

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

**“EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL COPOLÍMERO DE POLIÁCIDO
ACRÍLICO Y POLIACRILATO DE BUTILO EN LA ELABORACIÓN DE
POLIMEROSOMAS CARGADOS CON AGENTES ANTINEOPLÁSICOS”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

L.F. Xochitl Citlali Palomec Reyes
2143808371

COMITÉ TUTORAL:

Tutora: Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

Asesor: Dr. Abraham Faustino Vega

Asesor: M en I Alejandro Rubio Martínez

Mayo, 2017

**“EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL COPOLÍMERO DE POLIÁCIDO
ACRÍLICO Y POLIACRILATO DE BUTILO EN LA ELABORACIÓN DE
POLIMEROSOMAS CARGADOS CON AGENTES ANTINEOPLÁSICOS”**

COMITÉ TUTORAL

TUTORA: Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

Vo.Bo. _____

ASESOR: Dr. Abraham Faustino Vega

Vo.Bo. _____

ASESOR: M en I Alejandro Rubio Martínez

Vo.Bo. _____

ALUMNA: L.F. Xochitl Citlali Palomec Reyes

MATRÍCULA: 2143808371

FIRMA: _____

**“EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL COPOLÍMERO DE POLIÁCIDO
ACRÍLICO Y POLIACRILATO DE BUTILO EN LA ELABORACIÓN DE
POLIMEROSOMAS CARGADOS CON AGENTES ANTINEOPLÁSICOS”**

JURADO

PRESIDENTE: Dr. Máximo Pliego Díaz

VOCAL: Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos

SECRETARIA: Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

RESUMEN

En décadas recientes se han hecho grandes avances haciendo uso de los sistemas de liberación modificada para el transporte de fármacos dentro del organismo con el fin de mejorar las terapias para diversas enfermedades como el cáncer.

Los fármacos antineoplásicos empleados para el tratamiento de esta enfermedad presentan una gran variedad de efectos tóxicos y en algunos casos, estos efectos se ven aumentados por las dosis elevadas a las que son administrados para producir el efecto terapéutico.

Los polimerosomas han sido recientemente estudiados como acarreadores de fármacos para disminuir la toxicidad y favorecer el transporte de estos al sitio de acción. El tipo de bloque de copolímero (polímeros, proporción) empleado para la síntesis de la membrana polimérica y la naturaleza del fármaco utilizado, determinará la capacidad de encapsulación del activo y la forma de liberación del mismo a partir del sistema, lo que permite hacer una modificación al régimen de dosificación.

Con base en lo anterior, el propósito de esta investigación fue evaluar la capacidad de encapsulación de la familia del copolímero de poliácido acrílico (PAA) - poliacrilato de butilo (PBA) para formar polimerosomas; determinando: carga del activo, forma y tamaño de la vesícula, estabilidad de la misma y el perfil de liberación del fármaco a partir de éstas.

Los resultados obtenidos muestran que con el uso de la técnica de microfluidos con un dispositivo en “T” de vidrio y disoluciones con concentraciones por encima de la concentración micelar crítica (CMC) de los copolímeros se obtienen polimerosomas de tamaño micrométrico.

El polimerosoma fue capaz de encapsular a la ciclofosfamida y al fluorouracilo con rendimientos de carga del 59% para ciclofosfamida y de 71 a 79% para fluorouracilo.

Los ensayos de liberación *in vitro* mostraron que los polimerosomas liberan el fármaco por mecanismo de difusión fickiano siguiendo el modelo de Higuchi para ciclofosfamida y Korsmeyer – Peppas para fluorouracilo

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

La alumna agradece al CONACyT por la beca otorgada (CVU becario: 509611), que permitió la realización de este proyecto.

Se agradece al Departamento de Sistemas Biológicos (DSB) de la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-X), porque a través del Área de Tecnología Farmacéutica, facilitó el uso de los instrumentos analíticos del Área de Equipamiento Común de la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS). Así mismo y de manera particular, al equipo de investigadores del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada, por las facilidades y apoyo otorgados para el uso de instalaciones, equipamiento y recursos materiales que permitieron la realización de este proyecto.

Se agradece a la M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña, investigadora del Laboratorio de Farmacocinética y Farmacodinamia de la UAM-X, y responsable del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) del Área de Equipamiento Común de la UIDIS, por su orientación, apoyo y las facilidades otorgadas para el uso de este instrumento.

Se agradece al programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas (UAM – Xochimilco), por su apoyo económico para la difusión de los avances de este trabajo en el VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental.

Se agradece a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por el préstamo de material de vidrio para la realización de los estudios de liberación *in vitro* de los activos durante los 6 meses que dicho material fue requerido.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Norma Angélica Noguez Méndez: Por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, así como la libertad de proponer el contenido del mismo, por el apoyo, la paciencia y asesoría brindados y profundamente por ayudarme a crecer a nivel profesional y personal.

Al M en I Alejandro Rubio Martínez: Por la asesoría, gentileza, sabio consejo y recomendaciones durante esta etapa permitiéndome así obtener una formación más completa.

Al Dr. Abraham Faustino Vega: Por su apoyo, asesoría y acertadas observaciones que me permitieron profundizar y mejorar en mi desarrollo académico y profesional y que el trabajo realizado cubriera los objetivos planteados.

A la M. en C. Alma Elena Ibarra Cazares: Por su constante apoyo, gentileza, buen humor, consejos y comentarios que me acompañaron durante esta etapa.

A mis padres Jorge y María del Carmen por impulsarme siempre a llegar más lejos, por el apoyo incondicional y soportar que estuviera metida en el laboratorio todo el día, por el amor y paciencia brindados, por mostrarse siempre orgullosos de mis esfuerzos, y por ser un gran ejemplo a seguir.

A mis amigos de toda la vida Héctor y Miguel Hernández Almaraz que más que mis amigos son mis hermanos, por acompañarme en los buenos y malos momentos y brindarme su apoyo, consejos, tiempo y cariño.

A mi persona Omar Zamorano Meza por cuidarme, escucharme, apoyarme, distraerme y acompañarme siempre que puede y entenderme cuando estaba demasiado ocupada para verlo.

A todos los amigos que he hecho con el paso de los años que ahora son parte de mi vida y que en algún momento me brindaron un abrazo, un hombro en que llorar, un paseo, una palabra de aliento o una sonrisa para seguir adelante.

A mi enorme familia por apoyarme y tenerme paciencia por siempre estar siempre ocupada y ausentarme de algunas reuniones familiares y comprender que lo que hago tiene una utilidad y es importante.

A César Gazga Urioste, Julia Jimena Falcón Gerónimo, José de Jesús Juárez: por su inmensurable guía y apoyo que me permitió dar lo mejor de mí en esta etapa, compartirme sus experiencias y conocimientos, por hacerme un lugar en su vida y formar parte de la mía, son personas increíbles y los aprecio mucho.

A mis compañeros del primer trimestre de maestría por mostrarme que a pesar de lo difícil que puede ser una maestría el compañerismo es esencial y nos acerca a la meta.

A mis compañeros del laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada por su apoyo en la realización de este trabajo, compañía y amistad, en especial a José Luis Martínez ex ayudante de laboratorio y a Miguel Lucio Cruz ayudante de laboratorio.

Y en especial con mucho cariño, respeto y admiración a Juan José Sánchez Romero, por motivarme a iniciar esta travesía, demostrarme que es posible, por su paciencia, apoyo en todo lo que necesite, por su compañía y comprensión, por impulsarme hacia adelante cuando quise detenerme, por su cariño y por todas las experiencias buenas y no tan buenas que compartimos desde que entro en mi vida, pase lo que pase te estaré eternamente agradecida.

Índice general

1. Introducción	6
2. Antecedentes y planteamiento del problema	8
3. Marco teórico	9
3.1 Cáncer	9
3.1.1 Definición y estadísticas	9
3.1.2 Tratamiento del cáncer y efectos de los agentes antineoplásicos	10
3.2 Ciclofosfamida	11
3.2.1 Ciclofosfamida como agente terapéutico	11
3.2.2 Características fisicoquímicas de la ciclofosfamida	13
3.3 Fluorouracilo	14
3.3.1 Fluorouracilo como agente terapéutico	14
3.3.2 Características fisicoquímicas del fluorouracilo	15
3.4 Sistemas acarreadores de fármacos	15
3.5 Polimerosomas	16
3.5.1 Copolímeros	17
3.5.2 Elaboración de polimerosomas	19
3.5.3 Métodos de síntesis	20
a) Hidratación directa	20
b) Electroformación	21
c) Co-disolventes orgánicos	21
d) Microfluidos	21
3.5.4 Métodos de caracterización de polimerosomas	22
3.5.5 Polimerosomas como acarreadores de fármacos	23
4. Hipótesis	29
5. Objetivos	29
5.1 General	29
5.2 Particulares	29
6. Materiales y métodos	30
6.1 Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica de los copolímeros de PAA- PBA	30

6.2 Síntesis del polimerosoma mediante un dispositivo en “T” de vidrio.....	30
6.3 Morfología del polimerosoma	32
6.4 Distribución de tamaño de partícula	32
6.5 Evaluación de la capacidad de carga del polimerosoma	32
6.5.1 Evaluación previa	32
6.5.2 Carga con fármacos modelo	32
6.6 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de los activos ..	33
6.6.1 Ciclofosfamida	33
6.6.2 Fluorouracilo	34
6.7 Ensayo de liberación mediante la técnica de diálisis	34
6.7.1 Ciclofosfamida	34
6.7.2 Fluorouracilo	35
7. Resultados y discusión.....	36
7.1 Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica de los copolímeros de PAA- PBA	36
7.2 Síntesis del polimerosoma mediante un dispositivo en “T” de vidrio.....	37
7.3 Morfología del polimerosoma	39
7.4 Distribución de tamaño de partícula	39
7.5 Evaluación de la capacidad de carga del polimerosoma	41
7.5.1 Evaluación previa	41
7.5.2 Carga con fármacos modelo	42
7.6 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de los activos ..	44
7.6.1 Ciclofosfamida	44
7.6.2 Fluorouracilo	50
7.7 Ensayo de liberación mediante la técnica de diálisis	54
7.7.1 Ciclofosfamida	54
7.7.2 Fluorouracilo	58
8. Conclusiones	64
9. Perspectivas.	64
10. Referencias bibliográficas	65
11. Anexos	73

