1.2.3. Inmovilización de un biomolécula en un vehículo de liberación.	14
1.2.4. Panorama actual de los acuosomas.	19
1.3. Microscopio Electrónico.	20
1.3.1. Fundamento del microscopio electrónico.	22
1.3.2. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).	23
1.3.3. Componentes básicos del microscopio electrónico de barrido.	24
1.3.4. Modos de operación.	26
1.4. Espectrofotometría infrarroja.	
1.4.1. Fundamento de la espectrofotometría infrarroja.	27
1.4.2. Aplicaciones.	28
1.5. Resonancia magnética nuclear.	
1.5.1. Fundamento de la resonancia magnética nuclear.	29
1.5.2. Aplicaciones.	30
1.6. Calorimetría diferencial de barrido.	
1.6.1. Fundamento de la calorimetría diferencial de barrido.	31
1.6.2. Componentes del calorímetro diferencial de barrido.	31
1.6.3. Aplicaciones.	32
1.7. Espectroscopia de UV.	
1.7.1. Fundamento de la espectroscopia de UV.	33
1.7.2. Aplicaciones.	34
1.8. Método de Diálisis	
1.8.1. Definición.	35
1.8.2. Tipos de diálisis.	35
1.8.3. Ventajas y desventajas.	36
1.9. Propiedades fisicoquímicas de las materias primas.	
1.9.1. Lactosa USP.	38
1.9.2. Indometacina.	39
 <b>Capítulo 2. Desarrollo.</b>	
2.1. Planteamiento del problema.	43
2.2. Hipótesis.	43
2.3. Objetivo general.	43
2.4. Objetivo particular.	43

<b>Capítulo 3. Metodología.</b>	<b>Pág.</b>
3.1. Materiales y métodos.	44
3.2. Diseño experimental.	45
<b>Capítulo 4. Parte experimental.</b>	
4.1. Elaboración de núcleos.	47
4.2. Recubrimiento de núcleos con Lactosa USP e Indometacina.	47
4.3. Curva de calibración.	47
4.4. Caracterización de los núcleos y acuosomas por MEB.	
4.4.1. Preparación de la muestra.	50
4.4.2. Condiciones de trabajo del microscopio electrónico de barrido.	50
4.4.3. Granulometría.	50
4.5. Caracterización de los núcleos y acuosomas por IR.	
4.5.1. Preparación de la muestra.	50
4.5.2. Condiciones de trabajo del espectrofotómetro de infrarrojo.	50
4.6. Caracterización de los núcleos y acuosomas por H <sup>1</sup> RMN.	
4.6.1. Preparación de la muestra.	51
4.6.2. Condiciones de trabajo de H <sup>1</sup> RMN.	51
4.7. Caracterización de los núcleos y acuosomas por DSC.	
4.7.1. Preparación de la muestra.	51
4.7.2. Condiciones de trabajo de DSC.	51
4.8. Estudios de UV.	
5.8.1. Validación de método analítico.	52
4.8.1.1. Precisión del sistema.	52
4.8.1.2. Linealidad del sistema.	53
4.8.1.3. Especificidad.	53
4.8.1.4. Exactitud y repetibilidad.	54
4.8.1.5. Linealidad del método.	54
4.8.1.6. Límite de detección.	55
4.8.1.7. Límite de cuantificación.	56
4.8.2. Estabilidad fotoquímica de la indometacina.	56
4.8.3. Solubilidad en mezclas de Etanol:Agua.	57
4.8.4. Diálisis por membrana.	58

Capítulo 5. Resultados y discusión.	Pág.
5.1. Tamaño y distribución de partícula de los núcleos.	59
5.2. Tamaño y distribución de partícula de los núcleos recubiertos con Lactosa USP.	69
5.3. Tamaño y distribución de partícula de los acuosomas con indometacina.	77
5.4. Espectroscopia de infrarrojo.	
5.4.1. Espectro de núcleos.	85
5.4.2. Espectro de la mezcla física.	87
5.4.3. Espectro los acuosomas de indometacina.	89
5.5. H <sup>1</sup> RMN de los acuosomas con indometacina.	93
5.6. Calorimetría diferencial de barrido.	
5.6.1. Termograma de fosfato de calcio, Lactosa USP e indometacina y mezcla física.	94
5.6.2. Termograma de acuosomas con indometacina Exp. 12.	95
5.6.3. Termograma de acuosomas con indometacina Exp. 12-2.	96
5.7. Estudios de UV	
5.7.1. Validación.	
5.7.1.1. Precisión del sistema.	98
5.7.1.2. Linealidad del sistema.	99
5.7.1.3. Especificidad del método.	100
5.7.1.4. Exactitud y repetibilidad.	101
5.7.1.5. Linealidad del método.	102
5.7.1.6. Límite de detección.	103
5.7.1.7. Límite de cuantificación.	105
5.7.2. Estabilidad fotoquímica de la indometacina.	107
5.7.3. Solubilidad en mezclas de Etanol :Agua.	109
5.7.4. Diálisis.	110
5.8. Conclusiones.	112
5.9. Bibliografía.	114

## Capítulo 1. Introducción

Muchos de los fármacos y entre ellos la indometacina, son considerados dentro de la clase biofarmacéutica II, los cuales se caracterizan por su escasa solubilidad y elevada permeabilidad, lo que resulta en una baja biodisponibilidad y alta toxicidad. Entre las diversas maneras de superar este problema, se encuentra reduciendo estos materiales a escala nanométrica, con lo cual se aumenta la velocidad de disolución debido a un incremento en el área superficial y en su potencial químico; situación que puede ser aprovechada para su administración por vía respiratoria, inyectable, tópica y oftálmica.

Actualmente existen muchas propuestas para la producción de micro y nanopartículas, que se incluyen en dos categorías generales: micronización mediante molienda húmeda o homogenización a alta presión; y formación directa en etapas de las partículas. El primer grupo de técnicas presentan desventajas tales como la obtención de partículas dentro de un amplio rango de tamaño, posible contaminación con la molienda, inestabilidad térmica de los materiales debido al proceso. En cambio en los métodos de obtención directa de partículas, que incluyen precipitación en solución con estabilizadores, fluidos supercríticos, precipitación y emulsificación<sup>2</sup> pueden dar lugar también a micro y nanopartículas, pero según sea el caso, con márgenes de distribución de partículas más estrechos entre muchos otros métodos publicados en la literatura científica<sup>2-8</sup>.

## 1.1. Antecedentes.

Alcanzar una concentración de fármaco efectiva en un sitio específico por un periodo de tiempo suficiente para obtener el efecto farmacológico, es el requisito ideal para las formulaciones farmacéuticas. La mayoría de las enfermedades oculares, son tratadas mediante aplicación tópica de fármacos en forma de solución, suspensión o ungüento. Sin embargo, estas formas de dosificación no son lo suficientemente potentes para combatir dichas enfermedades y otras afecciones, debido particularmente a diversos factores pre-corneales naturales o derivados de la patología<sup>9</sup>. Esta situación llevó a considerar la necesidad de mejorar la disponibilidad ocular de fármacos mediante sistemas que incrementen el tiempo de residencia precorneal. Así, en la década de los 80's se desarrollaron sistemas sólidos de liberación controlada con capacidad de mejorar la retención de los fármacos en la superficie del globo ocular, pero lo cierto es que los pacientes receptores de tales sistemas no tardaron en manifestar su descontento por el malestar y la sensación que el cuerpo extraño les causaba<sup>10</sup>.

En la actualidad, con el desarrollo de la nanotecnología, disciplina científica que permite obtener, caracterizar, manipular y organizar la materia sistemáticamente a escala nanométrica, se está estimulando una revolución en la ciencia, la ingeniería, la tecnología e inevitablemente en la liberación de fármacos y la terapéutica<sup>11</sup> lo cual representa una opción para desarrollar nuevos sistemas oculares de liberación de fármacos.

Las nanopartículas poliméricas son, sin duda, los sistemas que muestran en la actualidad un mayor grado de innovación y versatilidad. Estos sistemas se pueden presentar en nanopartículas sólidas elaboradas a partir de un polímero biodegradable o bien, en forma de nanocápsulas consistentes en gotículas de aceite envueltas de una cubierta polimérica<sup>10</sup>. Kossovsky y colaboradores desarrollaron un nuevo vehículo de liberación, conocidos como "acuosomas", núcleos nanocristalinos sólidos y cubiertos con una superficie de polihidroxioligómeros<sup>12</sup>. Los acuosomas son como su nombre lo indica, "cuerpos de agua", es decir, presentan propiedades parecidas al agua, que le permiten

proteger y preservar moléculas biológicas frágiles (proteínas y polipéptidos); consiste de un núcleo nanocristalino en fase sólida, cubierto con una capa de oligómeros polihidroxilados en la cual fármacos y otras moléculas bioquímicamente activas pueden ser adsorbidas<sup>13</sup>.

Por lo anterior, se considera que estos sistemas pueden incluir en su estructura fármacos con características fisicoquímicas bien diferenciadas, desde moléculas altamente hidrofílicas y polares, fármacos ligeramente hidrosolubles, hasta fármacos muy hidrofóbicos; aunado a que su tamaño permitiría vehiculizar principios activos al interior del ojo y reducir la dosis a administrar, así como modificar la biodisponibilidad y minimizar los efectos adversos de la molécula.

Entre las sustancias sobre las que puede existir interés en desarrollar sistemas nanoparticulados, especialmente por su aplicación oftálmica está la Indometacina, ya que ésta tiene actividad antiinflamatoria y si bien en México no se comercializa un producto oftálmico con este principio activo, existen antecedentes en otros países sobre el uso y comercialización de formas farmacéuticas de aplicación oftálmica (Elmetacin, Indocorylle ) con este principio activo, que puede ser útil para el tratamiento de procesos inflamatorios oculares.

### 1.1.1. Nanotecnología.

La nanotecnología es un área de la ciencia dedicada a la manipulación de átomos y moléculas, permitiendo la construcción de estructuras dentro del intervalo del tamaño nanométrico (frecuentemente  $\leq 1000$  nm)<sup>14</sup>, pero también es un fenómeno extraordinario en la historia actual, la cual ha abarcado cada sector de la investigación, la ingeniería y los negocios; por su habilidad para caracterizar, manipular y organizar la materia sistemáticamente a escala nanométrica está originando una revolución en la ciencia, la tecnología e inevitablemente en la liberación de fármacos y la terapéutica. Así la nanotecnología ofrece oportunidades para la creación de materiales, dispositivos y sistemas que prometen avances científicos y tecnológicos importantes. En consecuencia, cada vez se está mucho más cerca de alcanzar el anhelado objetivo de una liberación precisa de fármacos en un compartimiento específico o en una célula blanco.

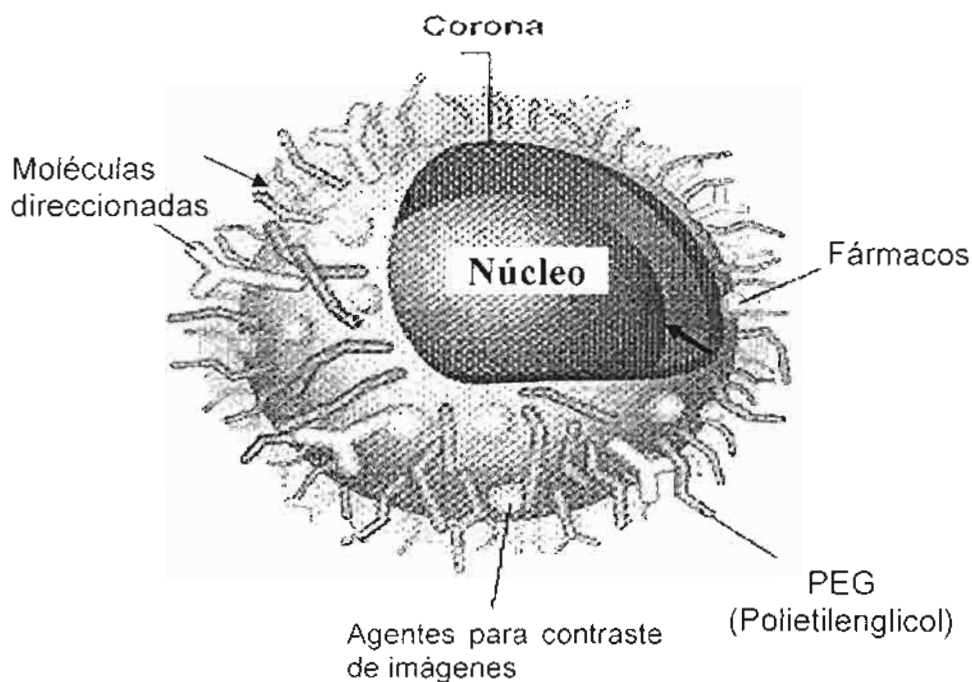
Claramente, los actuales sistemas nanoparticulados no deben confundirse con una versión en miniatura de los bien caracterizados sistemas coloidales (1 – 1000 nm) de liberación de fármacos en forma de emulsiones, suspensiones y así como los más relativamente recientes liposomas. De tal forma, los nanosistemas están predispuestos a ser transformados hacia sistemas más complejos asociados con sus dimensiones físicas menores a 100 nm (0.1 micras) y la nanotecnología promete generar una biblioteca de sistemas sofisticados de liberación de fármacos que integren el reconocimiento molecular, diagnóstico, entre otros<sup>12</sup>.

### 1.1.2. Definición de nanopartículas.

Son partículas sólidas coloidales con un intervalo de tamaño de 1 a 1000 nm. Un ejemplo se puede observar en la Figura 1 y suelen estar constituidos por materiales macromoleculares; pueden ser empleadas por si solas en la terapéutica por ejemplo, como adyuvantes en vacunas o como transportadores de fármacos, en este caso el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado y/o adsorbido o ligado<sup>15</sup>.

Por otra parte, es importante considerar que el término de nanopartículas generalmente se emplea para designar tanto a aquellas nanoesferas como a las nanocápsulas<sup>16</sup>.

A nivel mundial existen compañías que se encargan de la comercialización de nanomateriales para aplicaciones biológicas y médicas<sup>17</sup>.



**Fig. 1 Esquema de una nanopartícula y sus usos**

([http://www.nanowerk.com/spotlight/id1240\\_2.jpg&imgrefurl=http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid%3D1240.php&h=383&w=400&sz=25&hl=es&start=58&tbnid=Sim7GEi2KEySyM:&tbnh=119&tbnw=124&prev=/image%3Fq%3Dnanoparticle%2Band%2Bdrugs,%2BMRI,%2BPEG%26start%3D40%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26svnum%3D10%26hl%3Des%26sa%3DN](http://www.nanowerk.com/spotlight/id1240_2.jpg&imgrefurl=http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid%3D1240.php&h=383&w=400&sz=25&hl=es&start=58&tbnid=Sim7GEi2KEySyM:&tbnh=119&tbnw=124&prev=/image%3Fq%3Dnanoparticle%2Band%2Bdrugs,%2BMRI,%2BPEG%26start%3D40%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26svnum%3D10%26hl%3Des%26sa%3DN))



### 1.1.3. Métodos de preparación de nanopartículas.

A través de la literatura científica y las patentes, se ha notificado distintos métodos para la preparación de nanopartículas con sus variantes, entre ellos se encuentran <sup>15,16</sup> tan sólo por señalar los más difundidos:

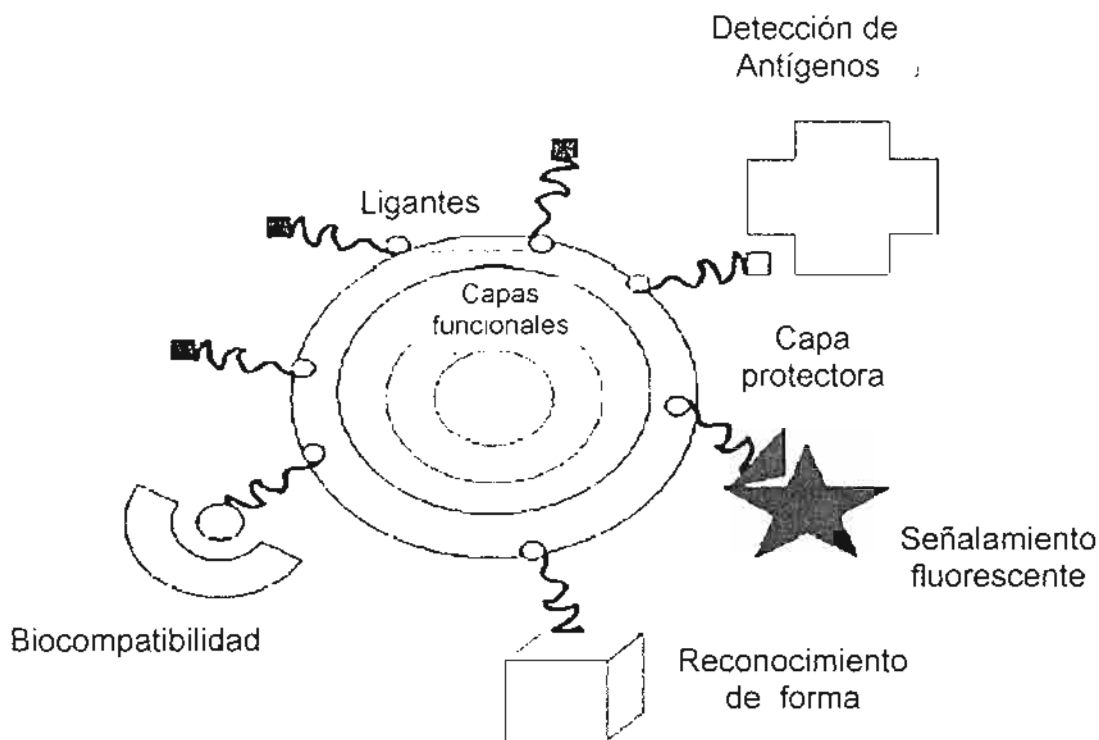
- A. *Polimerización*
- B. *Evaporación de disolvente*
- C. *Nanoprecipitación*
- D. *Proceso de precipitación por adición de sales (salting out)*

### 1.1.4. Aplicaciones.

A continuación se presenta una lista de las distintas aplicaciones dadas a los nanomateriales en la biología y la medicina<sup>16, 17, 18</sup>.

- ☞ Nanopartículas con propiedades inherentes de diagnóstico
- ☞ Marcadores fluorescentes biológicos
- ☞ Bio-detección de patógenos
- ☞ Prueba de la estructura del ADN
- ☞ Ingeniería de tejidos
- ☞ Destrucción de tumores vía calentamiento (hipertermia)
- ☞ Aumento del contraste de la imagen de resonancia magnética.
- ☞ Estudios de fagocinética
- ☞ Microchips para liberación de fármacos.

En la figura 2 se trata de esquematizar las aplicaciones de los nanobiomateriales en problemas médicos o biológicos.



**Fig. 2 Configuración típica utilizada en nanobiomateriales aplicados a problemas médicos y biológicos. (Tomado de Referencia 16)**

En lo que se refiere a la aplicación de las nanopartículas en el campo de la terapéutica se puede citar lo siguiente:

*a) Citostáticos*

Varios autores reportan resultados de nanopartículas con fármacos anticancerígenos<sup>18-21</sup>. Estos resultados claramente demuestran que éstos son transportadores muy promisorios de agentes citostáticos.

Entre las aplicaciones más prometedoras de las nanopartículas es su uso como transportadores de agentes antitumorales. Una de las razones puede ser la actividad endocítica incrementada presentada por una variedad de tumores. Esta

actividad endocítica aumentada puede ser una explicación para el marcado aumento en el aclaramiento de lípidos, en las pruebas de aclaramiento (Lipofundin®) en pacientes con cáncer. Otra posible razón para la acumulación tumoral aumentada es que las nanopartículas escapan de la circulación sanguínea a través de los poros del tejido endotelial en el tumor o que las partículas de los vasos sanguíneos en los tumores presentan una incrementada bioadhesividad para las partículas, comparable a la que se observa en los ojos después de la inflamación. Este efecto puede entonces permitir la absorción de nanopartículas en la superficie de los vasos sanguíneos del tumor.

#### *b) Antibióticos*

Se ha reportado la eficacia de algunos antibióticos unidos a nanopartículas en el tratamiento de infecciones<sup>22- 25</sup>. Asimismo se ha observado la efectividad de las nanopartículas cargadas con antibióticos contra microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Leishmania donovani* (causante de leishmaniasis visceral o kala-azar), el *Tripanosoma brucei brucei* y el *Aspergillus fumigatus*, entre otros.

#### *c) Productos Oftálmicos*

En la terapia ocular la vida media de eliminación tan corta (1-3 minutos) de soluciones acuosas de gotas oculares representa el mayor problema. Sin embargo, cuando se han utilizado nanopartículas de polialquilcianoacrilato en conejos, la vida media de eliminación se incrementa a aproximadamente 15 – 20 minutos. Esto se debe también en parte a que, una pequeña cantidad de nanopartículas se adhiere a la conjuntiva y a la córnea. Por otra parte, se ha reportado que ciertos fármacos como la pilocarpina y la indometacina, los cuales son fármacos importantes en el tratamiento del glaucoma, cuando se han unido a nanopartículas de polibutilcianoacrilato y quitosan, se mejora el tiempo de residencia ocular, lo cual disminuye la frecuencia de instilaciones del fármaco y también incrementa la concentración en el humor acuoso en conejos en

comparación con la solución, lo cual genera disminución en la presión intraocular, característica del glaucoma. Debido a que existen reportes<sup>9,25-30</sup> que indican que la indometacina es útil para el tratamiento de la inflamación ocular y si las nanopartículas se adhieren al tejido ocular inflamado cuatro veces más que al tejido sano, es por ello que estos sistemas prometen ser buenas propuestas como transportadores de fármacos antiinflamatorios como la Indometacina.

## 1.2. Sistemas de liberación de fármacos.

La unión de proteínas biológicamente activas, péptidos o agentes farmacológicos a varios transportadores ha sido en las últimas décadas un área de intensa investigación. Estos sistemas biológicos conjugados ofrecen la promesa de reducir la toxicidad, aumentar la eficacia y disminuir los costos de los agentes biológicamente activos. Las características principales de estos sistemas son: la naturaleza fisicoquímica del transportador y el método por el cual la molécula biológicamente activa es acoplada al vehículo.

Los sistemas de liberación de fármacos presentan las siguientes ventajas:

1. Permiten la conversión química, física o biológica de un agente biológicamente activo a una forma inactiva o profármaco.
2. Facilitan el empleo de macromoléculas solubles simples en las cuales un agente biológicamente activo es inmovilizado lo cual ocurre porque los transportadores macromoleculares exhiben propiedades de vectorización intrínseca.
3. Permiten el empleo de transportadores particulados multicomponentes más complejos para la protección del agente activo.
4. No obstante es necesario mencionar que existen retos técnicos a los cuales se enfrentan los sistemas de liberación molecular, entre los cuales se encuentran<sup>13</sup> los de tipo químico y como la posibilidad de una degradación, por ejemplo: deaminación, oxidación, isomerización, proteólisis, formación de enlaces bisulfuro, etc. Mismos que afectan tanto la liberación del principio activo, como el efecto farmacológico que se desea. Los desafíos de tipo físico también implican un proceso de degradación, pero éste involucra eventos como la desnaturalización, la agregación, la precipitación y la adsorción.

También se encuentran otro tipo de retos, los cuales son de naturaleza biológica, por ejemplo, el que las macromoléculas solubles están limitadas por su capacidad para liberar y entregar el fármaco, lo cual también afecta en última instancia el efecto farmacológico.

### 1.2.1. Generalidades.

La nanotecnología también se ha utilizado para el incremento de la solubilidad y la velocidad de disolución de sustancias poco solubles, siendo forma muy prometedora para aumentar la biodisponibilidad de fármacos<sup>18, 31</sup> y su utilidad.

Cuando los fármacos son inestables fisicoquímica y/o biológicamente en un ambiente biológico particular, por ejemplo al pH del jugo gástrico o por la presencia de enzimas o proteínas de la sangre, las partículas sólidas pueden ser convertidas a sistemas poliméricos nanoparticulados en los cuales los fármacos son encapsulados en la forma de una solución sólida o dispersión, o son adsorbidos en la superficie o químicamente unidos.

Un híbrido fármaco-polímero o sistemas combinados ofrecen la posibilidad de una entrega de fármaco determinada en este contexto por el tamaño de partícula y la distribución de la carga superficial, así como la hidrofiliidad o hidrofobicidad de las nanopartículas o nanoesferas. Para lograr este objetivo, existen muchas opciones para modificar dichas propiedades haciendo una adecuada selección de los materiales poliméricos naturales o sintéticos.

Las nanoesferas pueden ser preparadas por un número de métodos, los cuales son clasificados en dos categorías principales dependiendo de que tipo de polímero se forme:

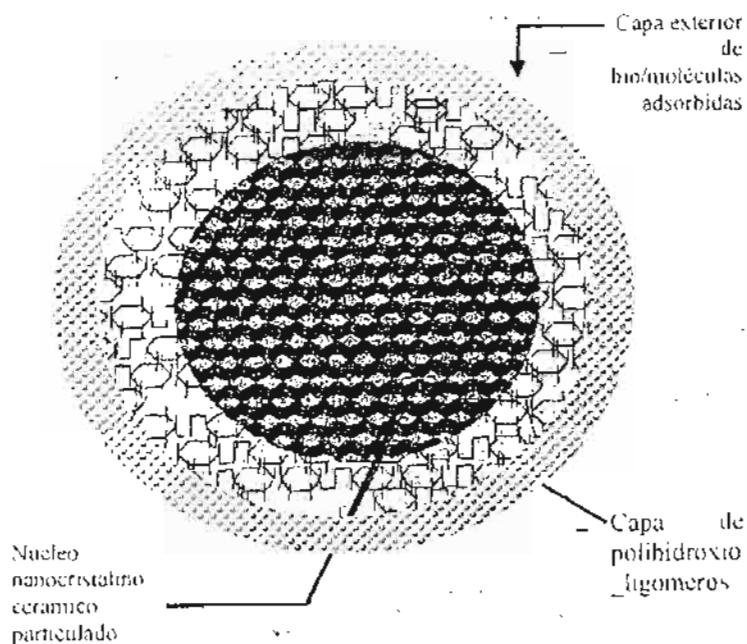
- a) Mediante una reacción de polimerización
- b) Por un proceso fisicoquímico, como son homogenización presurizada, emulsificación, precipitación, cristalización polimérica esférica usando directamente una macromolécula o un polímero preformado.

Es importante considerar otra función característica de las nanoesferas, que es su habilidad de liberar el fármaco atravesando previamente un número de barreras biológicas hasta el sitio de acción, lo cual aumenta su biodisponibilidad y por ende se alcanza el efecto farmacológico deseado.

### 1.2.2. Acuomas.

Actualmente se cuenta con diferentes modelos de transportadores, y en el campo farmacéutico se encuentran por ejemplo: los sistemas profármaco, ligando-receptor, anticuerpos monoclonales, polímeros solubles, y más recientemente los liposomas (bicapas lipídicas esféricas). Por otra parte Kossovsky y colaboradores desarrollaron un novedoso vehículo de liberación, conocido como "acuomas". Esta tecnología representa una unión de los principios de la microbiología, química de alimentos, biofísica y síntesis en fase sólida, química supramolecular, etc. Los acuomas son, como su nombre lo indica "cuerpos de agua", es decir, presenta propiedades parecidas al agua, que le permiten proteger y preservar moléculas biológicas frágiles (proteínas y polipéptidos); están constituidos por un núcleo nanocrystalino cerámico de fase sólida, el cual presenta una regularidad estructural, lo que asegura que cualquier cambio en la superficie no afectará la estructura principal, además de que exhibe altos niveles de energía superficial favoreciendo el enlace de los polihidroxioligómeros; este núcleo se encuentra recubierto por una capa de oligómeros hidroxilados (piridoxal-5-pirofosfato, citrato, sucrosa, trealosa y celobiosa, etc.) (Figura 3), en la cual fármacos y otras moléculas biológicamente activas son adsorbidas mediante uniones de tipo no covalente, se caracterizan por tener un diámetro entre 30 y 500 nm. Pueden liberar fármacos a través de una combinación con el blanco específico, mediante protección molecular y por un proceso de liberación lenta (liberación modificada).

La estructura general de un acuosoma se presenta a continuación:



**Fig. 3 Esquema de un acuosoma (Tomado de Referencia 12)**

El tamaño y la superficie activa inherente de los acuosomas les permite que éstos puedan ser unidos con una gran cantidad de fármacos a través de un proceso no covalente (fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas). Debido a su tamaño y estabilidad estructural relativa, los acuosomas pueden recubrirse para evitar ser filtrados rápidamente por el sistema reticuloendotelial u otro tipo de degradación ambiental<sup>12, 13</sup>.

La tecnología de los acuosomas ha comenzado a competir con otras nanotecnologías como la de los liposomas, vehículos de liberación de adenovirus modificados y vacunas de ingeniería genética<sup>13</sup>.