Índice de figuras

Figura 3.1 Mecanismo de biotransformación de la ciclofosfamida	12
Figura 3.2 Estructura química de la ciclofosfamida	13
Figura 3.3 Biotransformación y mecanismo de acción del 5-fluorouracilo	14
Figura 3.4 Estructura química del fluorouracilo	15
Figura 3.5 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración del tensoactivo	19
Figura 3.6 Etapas en la determinación de la tensión superficial	19
Figura 3.7 Esquema de formación de la vesícula	20
Figura 3.8 Diferencias de tamaño	23
Figura 6.1 Dispositivo para la formación del polimerosoma	31
Figura 6.2 Polimerosomas cargados con ciclofosfamida	31
Figura 6.3. Adaptación del disolutor para la cinética de liberación	35
Figura 7.1 Imágenes observadas en el microscopio con el objetivo de 100x con filtro verde	38
Figura 7.2. Morfología de las vesículas formadas	39
Figura 7.3 Comparación de polimerosoma vacío y cargados con colorantes	42
Figura 7.4 Comparación de polimerosomas cargados con fármacos modelo	43
Figura 7.5 Cromatograma muestra de ciclofosfamida	45

Índice de gráficas

Gráfico 7.1 Comparación de las mediciones de la tensión superficial de los diferentes copolímeros de PAA-PBA	36
Gráfica 7.2 Determinación de longitud de absorción máxima para ciclofosfamida	44
Gráfica 7.3 Triplicado de curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR (195 nm)	46
Gráfica 7.4 Curva de Calibración para ciclofosfamida por CLAR en disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.5	47
Gráfica 7.5 Curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR en placebo cargado	47

Gráfica 7.6 Cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.5	49
Gráfica 7.7 Cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para placebo	49
Gráfica 7.8 Determinación de la longitud de absorción máxima para fluorouracilo	50
Gráfica 7.9 Curva de calibración en amortiguador pH 5 para fluorouracilo (266 nm)	51
Gráfica 7.10 Triplicado de curva de calibración en placebo para fluorouracilo	52
Gráfica 7.11 Cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para placebo	53
Gráfica 7.12 Perfil de liberación de ciclofosfamida a los diferentes pH para el Cp 41	55
Gráfica 7.13 Perfil de liberación de ciclofosfamida a los diferentes pH para el Cp 42	57
Gráfica 7.14 Perfil de liberación de fluorouracilo a los diferentes pH para el Cp 41	59
Gráfica 7.15 Perfil de liberación de fluorouracilo a los diferentes pH para el Cp 42	60

Índice de tablas

Tabla 3.1 Fármacos encapsulados en polimerosomas y sus características	25
Tabla 3.1 Fármacos encapsulados en polimerosomas y sus características (continuación)	26 - 27
Tabla 3.2. Características físicas de los copolímeros de PAA-PBA seleccionados para la formación de los polimerosomas	28
Tabla 7.1 Concentración micelar crítica determinada para cada copolímero	37
Tabla 7.2 Mediciones de tamaño de partícula para Cp 41 cargado con ciclofosfamida	40
Tabla 7.3 Tamaño de partícula de los polimerosomas	40
Tabla 7.4 Capacidad de carga de los polimerosomas	44
Tabla 7.5 Comparación de las curvas de calibración ciclofosfamida	46
Tabla 7.6 Adecuabilidad del sistema de ciclofosfamida	48

Tabla 7.7 Correlación de fármaco recuperado ciclofosfamida	48
Tabla 7.8 Comparación de las curvas de calibración	51
Tabla 7.9 Resultados de exactitud y repetibilidad fluorouracilo	52
Tabla 7.10 Correlación de fármaco recuperado para fluorouracilo	53
Tabla 7.11 Resultados de precisión del método fluorouracilo	54
Tabla 7.12 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de ciclofosfamida Cp 41	56
Tabla 7.13 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de ciclofosfamida Cp 42	58
Tabla 7.14 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de fluorouracilo Cp 41	59
Tabla 7.15 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de fluorouracilo Cp 42	60
Tabla 7.16 Interpretación de mecanismos de liberación a partir de películas poliméricas	61

1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con esta afección (Stewart and Wild, 2014). En México el cáncer causa 48,255 muertes al año y ocupa el tercer lugar de mortalidad (Geografía, 2013), 5.3 % del total de la población menor de 20 años falleció de algún tipo de cáncer (57.4 % varones y 42.6 % mujeres); mientras que, en la población mayor de 20 años, 13.5 % de las defunciones se debieron a algún tumor (48.9 % varones y 51.1 % mujeres).

Los fármacos antineoplásicos presentan efectos tóxicos como: teratogenicidad, producen lesiones del tejido normal, depresión de la médula ósea, náusea, vómito, hiperuricemia y alopecia, algunos otros son específicos del fármaco, cistitis en el caso de la ciclofosfamida o mucositis y diarrea en el caso del fluorouracilo (Salud, 2015c); éstos se deben a la dosis elevada en las que se administran para producir el efecto terapéutico: ciclofosfamida 500 a 3500 mg/m² y fluorouracilo 350 a 600 mg/m² (Kalant, 2012).

Para que un fármaco pueda ejercer su función debe estar presente en el sitio de acción a la concentración suficiente y durante un periodo adecuado. Desde el sitio en el que es introducido, el fármaco encuentra múltiples barreras fisiológicas en su ruta hacia sus objetivos; sin embargo, la mayor parte de los fármacos antineoplásicos no poseen la capacidad de alcanzar los niveles terapéuticos en sus sitios de acción sin producir efectos adversos. Los acarreadores de fármacos mejoran la capacidad de los mismos para alcanzar el sitio de acción, disminuir la toxicidad y en algunos casos ayudan a combatir los mecanismos de resistencia que las células cancerígenas puedan llegar a desarrollar (Lin and Cui, 2015).

Los polimerosomas han sido recientemente estudiados como acarreadores de fármacos, son vesículas poliméricas formadas por copolímeros formados por bloques anfifílicos, son esferas huecas que contienen una disolución acuosa en el interior rodeada por una membrana sintética (Lee and Feijen, 2012).

Han demostrado poseer propiedades superiores a otros biomateriales tales como: mejor estabilidad, mayor capacidad de carga y un tiempo prolongado en la circulación en comparación con los liposomas (Levine et al., 2008).

La selección de los polímeros sintéticos y especialmente la selección de la masa molecular de los polímeros usados para la elaboración de los polimerosomas es importante ya que estas características influyen en las propiedades que poseerán las vesículas como sistemas de transporte y liberación de moléculas activas (carga superficial, tamaño, capacidad de carga) (Discher et al., 2007).

Con base en lo anterior, se han investigado y evaluado la capacidad de diversos polímeros como los copolímeros de poliácido acrílico (PAA) - poliacrilato de butilo (PBA) para el desarrollo de polimerosomas y la encapsulación de ciclofosfamida; que han mostrado resultados positivos, sin embargo, no ha sido posible evaluar la capacidad de carga y liberación del activo (Lorenceanu et al., 2005, Cruz Ruiz, 2009).

El propósito de este trabajo, es contribuir al conocimiento de las capacidades del copolímero antes mencionado para emplearlo como acarreador de fármacos, utilizando los antineoplásicos ciclofosfamida y fluorouracilo como modelo, con el fin de conocer su comportamiento de carga y liberación.

2. Antecedentes y planteamiento del problema

La toxicidad de los principales agentes antineoplásicos son el principal problema de la terapia contra el cáncer, la mayoría está relacionada no sólo con los mecanismos de acción, sino también con las dosis y los esquemas de administración de los mismos (Salud, 2015b).

Los polimerosomas han sido recientemente estudiados como acarreadores de fármacos para disminuir la toxicidad y favorecer el transporte del fármaco al sitio de acción (Lee and Feijen, 2012). Han demostrado poseer propiedades superiores a otros biomateriales como mejor estabilidad, mayor capacidad de carga y un tiempo prolongado en la circulación comparado con los liposomas (Levine et al., 2008).

El arreglo de los polimerosomas permite la encapsulación no sólo de moléculas terapéuticas como fármacos sino de enzimas, péptidos, proteínas y fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) en el interior acuoso, además de incorporar fármacos hidrofóbicos en el interior de la membrana sintética polimérica (Lee and Feijen, 2012).

La selección de los polímeros sintéticos y especialmente la selección de la masa molecular de los polímeros empleados para la síntesis de los polimerosomas es importante, ya que estas características impactan en las propiedades que poseerán las vesículas como sistemas de transporte y liberación de moléculas activas (Discher et al., 2007).

Al estudiar a la familia del copolímero de poliácido-acrílico (PAA) y poliacrilato de butilo (PBA) para conocer su capacidad de formación de polimerosomas con el fin de encapsular en ellos a fármacos como la ciclofosfamida y fluorouracilo, los cuales son antineoplásicos cuya toxicidad está relacionada con la dosis; al integrarlos en el polimerosoma será posible disminuir la carga de fármaco y lograr una vectorización del mismo para llegar a la célula blanco, por lo que se esperaría que su toxicidad disminuyera.

Ampliar los conocimientos acerca del comportamiento de la familia de copolímeros de PAA-PBA permitirá conocer si es el candidato adecuado para usarlo con el propósito antes mencionado.

3. Marco teórico

3.1 Cáncer

3.1.1 Definición y estadísticas

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un término genérico usado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. La característica principal de esta afección es la multiplicación rápida de células anormales y su extensión más allá de sus límites habituales, las cuales pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, el proceso de invasión es conocido como metástasis, el cual es la principal causa de muerte por cáncer (Salud, 2015b).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con esta afección (Stewart and Wild, 2014). La OMS prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% (22 millones, en los próximos 20 años) más del 60% de los casos nuevos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica; lo que representa el 70% de las muertes por cáncer en el mundo (Salud, 2015a).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el 2008, el cáncer causó 1.2 millones de muertes un 45% de las cuales ocurrieron en América Latina y el Caribe y prevé que aumente hasta 2.1 millones en el 2030 (Salud., 2014).

En México el cáncer causa 48,255 muertes al año y ocupa el tercer lugar de mortalidad (Geografía, 2013), 5.3 % del total de la población menor de 20 años fallecieron de algún tipo de cáncer (57.4% varones y 42.6% mujeres) ocupando el primer lugar los de origen hematológico; mientras que en la población mayor de 20 años, 13.5% de las defunciones se debieron a algún tumor principalmente de órganos digestivos (48.9% varones y 51.1% mujeres); detectándose al año 128 mil casos nuevos de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (INEGI, 2016).