Dentro de las aplicaciones de los acuosomas en el ámbito de la terapéutica se han utilizado en la liberación de:

1. Antígenos
2. Insulina o hemoglobina
3. Genes



### 1.2.3. Inmovilización de una biomolécula en un vehículo de liberación.

La forma tradicional de acoplar una molécula biológicamente activa a un vehículo de liberación es a través de enlaces covalentes. Este es el caso de varios vehículos macromoleculares, pero también ha sido usado para acoplar agentes a la mayoría de los acarreadores particulados. Una forma alternativa, es el empleo de fuerzas no covalentes para promover el autoensamblado de moléculas bioquímicamente activas al acarreador, como ha sido usado en liposomas y en algunos sistemas poliméricos complejos. Las interacciones no covalentes crean menos restricciones moleculares tridimensionales.

Los acuosomas actúan como el agua (Figura 4), permitiendo que estos vehiculos de liberación protejan y preserven a las moléculas como son los polipéptidos y proteínas.

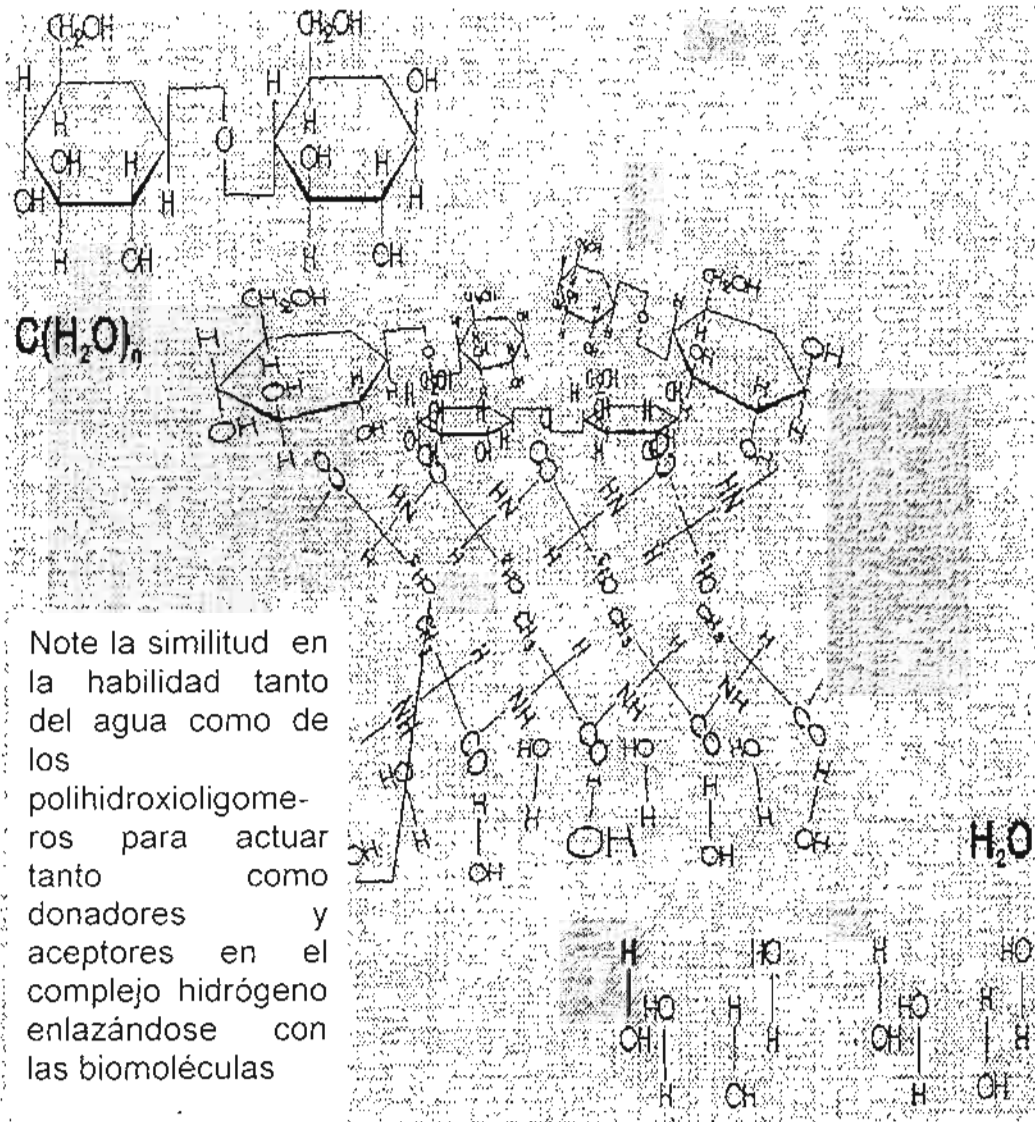


Fig. 4 Acuomas actuando como el agua (Tomado de Referencia 12)

Las interacciones agua-proteína son importantes para mantener las conformaciones en las proteínas, mismas que son vitales para sus actividades biológicas. La presencia de moléculas de agua afecta por completo las conformaciones de las proteínas, ya que afecta las interacciones electrostáticas entre las cargas y los grupos polares. En el sitio activo, las moléculas probablemente afectan las interacciones entre el sustrato y las proteínas, quizás afectando el mecanismo de enlace de sustrato y la actividad enzimática. El agua actúa como un plastificante molecular (suavizante) que "lubrica" la dinámica local de las proteínas y las vuelve lo suficientemente flexibles para asumir una variedad de conformaciones que es una ventaja para el enlace del sustrato, ligando o antígeno. A nivel molecular, el agua facilita el reconocimiento espacial de una molécula por otra, en la cual la energía y la información son transmitidas, los productos son generados y las respuestas son iniciadas, formándose estructuras biológicas complejas.

Irónicamente, mientras el agua es crítica para el mantenimiento de la forma molecular, el estado acuoso no es en el cual las proteínas sean resistentes a la desnaturalización. Una variedad de cambios ambientales como la temperatura, pH, sales y disolventes pueden causar inactivación de proteínas en el estado acuoso, y los mecanismos irreversibles de inactivación de proteínas frecuentemente siguen caminos muy comunes. Estos incluyen: destrucción de cisteína, oxidación de residuos de cisteína, deaminación de residuos de asparagina y glutamina e hidrólisis de enlaces peptídicos en los residuos de ácido aspártico.

Como su naturaleza podría indicar, las proteínas son más estables en estado sólido, sin embargo, el estado sólido en el cual las proteínas son estables, no incluye el estado sólido creado cuando los fármacos son acoplados a un vehículo de liberación. Ciertamente, en general, varios sistemas de liberación de proteínas en estado sólido y al igual que las superficies de los contenedores tienden a inactivar los enlaces o a absorber de otra manera a los fármacos. Esto debido la adsorción de la superficie a partir de un estado acuoso de las superficies de los vehículos de liberación o contenedores son originados por una ganancia entrópica

asociada a la deshidratación. La pérdida de moléculas de agua, importantes en el mantenimiento de la forma molecular, tiende a producir cambios conformacionales significativos (Figura 5). Dado lo anterior, se ha observado que una familia de azúcares exhibe propiedades dehidroprotectoras como los mono, di- y oligosacáridos; y esta habilidad está relacionada con la habilidad que tienen de formar capas vidriosas. Se han realizado diversos estudios con diferentes tipos de sacáridos como trealosa, sorbitol, celobiosa, maltosa, lactitol y sacarosa. Kossovsky y colaboradores han demostrado que la estructura molecular secundaria "acuosa" protege de la adsorción superficial y la desecación<sup>13</sup>.

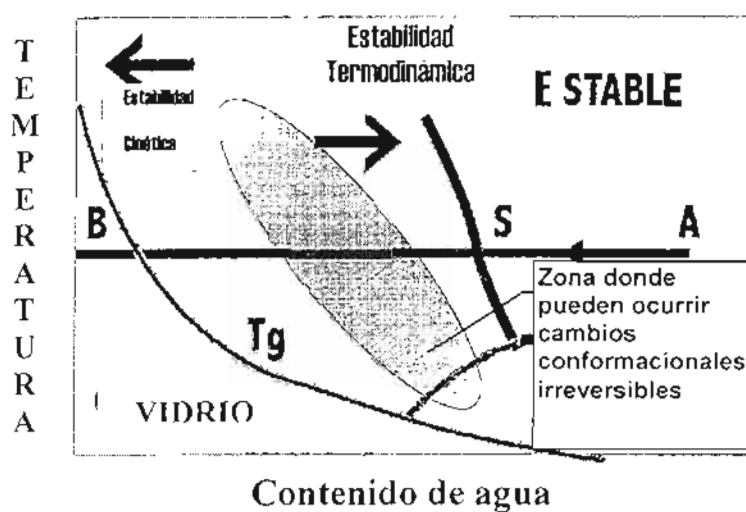


Fig. 5. Cambios conformacionales en una biomolécula. (Tomado de Referencia 12)

En una suspensión acuosa diluida, una biomolécula activa es estructuralmente estable, pero es vulnerable a una serie de fuerzas ambientales degradantes como es la hidrólisis, oxidación y racemización. En una superficie immobilizada o deshidratada, una biomolécula activa alcanza una gran estabilidad cinética a cambio de una inestabilidad termodinámica. A partir de un estado diluido (A) a través de una supersaturación (S) con una pérdida progresiva de agua sobre un camino hacia un estado sólido vídrio (S), una biomolécula activa pasa a través de una zona de transición termodinámicamente definida (pérdida entrópica de agua y entalpía de absorción (zona gris o grabada) donde cambios

conformacionales irreversibles podrían ocurrir. Se ha observado que los disacáridos empleados en la fabricación de acuosomas parecen estabilizar a las biomoléculas durante esta zona durante la deshidratación superficial inducida. La línea punteada representa el mecanismo de secado por congelación entre el punto eutéctico y la temperatura de transición vítrea.

#### 1.2.4. Panorama actual de los acuosomas.

En la siguiente tabla se presenta un panorama actual de los usos y la liberación molecular empleando acuosomas.

**Tabla 1. Situación actual de la tecnología de acuosomas para la liberación molecular**

Uso	Superficie macromolecular y proteínica	Se busca	Situación actual
Vacunas	Antigénica envolviendo proteínas como EBV y VIH	Que la conformación específica de la proteína conserve	Parece ser efectivo para una amplia variedad de antígenos. Tanto la inmunidad protectora y la toxicidad no han sido evaluadas.
Sustitutos sanguíneos	Hemoglobina		<i>In vitro</i> las propiedades son similares a las de la sangre. <i>In vivo</i> propiedades incluyendo seguridad y toxicidad no han sido completamente caracterizadas.
Farmacéutico	Fármacos activos (insulina)		Se conserva la bioactividad de fármacos. La toxicidad a largo plazo no ha sido caracterizada.
Terapia génica	Material genético		Enlace y liberación no han sido demostrados, La vectorización no está disponible.
Enzimas	Polipéptidos (DNAsa)		La bioactividad de enzimas es protegida. La toxicidad a largo plazo no ha sido caracterizada.

EBV = Virus de Epstein Barr (por sus siglas en inglés)

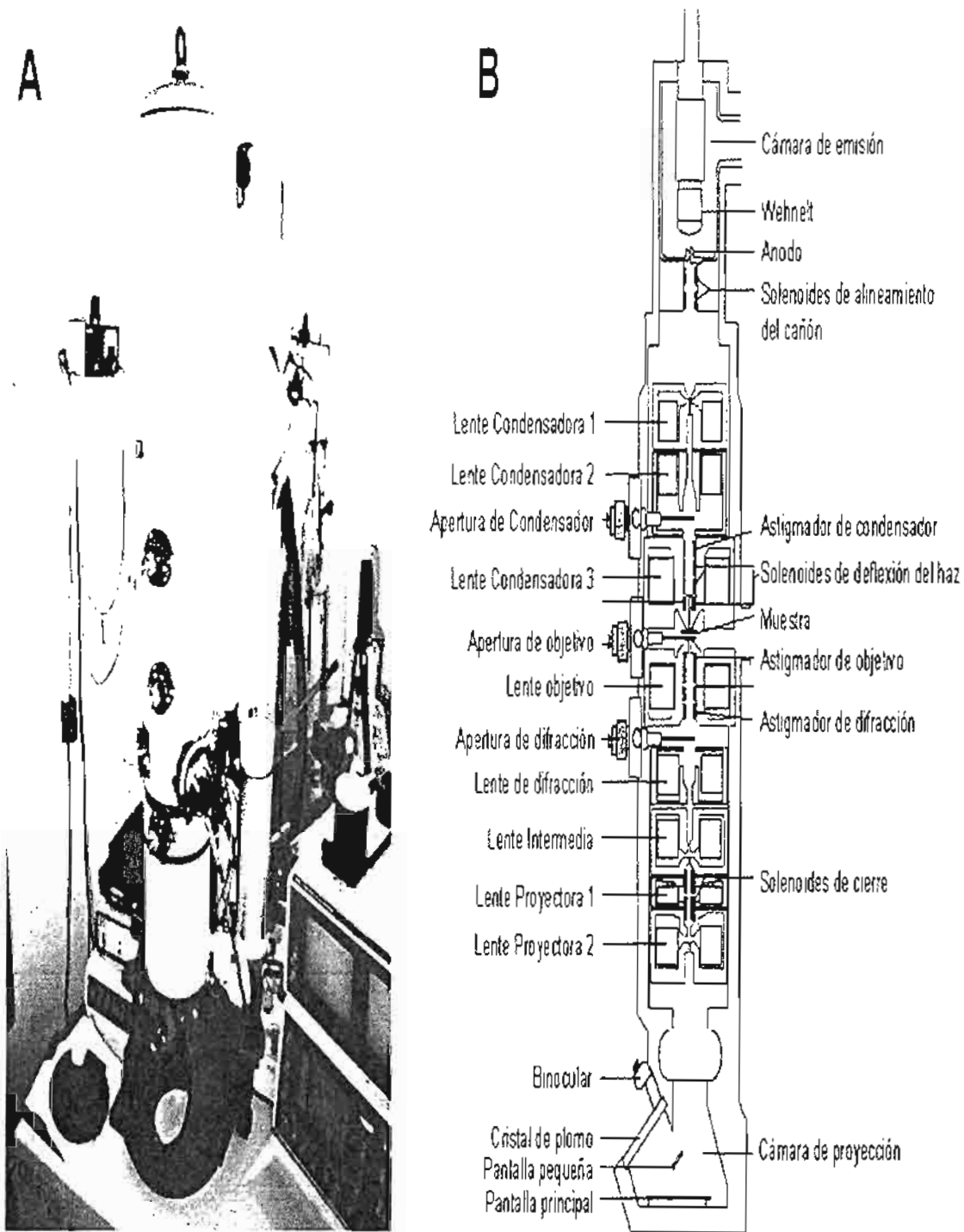
VIH = Virus de Inmunodeficiencia Humana.

### 1.3. Microscopia electrónica

El microscopio electrónico (Fig. 6) es un instrumento que explota las pequeñísimas longitudes de onda de los haces electrónicos acelerados con la finalidad de formar imágenes. Actualmente la microscopia electrónica es ampliamente usada en estudios biológicos de las estructuras celulares<sup>32</sup> y caracterización de sistemas poliméricos nanoparticulados para uso farmacéutico<sup>33</sup> y ha contribuido enormemente en la comprensión de éstas. Desde décadas pasadas, la microscopia electrónica se ha convertido en herramienta indispensable para la investigación de materiales e investigación biomédica. En farmacia, se aplica para la obtención de información relativa a la forma, tamaño, morfología de superficie de las nanopartículas.

Dentro de la microscopia electrónica se encuentran dos variantes:

- a) Microscopia electrónica de transmisión
- b) Microscopia electrónica de barrido



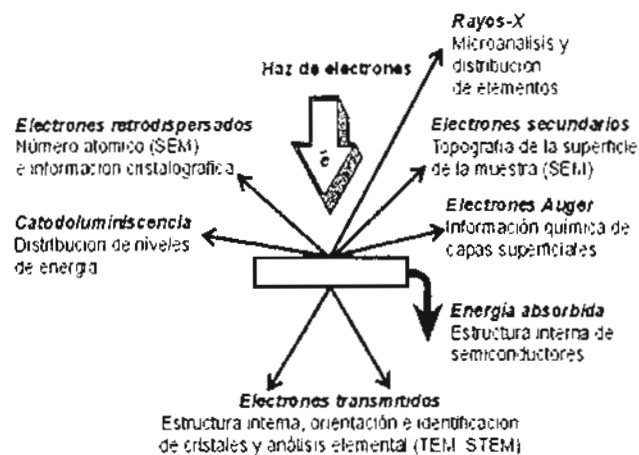
**Fig.6 Esquema del microscopio electrónico.**

([http://bifi.unizar.es/jsancho/estructuramacromoleculas/19microselect/microscopio elect.JPG](http://bifi.unizar.es/jsancho/estructuramacromoleculas/19microselect/microscopio%20elect.JPG)).



### 1.3.1. Fundamento del microscopio electrónico.

Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra, se producen varios tipos de señales, las cuales nos permiten hacer la caracterización estructural y química de ésta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos. La Figura 7 muestra esquemáticamente la interacción haz electrónico-muestra y las imágenes que originan. Los electrones retrodispersados y secundarios nos dan información sobre la superficie de la muestra, permitiéndonos de este modo obtener una imagen topográfica de ella. Estos electrones son la fuente de información para la microscopía electrónica de barrido. Los electrones absorbidos con el detector adecuado, nos dan información sobre la resistividad de la muestra. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, permitiéndonos hacer, por lo tanto, un análisis químico de ella. Los electrones que atraviesan la muestra los podemos clasificar en dos tipos: *transmitidos*, es decir, los que pasan por la muestra sin ser desviados de su dirección incidente; y *difractados*, que son aquellos que si son desviados de su dirección de incidencia que interfieren en su salida. Los haces transmitidos y difractados son los que usa la microscopía electrónica de transmisión<sup>32, 34</sup>.



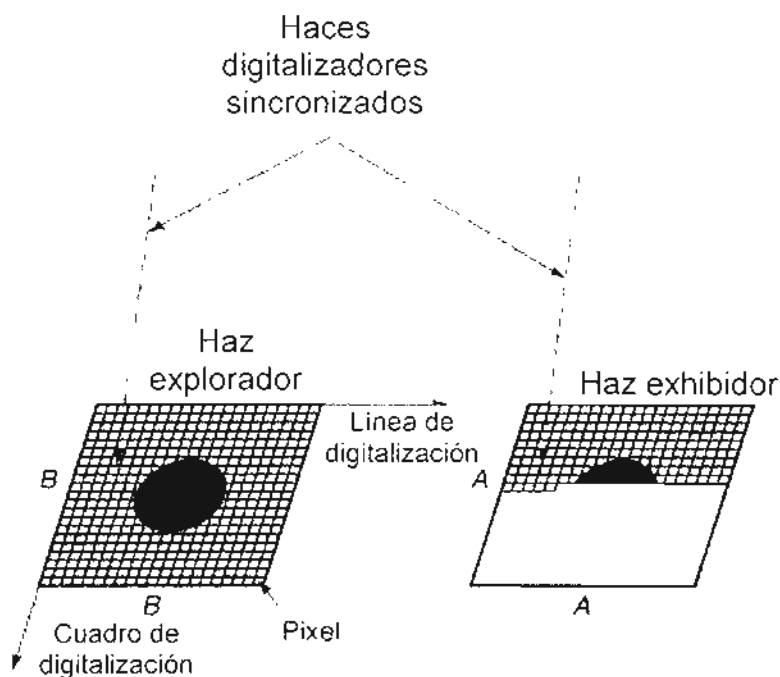
**Fig. 7 Señales generadas de la interacción haz de electrones-muestra y usos.**

([http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/imagenes/fig1.gif&imgrefurl=http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr\\_electr.htm&h=331&w=513&sz=16&hl=es&start=52&sig2=\\_rK1EcUfezFb\\_YUU1G6KWQ&tbnid=X23p hcAP0\\_OkFM:&tbnh=85&tbnw=131&ei=qzXXRtubloqQiQG0rAH&prev=/imagenes%3Fq%3Delectrones%2Bauger%26start%3D40%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26svnum%3D10%26hl%3Des%26sa%3DN](http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/imagenes/fig1.gif&imgrefurl=http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr_electr.htm&h=331&w=513&sz=16&hl=es&start=52&sig2=_rK1EcUfezFb_YUU1G6KWQ&tbnid=X23p hcAP0_OkFM:&tbnh=85&tbnw=131&ei=qzXXRtubloqQiQG0rAH&prev=/imagenes%3Fq%3Delectrones%2Bauger%26start%3D40%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26svnum%3D10%26hl%3Des%26sa%3DN))

Para los fines del trabajo, se describirá solamente la microscopía electrónica de barrido.

### 1.3.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la cual el enfoque es sobre un área pequeña de la muestra y barre la superficie de la misma moviendo el haz y detectando en cada zona una intensidad promedio de los electrones secundarios, dando información topográfica de la muestra. El microscopio electrónico de barrido es como una máquina de imágenes (Fig. 8).



**Fig. 8** Esquema del principio básico de mapeo del MEB. (Tomado de Referencia 34)

El microscopio electrónico de barrido es un miembro de la clase de instrumentos que funciona como una máquina para fax. La muestra es bombardeada por una corriente de electrones escaneando a través de la superficie. Las radiaciones del espécimen estimuladas por una corriente incidente son detectadas, amplificadas y usadas para modular el brillo de una segunda

corriente de electrones escaneando, sincronizadamente con la primera corriente, a través de un tubo de rayos.

Mediante la MEB es posible utilizar una gran parte de las señales provenientes de la interacción de los electrones con los sólidos, y esto nos permite tener una mayor información, acerca de la orientación cristalina, la composición química, la estructura magnética, etc., usando los detectores adecuados.

### **1.3.3. Componentes básicos de MEB**

La Figura 9 muestra los componentes básicos del microscopio. Estos pueden dividirse en dos categorías principales:

- a) Sistema óptico-electrónico
- b) Detector, sistemas de escaneo y exhibición.

Los componentes óptico-electrónicos son descritos como la columna de instrumento mientras que los otros componentes son conocidos como la "consola" de la máquina. La fuente de electrones, la cual produce electrones mediante una emisión térmica a partir de cátodos de tungsteno y hexabromuro de lantano o a partir de una fuente de campo de emisión. Estos electrones son entonces acelerados con una energía que va de 500 eV hasta 30 keV. La corriente electrones es enfocada sobre la muestra por una o más lentes condensadoras.

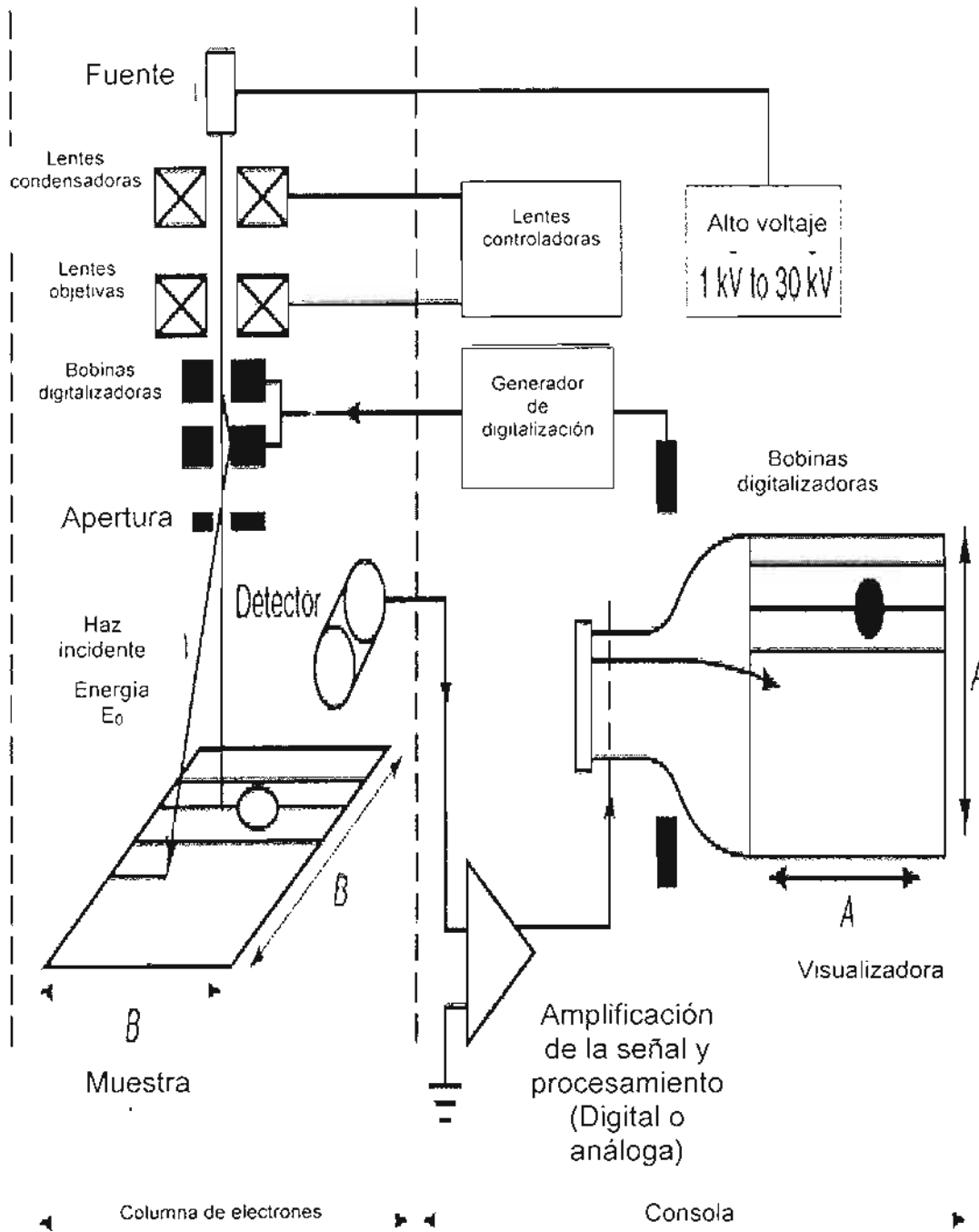


Fig. 9 Componentes básicos del Microscopio electrónico de barrido. (Tomado de Referencia 34)

#### 1.3.4. Modos de operación

##### 1. *Electrones secundarios*

Electrones secundarios son aquellos electrones emitidos por la muestra, bajo la irradiación de una corriente la cual tiene energía entre 0 eV a y 50 eV. Por su baja energía, los electrones secundarios solamente viajan distancias relativamente cortas en la muestra (3 a 10 nm). La formación de imágenes con electrones secundarios es el modo de operación más común del MEB. La razón de esto que los electrones secundarios son más fáciles de coleccionar y ellos llevan información acerca de la topografía de la superficie de la muestra.

##### 2. *Electrones retrodispersados*

Electrones retrodispersados son definidos como aquellos electrones reemitidos a partir de la muestra con energías entre 50 eV y la energía de la corriente incidente  $E_0$ . Debido a que el campo de BSE varía con el número atómico de la muestra, el contraste de las imágenes depende del número atómico del objeto<sup>34</sup>.

## 1.4. Espectrofotometría infrarroja.

### 1.4.1. Fundamento de la espectrofotometría infrarroja.

La espectrofotometría infrarroja<sup>35</sup> se basa en la medición de la absorción o emisión de la luz mediante vibraciones moleculares. Los átomos en las moléculas vibran uno con respecto a otro al mismo tiempo que los enlaces individuales se alargan y se acortan, grupos enteros oscilan con respecto a otros átomos o grupos, así como las estructuras de anillo se expanden o se contraen. Si existe un dipolo eléctrico oscilante que esté asociado con un modo de vibración en particular, entonces ocurrirá una interacción con el campo eléctrico o la radiación electromagnética de esa misma frecuencia, lo que llevará a la absorción o emisión de energía que se pone de manifiesto como una amplitud de vibración en aumento. La porción vibracional del espectro electromagnético está en la región infrarroja, entre las longitudes de onda entre 2.5 y 25  $\mu\text{m}$ .

La identificación de estos grupos depende de la cantidad de radiación infrarroja absorbida o emitida o emiten y la frecuencia particular, medida en  $\text{cm}^{-1}$ , (número de onda) a la cual estos grupos absorben o emiten. Así, en particular la espectroscopia infrarroja de absorción es una medida de la longitud de onda y de la intensidad de la absorción de luz infrarroja media por parte de una muestra. La luz infrarroja media (2.5 – 50  $\mu\text{m}$ , 4000 – 200  $\text{cm}^{-1}$ ) es energéticamente suficiente para excitar las vibraciones moleculares hacia niveles de energía superiores. La longitud de onda de muchas bandas de absorción infrarroja son características de enlaces químicos específicos, y la espectroscopia de infrarroja encuentra esto es de gran utilidad para el análisis cualitativo de moléculas orgánicas y organometálicas. También es usada para confirmar la identificación de un compuesto en particular y es una herramienta que ayuda a la determinación de la estructura de una molécula. Para la identificación de la fuente de una banda de absorción se considera la “intensidad” (débil, media o fuerte), la “forma” (ancha o delgada) y la “posición” ( $\text{cm}^{-1}$ ) en el espectro.