La incidencia de cada tipo de cáncer difiere en función del género, en 2012 los diagnosticados con mayor frecuencia en hombres fueron: pulmón, próstata, colon y recto e hígado; mientras que en las mujeres fueron: mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (INEGI, 2016).

3.1.2 Tratamiento del cáncer y efectos de los agentes antineoplásicos

El diagnóstico correcto es esencial para un tratamiento adecuado y eficaz, debido a que cada tipo de cáncer requiere un tratamiento específico (Salud, 2015a). Los tipos más comunes son cirugía, quimioterapia y radioterapia, sin embargo, recientemente se ha utilizado la terapia hormonal, el trasplante de médula ósea o de células madre, la inmunoterapia y las terapias dirigidas. La cirugía es a menudo la primera opción de tratamiento si se puede extirpar el tumor del cuerpo. En ocasiones sólo es posible extirpar una parte del tumor, por lo que antes o después de la cirugía, se utiliza radiación, quimioterapia o ambas para reducir el tumor (Society, 2014).

3.1.2.1 Quimioterapia

El término quimioterapia se refiere al uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. La elección del fármaco dependerá del avance del cáncer, la edad del paciente y las comorbilidades (Society, 2014). Algunos de los fármacos antineoplásicos incluidos en la lista de los medicamentos esenciales se pueden clasificar de la siguiente forma:

Alquilantes. Son los fármacos más utilizados en quimioterapia antineoplásica, lesionan el ADN e interfieren con la replicación celular. Se usan en el tratamiento de enfermedad de Hodgkin, linfomas no hodgkinianos, cáncer de mama, leucemia y cáncer de ovario.

En esta clasificación se incluye la *ciclofosfamida*, *clorambucilo*, *clormetina*, *dacarbacina*, *procarbacina* y *cisplatino*. Sus efectos tóxicos son esterilidad, leucemia aguda no linfocítica, mielosupresión, alopecia, náusea y vómitos.

Antibióticos citotóxicos. Cada uno de ellos se utiliza para diferentes enfermedades. *Bleomicina* para enfermedad de Hodgkin y cáncer de testículo, *doxorubicina* y *daunorubicina* para leucemias agudas y finalmente *dactinomicina* para neoplasias en pediatría. Sus efectos tóxicos incluyen fibrosis, neumonitis, mielosupresión, alopecia, náusea, vómitos y miocardiopatía.

Antimetabolitos y terapia relacionada. Se utilizan para diferentes enfermedades, como para la leucemia aguda *la citarabina* y *mercaptopurina*, para cáncer colorrectal y de mama se utiliza el *fluorouracilo*, el *metotrexato* y el *folinato de calcio*.

Los efectos adversos son amplios, entre estos tenemos: mielosupresión, mucositis, náusea, diarrea y, a dosis altas, neurotoxicidad central.

Alcaloides de la vinca y etopósido. Se utilizan principalmente para tratar leucemias agudas, la *vinblastina* se utiliza para la enfermedad de Hodking, la *vincristina* para linfomas no hodgkinianos y *etopósido* para carcinoma testicular, cáncer de pulmón y linfomas, dentro de los efectos tóxicos está la mielosupresión, neurotoxicidad y alopecia (Salud, 2015c, Brunton, 2012).

3.2 Ciclofosfamida

3.2.1 Ciclofosfamida como agente terapéutico

La ciclofosfamida es un compuesto alquilante que posee en su estructura una fracción bis(cloroetil)amina, en su forma original es inactiva, por lo que debe activarse metabólicamente (hidroxilación) por la isoenzima 2B del citocromo P450, con el transporte subsecuente del intermedio activado (4 – hidroxiciclofosfamida en equilibrio con la aldofosfamida) a los sitios de acción, estos intermedios reactivos forman enlaces covalentes por alquilación del ADN cuya alteración causa una desorganización en la función del ácido nucleico conllevando a la muerte celular (Morón Rodríguez et al., 2009, Brunton, 2012) (figura 3.1).

Posteriormente la aldofosfamida puede ser metabolizada de dos maneras por vía no enzimática en el tumor y los tejidos normales, produciendo las formas citotóxicas: la mostaza fosforamida y la acroleína responsables también de los efectos adversos del fármaco y enzimática en el hígado, en éste se producen los metabolitos inactivos la 4-cetociclofosfamida y la carboxifosfamida (Bertram, 2005, Brunton, 2012).

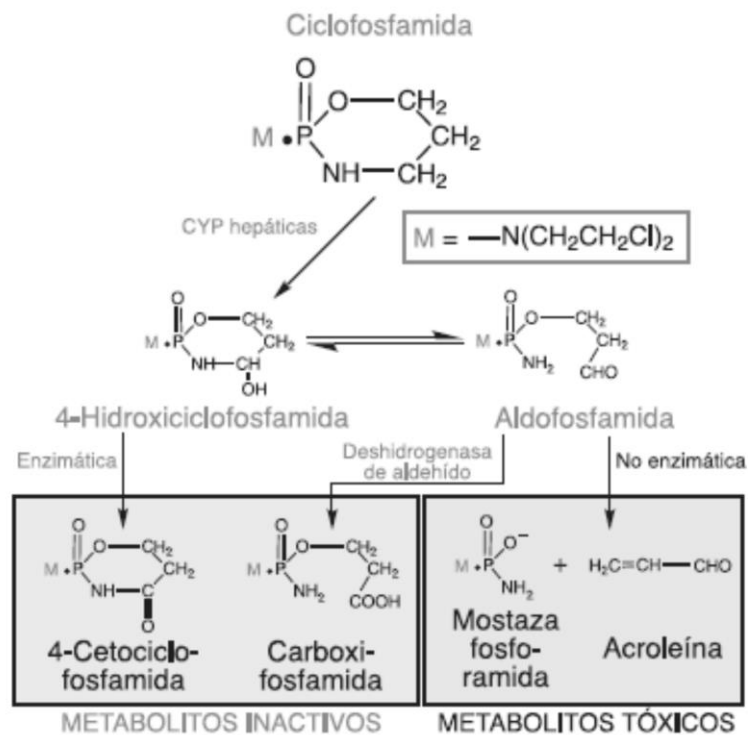


Figura 3.1 Mecanismo de biotransformación de la ciclofosfamida.

Imagen tomada de Bruton, 2012

La ciclofosfamida se absorbe bien por vía oral y posee una gran biodisponibilidad, las concentraciones máximas en plasma se obtienen 1 hora después de su administración, su semivida plasmática es de alrededor de 7 horas, por lo que puede administrarse por vía oral o intravenosa con la misma eficacia clínica (Morón Rodríguez et al., 2009).

Su unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 50 %, posee una amplia distribución en el organismo y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, sufre metabolismo por vía hepática y posteriormente es eliminada por vía renal (Bertram, 2005).

Se emplea en el tratamiento del linfoma Hodgkin y no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemias agudas y crónicas, micosis fungoide, neuroblastoma, adenocarcinoma de ovario, retinoblastoma, cáncer de mama, pulmón, endometrio, vejiga, próstata, testículo, artritis reumatoide, lupus eritematoso y recientemente en linfoma de Burkitt. Se administra en combinación con otros fármacos para tratar linfomas no Hodgkin, cánceres de ovario y tumores sólidos en niños (Brunton, 2012).

Efectos adversos: Depresión de la médula ósea, anemia, leucopenia, náusea, vómito, ictericia, amenorrea, alopecia, trombocitopenia y cistitis hemorrágica (Salud, 2015c, Morón Rodríguez et al., 2009).

Las dosis varían de acuerdo con el fármaco de elección y de su combinación con otros fármacos; la ciclofosfamida se administra en una dosis alta que va de los 500 a 3500 mg/m² vía intravenosa u oral (Grupo I CBF), (Kalant, 2012, OMS, 2005).

3.2.2 Características fisicoquímicas de la ciclofosfamida (monohidrato)

De acuerdo con Moffat et al. (2011), la ciclofosfamida (monohidrato) posee las siguientes características, ver fig. 3.2.

- **Descripción:** polvo blanco fino cristalino, sufre decoloración por exposición a la luz. En disolución acuosa a temperaturas por arriba de los 30 °C sufre hidrólisis con pérdida de cloro.

- **Solubilidad:** En agua 1 en 25, en etanol 1 en 1; ligeramente soluble en benceno, etilenglicol, dioxano y tetracloruro de carbono; prácticamente insoluble en éter y acetona.

- **Punto de fusión:** 41 – 45 °C

- **Masa molecular:** 279.1 g/mol

- **Coefficiente de reparto (n-octanol/agua):** 0.6

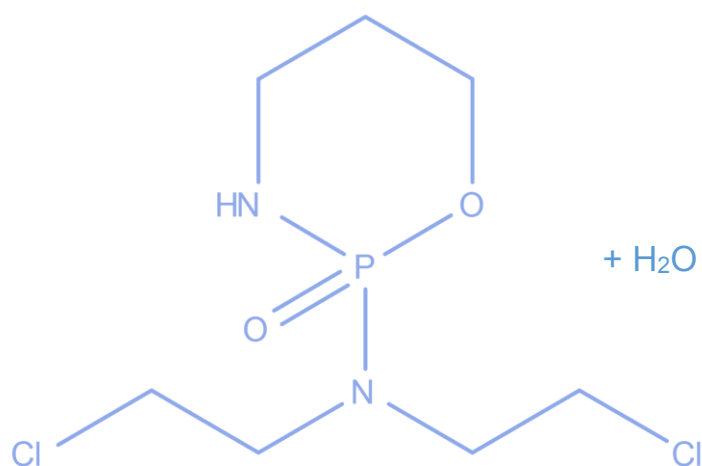


Figura 3.2 Estructura química de la ciclofosfamida

3.3 Fluorouracilo

3.3.1 Fluorouracilo como agente terapéutico

El fluorouracilo es una fluoropirimidina análogo del uracilo que requiere conversión en nucleótido (ribosilación y fosforilación) a fin de ejercer su actividad citotóxica. Se dispone de varias vías para la formación de monofosfato de floxuridina, en una de las vías el fluorouracilo se convierte en fluorouridina por acción de la fosforilasa de uridina y luego en floxuridina por la cinasa de uridina, posteriormente puede incorporarse en el RNA como trifosfato de fluorodesoxiuridina o bloqueando la síntesis de trifosfato de timidina, un constituyente necesario del ADN (Brunton, 2012), ver figura 3.3.