El espectro de infrarrojo registra la presencia de la mayoría de los enlaces covalentes asimétricos, y ésta técnica ha sido ampliamente empleada para la

identificación de las estructuras químicas. Como en otras técnicas espectroscópicas relacionadas, como son espectroscopia de UV-Vis, el grado de absorción de la luz está relacionado con la concentración. Sin embargo, la espectroscopia de infrarrojo es una técnica simple para la identificación de grupos en sistemas simples y complejos. El espectro vibracional de una molécula es único, excepto en los casos de que existan isómeros ópticos.

#### **1.4.2. Aplicaciones.**

Como una herramienta analítica, la espectroscopia infrarroja tiene aplicaciones diversas, tanto en investigación para la liberación de fármacos como en el desarrollo de producto y manufactura. Es una herramienta básica para investigar sistemas biológicos, caracterizar materiales, entre otros. En los procesos de desarrollo de medicamentos, para la reformulación y manufactura, es útil durante el monitoreo en línea para el control del proceso y en control de calidad para las pruebas de estabilidad a largo plazo<sup>36-37</sup>.

Dado que la indometacina presenta varios grupos funcionales que pueden tener una señal característica dada su naturaleza química, la espectrofotometría de infrarrojo es considerado una buena herramienta para el análisis de este fármaco.

## 1.5. Resonancia magnética nuclear.

### 1.5.1. Fundamento de la resonancia magnética nuclear.

La resonancia magnética nuclear es una extraordinaria fuente de información sobre la estructura y dinámica de las moléculas.

Está basado en el principio<sup>37-38</sup> de que el núcleo absorbe radiación de frecuencias ligeramente asociadas a su ambiente magnético local. Ciertos átomos tienen una "rotación" nuclear (spin) similar a la "rotación" de un electrón. La rotación de partículas cargadas (los protones en el núcleo tienen carga positiva) genera un campo magnético. Cuando un átomo es colocado en un campo magnético externo, el campo magnético generado por el núcleo será "alineado" con o contra este campo magnético externo. A algunas frecuencias de radiación electromagnética, los núcleos absorberán energía y girarán para alinearse respectivamente con el campo magnético externo. Esto es conocido como fenómeno de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Como parte de la técnica, se recomienda que la frecuencia de radiación sea constante mientras la fuerza del campo magnético externo es variada. A algunos valores de la fuerza del campo, la energía requerida para "voltear" el protón compite por la energía de la radiación. La absorción ocurrirá y se observará una señal. El espectro que resulta a partir de estas absorciones es llamado Espectro de RMN. Las absorciones que ocurren a campos de fuerza relativamente bajos son de "Campo bajo" relativas a aquellas que ocurren en campos de fuerza mayor. La fuerza de campo a la cual el protón absorberá energía se le conoce como "Desplazamiento químico" (medido en partes por millón, ppm o  $\delta$  relativo a la absorbancia del tetrametilsilano). El desplazamiento químico de un protón depende de su ambiente electrónico.

Las señales que se obtienen a partir de la absorción del protón pueden ocurrir como un singulete, doblete, triplete, etc. El número de picos en la señal depende de la cercanía de los protones. Los protones que están en un ambiente electrónico idéntico son protones equivalentes: aquellos que no se encuentran en ambientes electrónicos idénticos son protones no equivalentes. Un protón que



tiene "n" protones no equivalentes adyacentes tendrá una señal con "n + 1 picos" conocida como un "multiplete" (n + 1). Este es el resultado de un "spin-spin splitting" de los protones. Las diferencias en las frecuencias de resonancia son muy pequeñas. Cuando se analiza un compuesto, generalmente se mide como la diferencia entre la frecuencia de resonancia de un compuesto de referencia y la de la sustancia a ser analizada. La referencia más común empleada es la del tetrametilsilano, y cuando se reporta la resonancia de cada protón se reporta en términos de que tan lejos (en Hz) el protón es desplazado de los protones del tetrametilsilano (TMS) El desplazamiento del tetrametilsilano de un protón determinado depende de la fuerza aplicada al campo magnético. Los protones del TMS resuenan a 0 ppm. La mayoría de los protones en los compuestos orgánicos resonarán a altas frecuencias y la posición de la absorbancia de información importante acerca del ambiente molecular de un protón en particular, facilitando información estructural acerca del compuesto bajo investigación<sup>38</sup>.

### **1.5.2. Aplicaciones.**

Siendo una técnica analítica, las aplicaciones son diversas, tanto en investigación de moléculas que sirvan como fármacos, durante los procesos de estabilidad a largo y corto plazo. Su utilidad ayuda a la caracterización de materiales, elucidación de estructuras químicas, durante la formulación y reformulación. Considerando que la indometacina presenta grupos que tienen la capacidad de sufrir desplazamiento químico cuando son sometidas a un campo magnético, es posible emplear esta herramienta para identificación de éste fármaco en sistemas de liberación de fármacos<sup>39</sup>.

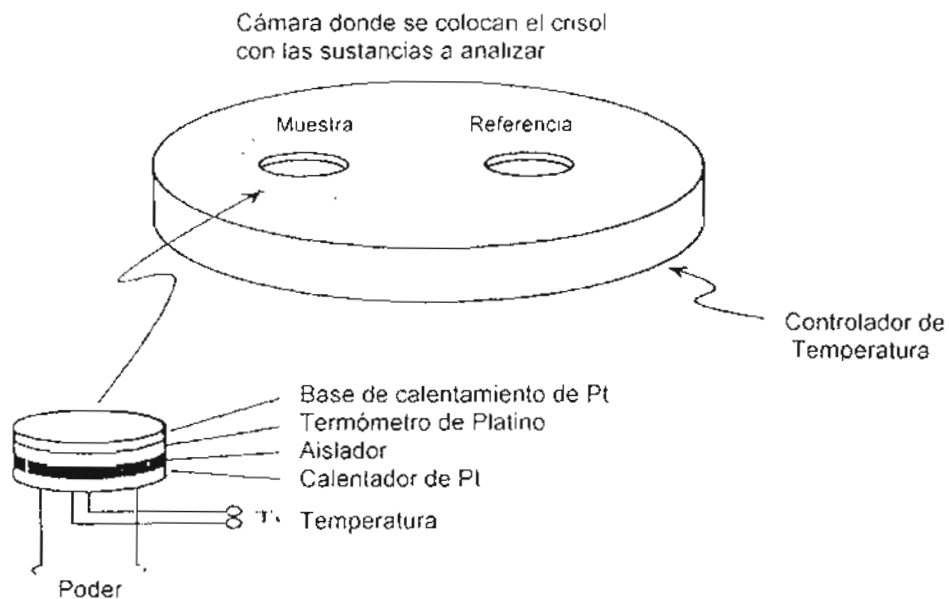
## **1.6. Calorimetría de barrido.**

### **1.6.1. Fundamento de la calorimetría diferencial de barrido.**

Se basa<sup>40</sup> en el mantenimiento de la temperatura de la referencia y de la muestra al mismo tiempo. Esto se logra por la colocación de sensores de temperatura (termómetros de resistencia de platino) en un circuito puenteado. Algún cambio en la temperatura tanto en la muestra como en la referencia (debido a un evento endo o exotérmico) es inmediatamente compensando por una cantidad equivalente de flujo requerido que conduzca al calentador a mantenerlos a la misma temperatura. La integral de la potencia de salida durante la transición (cambio en la capacidad calorífica) es igual a la diferencia de la energía ( $\Delta H$ ) administrada a la muestra o a la referencia durante un evento en particular. El evento puede ser endotérmico o exotérmico dependiendo de cual de los dos portamuestras lo experimenta. Esto resulta en un pico exotérmico descendente y un pico endotérmico es ascendente.

### **1.6.2. Componentes del calorímetro diferencial de barrido**

Dentro de los componentes de un equipo para DSC se observa que la presencia de dos cámaras (Fig. 12) para introducir el crisol que contiene la muestra y la referencia, ambos con dispositivos de calentamiento por separado. Ambos compartimentos están rodeados por un medio refrigerante (usualmente un flujo de agua) lo cual permite un enfriamiento más rápido.



**Fig. 10** Esquema del compartimento de calentamiento de un calorímetro diferencial de barrido. (Tomado de Referencia 40)

### 1.6.3. Aplicaciones.

La calorimetría diferencial de barrido puede ser empleado para detección de polimorfismos, pureza, presencia de impurezas, cinética, puntos de fusión, degradaciones, entre otros. Su aplicación dentro de la industria farmacéutica está enfocada a los principios activos y excipientes, es una herramienta útil durante los procesos de estabilidad a corto y largo plazo, para procesos productivos que involucren actividades que afecten las características termodinámicas o físicas de una molécula.

## 1.7. Espectrofotometría UV.

### 1.7.1. Fundamento de la espectrofotometría UV.

Todas las moléculas pueden absorber en la región UV-visible debido a que contienen electrones, compartidos y sin compartir, que se pueden excitar a niveles de energía más elevados<sup>41</sup>. Las longitudes de onda en las que ocurre la absorción dependen de la fuerza con la que están unidos los electrones a la molécula. Los electrones de un enlace covalente sencillo están unidos fuertemente y para su excitación se necesita radiación de alta energía (longitud de onda corta). Los electrones de los enlaces dobles y triples se excitan con mayor facilidad hasta los orbitales  $\pi$  más elevados. En las moléculas conjugadas (es decir, aquellas que contienen una serie de enlaces dobles alternados) la absorción se traslada hacia longitudes de onda más largas. El traslado hacia longitudes de onda más largas refleja el hecho de que un electrón que se encuentra en un sistema conjugado está unido con menor fuerza que aquel que está en un sistema no conjugado.

Involucra la excitación de un electrón en su estado base hacia un estado de energía más alto. Esto es realizado mediante la irradiación de una muestra con luz ultravioleta (radiación electromagnética con longitudes de onda en el rango de 200 – 400 nm).

Moléculas con dos o más cromóforos aislados (grupos absorbentes) absorben la luz a longitudes de onda cercanas como lo hace la molécula que contiene un solo cromóforo en un tipo en particular. La intensidad de la absorción es proporcional al número de diferentes cromóforos presentes en la molécula. La elección del disolvente para disolver la muestra, debe ser relativamente transparente en la región espectral de interés. Con el fin de evitar una pobre resolución y dificultades para la interpretación del espectro, un disolvente no debe ser empleado para mediciones que están cerca de la longitud de onda cercanas a las longitudes de onda límites del ultravioleta, esto es, la longitud de onda a la cual la absorbancia para el disolvente solo adquiere el valor de 1.

La combinación de grupos funcionales de sistemas cromóforos originan bandas de absorción características<sup>38-40</sup>.

### 1.7.2. Aplicaciones.

La mayoría de las aplicaciones de la espectrofotometría de ultravioleta y visible se enfocan a la identificación y cuantificación de sustancias químicas, ya que el espectro de absorción es una característica física constante, que se puede utilizar para la caracterización de un compuesto y para el análisis de multicomponentes, pureza, variaciones termodinámicas debidas por un proceso en particular, análisis de polímeros, entre otros. Por lo que ésta técnica puede emplearse para el análisis de medicamentos tal conteniendo indometacina.

## 1.8. Método de diálisis

### 1.8.1. Definición.

En este método, partículas cargadas de fármaco están físicamente separadas del resto del medio mediante una membrana de diálisis, y la liberación es evaluada en el compartimento exterior a intervalos de tiempo (Fig. 11).

Originalmente, la técnica de diálisis fue usada para estudiar la liberación de fármacos a partir de soluciones parenterales oleosas y supositorios, formulaciones inyectables particuladas de fármacos poco hidrosolubles y liposomas. Recientemente, esta técnica ha sido empleada para la liberación de fármacos a partir de una variedad de sistemas particulados para preparaciones tópicas, suspensiones orales, emulsiones submicronizadas, y de liberación intranasal. Otras formas de dosificación novedosas donde la técnica de diálisis ha sido empleada incluye nanopartículas, implantes y micelas. La selección del medio está basado en la solubilidad del fármaco y la estabilidad de éste durante el tiempo que dure el estudio de la liberación. Muchas modificaciones de la técnica inicial se han llevado a cabo para evaluar la liberación del fármaco, las cuales se describen a continuación.

### 1.8.2. Tipos de diálisis.

La modificación comúnmente reportada utiliza un saco o bolsa de diálisis, donde una suspensión de partículas se coloca dentro la bolsa, la cual se sella y es colocada dentro de un vaso de precipitado conteniendo solución reguladora. La difusión del fármaco desde la bolsa de diálisis hacia el compartimento exterior puede ser incrementada agitando el contenido del vaso de precipitado. Las formas más comunes de agitación incluye agitación horizontal o usando el aparato para disolución 2 bajo agitación. Otras modificaciones incluyen un tubo con una membrana dializante en un extremo o dos cámaras separadas por una membrana para diálisis. Los límites de corte de peso molecular de las membranas (Membrana molecular weight cutoffs, MWCO por sus siglas en inglés) reportados incluyen un amplio intervalo.

La técnica de diálisis ha sido empleada con pequeñas moléculas, péptidos y proteínas. El volumen del medio dentro de la membrana de diálisis que contiene las partículas debe de ser de 6 a 10 veces menor que el volumen del medio exterior, lo cual provee la fuerza de transporte del fármaco hacia el exterior y manteniendo las condiciones de dilución. Estudios realizados han comparado las diferencias entre el método de diálisis en tubo y diálisis en bolsa, con respecto a la liberación de partículas poliméricas conteniendo proteínas, mostrando que se obtiene una liberación más lenta con el método en tubo comparada con la diálisis en bolsa, además se observó que este último simula mejor el ambiente *in vivo* y mantiene mejor las condiciones de sumidero que con el método de tubo. Sin embargo, los descubrimientos de estos estudios deben ser interpretados con precaución, ya que en los estudios arriba mencionados, existieron diferencias en los volúmenes empleados tanto en tubo como en la bolsa de diálisis, siendo mayores en el método de tubo.

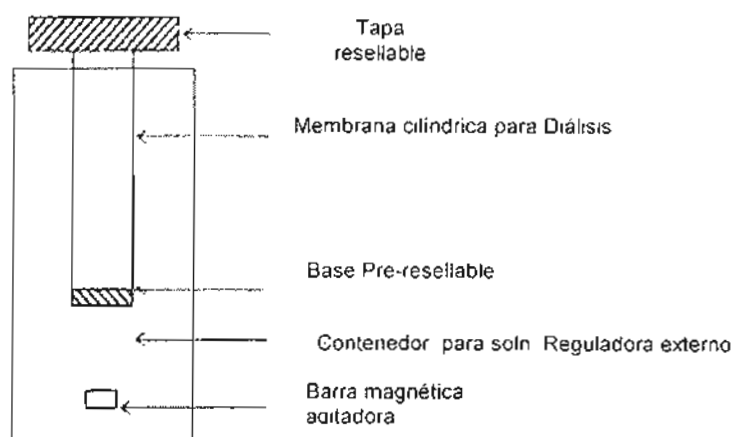


Fig. 11 Esquema de sistema de diálisis por membrana (Tomado de Referencia 42)

### 1.8.3. Ventajas y desventajas

El método de diálisis es atractivo, porque el muestreo y reemplazamiento del medio son convenientes, debido a la separación física de las partículas del medio

externo mediante la membrana dializante. No obstante, la técnica de diálisis ha sido criticada debido a su baja predictibilidad *in vivo* en el caso de administración oral o intravenosa de micropartículas, simulando las condiciones *in vivo*, donde las micropartículas son inmobilizadas después de la administración y rodeadas por una capa estancada causando una baja difusión del fármaco, debido a que las condiciones de dilución no se mantienen. El alcance del equilibrio con el medio exterior es lento, si el área superficial de la membrana es pequeña, lo que podría limitar un análisis preciso de los niveles iniciales de fármaco en las formulaciones donde el efecto de estallido o explosión es alto (se alcanzan niveles de fármaco muy altas en poco tiempo). Sin embargo, este problema puede ser superado empleando bolsas de diálisis más grandes (más área superficial).

Otra desventaja es que el tiempo de equilibrio es prolongado si el medio no es agitado (formación de capas de agua no agitadas). En muchos casos, se recomienda que el medio externo sea agitado para minimizar los efectos de la capa de agua no agitada o estacionaria y para prevenir la acumulación de productos de degradación polimérica, especialmente cuando las formulaciones contienen proteínas. Esta técnica no puede ser usada si el fármaco se une a la membrana. Sin embargo, debido a la facilidad de muestreo y a la posibilidad de un reemplazo total de la solución reguladora, este método es una atractiva opción para estudiar la liberación de fármacos a partir de micropartículas y otras formas particuladas de dosificación.

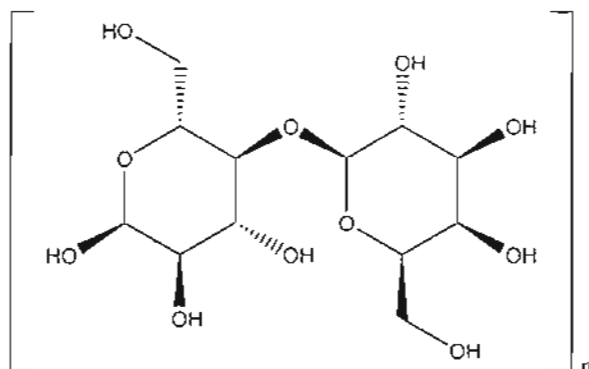
Otra desventaja con el método de diálisis son los tediosos pasos del proceso para el cierre de uno de los extremos de las bolsas para diálisis. Esto puede ser superado, empleando un dializador comercial mismos que se encuentran de diferentes marcas y características. Adicionalmente, las membranas de celulosa regenerada son estables a temperaturas superiores a 60°C, lo cual permite emplearlas en estudios de temperatura elevada a corto plazo. Finalmente, una ventaja es que las membranas pueden ser lavadas y reusadas después de cada experimento<sup>42</sup>.



## 1.9. Propiedades físicoquímicas de las materias primas.

### 1.9.1 Lactosa USP.

Fórmula estructural:



Fórmula molecular:  $C_{12}H_{22}O_{11}$

Peso molecular: 342.30

CAS: 63-42-3 (Anhídrido) 64044-51-5 (Monohidrato)

Sinónimos: (beta)-Lactosa, D-glucosa, 4-O-(beta)-D-galactopiranosil; (+)-Lactosa; D-(+)-Lactosa; Lactin; Azúcar de la leche

Descripción: Polvo y/o cristales blanco, inodoro, soluble en agua.

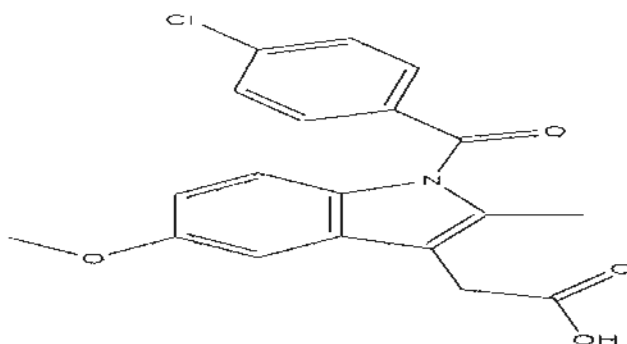
Punto de fusión: 202° C

Usos: Excipiente farmacéutico, complemento alimenticio.

Incompatibilidades: Oxidantes fuertes<sup>43</sup>.

### 1.9.2. Indometacina

Fórmula estructural:



Fórmula molecular:  $C_{19}H_{16}ClNO_4$

Peso molecular: 357.79

CAS: 53-86-1

Sinónimos : 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-ácido acético

1-(p-Clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-ácido acético

1-(p-Clorobenzoil)-2-metil-5-metoxi-3-indol-ácido acético

1-(p-Clorobenzoil)-2-metil-5-metoxiindol-3-ácido acético

$\alpha$ -[1-(p-Clorobenzoil)-2-metil-5-metoxi-3-indoil] ácido acético

Indocin; Indomed; Indomee; Indoptol; Amuno; Artracin; Artrinovo; Artrivia; Confortid; Dolovin; Idomethine; Imbrilon; Inacid; Indomecol; Indomethazine; Indoptic; Indo-rectolmin; Indo-tablinen; Inflazon; Inteban SP; Lausit; Metacen; Metartril; Methazine; Metindol; Mezolin; Mikametan; Mobilan; NCI-C56144; Reumacide; Sadoreum; Tannex.

Descripción: Polvo cristalino amarillento a color canela.

Punto de fusión: 155 – 162° C. (cristales polimórficos)

Usos: Fármaco analgésico, antiinflamatorio y antihistamínico.

Incompatibilidades: Base fuertes

Toxicidad aguda: LD<sub>50</sub> oral ratón: 13 mg kg<sup>-1</sup>

LD<sub>50</sub> oral perro: 160 mg kg<sup>-1</sup>

LD<sub>50</sub> intraperitoneal rata, ratón 13, 15 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

LD<sub>50</sub> intravenosa ratón, rata 30, 35 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Subaguda y subcronica: Monos <sub>oral</sub>: 0.2, 6, 12 mg kg<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup>, mortalidad del 100 % a dosis altas. Dosis intermedias inducen toxicidad gastrointestinal severa, mientras que a dosis bajas causan alteraciones funcionales y morfológicas renales.

Ratas: 3.55 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (ruta inespecífica) por tres meses causa daño renal. Tres administraciones repetidas de 0.02 mg kg<sup>-1</sup> en ratas (ruta inespecífica) causan daño hepático manifestado por un incremento en la actividad aminotransferasa y fosfatasa alcalina, una disminución en los niveles de glutatona y desordenes en las funciones renales.

Ratón <sub>oral</sub> 5, 10, 20 mg l<sup>-1</sup> en agua, hepatotoxicidad mínima a 5 mg l<sup>-1</sup> pero a altas dosis es letal.

Efectos teratogénicos y reproductivos: Inyección en ratones AKR en el día 13.5 de gestación no se observaron efectos teratogénicos.

El 50% de los implantes en el epidídimo en ratas 1-4 semanas después del implante la fertilidad fue reducida pero retorno a la normalidad dentro de la 5 -12 semana.

Administración oral en ratas gestantes de 1- 2.5 mg kg<sup>-1</sup> (día 18 y 21 de gestación) causó retraso dosis-dependiente del desarrollo en los nudos linfáticos mesentéricos de los fetos.

Administración oral en ratas preñadas de 0.7 mgkg<sup>-1</sup> causó constricción de los ductos y falla cardíaca en fetos de ratas. Los efectos fueron persistentes.

## Metabolismo y Toxicocinética

Dosis oral simple en humanos (concentración inespecífica), los picos máximos en sangre fueron observados entre 1.5-3.5 h. Aplicación dérmica simple en ratas de 2.5 mg, el pico de máxima concentración plasmática a las 8-9h, los niveles máximos de concentración en músculo se presentaron después de 8h. La proporción músculo/concentración plasmática fue alta cuando se administro oralmente.

El 99% se une a proteínas plasmáticas, es distribuido por el líquido sinovial, sistema nervioso central, placenta y leche. Se metaboliza a conjugados glucoronidos y desmetil-debenzoilindometacina, desbenzoilindometacina, desmetilindometacina y sus glucoronidos. A veces se presenta N-deacilación. Experimenta circulación enterohepática. Los metabolitos se excretan principalmente en la orina.

Irritabilidad: 100 mg colocados dentro del ojo de conejo causa irritación mínima.

Sensibilización: Reacciones de hipersensibilidad, incluyen asma aguda, ocurren en pacientes con una historia de asma o sensibilidad a la aspirina.

Genotoxicidad: *In vivo* en ensayos con ratones en un intervalo de concentración 12-36 mg kg<sup>-1</sup> dieron positivos para micronúcleos de médula ósea, formación anormal de esperma.

Efectos adversos en humanos: Síndrome nefrótico, falla renal aguda y necrosis papilar renal han sido reportadas. Lesiones gastrointestinales, sangrado, ulceración y perforación, al igual que náuseas, vómito y dispepsia fueron reportados.

Otros efectos adversos: Potente inhibidor en la síntesis de prostaglandinas.

*In Vitro* en ratas, los microsomas desnaturalizaron al P<sub>450</sub> a citocromo P<sub>420</sub>, independiente NADPH y enzimas. Disminución de la actividad del NADH-citocromo-b5 reductasa, NADPH citocromo c reductasa y epoxido hidratasa. Indometacina es un inhibidor del mecanismo de la ciclooxigenasa para el metabolismo de ácido araquidónico en vertebrados.<sup>43-44</sup>

## Capítulo 2. Desarrollo

### 2.1. Planteamiento del problema

Debido a los problemas de biodisponibilidad y aceptación que tienen algunos sistemas oculares de liberación modificada, aunado al desarrollo de nuevas formas de liberación de fármacos y al aumento de los efectos adversos generados por algunos fármacos ocasionados por la frecuencia en el número de dosis, se crea la necesidad de desarrollar formulaciones que modifiquen la liberación del fármaco y disminuyan el número de dosis a administrar del mismo para el tratamiento de diversas patologías oculares.

### 2.2. Hipótesis

El control en las condiciones de obtención de acuosomas, determina la relación de la masa de indometacina en el acuosoma y el tamaño de partícula.

### 2.3. Objetivo general

Optimizar el proceso de obtención de acuosomas de indometacina para la formulación de un medicamento.

### 2.4. Objetivo particular

Establecer las condiciones para obtener de manera reproducible acuosomas de Indometacina.

## Capítulo 3. Metodología.

### 3.1. Materiales y métodos

Para la fabricación de los acuosomas se emplearon los siguientes materiales:

- Cloruro de calcio (JT Baker, Lote M-25373)
- Fosfato de sodio (Merck, Lote 205410R)
- Lactosa calidad USP.
- Indometacina (Auzohu-Konsh Pharmaceutica).
- Sonificador marca Sonics & Materials Vibracell
- Liofilizadora Marca LabConco Mod. Freze-dryer-3.
- Microscopio Electrónico de Barrido Marca JEOL Mod. 5600.
- Espectrofotómetro de infrarrojo Bruker Modelo Tensor 27.
- Resonancia magnética nuclear Varian Gemini 200.
- Calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer Mod DSC 7.
- Espectrofotómetro de UV- Vis Marca Shimadzu Mod. UV-1201.
- Paquetería: Imago Web para Windows  
Digital Micrograph  
SPSS 12.0 para Windows

### 3.2. Diseño experimental.

Se planteó la elaboración de varios lotes de acuosomas para definir las condiciones (variables) que definirían la optimización del tamaño de partícula a escala nanométrica.

En el diseño estadístico para obtener las nanopartículas se consideraron las siguientes variables experimentales:

- Dependiente:                   Tamaño de partícula
- Independiente:                Velocidad de precipitación
- Forma de secado
- Concentración de Lactosa
- Concentración de Indometacina

Para determinar la significancia estadística de las diferencias en el tamaño de partícula de los lotes obtenidos a partir de la observación por microscopía electrónica de barrido, se planteó un análisis de varianza a través de un diseño factorial  $2^2$  con interacción. Se observó la influencia sobre el tamaño de partícula en función de cambios de velocidad y forma de secado (experimentos 1-5), como de la velocidad respecto a la concentración de lactosa (experimentos 6-9) y de la velocidad en relación a la concentración de indometacina (experimentos 10-13) como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Diseño factorial  $2^2$**

No. Exp.	Velocidad de precipitación <sup>(a)</sup>	Secado <sup>(b)</sup>	[L] <sup>(c)</sup>	[I] <sup>(d)</sup>
1	V <sub>1</sub>	P	NA	NA
2	V <sub>2</sub>	P	NA	NA
3	V <sub>3</sub>	P	NA	NA
4	V <sub>1</sub>	L	NA	NA
5	V <sub>2</sub>	L	NA	NA
6	V <sub>1</sub>	L	+	NA
7	V <sub>2</sub>	L	+	NA
8	V <sub>1</sub>	L	-	NA
9	V <sub>2</sub>	L	-	NA
10	V <sub>1</sub>	L	+	+
11	V <sub>2</sub>	L	+	+
12	V <sub>1</sub>	L	-	-
13	V <sub>2</sub>	L	-	-

(a) Velocidad V<sub>1</sub>= 9mL/min, V<sub>2</sub>= 7mL/min, V<sub>3</sub>= 1mL/min

(b) P= Parrilla, L= Liofilización

(c) Concentración de lactosa= (+)  $3 \cdot 10^{-3}$  M, (-)  $9.4 \cdot 10^{-5}$  M

(d) Concentración de Indometacina= (+)  $1.5 \cdot 10^{-3}$  M, (-)  $3.57 \cdot 10^{-5}$  M

(e) NA = No aplica



En base a los resultados de MEB de los núcleos se eligieron dos velocidades de precipitación y un método de secado.