La absorción del fluorouracilo es impredecible e incompleta, por lo que se administra por vía parenteral; tiene una vida media de 10 a 15 minutos, posee una amplia distribución en el organismo y posee la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Bertram, 2005).

Sufre inactivación por reducción del anillo de pirimidina realizada por la deshidrogenasa de dihidropirimidina en el hígado, mucosa intestinal, células tumorales y otros tejidos. Es eliminado por vía urinaria del 5 al 10% de la dosis inicial en 24 horas (Morón Rodríguez et al., 2009).

Esta indicado en el tratamiento de los carcinomas metastásicos de colon, del tubo digestivo alto, mama, cáncer de ovario, cabeza y cuello.

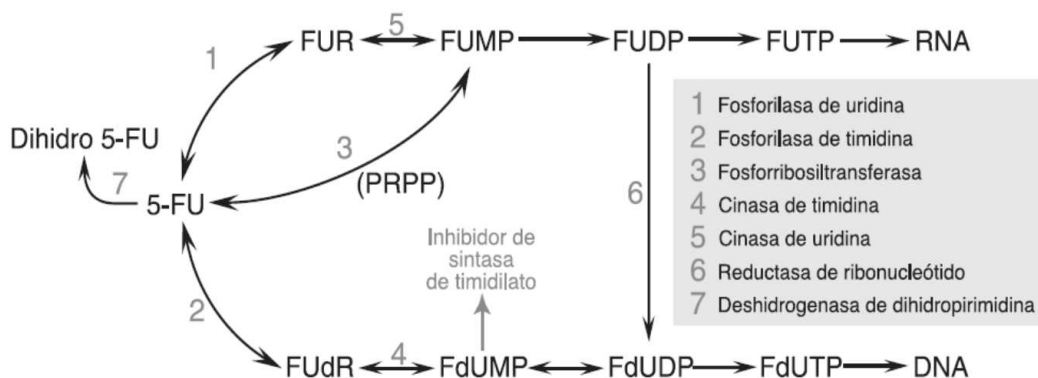


Figura 3.3 Biotransformación y mecanismo de acción del 5-fluorouracilo. 5-fluorouridina (FUR), difosfato de floxuridina (FUDP), monofosfato de floxuridina (FUMP), trifosfato de floxuridina (FUTP), fluorodesoxiuridina (FUdR), difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUDP), monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP), 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). **Imagen tomada de Brunton 2012**

Efectos adversos: Mielotoxicidad, trastornos gastrointestinales, toxicidad ocular y dermatológica, neurotoxicidad a dosis altas (Brunton, 2012).

Las dosis de fluorouracilo varían de 350 a 600 mg/m² semanales por vía intravenosa o dosis diarias de 500 mg/m² durante cinco días en ciclos mensuales (Kalant, 2012, OMS, 2005).

3.3.2 Características fisicoquímicas del fluorouracilo

De acuerdo con Moffat et al. (2011), el fluorouracilo tiene las siguientes características, ver fig. 3.4.

- **Descripción:** Polvo blanco cristalino
- **Solubilidad:** soluble en metanol, moderadamente soluble en agua, poco soluble en etanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter. Las disoluciones se decoloran en almacenamiento.
- **Punto de fusión:** 282 – 283 °C
- **Masa molecular:** 130.07 g/mol
- **pka:** 8.0, 13.0
- **Coefficiente de reparto (n-octanol/agua):** -1.0

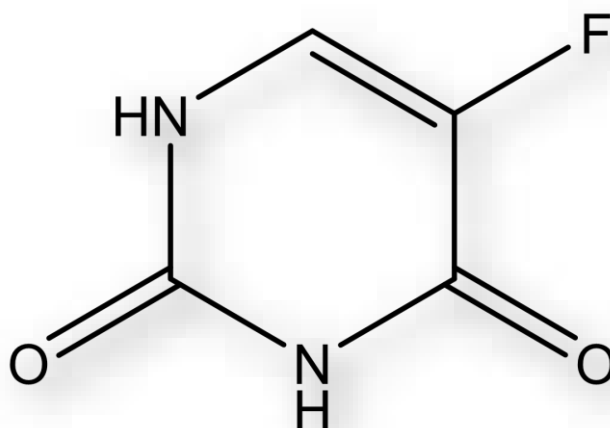


Figura 3.4 Estructura química del fluorouracilo

3.4 Sistemas acarreadores de fármacos

Para que un fármaco pueda ejercer su función debe estar presente en el sitio de acción a la concentración terapéutica y durante un periodo adecuado. Desde el sitio en el que es introducido, el fármaco encuentra múltiples barreras fisiológicas en su ruta hacia sus objetivos; desafortunadamente la mayor parte de los fármacos

antineoplásicos no poseen la capacidad de alcanzar los niveles terapéuticos en sus sitios de acción sin producir efectos adversos. Los acarreadores de fármacos mejoran la capacidad de los mismos para alcanzar el sitio de acción, disminuir la toxicidad y en algunos casos ayudan a combatir los mecanismos de resistencia que las células cancerígenas puedan llegar a desarrollar (Lin and Cui, 2015). Existen diversos tipos de acarreadores, los cuales dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas presentan diferentes capacidades, un ejemplo de ellos son los polimerosomas (Gómez-Gaete, 2014).

3.5 Polimerosomas

Los polimerosomas son vesículas poliméricas formadas por moléculas llamadas copolímeros que contienen bloques hidrofílicos e hidrofóbicos (anfifílicos), típicamente son esferas huecas, en el interior se encuentra la disolución acuosa rodeada por una membrana sintética polimérica (Lee and Feijen, 2012).

Han demostrado poseer propiedades superiores a otros biomateriales como, por ejemplo, una mejor estabilidad, mayor capacidad de carga y un tiempo prolongado en la circulación en comparación con los liposomas. La característica más relevante para el almacenamiento se debe a un interior hidrofóbico extenso en la membrana del polimerosoma, está posee una longitud de 9.6 nm en comparación de los 3.5 nm en los liposomas (Levine et al., 2008).

La membrana sintética polimérica se compone del bloque anfifílico con su porción hidrofílica expuesta a la disolución acuosa y su porción hidrofóbica forma agregados para excluir la disolución acuosa, esta estructura es muy ordenada, por lo que es capaz de imitar el comportamiento de las membranas biológicas (Förster and Borchert, 2005). El grosor de la membrana va de los 3 a 4 nm, dependiendo de la composición del copolímero puede presentar diferente permeabilidad. Este arreglo permite la encapsulación de moléculas terapéuticas como los fármacos, enzimas, péptidos, proteínas y fragmentos de ADN y ARN en el interior acuoso, además, en el interior de la bicapa hidrofóbica pueden incorporarse fármacos hidrofóbicos. Los polimerosomas llaman la atención debido a la posibilidad de cargar agentes terapéuticos en su interior, y esto abre un nicho de oportunidades en Medicina, Farmacia y en Biotecnología (Lee and Feijen, 2012).

3.5.1 Copolímeros

Un copolímero es una macromolécula compuesta por dos o más monómeros con propiedades físicas y químicas diferentes, unidos por medio de enlaces químicos para la formación de un nuevo polímero. Los monómeros poseen la facultad de distribuirse de forma aleatoria o periódica (Coustet, 2014).

Al intercalar largas secuencias de uno y otro monómero se obtienen copolímeros en bloque, mientras que si se dan cambios de composición, se producen ramificaciones dando como resultado un copolímero ramificado (Rodríguez-Hernández et al., 2005).

Las moléculas anfifílicas están constituidas por porciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Aunque existen varios tipos de copolímeros de bloque potencialmente capaces de formar estructuras micelares en medio acuoso, los tipo AB son los candidatos más apropiados para diseñar la magnitud del bloque, el grado de agregación y la estabilidad de la micela formada, debido a su arquitectura molecular simple (Pratten et al., 1985). La manipulación de la síntesis del copolímero da como resultado polimerosomas con funcionalidad diversa. La proporción de los bloques hidrofílico e hidrofóbico determinará si será capaz de formar micelas o polimerosomas. Como regla general una proporción menor al $35\% \pm 10\%$ del bloque hidrofílico forman polimerosomas y mayores al 45% forma micelas (Levine et al., 2008).

Dependiendo de la longitud y naturaleza química del copolímero, el polimerosoma puede ser más robusto y de diversos tamaños, el grueso de la membrana se puede controlar variando el grado de polimerización de la molécula, mientras que la permeabilidad al fármaco y fluidez (movimiento) de la membrana sintética polimérica puede ser controlada modificando la temperatura de transición vítrea (Lorenceanu et al., 2005).

Algunos monómeros estudiados incluyen: oxido de polietileno (PEO), poliestireno (PS), polietileno (PEE), polibutadieno (PBD), poliácido láctico (PLA), policaprolactona (PCL), poliácido acrílico (PAA) y polietilenglicol (PEG), entre otros (Jain et al., 2011). Para la síntesis de copolímeros existen diferentes técnicas de copolimerización como síntesis al azar y reacciones de radicales de Madix (Anseth et al., 1996).

3.5.1.1 Concentración micelar crítica

Un tensoactivo es aquella molécula que posee actividad interfacial, esto hace que reduzca la tensión superficial y en la interfase en mayor proporción que otros compuestos orgánicos solubles en agua, además forma agregados en disolución, llamados micelas. Debido a su estructura anfifílica los copolímeros pueden actuar como tensoactivos (Rosen, 2004).

Las micelas son generadas a concentraciones bajas del tensoactivo en agua, la concentración a la cual las micelas comienzan a formarse espontáneamente se conoce como concentración micelar crítica (CMC) (Kronberg et al., 2014).

Cuando la superficie es cubierta por las moléculas de tensoactivo, la tensión superficial se reduce, en los tensoactivos esta reducción es marcada. Este efecto se limita por la formación de agregados, las micelas por su parte no poseen actividad superficial por lo que la tensión superficial por encima de la CMC es prácticamente constante (Rosen, 2004).

Al realizar el gráfico de la tensión superficial en función del logaritmo de la concentración de un tensoactivo típico se aprecia una disminución de la tensión como se observa en la figura 3.5, seguida de una constante, el punto en el que ocurre este cambio es la concentración micelar crítica la cual puede determinarse por la intersección de las rectas (Kronberg et al., 2014).