Los núcleos, de esas dos velocidades de precipitación, se emplearon para recubrirlos con lactosa e indometacina, aplicando para el secado la liofilización a fin de no descomponer el compuesto polihidroxilado y al fármaco.

Una vez comparados los resultados de granulometría, se fabricaron 3 lotes con la velocidad de precipitación más favorable, para cuantificar a través de diálisis la indometacina adsorbida en el acuosoma.

## **Capítulo 4. Parte experimental.**

### **4.1. Elaboración de núcleos.**

Se fabricaron por precipitación de mezclas las soluciones de 0.25 M de Cloruro de calcio y 0.75 M de fosfato de sodio anhidro, conforme se indica en el diagrama 1, empleando inicialmente tres velocidades de goteo: 9.2-10.2 mL/min, 7.5-8 mL/min y 1mL/min, mismas que fueron identificadas como V1, V2, y V3 respectivamente, bajo sonicación a 90 pulsos. Una vez fabricados se procedió a filtrarlos a vacío empleando membranas con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Los procesos de eliminación de disolvente se realizaron de manera independiente mediante evaporación sobre parrilla de calentamiento y por liofilización.

### **4.2. Recubrimiento de núcleos con lactosa e indometacina.**

Una vez obtenidos los núcleos se procedió a recubrirlos conforme se indica en el diseño experimental expresado en la tabla 2, utilizando como concentración alta y baja de lactosa, un valor igual a  $3 \times 10^{-3}$  M y  $9.4 \times 10^{-5}$  M, respectivamente y de indometacina  $1.5 \times 10^{-3}$  M para la alta y  $3.57 \times 10^{-5}$  M para la concentración baja (acuosomas). La evaporación del disolvente se realizó mediante liofilización.

El análisis de los núcleos obtenidos se realizó mediante MEB, IR, DSC y  $^1\text{H}$ -RMN-, mientras que los núcleos recubiertos con lactosa e indometacina fueron caracterizados por MEB, IR, DSC y  $^1\text{H}$ -RMN. La liberación del fármaco se cuantificó mediante diálisis por membrana y espectrofotometría de UV-Vis.

### **4.3. Curva de calibración de indometacina.**

Como parte de proceso de optimización, se preparó una curva de calibración para evaluar la linealidad del sistema analítico para cuantificar indometacina. Las concentraciones de indometacina en el sistema analítico fueron: 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ , disuelta en una mezcla de agua y solución reguladora de fosfatos cuyo pH 7.2, en una proporción de (5:1). Se realizó previamente un barrido de 400 a 200 nm y finalmente se registro la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 318 nm.

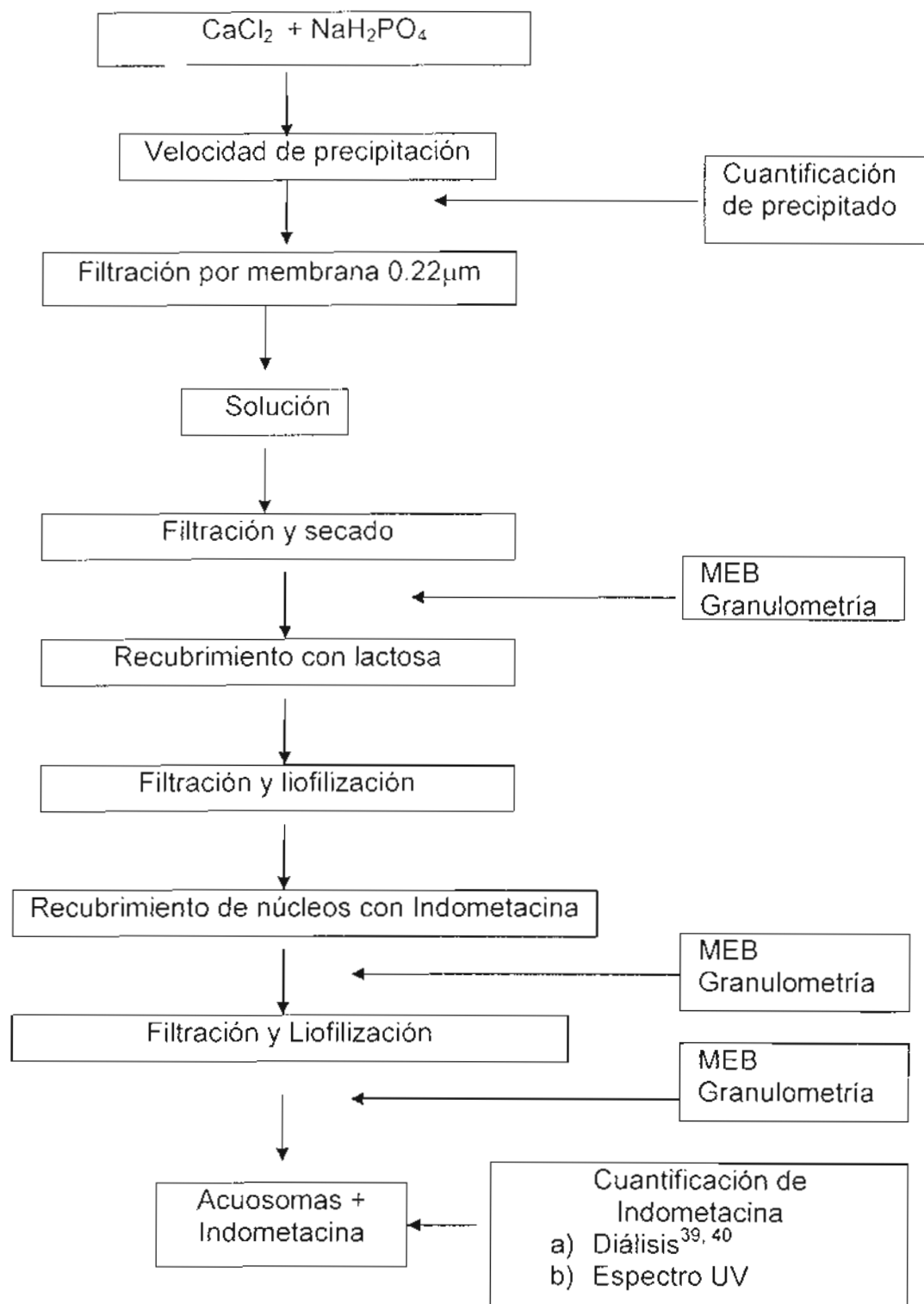


Diagrama 1. Proceso de obtención y caracterización de acuosomas de indometacina

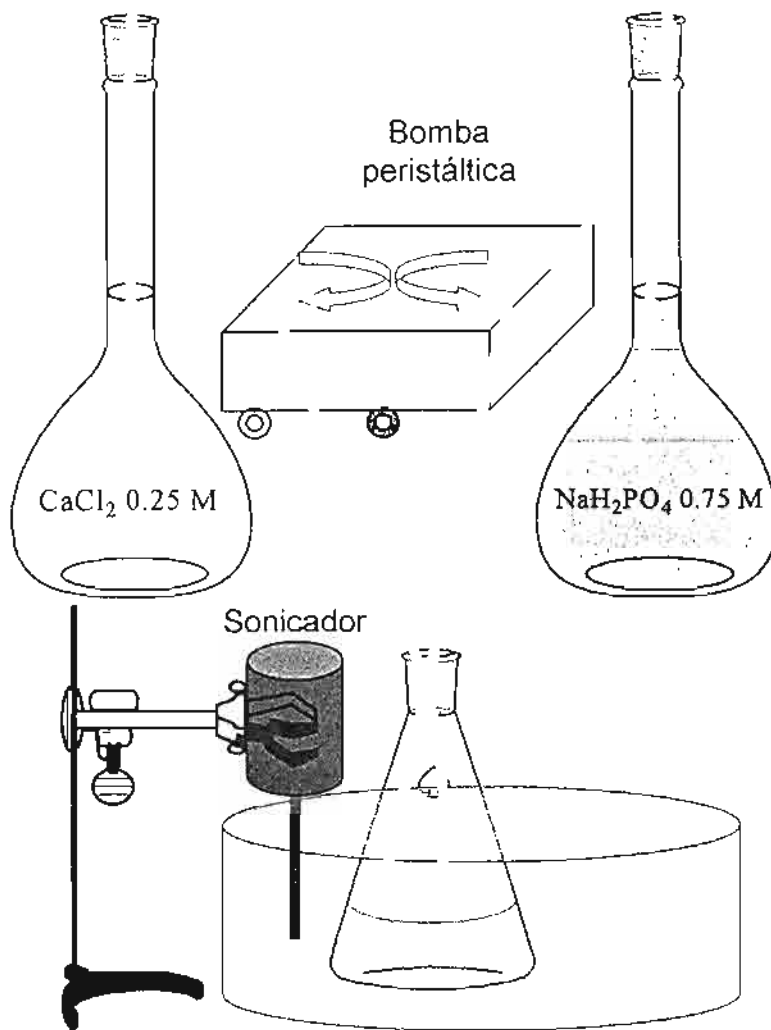


Fig. 12 Proceso de fabricación de núcleos de fosfato de calcio.

#### **4.4. Caracterización de los núcleos y acuosomas por MEB.**

##### **4.4.1. Preparación de la muestra.**

En un mortero se colocaron aproximadamente 5 mg de muestra y se trituró para eliminar partículas grandes. Se colocó sobre el porta muestras cubierto por una goma de carbón y recubriéndola a vacío con una película de carbón.

##### **4.4.2. Condiciones de trabajo del MEB.**

Las condiciones empleadas en el microscopio electrónico de barrido Marca Jeol Mod. 5600 para la el análisis de los núcleos, los núcleos recubiertos con lactosa e indometacina fue empleando un voltaje de 20 eV, colectando las señales a partir de los electrones secundarios, en alto vacío.

##### **4.4.3. Granulometría.**

La determinación del tamaño de partícula y morfología de los núcleos y de éstos cuando fueron recubiertos con lactosa e indometacina (acuosomas), se realizó empleando el programa Digital Micrograph, una vez medidos, se procedió al análisis estadístico computacional usando SPSS 12.0 versión para Windows.

#### **4.5. Caracterización de los núcleos y acuosomas por IR.**

##### **4.5.1. Preparación de la muestra.**

Las muestras en polvo fueron preparadas en solución sólida con KBr al 0.5%. La presión que se aplicada fue de alrededor de 4000 libras/pulgada<sup>2</sup> por 20 segundos, formándose tabletas rectangulares de 5 x2 mm. También se analizaron las materias primas de lactosa e indometacina.

##### **4.5.2. Condiciones de trabajo del espectrofotómetro de IR.**

Las muestras fueron analizadas en un intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  y de 0 a 50% de transmitancia.

## **4.6. Caracterización de los núcleos y acuosomas por H<sup>1</sup>RMN**

### **4.6.1. Preparación de la muestra.**

Las muestras fueron analizadas después de la disolución en CDCl<sub>3</sub>.

### **4.6.2. Condiciones de trabajo de H<sup>1</sup>RMN**

El espectro de H<sup>1</sup>RMN (200MHz) de los núcleos, núcleos recubiertos con lactosa y acuosomas se obtuvo en un Varian-Gemini 200 MHz.

## **4.7. Caracterización de los núcleos y acuosomas por DSC.**

### **4.7.1. Preparación de la muestra.**

Aproximadamente 5-6 mg de muestra pesados con exactitud en una microbalanza, se colocaron en un portamuestras de aluminio de 40μL y fueron sellados con una prensa manual.

### **4.7.2. Condiciones de trabajo de DSC.**

El aparato fue calibrado con el punto de fusión del Indio (NIST. National Institute of Standard and Technology, por sus siglas en inglés) 156.6°C. La calibración fue llevada a cabo una sola vez al inicio del uso del equipo.

Los porta muestras (crisoles) fueron de aluminio y cubiertos con tapas del mismo material. Todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo atmósfera de nitrógeno seco, con un flujo de 30 mL/min y realizados con una velocidad de calentamiento de 10.0°C/min y en un intervalo de temperatura de 50 – 250°C. De la misma forma se analizaron las materias primas de fosfato de calcio e indometacina.

## 4.8. Estudios de UV.

### 4.8.1. Validación de método analítico para cuantificación de indometacina.

La validación de método analítico para la cuantificación de indometacina se realizó de acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos<sup>44</sup>. Los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

Tabla 3. Parámetros de desempeño

Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración
Precisión/adecuabilidad del sistema	SI
Linealidad del sistema	SI
Especificidad <sup>1</sup>	SI
Exactitud y repetibilidad	SI
Linealidad del método	SI
Estabilidad analítica de la muestra <sup>2</sup>	*
Límite de detección	NO
Límite de cuantificación	NO
Robustez	*
Tolerancia	*

SI = Si se realiza, No = No se realiza

\*PUEDE SER REQUERIDO DEPENDIENDO DE LA NATURALEZA DEL MÉTODO

1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo Cromatografía en capa fina

2. También es definido como un estudio de tolerancia

#### 4.8.1.1. Precisión del sistema.

Se preparó por sextuplicado una solución de 50 µg/mL de indometacina en una mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1), la solución se leyó en barrido de 400 – 200 nm y se registró la lectura obtenida. Se calcularon los criterios de aceptación de acuerdo con la absorbancia obtenida.

#### 4.8.1.2. Linealidad del sistema.

Se preparó por triplicado y por dilución, cinco niveles de concentración (5, 15, 25, 35, 45  $\mu\text{g/mL}$ ), a partir de una solución concentrada de indometacina de 50 $\mu\text{g/mL}$ , en una mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1). Se leyeron en barrido 400-200 nm y se registraron las lecturas obtenidas. Se calcularon los criterios de aceptación.

#### 4.8.1.3. Especificidad.

Se prepararon por triplicado las siguientes soluciones:

a) Solución de indometacina 25 $\mu\text{g/mL}$

Se pesaron en una microbalanza 2.5 mg de indometacina, se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL disolviéndolo con 0.5 mL de metanol, se llevó al aforo con la mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1). Se protegió de la luz.

b) Solución de lactosa USP 25 $\mu\text{g/mL}$ .

Se pesaron en una microbalanza 2.5 mg de Lactosa USP, se depositaron en un matraz volumétrico de 100 ml se aforo con la mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1).

c) Solución de fosfato de calcio 25 $\mu\text{g/mL}$ .

Se pesaron en una microbalanza 2.5 mg de fosfato de calcio, los cuales se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al aforo con la mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1).

d) Solución de indometacina 25 $\mu\text{g/mL}$  + Lactosa 25 $\mu\text{g/mL}$ .

Se pesaron por separado, en una microbalanza 2.5 mg de indometacina, se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionó 0.5 mL de metanol para disolver; y 2.5 mg de Lactosa USP, se llevó al aforo con la mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1).

e) Solución de indometacina + Lactosa + Fosfato de calcio cuya concentración de cada uno en la solución fue 25 $\mu\text{g/mL}$ .



Se pesaron por separado en una microbalanza, 2.5 mg de indometacina, 2.5 mg de Lactosa y 2.5 mg de fosfato de calcio, se mezclaron manualmente y se aforó con la mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos (5:1).

Las soluciones preparadas, fueron leídas en el espectrofotometro UV-Vis con barrido de 400-200 nm y registradas las lecturas obtenidas para su posterior análisis conforme indican los parámetros de aceptación.

#### **4.8.1.4. Exactitud y repetibilidad.**

Por sextuplicado se pesaron 10 mg de fosfato de calcio, los cuales se mezclaron con 10 mL de una solución de Lactosa USP 32.2 µg/mL y 10 mL de una solución de indometacina 12.8 µg/ml con ayuda de agitación mecánica hasta disolución completa de los componentes. La mezcla se leyó en barrido de 400-200 nm y se registraron las lecturas obtenidas.

#### **4.8.1.5. Linealidad del método.**

Se preparó un placebo analítico por triplicado cada nivel de la siguiente manera:

1. Se pesaron 2.5 mg de indometacina, a la cual se le añadieron 0.5 mL de metanol para disolver, se adicionaron 2.5 mg de Lactosa USP y 2.5 mg de fosfato de calcio, se llevó a un volumen de 50 mL con una mezcla de Agua: solución reguladora de fosfatos de pH 7.2 (5:1).
2. De la solución anterior se tomaron por separado alícuotas de 1 y 9 mL, las cuales se colocaron en un matraz de 10 mL, las concentraciones obtenidas fueron de 5 y 45 µg/mL respectivamente, para obtener un nivel bajo y alto de concentración.
3. Los niveles de concentración se leyeron con barrido 400-200 nm.
4. Se registró la lectura obtenida, calculándose los parámetros de desempeño.

#### 4.8.1.6. Límite de detección

LD con base en señal de ruido

Se prepararon por triplicado las siguientes soluciones:

##### Solución patrón:

Se pesaron 5 mg de indometacina, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se adiciono 1 mL de metanol para disolver y se llevo al aforo con mezcla de agua: solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (5:1). Se tomaron las siguientes alícuotas:

- |                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| a) 1 mL de solución patrón → | 100 mL de mezcla [0.5µg/mL] |
| b) 3 mL de solución patrón → | 100 mL de mezcla [1.5µg/mL] |
| c) 5 mL de solución patrón → | 100 mL de mezcla [2.5µg/mL] |
| d) 7 mL de solución patrón → | 100 mL de mezcla [3.5µg/mL] |
| e) 9 mL de solución patrón → | 100 mL de mezcla [4.5µg/mL] |

##### Blanco

En un matraz volumétrico de 100 mL se colocó 1 mL de metanol y se llevó al aforo con mezcla de agua: solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (5:1).

Se determinó la cantidad de analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Este procedimiento se utilizó para verificar el límite de detección estimado por otros procedimientos. Posteriormente se calcularon los parámetros de desempeño correspondientes

#### 4.8.1.7. Límite de cuantificación.

##### Solución patrón:

Se pesaron 5 mg de Indometacina, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionó 1 mL de metanol para disolver y se llevó al aforo con mezcla de agua:solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (5:1). Se tomaron las siguientes alícuotas:

- a) 1 mL de solución patrón → 100 mL de mezcla [0.5µg/mL]
- b) 3 mL de solución patrón → 100 mL de mezcla [1.5µg/mL]
- c) 5 mL de solución patrón → 100 mL de mezcla [2.5µg/mL]
- d) 7 mL de solución patrón → 100 mL de mezcla [3.5µg/mL]
- e) 9 mL de solución patrón → 100 mL de mezcla [4.5µg/mL]

Se registró la lectura de las soluciones a  $\lambda = 318$  nm y con barrido de 400-200 nm, empleándose como blanco de ajuste el blanco preparado en el límite de detección.

Se determinó la cantidad de analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos 10 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Posteriormente se calcularon los parámetros de desempeño correspondientes, evaluando al mismo tiempo la exactitud y repetibilidad del método.

#### 4.8.2. Estabilidad fotoquímica de la indometacina

Se realizó una curva de calibración de la siguiente manera:

- a) 10 mg indometacina + 2 mL Metanol → 100 mL mezcla [100µg/mL]
- b) 2 mL (a) → 10 mL mezcla [20µg/mL]
- b) 4 mL (a) → 10 mL mezcla [40µg/mL]
- c) 6 mL (a) → 10 mL mezcla [60µg/mL]
- d) 8 mL (a) → 10 mL mezcla [80µg/mL]

Las soluciones anteriores fueron leídas a barrido de 400 - 200 nm, usando como blanco de ajuste la mezcla de agua - solución reguladora de fosfatos de pH 7.2 (5:1) conteniendo 1 mL en un matraz de 50 mL; a intervalos de tiempo de 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos, registrándose la máxima absorbancia longitudes de onda de 318 y 264 nm.

#### **4.8.3. Solubilidad de indometacina en mezclas de etanol:agua.**

Se realizaron pruebas de solubilidad para el fármaco modelo en mezclas de etanol:agua en proporciones 1:5, 1:10, y 1:20, preparando por triplicado y por separado una solución concentrada conteniendo 5 mg de indometacina disuelto en 1 mL de metanol en un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó al aforo con las mezclas arriba mencionadas (50 µg/mL), se filtró a vacío con malla 0.22 µm. De esta se tomó una alícuota de 5 mL depositándose en un matraz volumétrico de 10 mL y llevando al aforo con las mezclas respectivas, obteniendo una concentración de 25 µg/mL de indometacina (solución de prueba) protegida de la luz y a temperatura ambiente (~ 25° C). Se registró la lectura de absorbancia a una  $\lambda=$  318 nm con el objetivo de elegir una mezcla de disolventes adecuadas para la mayor solubilización del fármaco y que pudiera eliminarse el disolvente durante la liofilización.

#### 4.8.4. Diálisis.

Se evaluó el proceso de liberación de indometacina, mediante diálisis por membrana, para la cual se preparó una solución de indometacina (solución prueba), con una concentración de 1mg/mL disuelta en una mezcla de agua - solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (5:1), se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó por triplicado en cada una de las membranas de diálisis, de un peso molecular de 2000 daltons cada una, se colocaron por separado en vaso de precipitación conteniendo 250 mL de la misma mezcla en la que se disolvió la solución de prueba, se agitó lentamente, manteniéndose la temperatura de 37° C, se tomaron muestras de 3 mL, a los intervalos de tiempo de 0, 10, 20, 30, 60 min, hasta las 48 horas las cuales se leyeron a una longitud de onda igual a 318 nm; la operación se realizó con el fármaco modelo solo, en mezcla física (fosfato de calcio, lactosa e indometacina) y en los acuosomas elaborados, registrando la lectura de absorbancia y se calculó los mg/mL correspondientes a la lectura.

## Capítulo 5. Resultados y discusión.

### 5.1. Tamaño y distribución de partícula de los núcleos.

Los resultados obtenidos para los núcleos de fosfato de calcio secado por parrilla y liofilizados se muestran en las tabla 4. Con los datos de tamaño de partícula se realizó inicialmente la estadística descriptiva, obteniéndose los valores de la media (X), desviación estándar (DE) y error estándar (EE); se obtuvo el histograma de frecuencia (Tablas 7 y 8). Se realizó una prueba de bondad y ajuste de Kolmogorov-Smimov (Tabla 5), para determinar el tipo de distribución de los datos del tamaño de partícula para cada experimento (1,2, 4, 5). Como los datos no siguieron una distribución normal, se procedió a normalizar la distribución, sacando el logaritmo base diez a los resultados del tamaño de partícula, y se obtuvieron los valores de antilogaritmo de la media (X), desviación estándar (DE) y error estándar (EE) (Tabla 7), se realizó un análisis factorial  $2^2$  con interacción y se efectuó la prueba de Levene para comparar varianzas. Se determinó que las varianzas no eran iguales, por lo cual los datos se sometieron a una prueba de comparaciones múltiples, para determinar si existía un efecto de la velocidad y la forma de secado sobre el tamaño de partícula.

Tabla 4. Estadística descriptiva de los núcleos de fosfato de calcio.

No. Experimento	Parámetro estadístico	Valor
1	X	21.8968
	I.C. 95%	18.24 – 25.55
	EE	1.85
	DE	39.785
2	X	18.114
	I.C. 95%	16.091 – 20.135
	EE	1.02883
	DE	21.23486
3	X	No se realizaron
	I.C. 95%	determinaciones del tamaño
	EE	de partícula debido a que la
	DE	imagen no lo permitió.
4	X	4.08
	I.C. 95%	3.846-6.025
	EE	0.556
	DE	4.4352
5	X	6.993
	I.C. 95%	6.387 – 7.597
	EE	0.307
	DE.	4.9535

La prueba de bondad y ajuste para los experimentos 1 y 2 se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
1	0.274	303	0.000
2	0.220	426	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

En todos los casos con base en el valor de  $P < 0.05$ , resulta que los datos no presentan una distribución normal, por lo que se llevó a cabo la normalización calculando el logaritmo base diez a los datos del tamaño de partícula y se muestra en la tabla 7.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para los núcleos de fosfato de calcio de los experimentos 4 y 5 se muestran en la tabla 6.

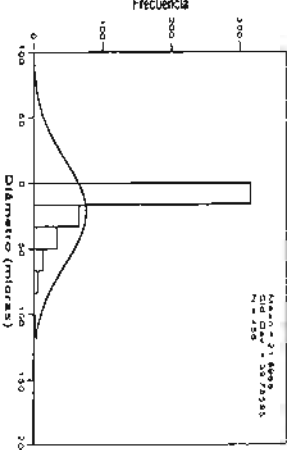

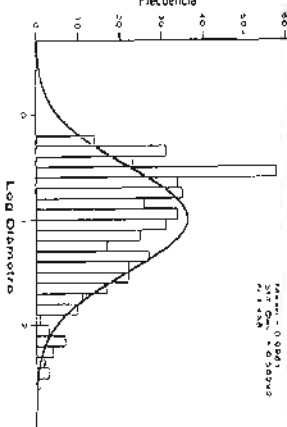
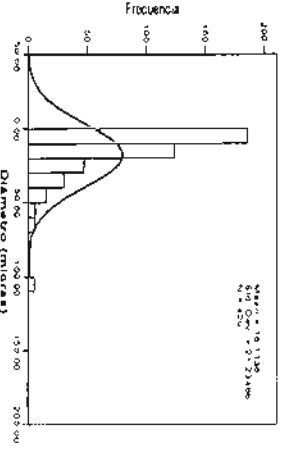

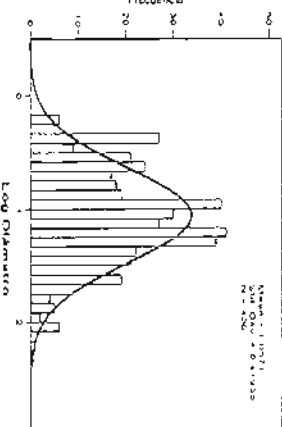
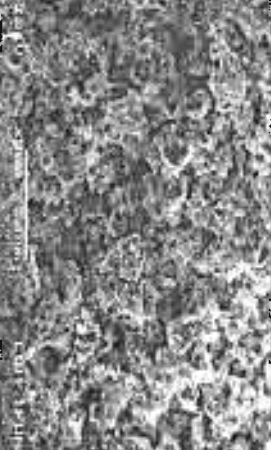
**Tabla 6. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
4	0.275	5574	0.000
5	0.155	260	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

Para los experimentos 4 y 5 y con base en el valor de  $P < 0.05$ , se observa que los datos no presentan una distribución normal. Por lo que se procedió a normalizarla sacando el logaritmo base diez a los resultados del tamaño de partícula y se muestra en la tabla 8.

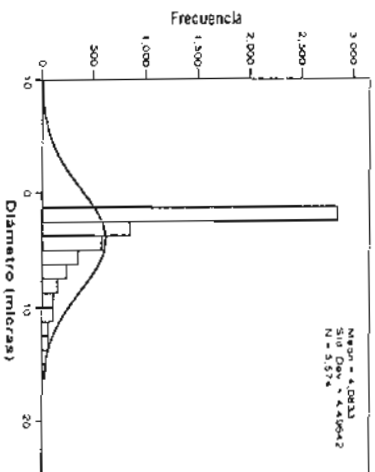

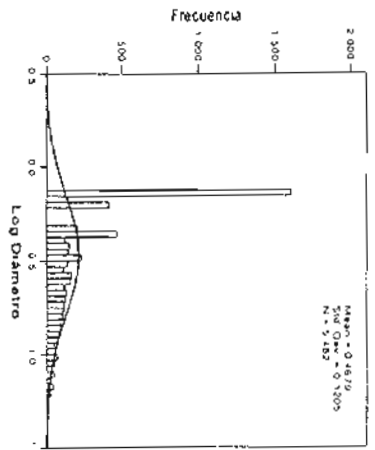
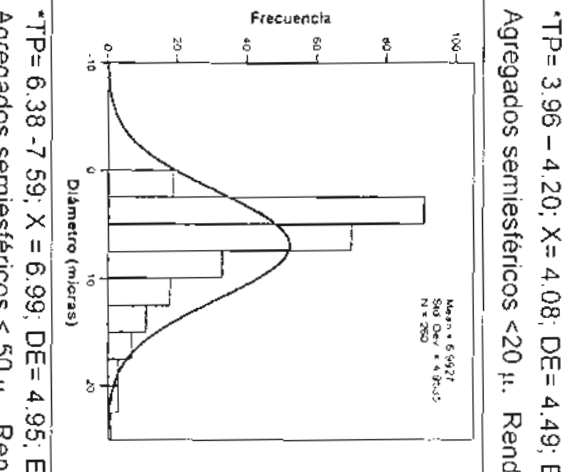
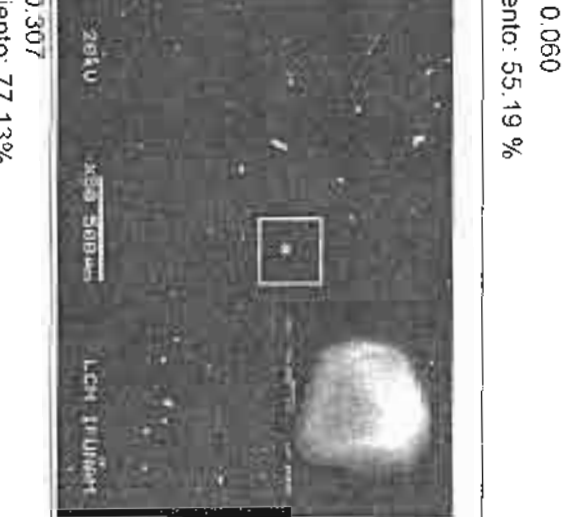
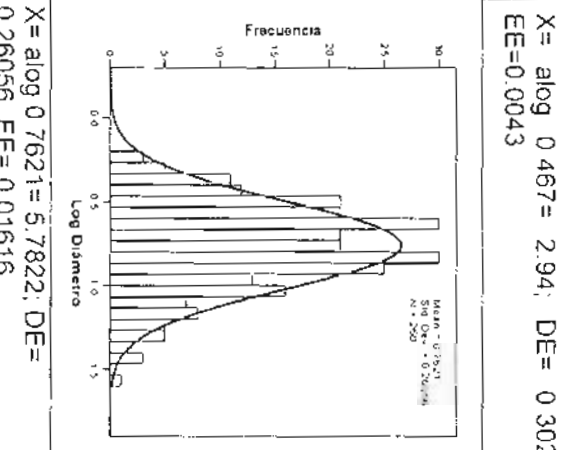
Tabla 7. Características de los núcleos de fosfato de calcio secados por parrilla.