El método más simple para medir la tensión superficial es utilizando un anillo de Du Noüy, en el cual un anillo de platino es sumergido en el líquido, luego la fuerza ejercida pasa por un máximo y posteriormente disminuye, desprendiéndose el líquido del anillo y volviendo a su posición original. Esa fuerza máxima en la cual el ángulo de contacto es cero es medido (Carrera et al.) (figura 3.6).

Para la determinación del valor de la tensión superficial, se emplea la ecuación:

$$\gamma = \frac{A}{2C} F$$

Donde

γ = tensión superficial

A = lectura del dial en dinas

C= circunferencia del anillo

F= factor de corrección

(Fisher, 2006)

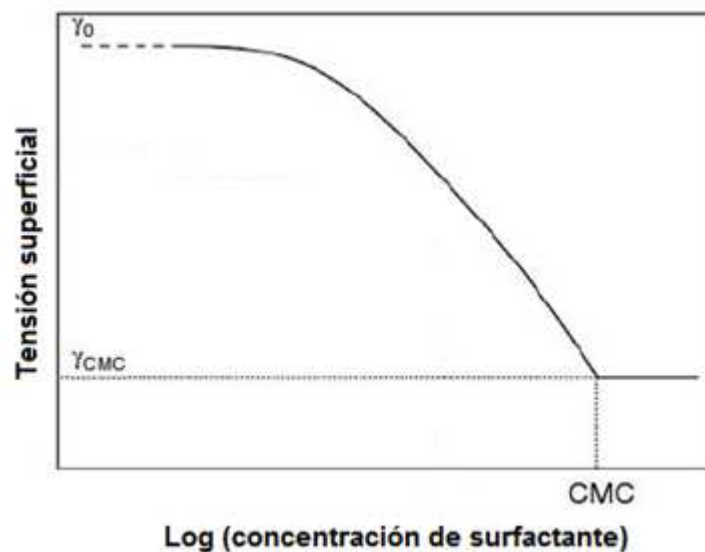


Figura 3.5 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración del tensoactivo. Modificado de Kronberg 2014

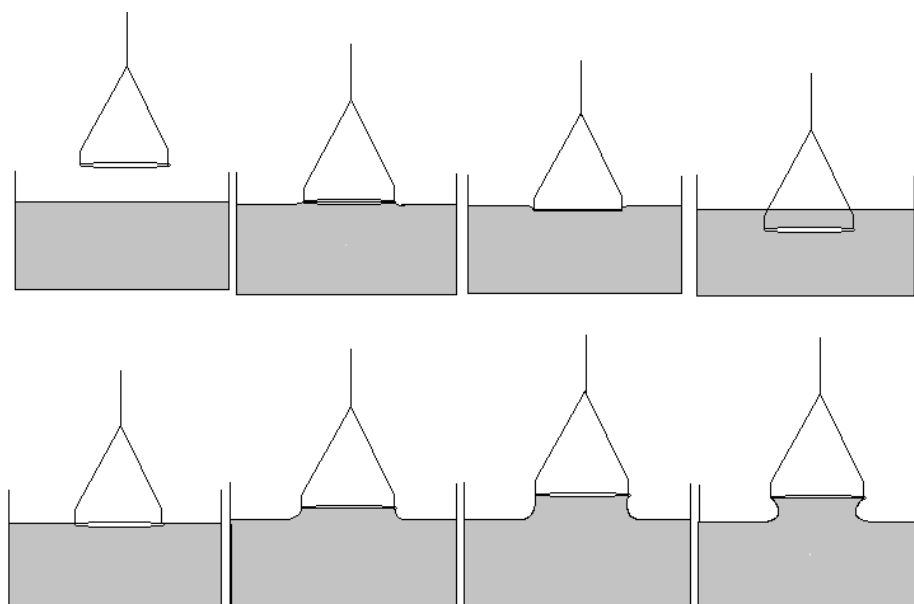


Figura 3.6 Etapas en la determinación de la tensión superficial. Carrera 2013

3.5.2 Elaboración de polimerosomas

Los polimerosomas pueden poseer diversas formas lo cual depende de las condiciones del proceso de preparación, la composición del copolímero, la naturaleza del disolvente y la temperatura del sistema.

Se clasifican en: vesículas pequeñas y uniformes, vesículas grandes y polidispersas, vesículas atrapadas, vesículas de vacío concéntrico, cebollas, y vesículas con tubos en la pared (Rodríguez-Hernández et al., 2005)

La formación se realiza a partir de bloques de copolímero utilizando disolventes orgánicos, acuosos o una mezcla de ambos (Discher and Ahmed, 2006), la formación se lleva a cabo en dos pasos, primero se forma la bicapa anfipática seguido del ajuste para la formación de la vesícula, ver figura 3.7, (Förster and Borchert, 2005).

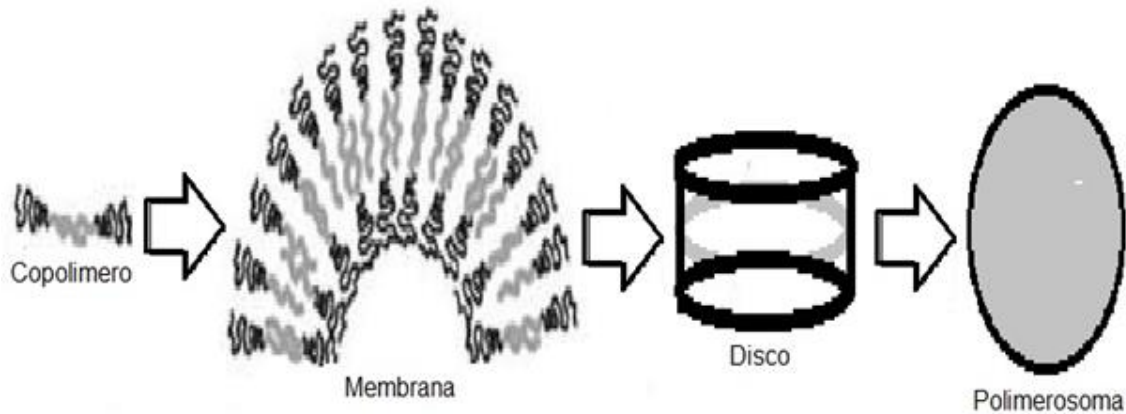


Figura 3.7 Esquema de formación de la vesícula.

La selección de los polímeros sintéticos y especialmente la selección de la masa molecular de los polímeros usados para los polimerosomas es importante, ya que estas características impactan en las propiedades que poseerán las vesículas como sistemas de transporte y liberación de moléculas activas (Discher et al., 2007).

En los copolímeros en bloque, donde uno de los polímeros tiene una temperatura baja de transición vítrea, los polimerosomas presentan la capacidad de formarse directamente en medio acuoso (Kwon, 2002).

3.5.3 Métodos de síntesis

Existen diversos métodos para la formación de liposomas, los cuales en la mayoría de los casos pueden ser utilizados para la preparación de polimerosomas, a continuación, se mencionarán algunos:

a) Hidratación directa. El proceso más simple es hidratar una película delgada o una pieza sólida del copolímero en una disolución acuosa, produciéndose una formación espontánea de vesículas. En la rehidratación de película el copolímero se disuelve en un disolvente orgánico, posteriormente se evapora a presión reducida o en un ambiente de nitrógeno, obteniéndose una película delgada sobre una superficie de vidrio o sustrato de teflón; al adicionar el agua, la película aumenta de tamaño

formando la membrana para iniciar el ensamblaje de las vesículas (Förster and Borchert, 2005).

Tiene 3 principales ventajas: es simple y no requiere equipo especial, produce menos impurezas y las vesículas se concentran en una región pequeña cerca del fondo de la lámina (Menger and Angelova, 1998).

b) Electroformación. Fue inventado por Angelova y Dimitrov en 1986 y se realiza depositando una delgada película en electrodos adyacentes con un diámetro de 0.5 mm y un espacio del mismo tamaño entre ellos (platino, oro u óxido de iridio-estaño cubierto con vidrio), el proceso de formación es inducido por una corriente alterna normalmente de 10 Hz. El campo eléctrico disminuye la tensión de la membrana facilitando la formación de la vesícula, con este método se obtienen las vesículas más grandes con diámetros por arriba de los 100 μm . Si se hidrata bajo agitación vigorosa se puede reducir el tamaño de la vesícula (Förster and Borchert, 2005, Hamley, 2003, Menger and Angelova, 1998).

c) Co-disolventes orgánicos. En este método, el copolímero es disuelto en un disolvente orgánico miscible en agua, por ejemplo, dioxano, tetrahidrofurano (THF) o dimetilfurano (DMF) y luego mezclado con una disolución acuosa para formar las vesículas. El disolvente orgánico se remueve por diálisis, filtración en gel, presión reducida o ultrafiltración.

El método de co-disolventes orgánicos es el más conveniente para preparar vesículas a gran escala. El tamaño y la distribución dependerán del proceso de mezclado, la velocidad de adición de la fase orgánica a la acuosa y el proceso de agitación (Förster and Borchert, 2005, Meng et al., 2003).

d) Microfluidos. En este método se utiliza un dispositivo con microcanales para inducir la formación de microcápsulas mediante el uso de fluidos inmiscibles, lo cual permite generar estructuras esféricas. Se obtienen mediante la formación de una doble emulsión constituida por una o más gotas pequeñas suspendidas en una gota más grande de un segundo líquido inmiscible, el cual a su vez se suspende en una tercera fase. De esta manera se generan dos tipos de emulsiones agua/aceite/agua (w/o/w) o la inversa aceite/agua/aceite (o/w/o) y la formación de las vesículas se realiza en un solo paso. El diámetro de estas depende del tamaño de los capilares del dispositivo y

la variación en el flujo de cada fase, encontrándose en un intervalo de 10-100 μm (Liu et al., 2000, Lorenceau et al., 2005)

La encapsulación de la sustancia se puede realizar por diversos métodos, pero los más comunes son la encapsulación directa durante la formación del polimerosoma y en la segunda, en un primer paso, se obtiene la vesícula y en un segundo, se transfiere el material por medio de un proceso osmótico, sin embargo, en ambos casos el encapsulamiento tiene una baja eficiencia. (Lee and Feijen, 2012, Lorenceau et al., 2005).