No. Experimento	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
1	 <p>*TP= 18.24 - 25.55; X = 21.89; DE = 39.78; EE = 1.85 Agregados deformes &lt; 50 <math>\mu</math>. Rendimiento: 96.80 %</p>		 <p>X = <math>\text{alog } 0.99 = 9.91</math>; DE = 0.5029, EE=0.02350</p>
2	 <p>*TP= 16.09-20.13; X = 18.11; DE = 21.23; EE=1.02 Agregados deformes &lt; 20 <math>\mu</math>. Rendimiento: 72.93%</p>		 <p>X = <math>\text{alog } 1.05 = 11.40</math>; DE = 0.41, EE = 0.020</p>
3	<p>La imagen no lo pudo registrar.</p>		<p>La imagen no lo pudo registrar.</p>

\*TP= Tamaño de partícula en micras. Se entiende X= media, DE= Desviación estándar, EE= Error estándar



Tabla 8. Características de los núcleos de fosfato de calcio secados por liofilización.

No. Experimento	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
4	 <p>Mean = 4.0831 Std Dev = 4.46642 N = 51374</p>		 <p>Mean = 0.4670 Std Dev = 0.1205 N = 51382</p>
5	 <p>Mean = 6.9927 Std Dev = 4.8265 N = 280</p>		 <p>Mean = 0.7621 Std Dev = 0.26056 N = 280</p>

\*TP= 3.96 - 4.20; X= 4.08; DE= 4.49; EE= 0.060  
Agregados semiesféricos < 20  $\mu$ . Rendimiento: 55.19 %

\*TP= 6.38 - 7.59; X= 6.99; DE= 4.95; EE= 0.307  
Agregados semiesféricos < 50  $\mu$ . Rendimiento: 77.13%.

\*TP= Tamaño de partícula en micras. \*Se entiende X= media. DE= Desviación estándar. EE= Error estándar

Con base en los resultados de MEB y el análisis estadístico de los mismos, se observa que existe un efecto de la velocidad de precipitación sobre el tamaño de las partículas, en el caso de los experimentos 1 y 2, se observa la formación de agregados de menor tamaño y la presencia en, comparación con el experimento 3, misma que por ser 1000 % más lenta y debido a que está bajo sonicación, hace que el tiempo de sonicación aumente en proporción 1:10, teniéndose la presencia de un mayor número de partículas de menor tamaño, que presentan una mayor área superficial y por ende una mayor energía libre de superficie, lo que se traduce en una inestabilidad termodinámica, la que es superada mediante la agregación, un mayor tiempo de sonicación genera agregados de pequeñas partículas como se ha reportado<sup>41</sup>.

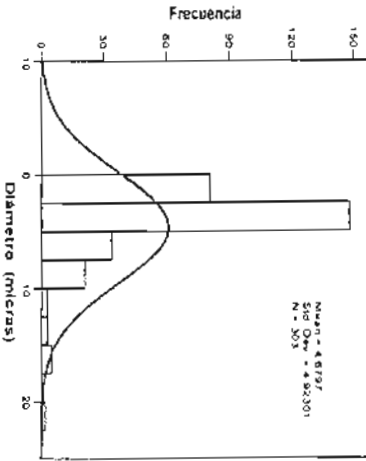

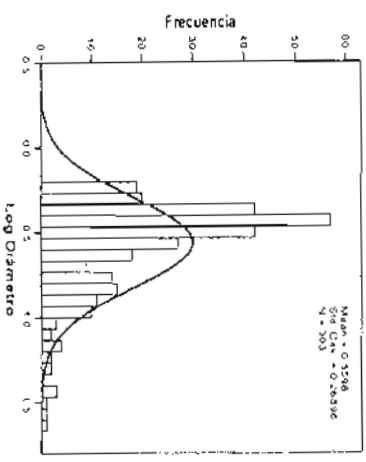
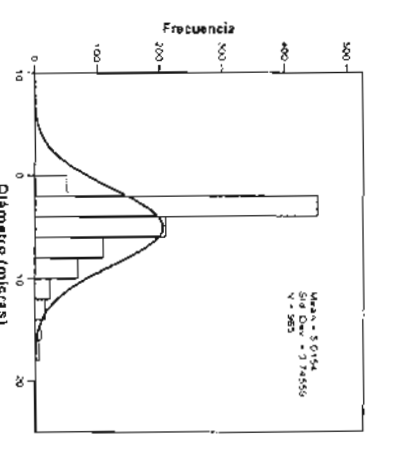

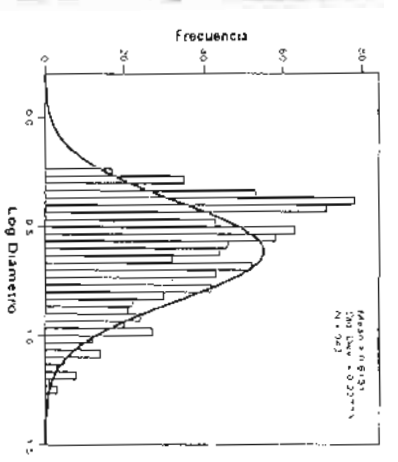
Por lo anteriormente expuesto se decide por tamaño de partícula continuar con la velocidad 1 como velocidad de trabajo y por lo tanto se hacen dos ensayos más para comparar la reproducibilidad, mismos que son identificados como experimentos 4-2 y 4-3. La prueba de bondad y ajuste se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
4-2	0.274	303	0.000
4-3	0.190	965	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

Tabla 10. Características de los núcleos de fosfato de calcio secados por liofilización.

No. Experimento	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
4-2	 <p>Mean = 4.8192 Std Dev = 4.80301 N = 303</p>		 <p>Mean = 0.4508 Std Dev = 0.26396 N = 303</p>
4-3	 <p>Mean = 5.0154 Std Dev = 3.74556 N = 303</p>		 <p>Mean = 0.6131 Std Dev = 0.22774 N = 303</p>

\*TP= Tamaño de partícula en micras. \*Se entiende X= media, DE= Desviación estándar, EE= Error estándar

\*TP= 4.77 -5.25; X = 5.01; DE= 3.74; EE=0.12  
 Agregados semiesféricos < 20 μ. Rendimiento: 70.38%.

X= alog 0.613=4.102; DE= 0.227;  
 EE= 0.0074

## Análisis factorial 2<sup>2</sup>

### Velocidad vs. Forma de secado

En la tabla 11 se muestran los datos obtenidos para los experimentos 1-5.

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de V1 y secado en parrilla son: media: 21.8968, desviación estándar: 39.7859, error estándar: 1.85; e intervalo de confianza al 95%: 18.2434 – 25.5502 (Exp. 1).

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de V1 y secado mediante liofilización son: media: 5.4167, desviación estándar: 4.4352, error estándar: 0.05374; e intervalo de confianza al 95%: 4.1331 – 4.3438 (Exp. 4).

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de V2 y secado en parrilla son: media: 18.114, desviación estándar: 21.23486, error estándar: 1.02; e intervalo de confianza al 95%: 16.0914 – 20.13502 (Exp. 2).

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de V2 y secado mediante liofilización son: media: 6.993, desviación estándar: 4.9535, error estándar: 0.307; e intervalo de confianza al 95%: 6.3877 – 7.5976 (Exp. 5).

**Tabla 11. Estadística descriptiva**

Variable dependiente: Tamaño de partícula

No Experimento	Secado	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	N	Intervalo de Confianza 95%	
						LI	LS
1	Parrilla	21.8968	39.785	1.85	458	18.243	25.550
4	Liofilización	5.4167	4.4352	0.131	8103	4.133	4.3438
2	Parrilla	18.114	21.234	0.570	426	16.091	20.135
5	Liofilización	6.993	4.953	0.729	686	6.387	7.597

LI = Límite inferior,  
LS = Límite superior

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos al aplicar a los experimentos 1, 4, 2 y 5 la prueba de normalidad de Levene que en base al valor de  $P < 0.05$  revela que las varianzas son diferentes.

**Tabla 12. Prueba de normalidad<sup>a</sup>.**

Variable dependiente. Tamaño de Partícula

F	gl1	Gl2	Sig
599.72	3	9243	0.000

Prueba la hipótesis nula que la varianza del error de la variable dependiente es igual en los grupos cruzados

a. Diseño: Intercepto+VelocPrecipit+Secado+VelocPrecipit\*Secado

El análisis factorial exhibió los siguientes resultados:

**Tabla 13. Análisis factorial 2<sup>2</sup>.**

Variable dependiente: Tamaño de partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.	Parámetro de no Centralidad	Poder Observado <sup>a</sup>
VelocPrecip.	573.150	1	573.150	4.146	0.042	4.146	0.530
Secado	89620.839	1	89620.839	648.357	0.000	648.357	1.000
VelPreci +Secado	3378.628	1	3378.628	24.443	0.000	24.433	0.999
Error	1277637.54	9243	138.228				
Total	1452036.08	9246					

a. Computado usando alfa= 0.05

Con base en el resultado del valor de  $P$ , para la interacción velocidad de agitación \* secado, el cual es menor que 0.05, por lo que se observan diferencias en el tamaño de partícula al menos uno de los niveles de cada factor.

Dado que las varianzas son diferentes, se decide efectuar una prueba de comparaciones múltiples para observar si existe diferencia sobre el tamaño de partícula en al menos uno de los niveles de los factores (forma de secado y velocidad de precipitación), siendo los resultados los que se presentan en la tabla 14.

**Tabla 14. Prueba de comparaciones múltiples entre velocidad de precipitación y forma de secado.**

Variable dependiente: Tamaño de Partícula

Secado	(I) Veloc. Precipit.	(J) Vel. Precip	Media de la diferencia (I-J)	Error Estándar	Sig. <sup>a</sup>
Parrilla	9 mL/min	7 mL/min	3.783*	0.791	0.000
	7 mL/min	9 mL/min	- 3.783*	0.791	0.000
Liofilización	9 mL/min	7 mL/min	- 1.576*	0.741	0.000
	7 mL/min	9 mL/min	1.576*	0.741	0.000

Basados en las medias de los marginales estimados:

\* La diferencia de la media es significativa a 0.05

a Ajuste de comparaciones múltiples: Bonferroni

Con base en el valor de P, para cada una de las comparaciones, se observa que existen diferencias significativas en el tamaño de partícula cuando se emplean la velocidad de 9 mL/min y diferentes formas de secado, al igual que cuando se emplea la velocidad 7 mL/min.

Considerando el proceso de secado, el cual se ha visto que existe en efecto de la forma de secado sobre el tamaño de partícula ( $p < 0.05$ ), y en el caso del secado por parrilla, el cual fue empleado en los experimentos 1-3, la eliminación del disolvente no es controlada, ya que la evaporación origina que la súbita salida del disolvente de la partículas, promueva que las partículas se acomoden de una manera "desordenada", conforme el disolvente abandona las partículas, ocasionando la formación de agregados grandes y deformes.

En cuanto al secado por liofilización se observo, que conforme a lo reportado<sup>14</sup>, que esta operación no solamente modifica el área superficial, sino también el orden del cristal lo cual se ve reflejado en la forma en la cual se agregan las partículas, sin embargo este proceso es mas controlado mediante la temperatura de congelación y el vacío necesario para la extracción del disolvente, ya que las variaciones en estos parámetros son mínimos y es posible que la misma eliminación genere partículas de menor tamaño, que tiendan menos a agregarse debido a la operación de secado, independientemente de la inestabilidad termodinámica inherente al tamaño, esto confirma con lo ya reportado en la literatura que para la fabricación de nanopartículas<sup>14,45-47</sup> resulta

ser el método más recomendable, sin embargo se debe considerar el tiempo que dura el proceso, el cual resulta ser largo, lo cual debe ser contrastado con el tamaño y forma de la partícula, considerando los beneficios de dicho proceso para la optimización del proceso de obtención de acuosomas.

## 5.2. Tamaño y distribución de partícula de los núcleos recubiertos con lactosa USP.

Siguiendo los experimentos 6 - 9 de la tabla 2 donde los núcleos fueron recubiertos con lactosa en concentraciones  $3 \times 10^{-3}$  M y  $9.4 \times 10^{-5}$  M usando las velocidades V1 y V2 y se analizaron mediante MEB obteniendo los resultados expresados en las tablas 15 -18.

Con los tamaños de partícula se calcularon inicialmente la estadística descriptiva, obteniéndose los valores de la media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (DE) y error estándar (EE), se obtuvo el histograma de frecuencia y se corrió una prueba bondad y ajuste de Kolmogorov-Smirnov, para determinar el tipo de distribución de los datos del tamaño de partícula. Como los datos no siguieron una distribución normal, se procedió a normalizar la distribución, sacando el logaritmo base diez a los resultados del tamaño de partícula, y se obtuvieron los valores de antilogaritmo de la media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (DE) y error estándar (EE), se realizó un análisis factorial  $2^2$  con interacción y se efectuó la prueba de Levene para comparar varianzas, se determinó que las varianzas no eran iguales, por lo cual los datos se sometieron a una prueba de comparaciones múltiples, para determinar si existía un efecto de de las concentraciones de lactosa sobre el tamaño de partícula.



Tabla 15. Características de los núcleos de fosfato de calcio recubiertos con lactosa  $3 \cdot 10^{-3}$  M liofilizados..

Experimento No.	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
6			
7			

\*TP= 6.99-7.70; X = 7.35; DE= 6.25; EE= 0.22  
Agregados deformes >50 µ. Rendimiento: 63.15%

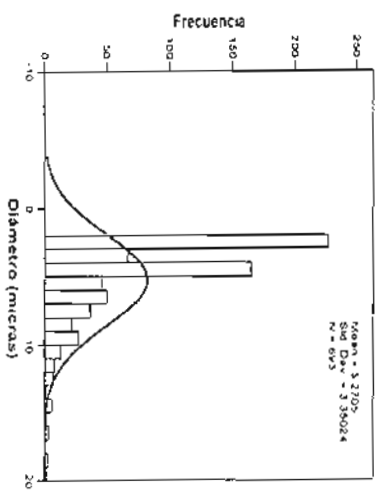

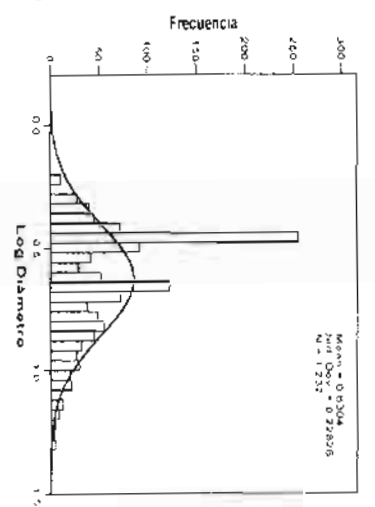
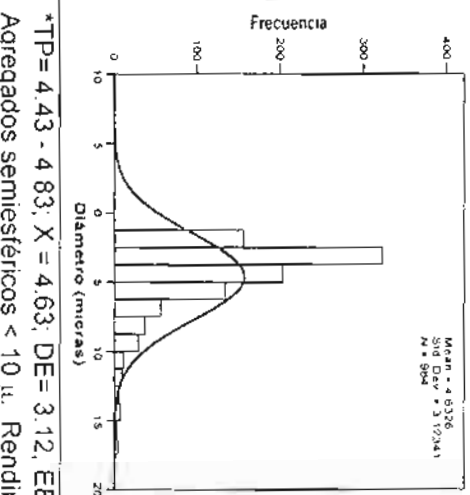
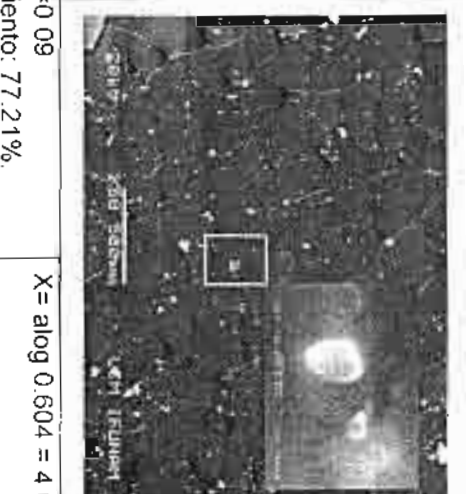
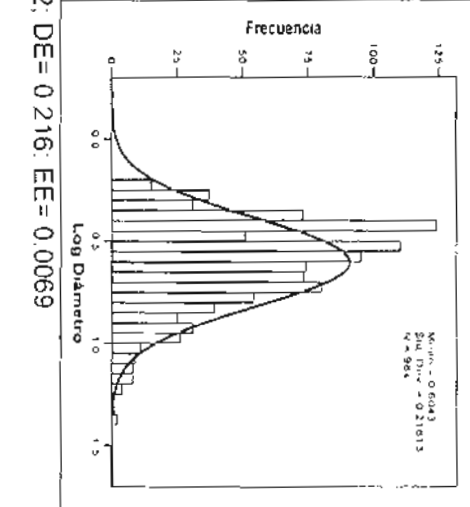
X=  $\log 0.759 = 5.75$ ; DE= 0.326; EE=0.0116

\*TP= 6.38-7.59; X = 6.99; DE= 4.95; EE=0.307  
Menor presencia y deformes < 50 µ. Rendimiento 49.0%.

X=  $\log 0.54 = 3.48$ ; DE= 0.191 EE= 0.007

\*TP= Tamaño de partícula en micras. \*Se entiende X= media, DE= Desviación estándar, EE= Error estándar

Tabla 16. Características de los núcleos de fosfato de calcio recubiertos con lactosa 9.4 \*10<sup>-5</sup> M liofilizados.

No. Experimento	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
8			
	<p>*TP= 5.02-5.52; X= 5.27; DE= 3.35; EE= 0.125 Agregados semiesféricos &lt; 10 μ. Rendimiento: 73.04%</p>	<p>X= alog 0.63 = 4.267; DE= 0.23; EE= 0.006</p>	
9			
	<p>*TP= 4.43 - 4.83; X= 4.63; DE= 3.12; EE= 0.09 Agregados semiesféricos &lt; 10 μ. Rendimiento: 77.21%.</p>	<p>X= alog 0.604 = 4.02; DE= 0.216; EE= 0.0069</p>	

\*TP= Tamaño de partícula en micras. \*Se entiende X= media, DE= Desviación estándar, EE= Error estándar

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para los experimentos 6-7 y 8-9 se muestra en las tablas 17 y 18.

**Tabla 17. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
6	0.188	780	0.000
7	0.278	1913	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

**Tabla 18. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

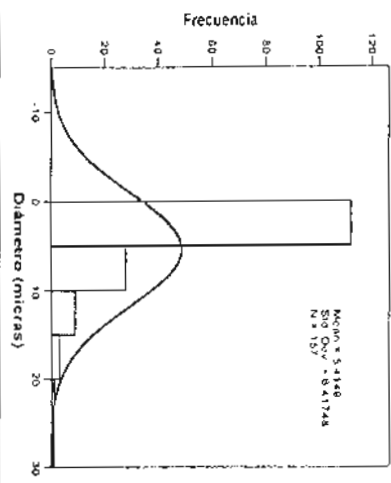

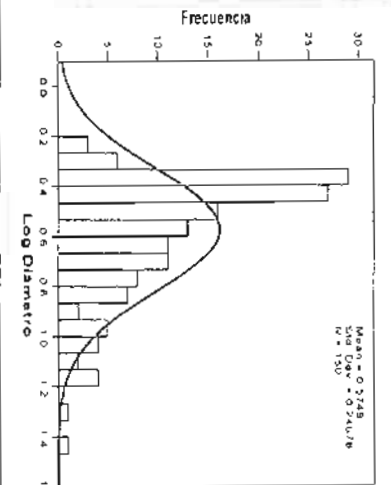
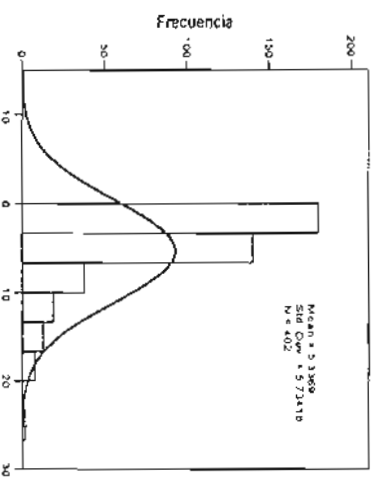

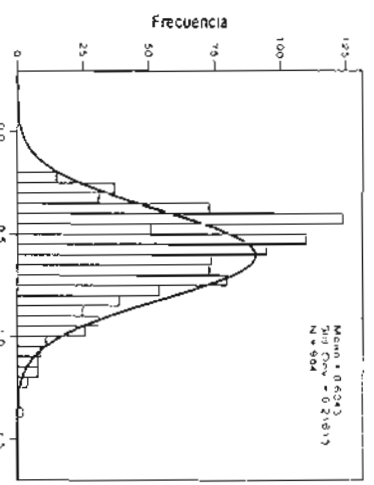
No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
8	0.282	157	0.000
9	0.176	984	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

En todos los casos con base en el valor de  $P < 0.05$ , resulta que los datos no presentan una distribución normal, por lo que se llevó a cabo la normalización calculando el logaritmo base diez a los datos del tamaño de partícula y se muestra en las tablas 15 y 16.

Por lo tanto se decide hacer dos ensayos con la velocidad 1 y concentración baja, más para comparar la reproducibilidad, los que son identificados como experimentos 8-2 y 8-3. La prueba de bondad y ajuste se muestra en la tabla 20.

Tabla 19. Características de los núcleos de fosfato de calcio recubiertos con lactosa 9.4 \*10<sup>-5</sup> M liofilizados.

Experimento No.	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
8-2			
8-3			

\*TP= 4.40 – 6.43; X= 5.41; DE= 6.42; EE= 0.51  
Agregados semiesféricos < 10 µ. Rendimiento: 66.50%

X= alog 0.574 = 3.75; DE= 0.246; EE= 0.020

\*TP= 4.77-5.89; X= 5.34; DE= 5.73; EE= 0.285  
Agregados semiesféricos < 10 µ. Rendimiento: 69.43%.

X= alog 0.596 = 3.94; DE= 0.237; EE= 0.0120

\*TP= Tamaño de partícula en micras; \*Se entiende X= media, DE= Desviación estándar, EE= Error estándar

## Análisis factorial 2<sup>2</sup>

Tabla 20. Estadística descriptiva velocidad vs. concentración de Lactosa

Variable dependiente: Tamaño de partícula

No Experimento	Media	Desviación Estándar	N	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%	
					LI	LS
6	7.3502	6.2545	780	0.223	6.998	7.702
7	5.0268	5.6126	1913	0.128	4.77	5.2784
8	4.6444	3.32152	558	0.212	4.228	5.061
9	4.6326	3.12341	984	0.099	4.319	4.828

LI = Límite inferior  
LS = Límite superior

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de 9 mL/min y concentración alta de lactosa son: media: 7.3502, desviación estándar: 6.2545, error estándar: 0.180; e intervalo de confianza al 95%: 6.998 – 7.702.

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de 9 mL/min y concentración baja de lactosa son: media: 4.6444, desviación estándar: 3.32152, error estándar: 0.212; e intervalo de confianza al 95%: 4.228 – 5.061

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de 7 mL/min y concentración alta de lactosa son: media: 5.0268, desviación estándar: 5.61269, error estándar: 0.115; e intervalo de confianza al 95%: 4.802 – 5.252.

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación de 7 mL/min y concentración baja de lactosa son: media: 4.6326, desviación estándar: 3.12341, error estándar: 0.160; e intervalo de confianza al 95%: 4.319-4.946.

En la tabla 21 se muestra que el análisis factorial exhibió los siguientes resultados:

**Tabla 21. Análisis factorial 2<sup>2</sup>.**

Variable dependiente: Tamaño de partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.	Parámetro de no Centralidad	Poder Observado <sup>a</sup>
Lactosa	2083.053	1	2083.053	82.801	0.00	82.801	1.000
Vel. Precipit	1181.993	1	1181.993	46.984	0.000	46.984	1.000
Lactosa*Vel							
Precipitación	1158.400	1	1158.400	46.046	0.000	46.046	1.000
Error	106441.31	4231	25.157				
Total	110540.00	4234					

a. Computado usando alfa= 0.05.

Con base en el resultado del valor de P, para la interacción velocidad de agitación \* lactosa, el cual es menor que 0.05, por lo que se observan diferencias en el tamaño de partícula al menos uno de los niveles de cada factor.

Dado que las varianzas son diferentes, se decide efectuar una prueba de comparaciones múltiples para observar si existe diferencia sobre el tamaño de partícula en al menos uno de los niveles de los factores (concentración de lactosa y velocidad de precipitación).

Prueba de comparaciones múltiples:

**Tabla 22. Prueba de comparaciones múltiples entre velocidad de precipitación y concentración de lactosa.**

Variable dependiente: Tamaño de Partícula

Vel. Precip.	(I) Lactosa	(J) Lactosa	Media de la diferencia (I-J)	Error Estándar	Sig. <sup>a</sup>
V1	+	-	2.706*	0.278	0.000
	-	+	- 2.706*	0.278	0.000
V2	+	-	0.394*	0.197	0.045
	-	+	- 0.394*	0.197	0.045

(+) =  $3 \times 10^{-3}M$ ; (-) =  $9.4 \times 10^{-5}M$

Basados en las medias de los marginales estimados.

\* La diferencia de la media es significativa a 0.05.

a. Ajuste de comparaciones múltiples: Bonferroni.

Con base en el valor de  $P$ , para cada una de las comparaciones, se observa que existen diferencias significativas en el tamaño de partícula cuando se emplean las velocidades de 9 mL/min y 7 mL/min, y concentración alta y baja de lactosa. Lo que indica que en el caso de la experimento 6, el tamaño de partícula aumenta con respecto a los núcleos, debido a que existe una cantidad de lactosa en exceso, lo que favorece la formación de agregados. Considerando que el tamaño de los núcleos de esta velocidad era 4.23 y aumentó a 7.3 micras. Para el experimento 7, los núcleos son de menor tamaño 6.99 y disminuye a 5.02 micras, debido posiblemente a que en los núcleos obtenidos con la velocidad 2, existe una presencia de un mayor número de agregados de pequeñas partículas en comparación con la velocidad 1, mismos que al solubilizarse se desintegraron, generando partículas de menor tamaño lo cual aumenta el área superficial, permitiendo un mayor espacio para que las moléculas de lactosa puedan adsorberse y acomodarse, favoreciendo que disminuya el tamaño de partícula. Sin embargo, empleando concentraciones bajas de lactosa con ambas velocidades, experimentos 8 y 9, el tamaño de partícula disminuye más en comparación con las partículas fabricadas con altas concentraciones, lo cual es de esperarse debido a la concentración tan baja, no hay un exceso de lactosa; las diferencias en el tamaño de partícula entre ambas velocidades es mínima, esto pudiera deberse también a la concentración, ya que esta provoca que el recubrimiento pudiera considerarse que es más homogéneo y continuo, formando posiblemente una monocapa alrededor de los núcleos.