3.5.4 Métodos de caracterización de polimerosomas

3.5.4.1 Análisis de tamaño y distribución de partícula

La difracción de luz láser es una de las técnicas usadas para la determinación del tamaño de diferentes tipos de partículas desde muy finas hasta muy gruesas. Este método es muy popular debido a que es rápido y fácil de usar, flexible y puede ser adaptado para muestras en diversas formas físicas (USP, 2011).

Este método depende del análisis del patrón de difracción producido cuando las partículas se exponen al haz de luz, debido a que los patrones son característicos del tamaño de la partícula, el análisis matemático puede producir resultados precisos y repetibles de la distribución del tamaño de partícula (USP, 2011).

La técnica de difracción de luz láser (DLS) se basa en el fenómeno de que las partículas dispersan la luz en todas direcciones con un patrón de intensidad dependiente del tamaño de partícula.

El movimiento browniano de las posiciones relativas de las partículas varía constantemente entre sí, situación que también provoca cambios en la intensidad de la dispersión.

Si las partículas son pequeñas, se mueven rápidamente y por lo tanto aumenta la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas grandes llevan a variaciones más lentas (Cuadros-Moreno et al., 2014).

3.5.4.2 Morfología de la vesícula

La microscopía óptica surge como respuesta al descubrimiento del mundo microbiano, ya que la mayoría de las células y los microorganismos son demasiado pequeños para ser detectados por el ojo humano sin otra ayuda.

Un microscopio moderno posee tres sistemas de lentes: el condensador que se localiza entre la fuente de luz y la muestra, el objetivo que produce una imagen ampliada del campo dentro del microscopio y el ocular el cual amplía más la imagen para permitir su percepción por el ojo (Stanier and Villanueva, 1996).

Como se observa en la figura 3.8, las bacterias poseen tamaños que van desde los 0.5 a los 5 μm y las células de los 20 a 35 μm , por lo que al microscopio óptico es posible observar partículas que se encuentren dentro de estos tamaños utilizando un contraste adecuado. Aunque simple, está técnica permite obtener información acerca de la morfología de las partículas a un costo bajo, de forma fácil y rápida; especialmente cuando no se tiene acceso directo o presupuesto para utilizar técnicas analíticas más sofisticadas como la microscopia de luz polarizada o la microscopia electrónica.

Se ha descrito su utilización para la visualización de polimerosomas cargados con hemoglobina en años recientes para la determinación de morfología y tamaño de partícula (Noguez Mendez, 2015).

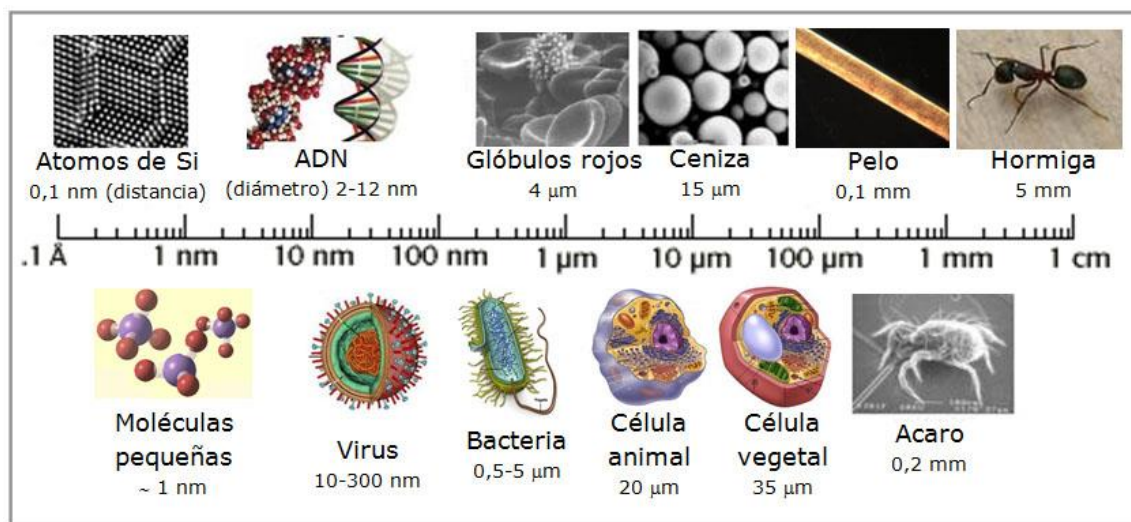


Figura 3.8. Diferencias de tamaño

Fuente: imagen tomada de <http://asovenac.org/asovenac-2/nanomedicina/> 01:13,25/01/2017

3.5.5 Polimerosomas como acarreadores de fármacos

Se ha investigado la modificación de la superficie de los polimerosomas con el fin de mejorar su capacidad de liberar al fármaco en el sitio activo. Las investigaciones se han enfocado en observar cómo se modifican sus características fisicoquímicas por variaciones del pH, liberación activada por degradación (liberación sostenida),

liberación por modificación de solubilidad (liberación instantánea), liberación por cambio de temperatura, liberación por cambio de potencial redox, liberación por cambio de fuerza electrostática y otros tipos de estímulos como: cambios de campo magnético y ultrasonido (Meng et al., 2009).

En la tabla 3.1 se presenta un resumen de los avances en la última década del uso de los polimerosomas como acarreadores de fármacos, los polímeros utilizados para la encapsulación de los fármacos y las características de los polimerosomas obtenidos y las ventajas que presentan.

En conjunto se aprecia que los polimerosomas cargados con fármacos están siendo ampliamente estudiados, al ser flexibles para la inclusión de una amplia diversidad de activos, con la variedad de polímeros disponibles en el mercado, las posibilidades son altas. Las numerosas combinaciones de polímeros posibles proveen nuevas expectativas en la liberación modificada de fármacos.

Tabla 3.1 Fármacos encapsulados en polimerosomas y sus características

Fármaco	Polímero	Propiedades del fármaco	Propiedades del polimerosoma	Beneficios	Referencia
Paclitaxel y Doxorubicina	Óxido de etileno/Ácido láctico (PEO-PLA) Óxido de etileno/Butadieno (PEO-PBD)	Hidrofóbicos	Liberación dependiente del pH Tamaño: menor a 100 nm	Incremento de la concentración en tumores sólidos y apoptosis. Disminución de tumores	(Ahmed et al., 2006)
Doxorrubicina	Óxido de etileno/Policaprolactona (PEO-PCL)	Hidrofóbico	200 nm de diámetro, mayor liberación a pH 5.5	Liberación prolongada, disminución de tumor. Incremento en la concentración de activo en el tumor	(Levine et al., 2008)
Clorhidrato de doxorubicina	Polietilenglicol/polidicloro fosfaceno	Hidrofílico	Tamaño de partícula 305 nm. Liberación a pH 7.4	Disminución de la viabilidad de células tumorales	(Chen et al., 2010, Zheng et al., 2009)
Doxorrubicina	Polimetacriloyloxyetil fosforilcolina/ Polidiisopropilaminoetil metacrilato (PMPC-PDPA)	Hidrofóbico	pH 6. Diámetro 130 nm	Disminución de la viabilidad de células tumorales	(Meng et al., 2009)
Indometacina	Polietilenglicol/Poliglicerol monometacrilato	Antiinflamatorio	>2 μm . Liberación a pH 2.0- 3.5	Sin estudios	(Meng et al., 2009)
Doxorrubicina	Polietilenglicol/ Poli /N-isopropilacrilamida (PEG-PNIPAAM)	Hidrofóbico	Liberación a 25 °C 115 nm	Sin estudios	(Meng et al., 2009)

Tabla 3.1 Fármacos encapsulados en polimerosomas y sus características (continuación)

Fármaco	Polimero	Propiedades del fármaco	Propiedades del polimerosoma	Beneficios	Referencia
Pravastatina	Polimetiloxazolina/ Polidimetilsiloxano/ Polimetiloxazolina	Hidrofílico	Mecanismo no determinado	Sin efectos tóxicos	(Onaca et al., 2009)
Paclitaxel	Polibutadieno/Polietilenglicol	Hidrofóbico	Mayor estabilidad	Disminución de la toxicidad	(Onaca et al., 2009)
Docetaxel (DOC)	poly(g-bencil L-glutamato)-hialuronico	Antitumoral hidrófobo		Una liberación controlada por días, tiempo de vida media aumentó	(Upadhayay et al., 2010)
Doxorrubicina	Polietilenglicol/ Policaprolactona/ Polidietilaminoetilmetacrilato (PEG-PCL-PDEA)	Hidrofóbico	Capacidad de carga 72.2% 154 nm Liberación a pH 7.4	Sin efectos tóxicos del polimerosoma en células HeLA	(Liu et al., 2010)
Doxorrubicina	Politrimetilene carbonato/ Poliácido glutámico (PTMC-PGA)	Hidrofóbico	131 nm de radio, a pH 7.4 168 nm de radio a pH 10.5	Mejor liberación a pH 5.5 a 37 °C	(Sansone et al., 2010)
Eritropoyetina	Dextran/ Policaprolactona (DEX- PLC)	Proteína	2.2 micrómetros de diámetro	Liberación en Buffer de ácido cítrico a 37 °C	(Zhang et al., 2010b)
Anfotericina B	Polietilenglicol/ poli ácido láctico (PEG-PLA)	No soluble	199.6 nm de diámetro.	Liberación a pH 7.4	(Jain and Kumar, 2010)
Cumarina	Polietilenglicol/ Poli ácido láctico glicolico (PEG-PLGA)	Hidrofóbico	120 nm Liberación a pH 7.4, guiados con lactoferrina	Capaz de cruzar barrera hematoencefálica	(Yu et al., 2012)

Tabla 3.1 Fármacos encapsulados en polimerosomas y sus características (continuación)

Propiedades del fármaco	Propiedades del polimerosoma	Beneficios	Referencia	IC 50 en HeLA 1.47 µg/mL	(Du et al., 2012)
Doxorrubicina Fe ₂ O ₃ (súper paramagnético)	Politrimetileno carbonato/ Poli ácido glutámico (PTMC-PGA)	Hidrofílico	194 nm. Liberación inducida magnéticamente	Disminuye la viabilidad de las células tumorales	(Oliveira et al., 2013)
Clorhidrato de doxorrubicina	Poli óxido de etileno/ Poli N-etoxidioxanil acrilamida (PEO-PtNEA)	Hidrofílico	100-160 nm Liberación pH 5.0	Menor actividad	(Qiao et al., 2013)
Clorhidrato de doxorrubicina	Poliácido acrílico/ Polidiestearin acrilato (PAA-PDSA)	Hidrofílico	Liberación pH 4.7 120nm de diámetro	Disminuye la viabilidad celular/ Incluidos en gel	(Chiang et al., 2013)
Curcumina	Monometoxypolietilenglicol/oleato (mPEG-OA)	Hidrofóbico	Aprox. 99.4 nm varia con la [C]	Apoptosis a 24 µM- Inferiores a las micelas.	(Erfani-Moghadam et al., 2014)
Doxorrubicina	Polietilenglicol/ Poli ácido láctico/ Polietilenglicol (PEG-PLA-PEG)	Hidrofóbico	120.6 nm pH 5 redox	Trastuzumab IC50 63.83 µg/mL	(Lale et al., 2015)

En años recientes se ha estudiado la utilización del copolímero de poliácido acrílico (PAA) y poliacrilato de butilo (PBA), para el desarrollo de polimerosomas y la encapsulación de ciclofosfamida; se han encontrado resultados positivos, sin embargo no ha sido posible evaluar la capacidad de carga y liberación del activo (Cruz Ruiz, 2009).