### 5.3. Tamaño y distribución de partícula de los núcleos recubiertos con Indometacina.

Llevando a cabo los experimentos 10 al 13 señalados en la tabla 2 se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 23 - 25. Con los tamaños de partícula se calcularon inicialmente la estadística descriptiva, obteniéndose los valores de la media, intervalos de confianza, desviación estándar y error estándar, se obtuvo el histograma de frecuencia y se corrió una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smimov, para determinar el tipo de distribución de los datos del tamaño de partícula. Como los datos no siguieron una distribución normal, se procedió a analizar utilizando la estadística no paramétrica, mediante un diseño de dos factores con interacción y mediante la prueba de Levene, se determinó que las varianzas no eran iguales, por lo cual los datos se sometieron a una prueba de comparaciones múltiples, para determinar si existía un efecto de la velocidad y la concentración de fármaco modelo sobre el tamaño de partícula. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla 23. Estadística descriptiva.**

Variable dependiente: Tamaño de partícula

No Experimento	[Indometacina*]	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%	
					LI	LS
10	+	8.582	10.2019	0.170	8.155	9.008
11	+	8.422	13.4255	0.777	6.892	9.953
12	-	5.077	2.62992	0.196	4.689	5.465
13	-	4.281	2.8324	0.0781	4.127	4.434

\* Se entiende por (+) =  $1.5 \times 10^{-5} M$ , (-) =  $3.57 \times 10^{-5} M$

LI = Limite inferior

LS = Limite superior

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación V1 y concentración alta de indometacina son: media: 8.5820, desviación estándar: 10.20196, error estándar: 0.170; e intervalo de confianza al 95%: 8.1559 -9.008.



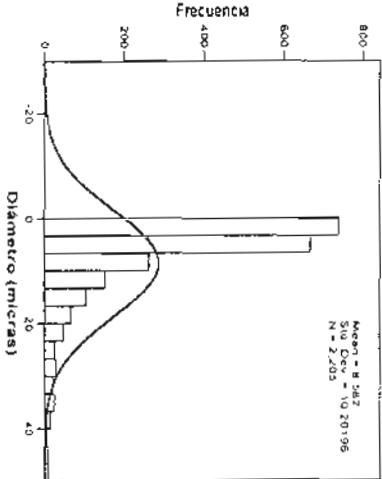
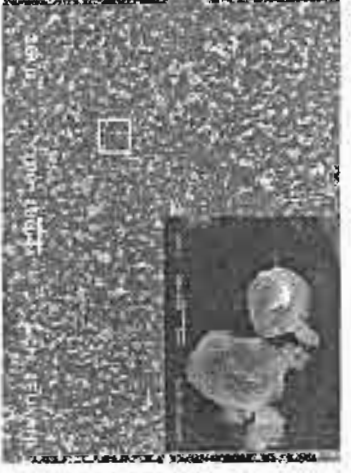
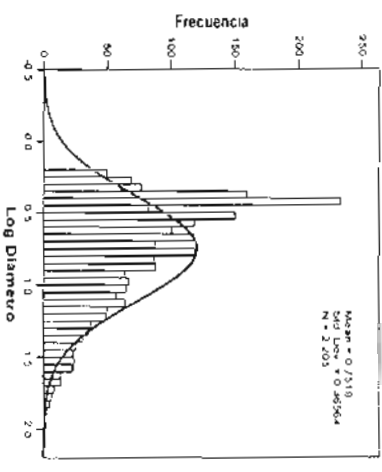
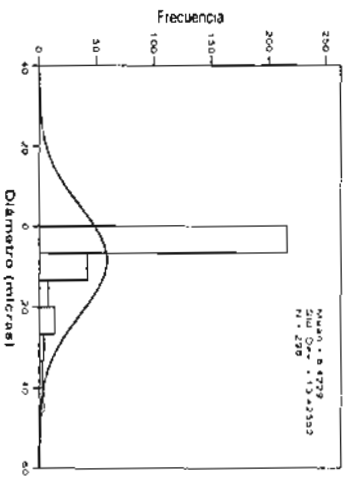
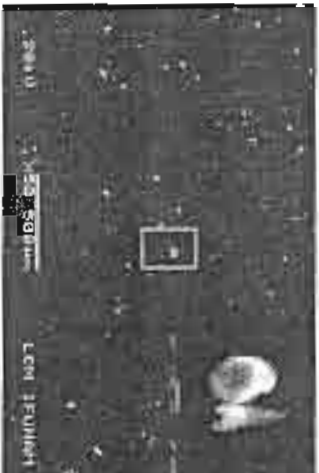
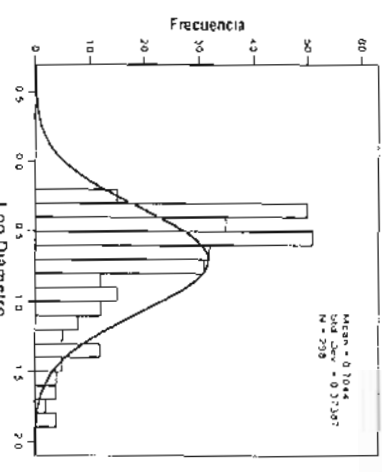
Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación V1 y concentración baja de indometacina son: media: 5.0771, desviación estándar: 2.62992 error estándar: 0.196; e intervalo de confianza al 95%: 4.689 – 5.465.

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación V2 y concentración alta de indometacina son: media: 8.4229, desviación estándar: 13.4255, error estándar: 0.777; e intervalo de confianza al 95%: 6.8923 – 9.9534.

Los resultados obtenidos con la velocidad de precipitación V2 y concentración baja de indometacina son: media: 4.2810, desviación estándar: 2.8324, error estándar: 0.0781; e intervalo de confianza al 95%: 4.1278 – 4.4343.

De lo cual se deduce que con base al análisis estadístico existe un efecto de la concentración de indometacina sobre el tamaño de partícula ( $p < 0.05$ ).

Tabla 24. Características de los acuosomas de indometacina  $1.5 \cdot 10^{-3}$  M iiofilizados.

Experimento No.	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
10			
11			

\*TP= 8.15 -9.01; X= 8.58; DE= 10.20; EE= 0.217  
Agregados pequeños y deformes < 10  $\mu$ . Rendimiento: 96.76%

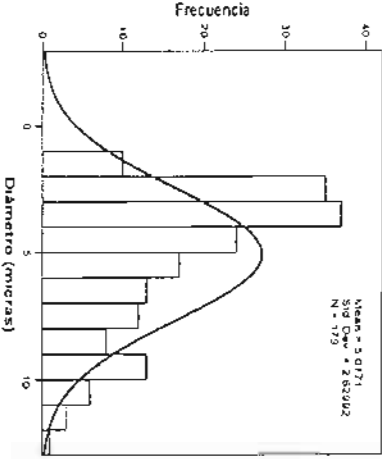
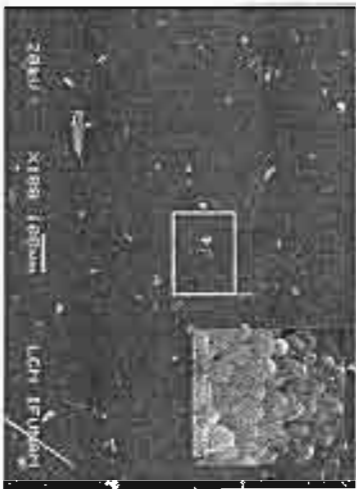
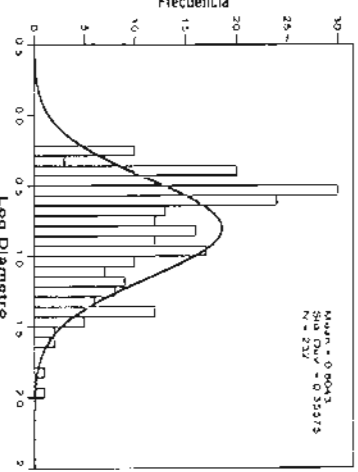
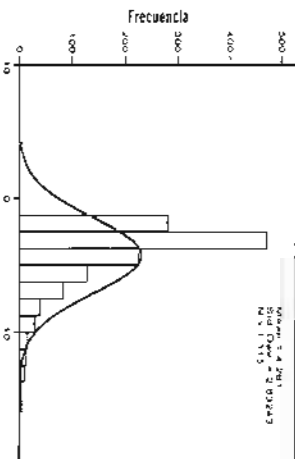

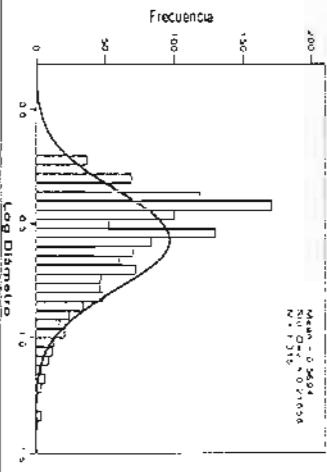
X=  $\log 0.752 = 5.65$ ; DE= 0.37; EE=0.007

\*TP= 6.892 - 9.953; X= 8.422; DE= 13.425; EE=0.777  
Agregados deformes y grandes > 10  $\mu$ . Rendimiento: 67.37%.

X=  $\log 0.704 = 5.06$ ; DE= 0.373; EE= 0.0216

\*TP= Tamaño de partícula en micras. \*Se entiende X= media, DE= Desviación estándar, EE= Error estándar.

Tabla 25. Características de los acuosomas de indometacina 3.57 \*10<sup>-5</sup> M liofilizados.

Experimento No.	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
12	 <p>Mean = 5.0171 Std. Dev. = 2.82842 N = 173</p>		 <p>Mean = 0.8043 Std. Dev. = 0.35873 N = 173</p>
13	 <p>Mean = 5.4281 Std. Dev. = 2.03243 N = 1113</p>		 <p>Mean = 0.5694 Std. Dev. = 0.21658 N = 1113</p>

\*TP= Tamaño de partícula en micras. \*Se entiende X= media, DE= Desviación estándar. EE= Error estándar

\*TP= 4.13- 4.43; X = 4.28; DE= 2.83; EE=0.078  
Agregados deforme > 10 μ. Rendimiento: 67.37%.

\*TP= 4.689 - 5.465 X = 5.07; DE= 2.629; EE= 0.196  
Agregados esféricos < 10μ. Rendimiento: 96.76%

X= alog 0.804 = 6.37, DE= 0.355  
EE=0.023

X= alog 0.569 = 3.71; DE= 0.216  
EE= 0.0059

La prueba de bondad y ajuste para los acuosomas de indometacina de los experimentos 10-13, se presenta a continuación.

**Tabla 26. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
10	0.251	2205	0.000
11	0.309	298	0.000
12	0.168	179	0.000
13	0.183	1315	0.000
12-2	0.172	684	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

En todos los casos anteriores y con base en el valor de  $P < 0.005$ , se observa que los datos no presentan una distribución normal, por lo que se llevó a cabo la normalización calculando el logaritmo base diez a los datos del tamaño de partícula y se muestra en la tabla 25.

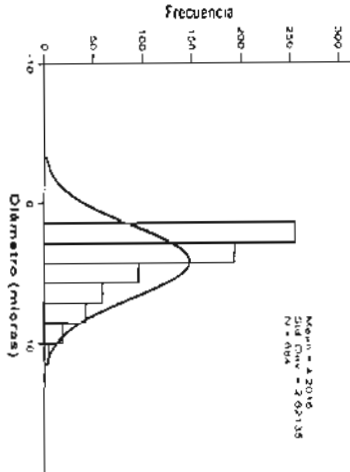

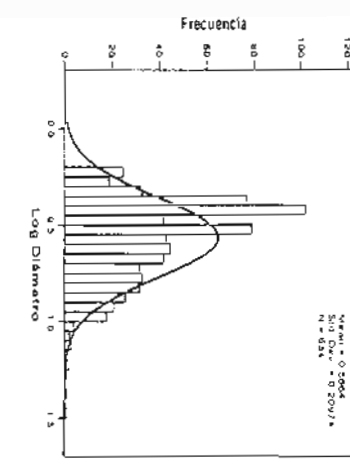
Para evaluar la reproducibilidad se realiza un ensayo más, identificado como experimento 12-2 (Tabla 28). La prueba de bondad y ajuste se muestra en la tabla 27.

**Tabla 27. Prueba de bondad y ajuste Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>**

No. Experimento	Estadística	gl	Significancia
12-2	0.172	684	0.000

a. Corrección de significancia de Lilliefors  
gl = grados de libertad

Tabla 28. Características de los acusomas de indometacina 3.57 \*10<sup>-5</sup> M liofilizados.

No. Experimento	Histograma	Microfotografía	Histograma normalizado
12-2			
<p>*TP= 4.39 - 4.44 ; X= 4.20; DE= 2.62; EE= 0.10                      Agregados esféricos &lt; 10µ. Rendimiento: 96.36%</p>			<p>X= alog 0.566 = 3.68, DE= 0.209                      EE=0.0082</p>

La prueba de normalidad de Levene arrojó lo siguiente:

**Tabla 29. Prueba de normalidad<sup>a</sup>**

Variable Dependiente: Tamaño de Partícula

F	gl 2	Sig
230 152	4677	.000

Prueba la hipótesis nula que la varianza del error de la Variable dependiente es igual en los grupos cruzados.

a. Diseño Intercepto+Indometacina+Veloc. de Precip.+ Indometacina \* Veloc. de Precip

gl = grados de libertad.

La prueba de Levene, muestra con base al valor de  $P < 0.05$  que las varianzas son diferentes y que presenta una distribución de tipo no normal. Por lo que se procedió a normalizarla sacando el logaritmo base diez a los resultados del tamaño de partícula.

El análisis factorial exhibió los siguientes resultados:

**Tabla 30. Análisis factorial 2<sup>2</sup>**

Variable Dependiente: Tamaño de Partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig	Parametro de no Centralidad	Poder Observado <sup>a</sup>
Indometacina	12144.118	1	12144.118	189.643	.000	189.643	1.000
VelocdePrecip	11.912	1	11.912	186	.666	186	.072
Indometacina * VelocdePrecip	.567	1	.567	.009	.925	.009	.051
Error	299499.88	4677	64.037				
Corrected Total	320464.037	4680					

a. Computado usando alfa = .05

Con base en el resultado del valor de  $P$ , para la interacción velocidad de agitación \*indometacina, el cual es menor que 0.05, por lo que se observan diferencias en el tamaño de partícula al menos uno de los niveles de cada factor.

Dado que las varianzas son diferentes, se decide correr una prueba de comparaciones múltiples para observar si existe diferencia sobre el tamaño de partícula en al menos uno de los niveles de los factores (concentración de indometacina y velocidad de precipitación), siendo los resultados los que a continuación se presentan.

Prueba de comparaciones múltiples:

**Tabla 31. Prueba de comparaciones múltiples entre velocidad de precipitación y concentración de indometacina.**

Variable dependiente: Tamaño de Partícula

Vel Precip.	(I) Indometacina	(J)Indometacina	Media de la diferencia (I-J)	Error Estándar	Sig. <sup>a</sup>
V1	+	-	4.199*	0.321	0.000
	-	+	- 4.199*	0.321	0.000
V2	+	-	4.142*	0.513	0.000
	-	+	- 4.142*	0.513	0.000

(+) =  $1.5 \times 10^{-4} M$ ; (-) =  $3.57 \times 10^{-5} M$

Basados en las medias de los marginales estimados

\* La diferencia de la media es significativa a 0.05

a. Ajuste de comparaciones múltiples. Bonferroni

Con base en el valor de P, para cada una de las comparaciones, se observa que existen diferencias significativas en el tamaño de partícula cuando se emplean las velocidades de V1y V2 y concentración alta y baja de indometacina.

En los experimentos 10 y 11, existe un aumento en el tamaño de partícula con respecto a los núcleos de los que parten, esto puede ser atribuido a que la cubierta de lactosa posee muchos grupos hidroxilo reactivos, con los cuales se pueden establecer enlaces de tipo puente de hidrógeno y Van der Waals con los grupos metoxi, carbonilo de ácido, los hidrógenos de los aromáticos, permitiendo, al emplear una concentración alta de indometacina, una mayor cantidad de fármaco se adsorbida y por el ende el tamaño de partícula se mayor. En el caso de los experimentos 12 y 13, los tamaños de partícula son menores debido posiblemente a que como se empleó una concentración menor de lactosa, se formó quizás una monocapa o una capa más delgada, con una menor cantidad de grupos hidroxilo disponibles para formar enlaces por puente de hidrógeno y a distancia, la cantidad de indometacina que se enlace fue menor, aunado a la concentración empleada, y genero partículas con un tamaño menor en comparación con los experimentos 10 y 11.

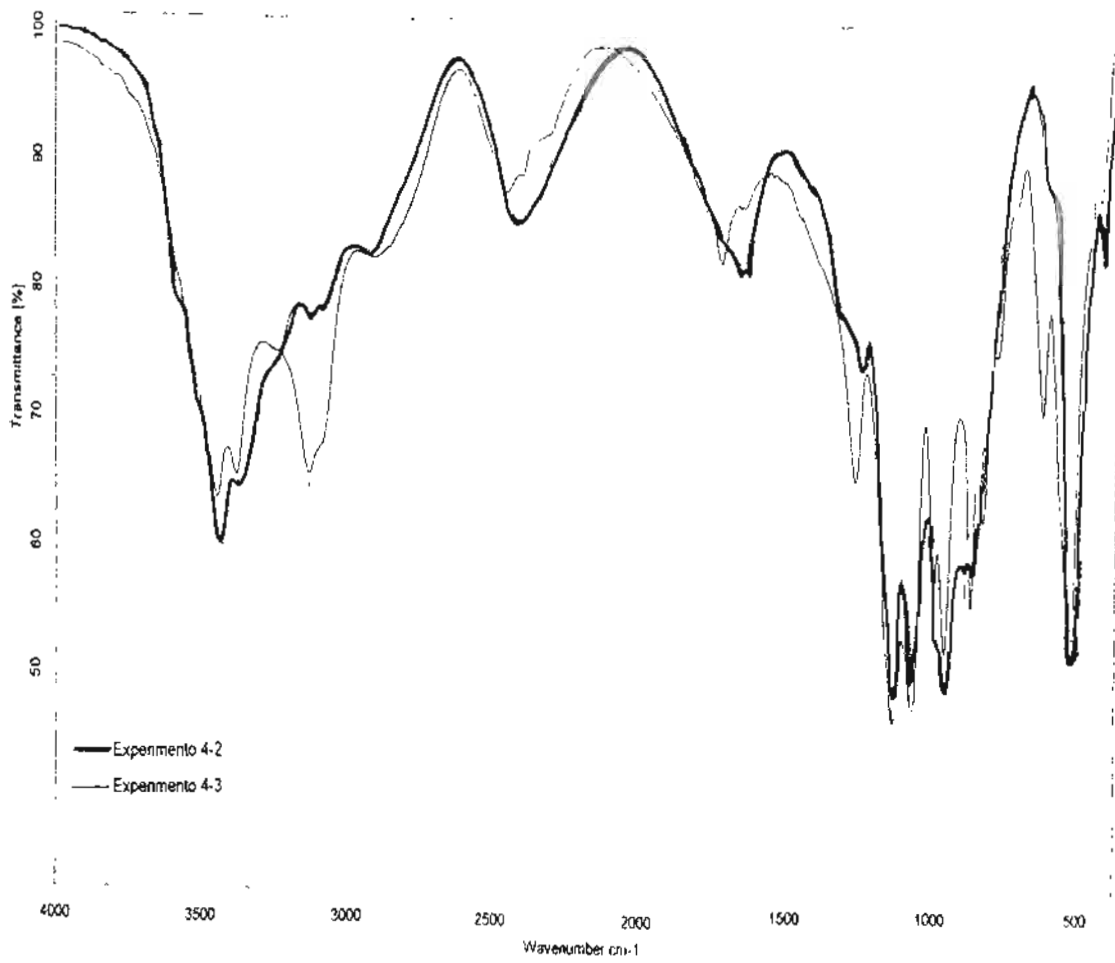
## 5.4. Espectroscopia infrarroja.

### 5.4.1. Espectro de núcleos.

En la gráfica 1 se muestra los infrarrojos de los núcleos de fosfato de calcio (experimento 4-2 y 4-3). Para el infrarrojo del experimento 4-2 (gráfica 1a) se registraron las siguientes bandas: 3441.27, 3357.62, 3133.79, 2915.61, 2429.33, 1662.28, 1634.66, 1245.69, 1137.16, 1075.67, 957.38, 890.05, 865.76, 519.53, 420.10  $\text{cm}^{-1}$ . En el caso de estos núcleos se encuentran con los números de onda 1075.67 y 519.53  $\text{cm}^{-1}$ , este último se encuentra desplazado quizás debido la presencia de agua, ya que la interacción entre grupos funcionales dentro de una molécula puede dar origen a cambios en la frecuencia e intensidad de las bandas<sup>50</sup>. Las bandas de absorción a 3400  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidas a las vibraciones de alargamiento H-O-H.

En la gráfica para el experimento 4-3 se observaron las siguientes bandas: 3444.97, 3379.88, 3130.82, 2449.95, 1715.71, 1633.80, 1261.39, 1134.63, 1069.48, 993.43, 956.26, 865.50, 823.16, 618.57, 537.20, 518.18, 418.39  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas características de los grupos fosfatos reportados<sup>49</sup> se encuentran entre 1090- 1030 y 600-560  $\text{cm}^{-1}$ . En el caso de estos núcleos se encuentran con los números de onda 1069.48 y 518.18  $\text{cm}^{-1}$ , este último se encuentra desplazado quizás debido la presencia de agua, ya que la interacción entre grupos funcionales dentro de una molécula puede dar origen a cambios en la frecuencia e intensidad de las bandas<sup>50</sup>. Las bandas de absorción a 3400  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidas a las vibraciones de alargamiento H-O-H

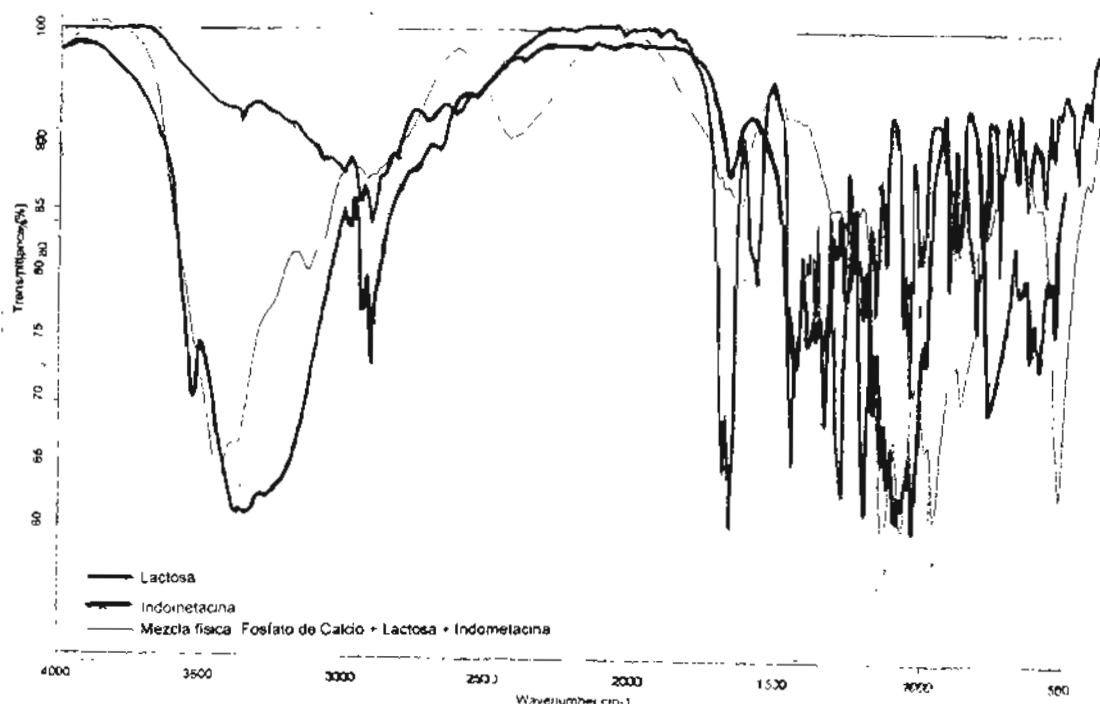




Gráfica 1. Espectro de infrarrojo experimentos 4-2 y 4-3.

### 5.4.2. Mezcla física.

En la gráfica 2 se muestra el espectro de infrarrojo obtenido de lactosa USP materia prima registrando las siguientes señales: 3526.68, 3381.01, 3340.91, 3276.08, 2981.21, 2933.90, 2900.61, 2667.21, 1656.75, 1430.22, 1388.13, 1362.92, 1341.11, 1300.02, 1260.84, 1201.96, 1168.72, 1141.34, 1116.80, 1074.22, 1035.28, 988.88, 899.33, 876.17, 776.30, 673.02, 632.07, 605.84, 551.59  $\text{cm}^{-1}$ . Las señales 1201.96- 1035.28  $\text{cm}^{-1}$  son características de los enlaces C-O de lactosa<sup>51</sup>.



**Gráfica 2. Espectro de infrarrojo de mezcla física comparado con lactosa e indometacina.**

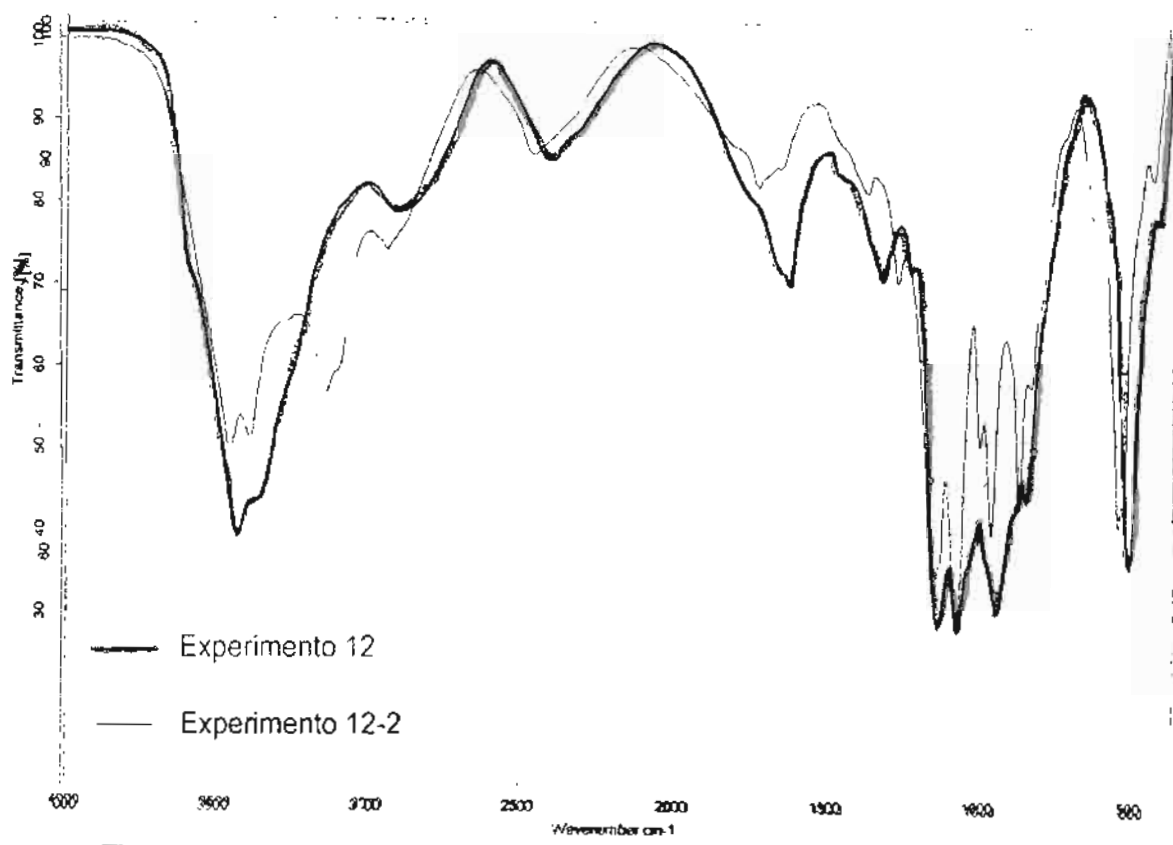
También se observa que del análisis de materia prima indometacina se obtuvieron las siguientes señales: 3371.61, 3095.31, 3021.52, 2967.14, 2927.05, 2833.68, 2731.49, 2629.19, 2557.69, 1716.21, 1691.60, 1591.81, 1479.65, 1454.95, 1425.85, 1396.99, 1362.60, 1309.87, 1260.44, 1228.66, 1187.57, 1146.70, 1086.63, 1067.25, 1028.67, 925.41, 905.46, 835.88, 803.62, 752.41, 694.54, 657.24, 594.24, 561.08, 538.56, 481.29, 437.15  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos

característicos del grupo carbonilo de la amida y el ácido de la indometacina corresponden a las señales observadas en 1691.60 y 1716.21  $\text{cm}^{-1}$ .

El infrarrojo de la mezcla física de fosfato de calcio, lactosa e indometacina mostró las siguientes señales: 3441.44, 3382.63, 3133.91, 2928.64, 2432.18, 1712.97, 1690.39, 1634.51, 1477.66, 1323.15, 1256.25, 1136.73, 1070.88, 990.07, 955.42, 865.09, 607.95, 516.92, 423.65  $\text{cm}^{-1}$ . Las señales características del grupo carbonilo de la amida y el ácido de la indometacina se observaban en 1691.60 y 1716.21  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.4.3. Espectro de acuosomas de indometacina.

En el espectro de infrarrojo obtenido de los acuosomas de indometacina con el experimento 12 se muestra en la gráfica 3 se observaron los siguientes picos: 3435.95, 2925.68, 2412.08, 1633.40, 1327.13, 1235.65, 1140.31, 1079.73, 951.16.855.01.515.72  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos característicos de los grupos fosfatos reportados<sup>49</sup> se encuentran entre 1090- 1030 y 600-560  $\text{cm}^{-1}$ . En los acuosomas obtenidos, los picos característicos del grupo fosfato se encuentran con los números de onda 1079.73 y 515.72  $\text{cm}^{-1}$ , este último se encuentra desplazado quizás debido la presencia de agua, ya que la interacción entre grupos funcionales dentro de una molécula puede dar origen a cambios en la frecuencia e intensidad de las bandas<sup>50</sup>.



Gráfica 3. Acuosomas de indometacina experimentos 12 y 12-2.

Para el experimento 12 – 2 mostrado en la gráfica 3, mostró los siguientes picos: 3443.90, 3379.92, 3130.16, 2925.81, 2441.14, 1713.69, 1360.13, 1260.31, 1138.61, 1071.46, 992.04, 954.71, 863.57, 825.52, 618.94, 536.45, 519.14 y 420.05  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos característicos de los grupos fosfatos reportados<sup>49</sup> se encuentran entre 1090- 1030 y 600-560  $\text{cm}^{-1}$ . En los acuosomas obtenidos, los picos característicos del grupo fosfato se encuentran con los números de onda 1071.46 y 519.14  $\text{cm}^{-1}$ , este último se encuentra desplazado quizás debido a la presencia de agua, ya que la interacción entre grupos funcionales dentro de una molécula puede dar origen a cambios en la frecuencia e intensidad de las bandas<sup>50</sup>.

Por lo anterior se observa que en el espectro de infrarrojo de la mezcla física tiene señales muy semejantes a los acuosomas del experimento 12, tanto en forma como en intensidad, la única diferencia en los acuosomas experimento 12 es que no aparece la señal de 3133.81, en la zona de 1700 – 1630  $\text{cm}^{-1}$  faltan señales que aparecen en la mezcla física, en la señal alrededor de 1327 se intensifica en el caso de los acuosomas y la de 990 no aparece en los acuosomas.

Con respecto los acuosomas del experimento 12-2, se ve claramente que en la zona de 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  hay una diferencia más marcada con la banda de 3130.16 en el experimento 12. También se muestra que la mezcla física presenta las señales 1712.97 y 1690.39  $\text{cm}^{-1}$  las cuales sugieren que corresponden al carbonilo del ácido y de la amida de la indometacina en comparación con los acuosomas del experimento 12 (AQE-12) en el cual solo se observa una señal en 1713.69 $\text{cm}^{-1}$ , aunque existe una señal cercana de baja intensidad no marcada, que podría quizás corresponder a la registrada en 1690.39 en la mezcla física. Las bandas registradas en 1634.51, 1477.86 y 1323.15 $\text{cm}^{-1}$  en la mezcla física no se observan en AQE-12. La banda en los acuosomas (AQE-12) en 863.57 $\text{cm}^{-1}$  presenta una señal anexa de baja intensidad en 825.52 $\text{cm}^{-1}$  al igual que en 536.45 y 519.14 $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas 607.95 y 423.65 $\text{cm}^{-1}$  en la mezcla física son menos intensas en AQE-12. Se observa también que existen algunas zonas en las cuales muestran cierta semejanza como en la señal 2925.81  $\text{cm}^{-1}$  en AQE-12 con 2928.64  $\text{cm}^{-1}$  de la

mezcla física. La zona de  $1136.73 - 865.09 \text{ cm}^{-1}$  en la mezcla física es similar en forma a la zona  $1138.61 - 863.57 \text{ cm}^{-1}$  de los acuosomas AQE-12.

Con respecto al análisis de la materia prima del fármaco modelo, indometacina, se observan las bandas de  $1716.21$  y  $1691.60 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes al carbonilo del ácido<sup>52-54</sup> y de la amida, en el caso de la mezcla física aparecen y se sugiere que corresponden a las señales registradas en  $1712.97$  y  $1690.39 \text{ cm}^{-1}$ ; en el caso de los acuosomas del experimento 12-2 (AQE-12-2), estas señales aparecen, aunque existe una señal no marcada cerca de  $1633.40 \text{ cm}^{-1}$  y en los acuosomas AQE-12 solamente aparece una señal en  $1713.69 \text{ cm}^{-1}$  que podría ser del grupo carbonilo y que pudiera estar desplazado por la interacción con lactosa. Se encuentran diferencias entre la indometacina y los acuosomas AQE-12-2 en las siguientes zonas:  $3371.61 - 2967.14 \text{ cm}^{-1}$ , resulta difícil ver las señales en los acuosomas AQE-12 porque hay una banda muy ancha en la región, correspondiente al enlace O-H de la lactosa. Las señales de  $1260.44 - 1187.57 \text{ cm}^{-1}$  presente en la indometacina, no aparecen AQE-12-2, al igual que  $1028.67 - 538.56 \text{ cm}^{-1}$ .

En lo que respecta a los acuosomas AQE-12-2 presentan diferencias con la indometacina en las zonas  $3095.31 - 2967.14 \text{ cm}^{-1}$  no se observan en AQE-12-2,  $2833.68 - 2557.69$ , así como la zona correspondiente a  $1691.-1396.99 \text{ cm}^{-1}$ . No presenta las señales en  $1309.87$ ,  $1228.66$ ,  $1187.57$ ,  $1086.63$  y  $1028.67 \text{ cm}^{-1}$  presentes en indometacina materia prima.

El análisis de la materia prima de Lactosa USP sugiere que se trata de  $\alpha$ -Lactosa monohidrato, ya que presenta similitudes con lo reportado por Drapier<sup>51</sup> y colaboradores, las bandas de  $3526-3276.08 \text{ cm}^{-1}$  caracterizan a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O-H de los grupos alcohol de lactosa. Las bandas de  $2933.90- 2900.61$  se deben a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H que se generan dentro de las unidades de glucosa y galactosa que conforman a lactosa. Las señales observadas entre  $1430.22- 1201.96$  son características de las vibraciones de torsión del enlace C-H. Las bandas de  $1168.72 - 1035.28 \text{ cm}^{-1}$  se ha reportado que son debidas a las vibraciones de estiramiento asimétrico del enlace éter C-O-C entre las

unidades de glucosa y galactosa. Las vibraciones entre  $960-730\text{cm}^{-1}$  aparecen las vibraciones de la molécula entera de lactosa

## 5.5. Resonancia magnética nuclear de protón. ( $H^1$ NMR)

Las señales características de indometacina en  $H^1$ NMR están en 7.65 y 7.45 ppm, así como 6.944, 6.873, 6.828, 6.688 y 6.644 que corresponden a los aromáticos, en 3.824 ppm para el metoxilo, 3.691 ppm para el carbonilo alfa al carboxilo y la señal 2.385 corresponde al metilo vinílico.

En lo que respecta al los acuosomas del experimento 12 se observa las siguientes señales: 7.67 y 7.49 ppm, así como 6.67 que corresponde a los aromáticos, en 3.842 ppm para el metoxilo, 3.722 ppm para el carbonilo alfa al carboxilo y 2.406 correspondiente al metilo vinílico.

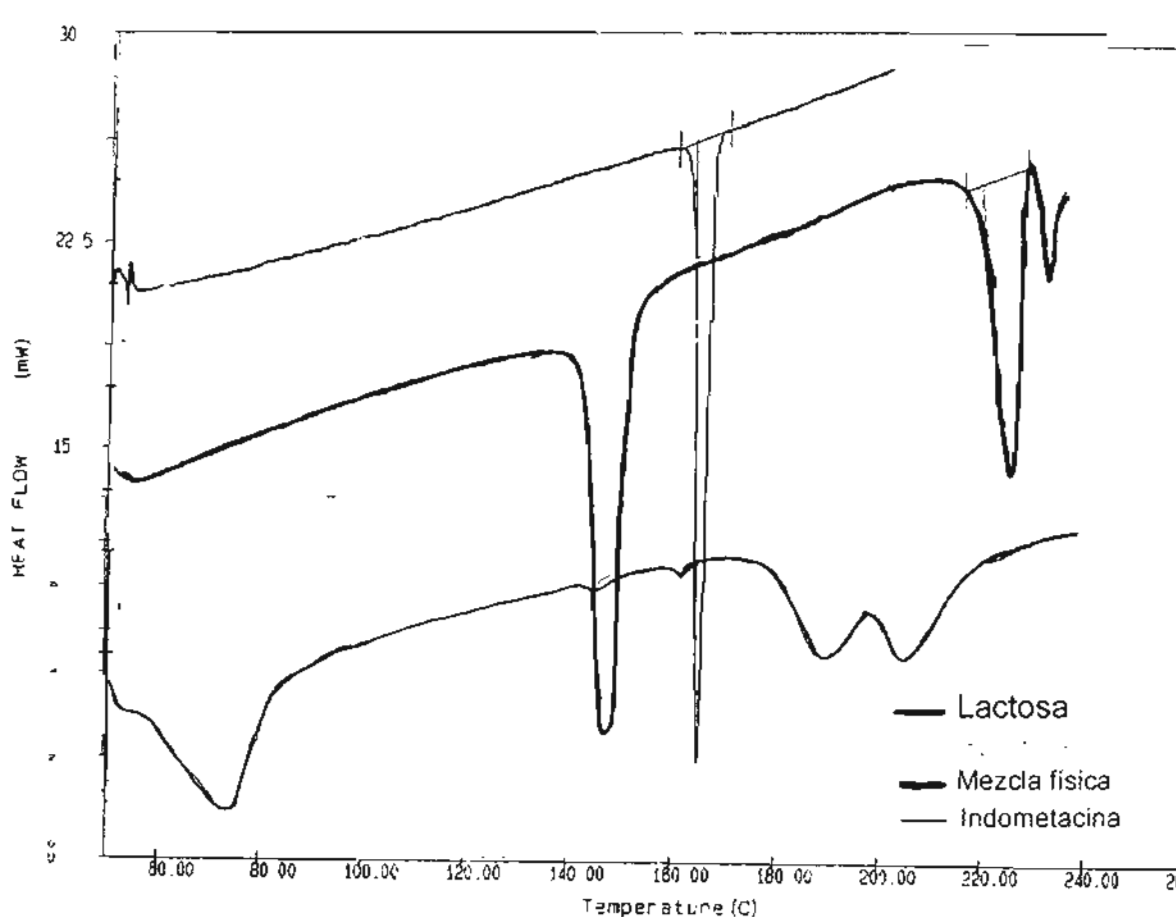
Para los acuosomas del experimento 12-2, las señales en 7.8 y 7.264 ppm, así como 6.7 corresponden a los grupos aromáticos, en 3.842 ppm se observa la señal para el metoxilo, en 3.725 ppm correspondiente al carbonilo alfa al carboxilo y 2.408 ppm correspondiente al metilo vinílico. En los dos experimentos de acuosomas se observa una cantidad menor de señales características de la indometacina, debido a que en los acuosomas se encuentra unido, mediante enlaces no covalentes, a la lactosa, lo que probablemente genere que los demás grupos no sean "vistos", ya que se encuentran unidos, por lo cual disminuye las señales generadas para la indometacina en los acuosomas.



## 5.6. Calorimetría diferencial de barrido

### 5.6.1. Termograma de materias primas y mezcla física.

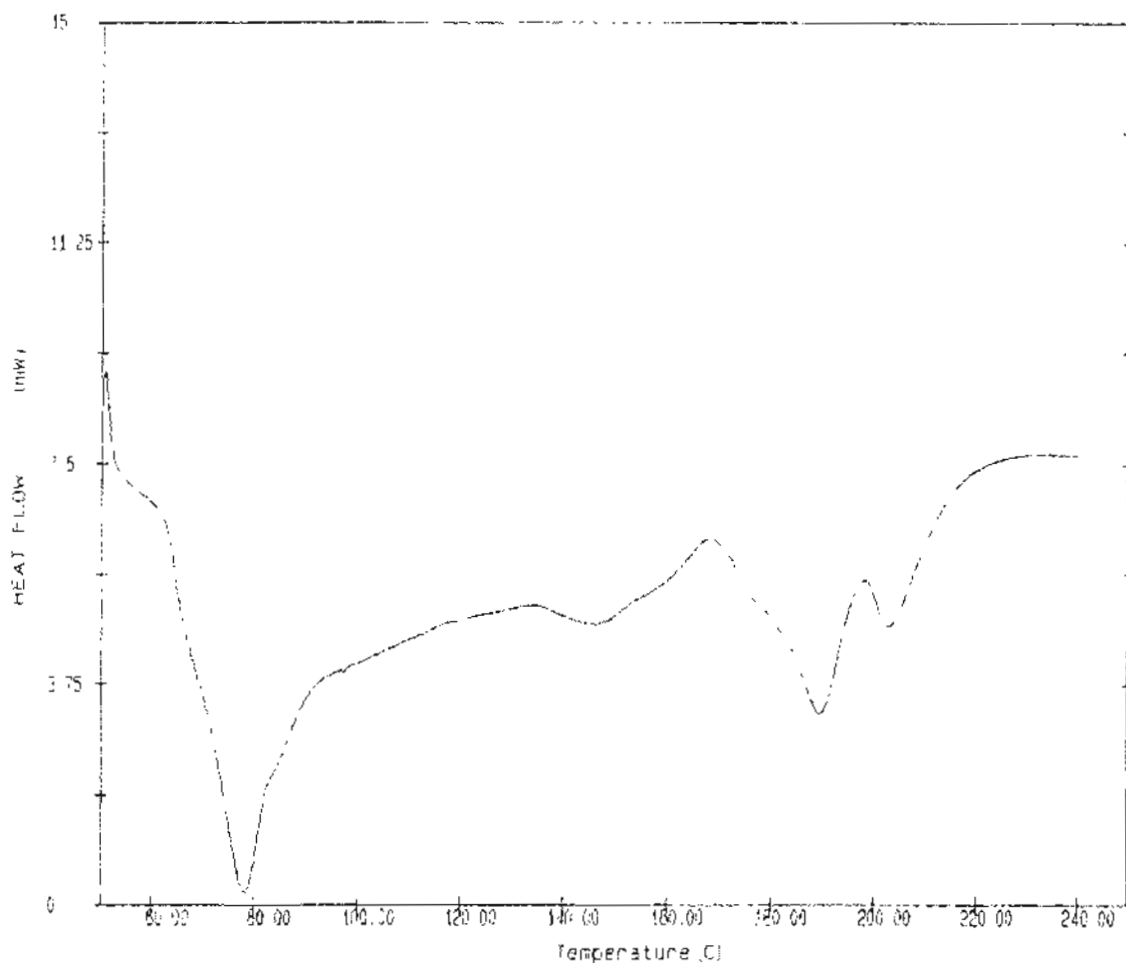
En la gráfica 4 se muestra un termograma comparativo de las materias primas contra una mezcla física de fosfato de calcio, lactosa e indometacina. Se observa que para el caso de las materias primas, se observan endotermas correspondientes a sus puntos de fusión, para la lactosa USP en 148°C correspondiente a la pérdida de agua y una más en 218.6°C correspondiente a su punto de fusión. En el caso de la mezcla física se registro una endoterma en aproximadamente 148°C correspondiente a la pérdida de agua, otra cercana a 210°C que podría atribuirse al punto de fusión de lactosa y uno pequeño en ~160°C que pudiera ser considerado como punto de fusión de la indometacina.



Gráfica 4. Termograma comparativo materias primas vs mezcla física.

### 5.6.2. Termograma de acuosomas de indometacina experimento 12.

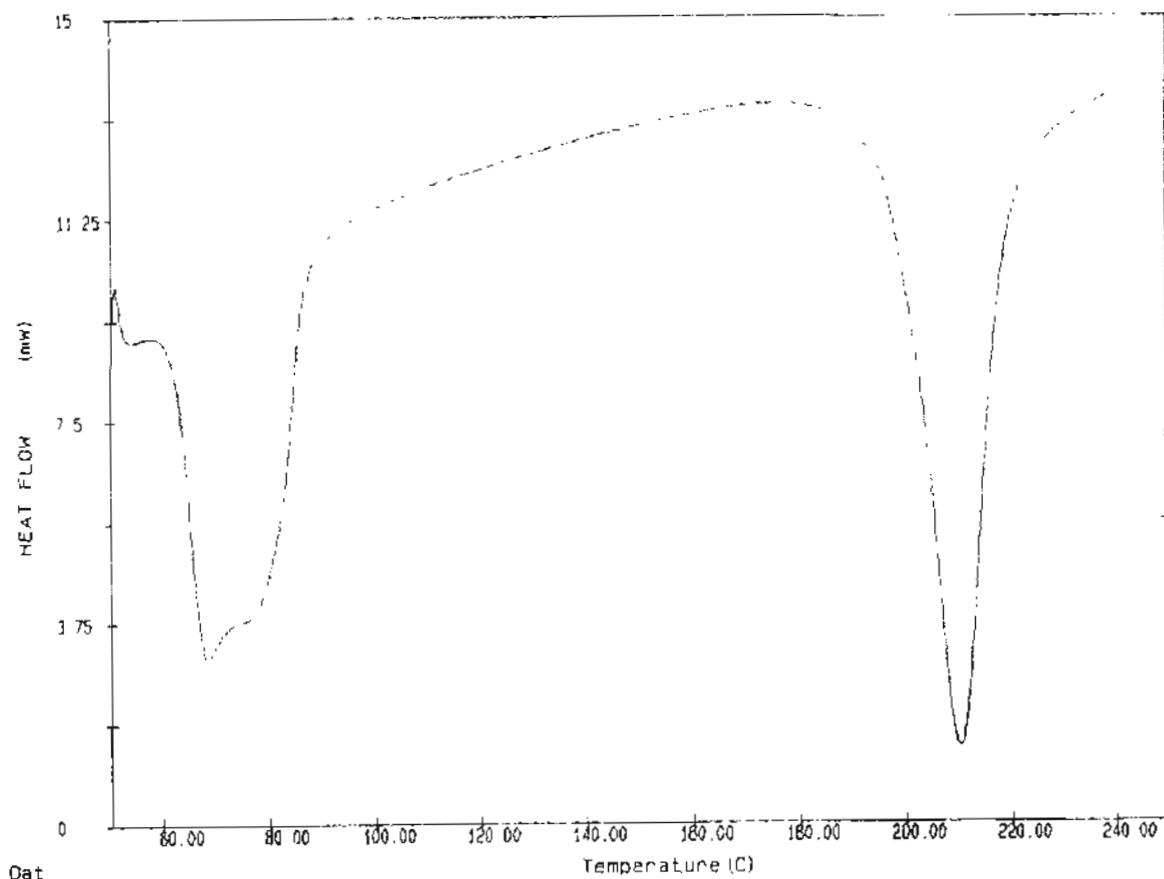
El análisis por calorimetría diferencial de barrido de los acuosomas de indometacina muestra una sola endoterma durante la corrida a 77.93°C, una endoterma en 169.10° C correspondiente al punto de fusión de la indometacina, 189.66, 203.63° C. En 151.80°C corresponde a la temperatura de transición vítrea (Tg).



Gráfica 5. Termograma de acuosomas de indometacina experimento 12.

### 5.6.3. Termograma de acuosomas de indometacina experimento 12-2.

El análisis por calorimetría diferencial de barrido de los acuosomas de indometacina muestra un endoterma a 68.38°C y 210.12°C que puede atribuirse a la presencia de agua y el punto de fusión de lactosa, respectivamente.



**Gráfica 6. Termograma de acuosomas de indometacina experimento 12-2.**

En cuanto a los resultados obtenidos a partir del análisis por calorimetría diferencial de barrido se observó lo siguiente: en el caso del fármaco modelo indometacina, se observa que el punto de fusión se registró en 164.9°C, por lo cual se puede considerar que el polimorfo al que corresponde alfa según lo reportado en la literatura<sup>52,53</sup>. En la mezcla física se detecta el pico de indometacina, se observa que el punto de fusión es diferente probablemente debido aun cambio en comportamiento de la fusión de indometacina por

interacción con lactosa, este hecho ha sido reportado<sup>54</sup>, y de agua a 148°C, el pico de lactosa cercano a 210°C y ningún pico de fosfato de calcio, debido a que descompone a temperaturas mayores a 500°C.

En los acuosomas no se observan en el termograma debido a que se disuelven y se incorporan probablemente sea de manera amorfa porque no son iguales a los sólidos cristalinos o debido a la cantidad empleada para elaborarlos.

## 5.7. Estudios de UV.

### 5.7.1. Validación de método analítico para cuantificación de IM.C

En cuanto a la validación del método analítico para la cuantificación de indometacina, los cálculos de los parámetros de desempeño arrojaron los siguientes resultados.

#### 5.7.1.1. Precisión del sistema

Para evaluar la precisión del sistema se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta analítica, en este caso, la absorbancia, los resultados obtenidos son los siguientes:

**Tabla 32. Precisión del sistema**

Muestra	Absorbancia
1	0.512
2	0.515
3	0.509
4	0.509
5	0.507
6	0.507
$\Sigma y = 3,059$ $\Sigma y^2 = 1,559629$ $n = 6$ $\bar{y} = 0,50983333$ $S = 0,003125$ $CV = 0,6129$	

Los resultados indican que el sistema es preciso.

### 5.7.1.2. Linealidad del sistema.

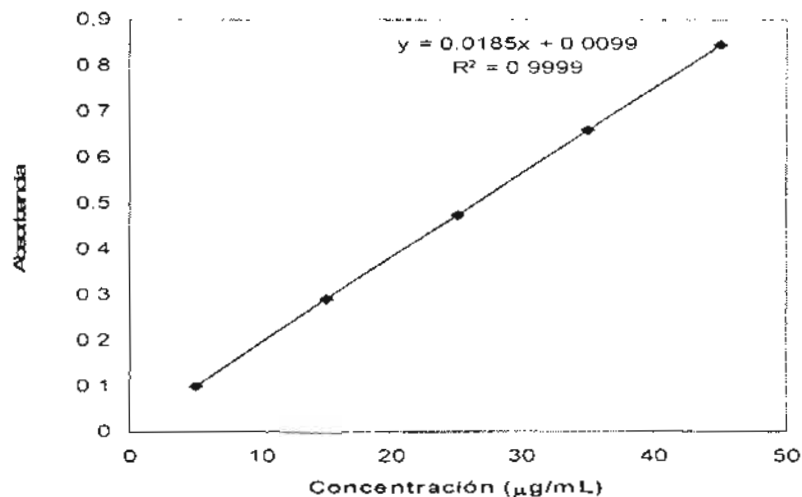
Los resultados de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ) para determinar la linealidad del sistema se muestran en la tabla 33 y gráfica 7.

**Tabla 33. Linealidad del sistema**

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	M1	M2	M3	Promedio
5	0,107	0,101	0,095	0,101
15	0,297	0,292	0,283	0,290666667
25	0,455	0,492	0,473	0,473333333
35	0,626	0,692	0,658	0,658666667
45	0,818	0,874	0,841	0,844333333

$\Sigma x = 125$	$b_1 = 2,93891\text{E-}07$
$\Sigma x^2 = 4125$	$b_0 = 0,394660544$
$\Sigma y = 2,368$	$R^2 = 0,999$
$\Sigma y^2 = 1,46547311$	$b_0 = 0,0099$
$\Sigma xy = 77,7466667$	$S_{x/y} = 0,364312398$
$n = 6$	$S_{b_1} = 0,009341855$
	$t_{0,975,4} = 2,776$
	$IC(\beta_1) = 0,025933284, 0,32266975$

Gráficamente:



**Gráfica 7. Linealidad del sistema.**

Con base en los resultados de los parámetros de desempeño anteriores se observa que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones empleado.

### 5.7.1.3. Especificidad del método.

Conociéndose los componentes que están presentes en los acuosomas, los resultados de la lectura de absorbancia de los mismos se presentan a continuación.

**Tabla 34. Especificidad del método**

Solución	M1	M2	M3	Promedio
IMC	0.499	0.486	0.481	0.488
Lactosa	0.003	0.003	0.003	0.003
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.002	0.000	0.002	0.001
IMC + Lactosa	0.209	0.164	0.240	0.204
IMC + Lactosa + Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.506	0.483	0.457	0.482

M1 = Muestra 1, M2= Muestra 2, M3= Muestra 3

Con base en los resultados anteriores se observa que la respuesta del método es específico para indometacina.

#### 5.7.1.4. Exactitud y repetibilidad

Para evaluar la exactitud y repetibilidad se calcularon el promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media (IC( $\mu$ )) obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 35. Exactitud y repetibilidad**

Muestra	IMC adicionada	IMC recuperada	% recobro
1	133,16	133,160651	100,000489
2	133,16	133,160596	100,000447
3	133,16	133,160577	100,000433
4	133,16	133,16054	100,000405
5	133,16	133,160521	100,000391
6	133,16	133,160558	100,000419
$\Sigma y = 600,002586$ $\Sigma y^2 = 60000,5172$ $n = 6$ $\bar{y} = 100,000431$ $DE = 0,01$ $CV = 0,00999996$ $t_{0,975,5} = 2,571$ $IC(\mu) = 99,9899349, 100,010927$			

Los resultados indican que el método es exacto y repetible para la cuantificación de indometacina.



### 5.7.1.5. Linealidad del método.

Al determinar la linealidad del método se obtuvieron los datos expresado en la tabla 36.

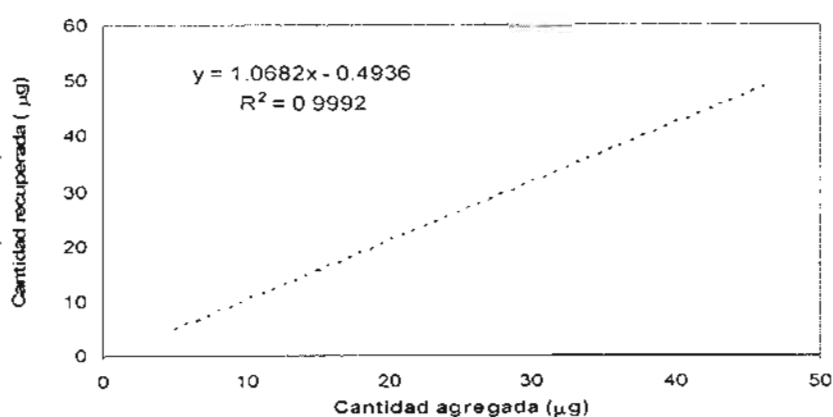
**Tabla 36. Linealidad del método**

Muestra	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de recobro
1	5	4,884	97,689
2	5	5,132	102,640
3	5,2	4,686	93,729
4	45	48,376	107,503
5	45	47,968	106,595
6	46,8	48,359	107,464

$y = 159,4067618$ $\Sigma y^2 = 7051,994625$ $\Sigma x = 152$ $\Sigma x^2 = 6317,28$ $\Sigma xy = 6673,16897$ $n = 6$ $\bar{y} = 26,56779363$ $b_1 = 1,068211342$ $b_0 = 0,493560364$ $r^2 = 0,9992$ $\bar{x} = 25,33333333$	$S_{x/y} = 0,76103636$ $S_{b_1} = 0,01532339$ $t_{0,975,4} = 2,776$ $IC(\beta_1) = 0,058562$ $S_{b_0} = 0,5124$ $IC(\beta_0) = 0,92886204$ $CV_{x/y} = 2,8645072$
--	---

Gráficamente:



**Gráfica 8 Linealidad del método**

Los resultados muestran que el método es lineal en el intervalo de concentraciones empleado.

#### 5.7.1.6. Límite de detección.

Para la estimación del límite de detección con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos se calculó el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente, así como el límite de detección, obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 37. Límite de detección estimado**

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>
Blanco o Ruido	0.0024
3* Ruido	0.0072
0,5	0,0086
1,5	0,0256
2,5	0,044
3,5	0,063
4,5	0,083

El límite de detección se estima en 0.5 µg, que es la cantidad de analito inmediatamente posterior a tres veces el ruido.