En un estudio más reciente se evaluaron las condiciones y las proporciones para la formación del copolímero de ácido acrílico y acrilato de butilo para la obtención del polimerosoma, de los cuales se seleccionaron 4 candidatos para la encapsulación con las siguientes características, ver tabla 3.2 (Noguez Mendez, 2015).

Tabla 3.2. Características físicas de los copolímeros de PAA-PBA seleccionados para la formación de los polimerosomas

Copolímeros	Temperatura de transición vítrea (Tg) °C	Peso molecular (g/mol)	Polidispersidad (Dp)	% ácido acrílico (AA)	% acrilato de butilo (BA)
Cp 39	- 9.00	4299.88	1.20	21.32	78.68
Cp 41	- 9.86	4488.39	1.19	20.84	79.16
Cp 42	- 9.33	2432.57	1.17	21.96	78.04
Cp 44	- 10.11	2128.70	1.60	21.35	78.65

4. Hipótesis

El copolímero de poliácido acrílico (PAA) y poliacrilato de butilo (PBA) puede formar polimerosomas y favorecer la encapsulación de activos antineoplásicos tales como: ciclofosfamida y fluorouracilo, mejorando la estabilidad y liberación de los mismos.

5. Objetivos

5.1 General

Evaluar la capacidad de formación de polimerosomas a partir del copolímero de (PAA-PBA) y carga utilizando como fármacos modelo ciclofosfamida y fluorouracilo.

5.2 Particulares

- Determinar la capacidad de formación del polimerosoma a partir de los copolímeros de PAA-PBA Cp 39, Cp 41, Cp 42 y Cp 44.
- Incorporar los fármacos modelo en el polimerosoma, evaluar la morfología y distribución de tamaño de partícula.
- Diseñar y validar el método analítico para la cuantificación de cada uno de los activos antineoplásicos y el porcentaje liberado.
- Determinar la cinética de liberación de los activos antineoplásicos (ciclofosfamida y fluorouracilo) por el polimerosoma de los copolímeros elegidos.

6. Materiales y métodos

6.1 Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica de los copolímeros de PAA- PBA

Lavado. Se colocaron las lentejas de copolímero en agua destilada y se dejó remojar de 24 a 48 h. Se eliminó el exceso de agua y se secó en una estufa a 60 °C en condiciones presión reducida durante 48 h.

Disolución. Se colocó la cantidad pesada para obtener una concentración de $5.055 \pm 0.068 \times 10^{-4}$ M (disolución madre) en agitación (500 rpm) con 20 mL de disolución de tetrahidrofurano (THF): tolueno (Tol) (50:50) durante 24 a 48 h hasta disolución completa.

Diluciones. Se prepararon 6 diluciones consecutivas a partir de la disolución madre de los 4 copolímeros de PAA-PBA (Cp 39, 41, 42 y 44) en un intervalo de concentración de $1.02 \pm 0.014 \times 10^{-4}$ M a $5.055 \pm 0.068 \times 10^{-4}$ M.

Medición. Se determinó la tensión superficial de las diferentes disoluciones a una temperatura de $14 \text{ °C} \pm .5 \text{ °C}$ mediante el método de desprendimiento del anillo (platino – iridio) en un tensiómetro de Du Noüy. (Modelo Fisher Scientific) Con estos datos se realiza el gráfico tensión superficial en función del logaritmo de la concentración.

6.2 Síntesis del polimerosoma mediante un dispositivo en “T” de vidrio

Se empleó la técnica de microfluidos utilizando un dispositivo en T de vidrio con flujos convergentes y un flujo volumétrico inicial de 1.5 mL/min. El copolímero se disuelve en una mezcla orgánica de THF: Tol (50:50) como fase orgánica, agua destilada como fase interna acuosa y una fase externa de glicerol: agua (80:20) con agitación constante (ver fig.6.1). Los polimerosomas se forman al converger los flujos dentro de la “T” y son estabilizados por la fase externa. Es posible observar los polimerosomas formados horas después de su elaboración (figura 6.2).

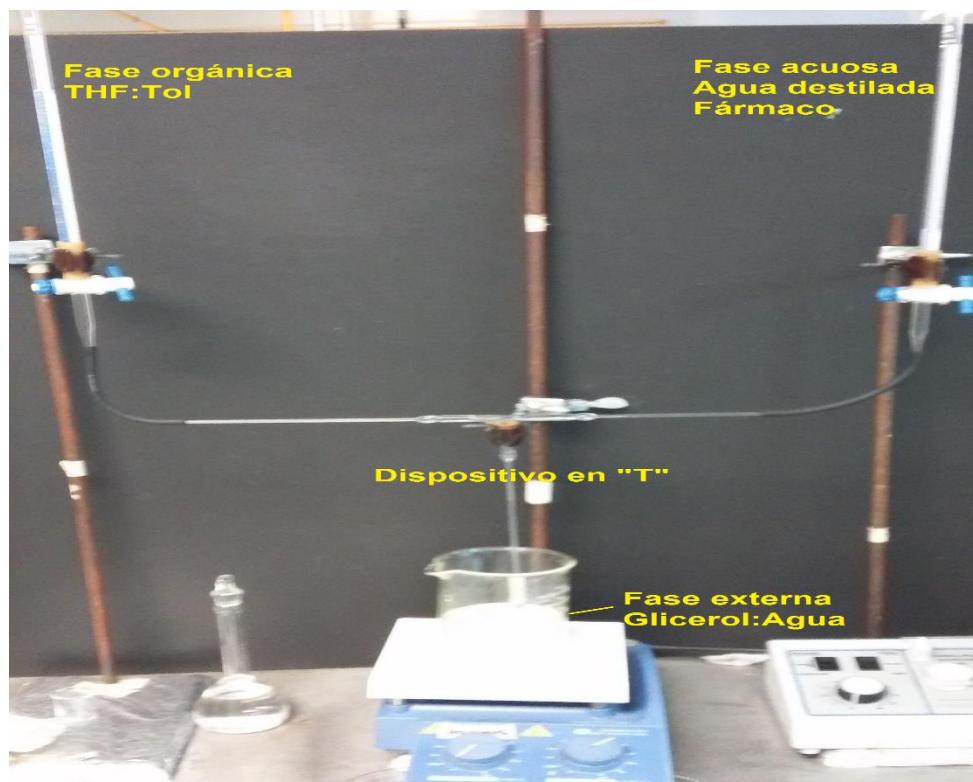


Figura 6.1 Dispositivo para la formación del polimerosoma



Figura 6.2 Polimerosomas cargados con ciclofosfamida

Se seleccionaron los copolímeros con mejor solubilidad y mayor número de vesículas.

6.3 Morfología del polimerosoma

Se observaron las vesículas formadas por cada copolímero de PAA-PBA (Cp 39, Cp 41, Cp 42 y Cp 44) con el microscopio de luz, empleando el objetivo de 100x; se tomaron fotografías y se procesaron las imágenes con el paquete ScopePhoto 3.0.

6.4 Distribución de tamaño de partícula

Para la determinación del tamaño de partícula, en los lotes cargados con fármaco se utilizó un analizador de distribución de tamaño de partícula mediante difracción de luz láser modelo LA-950 (Horiba Ltd. Japón).

Existen actualmente dos guías aceptadas internacionalmente para el uso de la difracción láser: ISO 13320 (ISO, 2007, ISO, 2009) y USP capítulo general <429> Medición del tamaño de partícula por difracción de luz (USP, 2011). Ambos estándares establecen que las muestras deberán ser medidas al menos tres veces y la reproducibilidad debe estar de acuerdo con la guía que se tome como base para realizar la determinación. De acuerdo con los requerimientos del USP capítulo general <429>, el coeficiente de variación para la medición del tamaño del 50% de las moléculas (D_{50}) deberá ser menor de 10 % y para la medición del 10% (D_{10}) y el 90% (D_{90}) de las partículas menor del 15%. Se realizaron las mediciones para comprobar que se cubren los requerimientos y se obtuvieron los promedios de los tamaños.

6.5 Evaluación de la capacidad de carga del polimerosoma

6.5.1 Evaluación previa

- a) Se preparó una disolución de azul de metileno para evaluar la capacidad de carga de **compuestos hidrofílicos**; la síntesis de polimerosomas se realizó utilizando esta disolución como fase interna acuosa.
- b) Se preparó una disolución de Sudan III en THF: Tol con copolímero para evaluar la capacidad de carga de **compuestos hidrofóbicos**; esta disolución se utilizó como fase orgánica en la síntesis.

Se observó la morfología de las vesículas para conocer donde se encapsuló cada colorante.

6.5.2 Carga con fármacos modelo

- a) Se preparó una solución de ciclofosfamida a una concentración de 5 mg/mL en agua la cual se utilizó como fase interna acuosa.

b) Se preparó una disolución de fluorouracilo a una concentración de 5 mg/mL en THF: Tol con el copolímero de síntesis como fase orgánica.

Se observó la morfología de las vesículas y cuantificó la cantidad de fármaco contenida en el sistema con los métodos desarrollados.