El cálculo de la curva de calibración se realizó de la siguiente manera:

**Tabla 38. Curva de calibración**

Muestra	$\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
1	0,5	0,01
2	0,5	0,008
3	0,5	0,008
4	1,5	0,028
5	1,5	0,026
6	1,5	0,023
7	2,5	0,047
8	2,5	0,042
9	2,5	0,043
10	3,5	0,068
11	3,5	0,061
12	3,5	0,06
13	4,5	0,087
14	4,5	0,079
15	4,5	0,083
$\Sigma y = 0,7$ $\Sigma y^2 = 0,040683$ $\Sigma x = 37,5$ $\Sigma x^2 = 123,75$ $\Sigma xy = 2,2405$ $n = 15$		$b_0 = -0,001633$ $S_{x/y} = 0,0028947$ $S_{b1} = 0,000528$ $t_{0,975,13} = 2,16$ $IC(\beta_1) = 0,019741$
$b_1 = 0,0186$ $r^2 = 0,9896$ $S_b = 0,76654977$ $LD = 136,0007657$		

El cálculo de la desviación estándar de los blancos se presenta en la tabla 39.

**Tabla 39. Absorbancia de los blancos**

Blanco	Absorbancia (y)
1	0,002
2	0,001
3	0,003
4	0,002
5	0,004
$\Sigma y = 0,0120$ $\Sigma y^2 = 0,000034$ $n = 5$ $S_b = 0,011575837$ $\bar{X} = 0,0024$	

El límite de detección calculado es de 2.0537  $\mu\text{g}$ .

#### 5.7.1:7. Límite de cuantificación.

Para la estimación del límite de cuantificación se realizó con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos, obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 40. Límite de cuantificación estimado**

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>
Blanco o Ruido	0.0024
10* Ruido	0.024
0,5	0,0086
1,5	0,0256
2,5	0,044
3,5	0,063
4,5	0,083

El límite de detección se estima en 1.5 µg, que es la cantidad de analito inmediatamente posterior a diez veces el ruido.

El cálculo de la curva de calibración se realizó de la siguiente manera:

**Tabla 41. Curva de calibración**

Muestra	$\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
1	0,5	0,01
2	0,5	0,008
3	0,5	0,008
4	1,5	0,028
5	1,5	0,026
6	1,5	0,023
7	2,5	0,047
8	2,5	0,042
9	2,5	0,043
10	3,5	0,068
11	3,5	0,061
12	3,5	0,06
13	4,5	0,087
14	4,5	0,079
15	4,5	0,083

$\Sigma y =$ 0,7	$b_0 =$ -0,00163333
$\Sigma y^2 =$ 0,040683	$S_{x/y} =$ 0,00289473
$\Sigma x =$ 37,5	$S_{b1} =$ 0,0005285
$\Sigma x^2 =$ 123,75	$t_{0,975,13} =$ 2,16
$\Sigma xy =$ 2,2405	$IC(\beta_1) =$ 0,01974157
$n =$ 15	
$b_1 =$ 0,0186	
$r^2 =$ 0,9896	
$S_b =$ 0,76654977	
$LD =$ 136,0007657	

El cálculo de la desviación estándar de los blancos se presenta en la tabla 42.

**Tabla 42. Absorbancia de los blancos**

Blanco	Absorbancia (y)
1	0,002
2	0,001
3	0,003
4	0,002
5	0,004

$\Sigma y =$ 0,0120
$\Sigma y^2 =$ 0,000034
$n =$ 5
$S_b =$ 0,011575837
$x =$ 0,0024

El límite de cuantificación calculado es de 6.22  $\mu\text{g}$ .

### 5.7.2. Estabilidad fotoquímica de la indometacina.

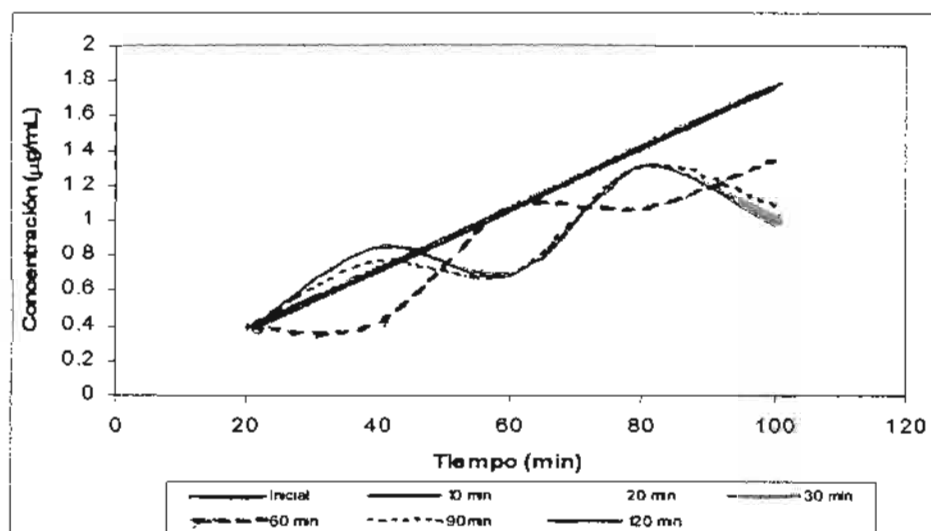
Se evaluaron los cambios en la concentración de indometacina respecto a su degradación por la luz en función del tiempo (Tabla 43).

**Tabla 43. Estabilidad fotoquímica de la IMC.**

[ IMC] μg/mL	Absorbancia							D.E.
	Inicial	10'	20'	30'	60'	90'	120'	
20	0.382	0.380	0.380	0.372	0.387	0.397	0.365	0.0102
40	0.710	0.710	0.694	0.696	0.701	0.758	0.848	0.137
60	1.052	1.053	1.056	1.057	1.057	0.680	0.685	0.182
80	1.425	1.434	1.435	1.443	1.058	1.311	1.305	0.139
100	1.768	1.755	1.738	1.768	1.339	1.086	0.970	0.351

D.E. = Desviación estándar.

El comportamiento gráfico se muestra en la siguiente gráfica:



**Gráfica 9 Comportamiento espectrofotométrico de IMC**

Por lo que respecta al comportamiento espectrofotométrico de la indometacina, en donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito, se observa estabilidad durante los primeros 30 minutos, después de éste tiempo la relación absorbancia-concentración sufre cambios, lo cual sugiere la indometacina se degrada a partir de este tiempo con las condiciones de trabajo empleadas, y los productos de degradación puedan

intervenir en la lectura a la longitud de onda de 318 nm, lo cual podría explicar el cambio en el comportamiento que presenta el fármaco.

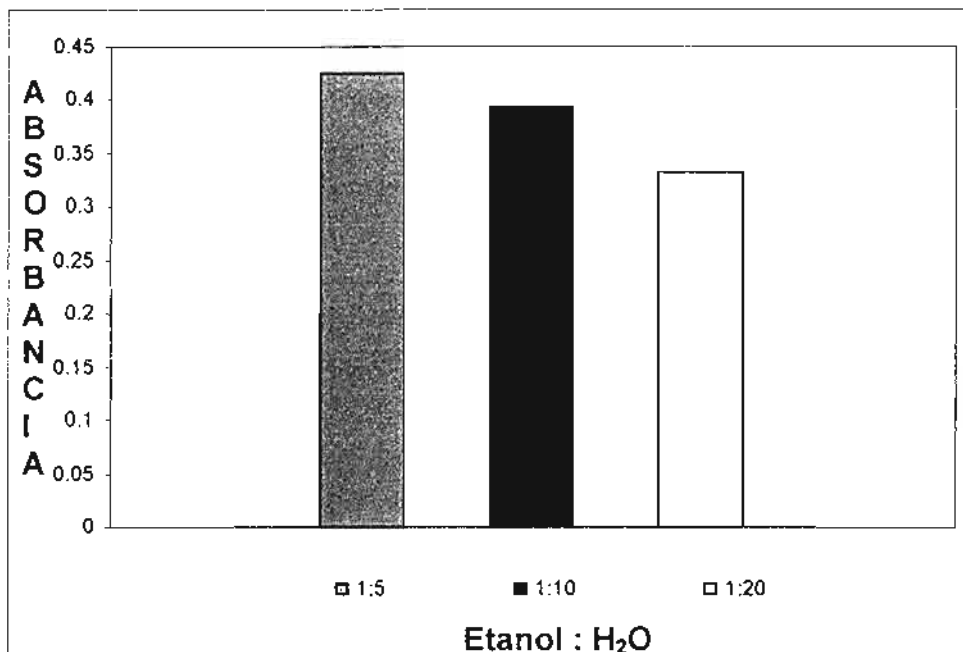
### 5.7.3. Solubilidad de indometacina en mezclas de etanol:agua v/v.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 44 y en la gráfica 10.

Tabla 44. Solubilidad de IMC en mezclas EtOH:H<sub>2</sub>O

EtOH:H <sub>2</sub> O	Absorbancia				
	M1	M2	M3	Promedio	DE
1:5	0,404	0,439	0,431	0,4247	0.018
1:10	0,395	0,394	0,391	0,3933	0.002
1:20	0,34	0,343	0,315	0,3327	0.015

Se entiende como M1 = Muestra 1, M2 = Muestra 2 y M3 = Muestra 3.  
DE = Desviación estándar.



Gráfica 10. Solubilidad de IMC en mezclas de EtOH:H<sub>2</sub>O.

En lo que respecta a la utilización de mezclas de etanol: agua en diferentes proporciones se observa que utilizando la concentración de 1:5, se obtiene una mayor absorbancia, lo cual permite que el fármaco se disuelva por la presencia de una mayor cantidad de etanol y a su vez pueda ser liofilizado, con la mezcla de etanol : agua (1:20) se obtiene menor absorbancia y se presenta la precipitación del fármaco. En la proporción 1:10 se obtiene una solubilidad media, pero se considera que podría presentarse precipitación después con el tiempo.



#### 5.7.4. Diálisis.

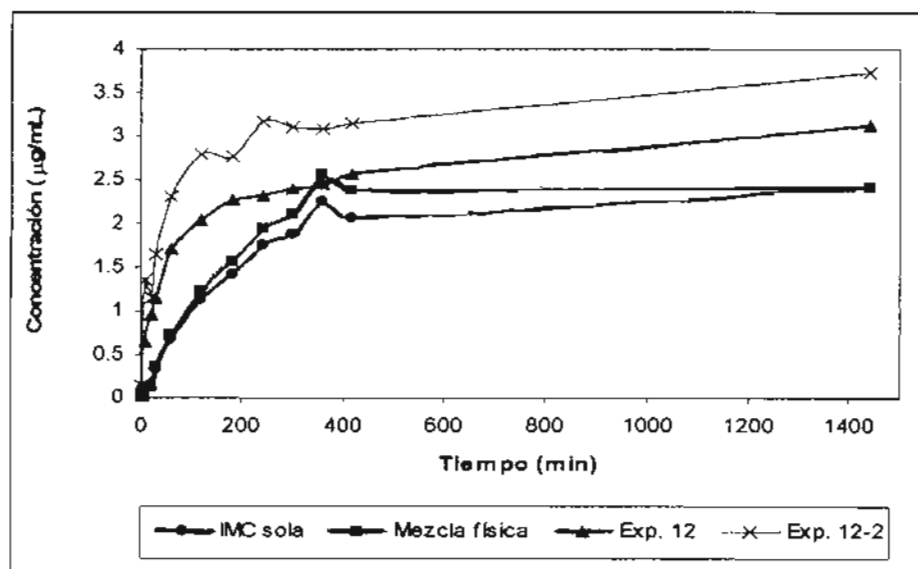
Los resultados obtenidos realizando el proceso de diálisis en membrana de 2000 Da se muestran en la tabla 45 y en la gráfica 11.

**Tabla 45. Cantidad de Indometacina en  $\mu\text{g/mL}$  obtenidos mediante diálisis por membrana**

Tiempo (min)	IMC 2000 Da	MF 2000 Da	Acuosomas Exp. 12 2000 Da	Acuosomas Exp. 12-2 2000 Da
0	-0,2828	-0,4991	0.1315	0.1676
10	-0,1729	-0,4810	0.3838	1.1405
20	0,1135	-0,4270	0.7982	1.3568
30	0,3117	-0,3729	1.1766	1.6991
60	0,6360	-0,0847	1.6810	2.2036
120	1,0504	0,3837	2.0234	2.4559
180	1,3027	0,9423	2.1495	2.4739
240	1,5909	1,2126	2.1676	2.8162
300	1,6811	1,4469	2.2036	2.8703
360	1,9873	2,4018	2.2216	2.8703
420	1,7891	2,6180	2.2937	2.8883
1440	2,0774	4,2577	2.6360	3.4288

M.F. = Mezcla física: 972.76 mg núcleos + 31.32 mg Lactosa USP + 10 mg Indometacina en 10 ml de agua: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (5:1).

Gráficamente:



**Gráfica 11. Porcentaje disuelto de IMC obtenido por diálisis.**

En la cuantificación de indometacina mediante diálisis<sup>56</sup>, se comparó la liberación de fármaco solo y en la mezcla física contra los acuosomas obtenidos en los experimentos 12-1 y 12-2. Se observó que en estos últimos la liberación fue mayor, esto podría considerarse que es debido a que efectivamente sí se mejora la solubilidad de la indometacina mediante la formación de acuosomas, tal como se ha reportado, teniendo un comportamiento siempre en ascendente, llegando a un tiempo en el cual existe un incremento gradual moderado, a partir de los 480 min y hasta el final del ensayo, 1440 min. También se considera que con base en los resultados de diálisis, los acuosomas obtenidos no son una mezcla física, sino que existe una interacción de tipo no covalente entre lactosa e indometacina que gradúa la liberación del fármaco, caracterizada principalmente por puentes de hidrógeno, que son fuerzas de baja energía<sup>57</sup> (~20kJ/mol) comparadas con las de los enlaces covalentes<sup>57</sup> (~460 kJ/mol) para el enlace O-H, son los suficientemente "fuertes" como para no permitir una salida súbita del fármaco durante el proceso de diálisis. Esto se considera una ventaja importante, ya que pudiera tener una aplicación práctica para los sistemas de liberación de fármacos modificada (retardada o controlada) en formas farmacéuticas tales como pomadas, geles, parches, entre otros, así como en patologías en donde la administración continua y a largo plazo es necesaria para el tratamiento farmacoterapéutico.

## 5.8. Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. Se confirma la hipótesis planteada en este trabajo: El control en las condiciones de agitación, concentración de lactosa e indometacina, en la obtención de acuosomas, determina la relación de la masa de indometacina en el acuosoma y el tamaño de partícula.
2. El empleo de diferentes velocidades de precipitación genera núcleos de tamaños variables, donde a mayor velocidad de precipitación menor tamaño de partícula. Para la velocidad 2 los acuosomas fueron de menor tamaño, aun cuando los núcleos procedentes de ésta velocidad tendieron a formar aglomerados de mayor tamaño que con los de la velocidad 1.
3. La eliminación del disolvente por conducción (calentamiento con parrilla) no fue adecuado para la obtención de las nanopartículas debido a que genera aglomeramiento. El método más recomendable para la obtención de éstas, es la liofilización, la cual es lo usual de acuerdo a la información publicada.
4. El tiempo de agitación para la carga del fármaco en el acuosoma mediante el proceso establecido en este trabajo no debe ser mayor a 30 minutos.
5. La mezcla etanol:agua (1:5) es el disolvente recomendado para la adsorción de la indometacina en el acuosoma, ya que facilita la eliminación del agua mediante la liofilización.
6. A través de la diálisis por membrana efectuada en este trabajo, se observó que los acuosomas liberan indometacina y fue posible la cuantificación de indometacina en los acuosomas.
7. El sistema propuesto para obtener los acuosomas de indometacina es reproducible y factible de escalamiento.
8. La microscopia electrónica de barrido es una herramienta fundamental que ayudó a observar la influencia de las variables del

proceso sobre el tamaño de partícula durante las diferentes etapas del proceso de formación de acuosomas.

9. Las técnicas de calorimetría diferencial de barrido, espectrofotometría infrarroja y resonancia magnética nuclear, son indispensables durante el proceso de obtención de los acuosomas, ya que permiten la observación de cambios ocurridos a las moléculas de lactosa e indometacina, así como para la determinación cualitativa de las mismas.

#### Perspectivas del trabajo.

- El sistema desarrollado podría ser aplicado a la obtención de acuosomas con distintas moléculas de interés farmacoterapéutico.
- Los acuosomas que pueden obtenerse mediante el proceso desarrollado, es factible que permitan la elaboración de sistemas con diferentes características de cinética de liberación del principio activo.

## 5.9. Bibliografía.

1. Shekunov, B. Chattopadhyay, P., Seitzinger, J., and Huff, R. Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions. (2006), *Pharmaceutical Research*, 23(1), 196-204.
2. Eerikäinen, H., Kauppienen, E., Kansikas, J., Polymeric drug nanoparticles prepared by an aerosol flow reactor method. (2004), *Pharmaceutical Research*, 21(1), 136-143.
3. Wang, N., Shen, X., and Li, J. A Heterogeneously structured composite based on Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres and Poly(vinyl alcohol) hydrogel nanoparticles for long-term protein drug delivery. (1999), *Pharmaceutical Research*, 16 (9), 1430-1435.
4. Calvo, P., Remuñan-López, C. Vila-Jato, J. Alonso, M. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. (1997), *Pharmaceutical Research*, 14(10), 1431-1436.
5. Jeong, Y., Jae-Woon, N., Han-Kwang, N., Kun, N., In-sook, K., Chong-Su, C., Sung-Ho, K. Self-assembling nanospheres of hydrophobized pullulans in water. (1999), *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(8), 917-927.
6. Alvarez-Román, R, Naik, K., and Guy, F. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. (2004), *Pharmaceutical Research*, 21(10), 1818-1824.
7. Illing, A. Unruh, T., and Kock, M., Investigation on particles self-assembly in solid lipid-based colloidal drug carrier system. (2004), *Pharmaceutical Research*, 21(4), 592-597.
8. Mainardes., R., Urban, M., Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. (2005), *Current Drug Targets*, 6(3), 363-371.
9. Alonso Ma., Las nanopartículas poliméricas: Nuevos sistemas para mejorar la biodisponibilidad ocular de fármacos. (2001) *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, Extraído de: <http://www.oftalmo.com/seo/archivos/maquetas/9/2A3E276F-2963-D3C8-73F8-00000307D229/articulo.html>. El día 29 de Mayo de 2006.

10. Gupta A.K., and Maitra A.N., Polymeric nanoparticles encapsulating NSAIDs for ocular delivery: corneal penetration and polymorphonuclear leukocyte migration studies. **(2003)**, *European Cells and Materials*, 6(Suppl 2), 40.
11. Lee V. Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. **(2004)**, *Advance Drug Delivery Reviews*, 56, 1527-1528.
12. Kossovsky N. Biomolecular delivering using nanocrystalline ceramics (aquasomes). **(1996)**, *Nanotechnology*, 622, 334-350.
13. Moein S., Christy A. and Clifford J. Nanomedicine: current status and future prospects, Review. **(2005)**, *The FASEB Journal*, 19, 311-328.
14. Kreuter, J. Nanoparticles – Preparation and applications, in *Microcapsules and nanoparticles for medicine and pharmacy*. **(2000)**, Donbrow M., Edit. PRC Press-Inc. USA, 125-148.
15. Charcosset C. and Fessi H., A new process for drug loaded nanocapsules preparation using a membrane contactor. **(2005)**, *Drug development and industry pharmacy*, 3, 987-992.
16. Salata O.V., Applications of nanoparticles in biology and medicine. **(2004)**, *Journal of Biotechnology*, 2, 1-6.
17. Hughes G. Nanostructure-mediated drug delivery. **(2005)**, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine*, 1, 22-30.
18. Raymond M.S., Islam A., Jun X., Qin W., Quinquan T., Pert S., Grietje M., Patrick Y.L. Puthupparrampil V.S. and Martin C.W., Cancer sRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-target sterically stabilized nanoparticle. **(2004)**, *Nucleic Acids Research*, 32(19), 149-154.
19. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., and Gianni L., Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic development in antitumor activity and cardiotoxicity. **(2004)**, *Pharmacolo. Rev.*, 5, 185-299.
20. Jingwei Xie and Chi-Hwa Wan. Self-Assembled Biodegradable Nanoparticles Developed by Direct Dialysis for the Delivery of Paclitaxel. **(2005)**, *Pharmaceutical Research*, 22(12),

21. Chen Q., Tong S., Dewhirst M. and Yuan F. Targeting tumor microvessels using doxorubicin encapsulated in a novel thermosensitive liposome. **(2004)**, *Mol Cancer Ther*, 3(10), 1311-1317.
22. Otsubo T., Mesaki W., Hossain M.A., Yamamoto K., Tashiro T., Seki J., Tom Y., Sonoke S., and Cono S., *In Vitro* and *in Vivo* activities of NS-718, a new lipid nanosphere incorporating Amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. **(1999)**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), 471-475.
23. Furneri P., Fresta M., Puglisi G., and Tempera G., Ofloxacin-loaded liposomes: *In vitro* activity and drug accumulation in bacteria. **(2000)**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(9), 2458-2464.
24. Pandey R., Sharma A., Zahoor A., Sharma S., Khuller G., and Prasad B. Poly-(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery for experimental tuberculosis. **(2003)**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 981-986.
25. Espuelas MS., Legrand P., Campanero M.A., Appel M., Gamazo C., Barratt G., and Irache J.M. Polymeric carriers for amphotericin B: *in Vitro* activity, toxicity, and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. **(2003)**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 419-427.
26. De Campos A., Diebold, Y., Carvalho E., Sánchez A., and Alonso M., Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery System: *in Vitro* stability, *in Vivo* fate and cellular toxicity. **(2004)**, *Pharmaceutical Research*, 21(5), 803-810
27. Lux, A.M Maier, S., Dinslage, S., Süverkrüp, R., and Diestelhorst, M., A comparative bioavailability study of three conventional eye drops versus a single lyophilisate. **(2003)**, *Br. J. Ophthalmol*, 87, 436-440.
28. Jagdish, B. Shri, K., Jayanta, K., *In vitro* and *in vivo* evaluation of the Gelrite® gellan gum-based ocular delivery system for indomethacin. **(2003)**, *Acta Pharm.*, 53, 251-261
29. Jun, T., Atsuo, T., Yasuhiro T., and Makoto, A. Time course of changes in optic nerve head circulation after acute reduction in intraocular pressure. **(2005)**, *IOVS*, 46(4), 1409-1419.

30. Okada, M. and Kohkichi, S. Effects of various pharmacologic agents on allergic inflammation of the eye. The roles of chemical mediators in ocular inflammation. (1980), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 176-181.
31. Bodmeier, R. and Chen, H., Indomethacin polymeric nanosuspension prepared by microfugidization. (1990), *Journal of Controlled Release*, 12(3), 223-233.
32. Ayuso, A., Esmalte dental en niño, adolescente y adulto: caracterización por técnicas de microscopia electrónica. (1999), Tesis para obtener el grado de maestría en odontología, *Universidad Nacional Autónoma de México*, 30, 44-46.
33. Rezende, S., Stanisçuaski, S., Caracterização e estabilidade de físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. (2003), *Quim Nova*, 26(5), 726-737.
34. Van Dyck, D., *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*. (2002), Edit. John Wiley & Sons, Inc. Consultado en: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/eist/articles/img111/abstract-fs.html> el día 05 de Julio de 2006.
35. [http://mx.search.yahoo.com/search/images/view?back=http%3A%2F%2Fmx.search.yahoo.com%2Fsearch%2Fimages%3Fp%3Delectrones%2Bauger%26sp%3D1%26fr2%3Dsp-topei%3DUTF-8%26fr%3DFP-tab-web-t340%26x%3Dwrt%26ei%3DUTF-8%26SpellState%3Dn-505427228\\_qNu5Zk8BtqLcDOIqH8Z.9XqABAA%40%40&w=513&h=331&imgurl=www.uned.es%2Fcrisamine%2Fmineral%2Fmetodos%2Fimagenes%2Ffig1.gif&rurl=http%3A%2F%2Fwww.uned.es%2Fcrisamine%2Fmineral%2Fmetodos%2Fmicr\\_electr.htm&size=15.8kB&name=fig1.gif&p=electrones+auger&type=qif&no=6&tt=9&oid=c220efad52befddc&ei=UTF-8](http://mx.search.yahoo.com/search/images/view?back=http%3A%2F%2Fmx.search.yahoo.com%2Fsearch%2Fimages%3Fp%3Delectrones%2Bauger%26sp%3D1%26fr2%3Dsp-topei%3DUTF-8%26fr%3DFP-tab-web-t340%26x%3Dwrt%26ei%3DUTF-8%26SpellState%3Dn-505427228_qNu5Zk8BtqLcDOIqH8Z.9XqABAA%40%40&w=513&h=331&imgurl=www.uned.es%2Fcrisamine%2Fmineral%2Fmetodos%2Fimagenes%2Ffig1.gif&rurl=http%3A%2F%2Fwww.uned.es%2Fcrisamine%2Fmineral%2Fmetodos%2Fmicr_electr.htm&size=15.8kB&name=fig1.gif&p=electrones+auger&type=qif&no=6&tt=9&oid=c220efad52befddc&ei=UTF-8). Consultado el día 06-May-2006.
36. Moore, J.H.; Spencer, N.D. (2001), *Encyclopedia of Chemical Physics and Physical Chemistry*, Volumes 1 – 3, (pp 1). Institute of Physics. Online version available at: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=474&VerticalID=0>. Consultado el día 16 de Junio de 2006.



37. Dean, J.A. (1999), Lange's Handbook of Chemistry (15th Edition). (Section 7). McGraw-Hill. Online version available at: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=47&VerticalID=0>  
Consultado el 16 de Junio 2006,
38. Hore, P.J., Nuclear Magnetic Resonances Principles. (1999), Oxford University Press, pág. 1545 – 1553.
39. Mathiowitz, E. Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Volumes 1-2. (pp. 256-259). John Wiley & Sons. Online version available at: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=1054&VerticalID=0>  
Consultado el 15 de Junio de 2006.
40. Speyer, R. Thermal Analysis of Materials. (1993), CRC Press. Pág. 35-63.
41. Day, R. and Underwood. Química Analítica Cuantitativa. 5a edición. Prentice-Hall Hispanoamericana. Pág. 459-501.
42. D'Souza, S., DeLuca P. Methods to assess *in Vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. (2006), *Pharmaceutical Research*, 23(3), 460-474.
43. Gangolli, S. (2005), Dictionary of Substances and Their Effects (DOSE, 3rd Electronic Edition). (pp. 135). Royal Society of Chemistry. Online version available at: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=527&VerticalID=0>  
Consultado 17 de Junio de 2006.
44. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens (4th Edition) (2002), Edit. Noyes Publications & William Andrew Publishing.
45. García, M., Soberon, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A. Guía de validación de métodos analíticos. (2002), Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
46. Cherian, K.A., Rana, A. and Jain, S. Self-assembled carbohydrate-stabilized ceramic nanoparticles for the parenteral delivery of insulin. (2000), *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(4), 459–463.
47. Nokhodchi, A., The effect of type and concentration of vehicles on dissolution rate of de poorly soluble drugs (indomethacin) from liquid solid compacts. (2005), *J. Pharmaceut Sci (www.cspscanada.org)*, 8(1), 18-25.

48. Calvo P., Vila-Jato J., and Alonso M. Comparative *in Vitro* evaluation of several colloidal system, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsion, as ocular drug carriers. (1996), *Journal of Pharmaceuticals Sciences*, 85(5), 530-536.
49. Lai C., Tang S., Wang Y., Wei, K. Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsions. (2005), *Materials Letters* 59, 210-214.
50. Determinación de estructuras mediante métodos físicos. [www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA9FQO.pdf](http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA9FQO.pdf). Consultado el día 27 de diciembre de 2006.
51. Drapier-Beche, N., Fanni, J. and Parmentier, M. Physical and chemical properties of molecular compounds of lactose. (1999) *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2558-2563.
52. Otsuka, M., Kato, F. and Matsuda, Y., Comparative evaluation of the degree of indomethacin crystallinity by chemoinformetrical Fourie-transformed near-infrared spectroscopy and conventional powder X-Ray diffractometry. (2000), *AAPS Pharmsci*, 2(1) ,1-8, article 9, *Extraído de <http://www.pharmsci.org/>* Consultado 05 de Mayo de 2006.
53. Androniss, V. and Zografí, G. Crystal nucleation and growth of indomethacin polymorphs from the amorphous state. (200), *Journal of Non-Crystalline Solids* 271, 236 – 248.
54. Sungthonjenn, S., Sriamornsak, P. and Somsiri, A. Effect of degree of esterification and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. (2004), *AAPS PharmSciTech* 5(1), 1-8. *Extraído de <http://www.aapspharmascitech.org>*. Consultado el 05 de Mayo de 2006.
55. <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/11044.htm> Consultado 17 de Junio de 2006
56. Levy M., and Benita S., Drug release form submicronized o/w emulsion: a new *in Vitro* kinetic evaluation model. (1990), *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 66, 29- 37.
57. Voet, D., Voet, J. Bioquímica. (1990), *Ediciones Omega S.A., Barcelona, España, Págs 31-32.*