6.6 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de los activos

6.6.1 Ciclofosfamida

Se realizó la determinación de la longitud máxima de absorción en amortiguador de fosfatos pH 2, 4, 5, 6.5 y 7.4 utilizando un espectrofotómetro UV—Vis Perkin Elmer. Con estos datos se determinó la longitud óptima de trabajo para la curva de calibración. Se realizaron 3 curvas de calibración, cada una en un medio diferente por triplicado: agua para la cuantificación del activo en el sistema, amortiguador de fosfatos pH 6.5 para la liberación del activo a partir del sistema y agua con placebo adicionado para evaluar si algún componente del sistema genera interferencia en la señal. Se preparó una disolución estándar de 1000 µg/mL de ciclofosfamida a partir de la cual se prepararon diluciones en un intervalo de concentraciones de 25 a 350 µg/mL con el fin de cuantificar el contenido y la liberación del fármaco utilizando la misma curva.

La determinación de las muestras se realizó por el método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) reportado en la undécima edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (Salud, 2014). Las muestras fueron filtradas a través de membranas de 0.45 µm e inyectadas a un cromatógrafo Agilent 1260 con una columna C₁₈ (Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 4.6 × 50 mm, tamaño de partícula de 2.7 µm), fase móvil de acetonitrilo: agua (30:70), a un flujo de 0.7 mL/min, un volumen de inyección de 5 µL a 20 °C con un detector de UV a una longitud de onda de 195 nm.

Se realizó la verificación del método analítico por CLAR, bajo las condiciones de operación del laboratorio mediante la determinación de los estadígrafos: precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema y linealidad del método; de acuerdo con lo que se marca en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB (2002) (García et al., 2002).

6.6.2 Fluorouracilo

Se utilizó un espectrofotómetro UV—Vis Perkin Elmer para la determinación de la longitud máxima de absorción en solución amortiguadora de fosfatos pH 2, 4, 5, 6.5 y 7.4. Con estos datos se determinó la longitud de onda óptima para el desarrollo de la curva de calibración de trabajo.

Se realizaron 2 curvas de calibración en un espectrofotómetro UV — Vis Shimadzu 1201 cada una en un medio diferente por triplicado: solución amortiguadora de fosfatos pH 5 para la liberación del activo a partir del sistema y agua con placebo adicionado para la cuantificación del activo en el sistema. Se preparó una disolución estándar de 100 µg/mL de fluorouracilo a partir de la cual se realizaron diluciones en un intervalo de concentraciones de 5 a 30 µg/mL con el fin de cuantificar el contenido y la liberación utilizando la misma curva. Las mediciones se realizaron a la longitud de onda máxima absorbancia determinada.

Se procedió a validar el método desarrollado con la determinación de los estadígrafos establecidos en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB (2002): precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud y repetibilidad, linealidad del método y precisión del método. (García et al., 2002).

6.7 Ensayo de liberación mediante la técnica de diálisis

6.7.1 Ciclofosfamida

Para la determinación de la cinética de liberación de los activos a partir de los polimerosomas, se empleó membranas para diálisis (Spectra/Por® Dyalisis, USA de Spectrum Labs) con tamaño de poro de 1 kDa.

Para realizar los estudios se cortaron porciones de 120 mm de largo y cerradas por el extremo inferior con hilo. Se colocaron 10 mL de la formulación y se cerró el otro extremo de la misma forma.

Una vez cerradas las membranas, se adaptaron a un disolutor Vankel modelo VK 7000, se utilizaron vasos para disolutor Varian de 250 mL, con 200 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 4, 5, 6.5 y 7.4 como medio de disolución (figura 6.3). La temperatura se mantuvo a 37 ± 0.5 °C con agitación constante a 50 rpm durante 7 h tomando alícuotas de 3 mL con reposición de medio a los: 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360 y 420 minutos.

Las muestras obtenidas fueron filtradas a través de membranas de 0.45 μm e inyectadas en el cromatógrafo bajo las mismas condiciones que las curvas de calibración.

6.7.2 Fluorouracilo

Para realizar los estudios se cortaron porciones de 80 mm de largo y cerradas por el extremo inferior con hilo. Se colocaron 5 mL de la formulación y se cerró el otro extremo de la misma forma. Se adaptaron al disolutor de la misma forma que para la ciclofosfamida, utilizando 200 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 2, 4, 5, 6.5 y 7.4 como medio de disolución. La temperatura se mantuvo a 37 ± 0.5 °C con agitación constante a 50 rpm durante 6.5 h tomando alícuotas de 3 mL con reposición de medio a los: 15, 30, 45, 60, 90, 150, 210, 270, 330 y 390 minutos.

Se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a las condiciones de la curva de calibración desarrollada. La cinética de liberación de los fármacos fue determinada aplicando a los resultados experimentales los modelos matemáticos de primer orden, Higuchi, Hixson – Crowell y Korsmeyer – Peppas utilizando el complemento DDSolver para Microsoft® Excel. Se seleccionó el modelo que presentara el valor más alto de coeficiente de correlación ajustado (r^2 ajustado) (Zhang et al., 2010a).

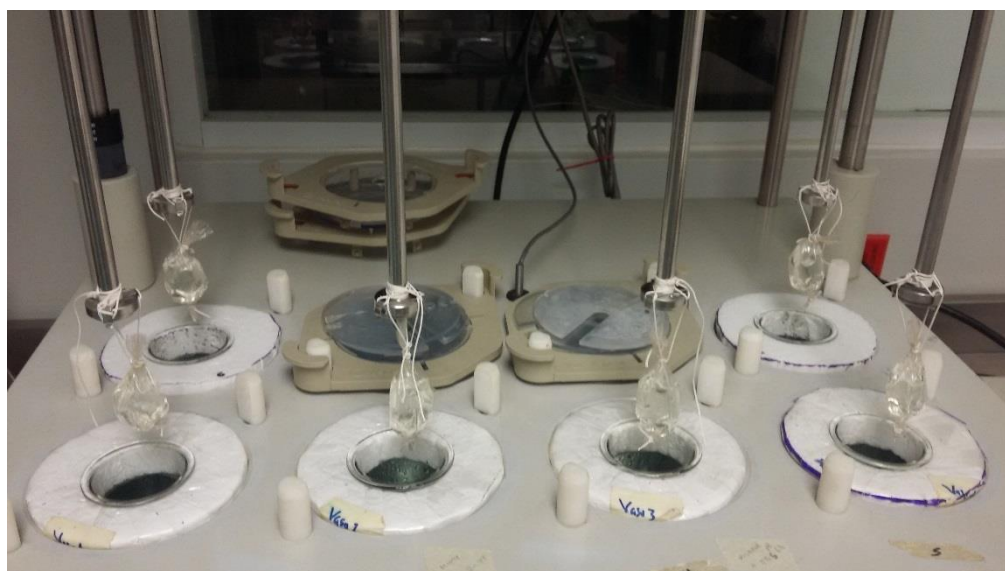


Figura 6.3. Adaptación del disolutor para la cinética de liberación

7. Resultados y discusión

7.1 Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica de los copolímeros de PAA- PBA

Debido a su estructura anfifílica, la familia del copolímero de PBA-PAA presenta propiedades como tensoactivo, por lo que fue posible determinar la CMC en el intervalo de concentración aproximado de 1.0×10^{-4} M a 5.0×10^{-4} M a $14 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$; para cada uno de los copolímeros. Los resultados se presentan en el gráfico 7.1 (las líneas son únicamente de carácter ilustrativo) y en la tabla 7.1 se muestra el valor obtenido de CMC para cada copolímero.

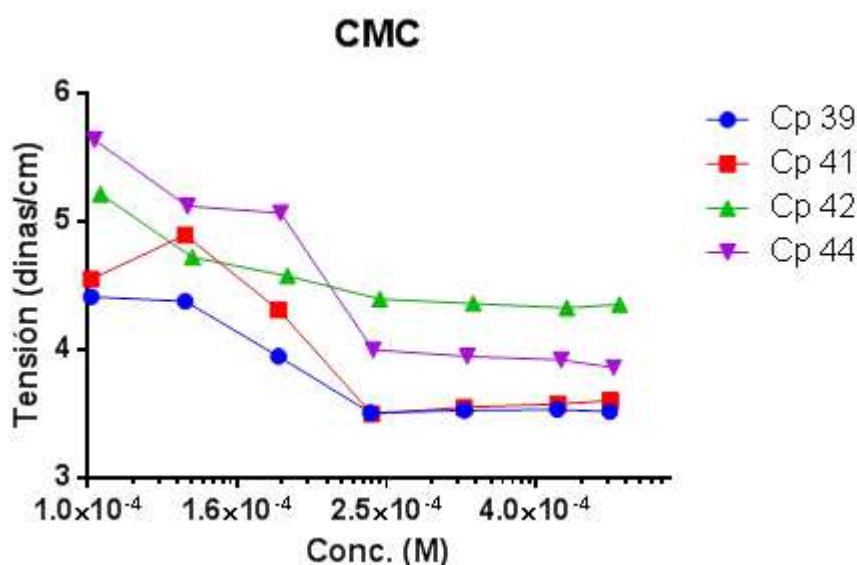


Gráfico 7.1 Comparación de las mediciones de la tensión superficial de los diferentes copolímeros de PAA-PBA.

En el gráfico 7.1 se observa que en el intervalo de concentraciones por debajo del logaritmo de 1.0×10^{-4} M a 2.4×10^{-4} M, la tensión superficial presenta una disminución con el aumento de la concentración del copolímero, observando un primer punto de inflexión dentro de este intervalo que difiere ligeramente entre cada copolímero, a partir de 2.4×10^{-4} M, los copolímeros 39, 41 y 44 presentan un segundo punto de inflexión marcado con el cambio de pendiente en la cuarta dilución, a partir de esta concentración, la tensión superficial sigue disminuyendo con una pendiente menor.

En el caso de los copolímeros el segundo punto de inflexión indica la dilución en la que se encuentra la CMC (Pasquali et al., 2005).

Sin embargo, en el copolímero Cp 42 este cambio no es tan drástico, lo cual puede deberse a que durante los ensayos presentó una mejor solubilidad con respecto a los demás, indicativo de una actividad superficial menor al incorporarse más fácilmente en el seno de la solución, la cantidad de moléculas que tienden a colocarse en la interfase de la solución es menor en comparación con los otros copolímeros (Rosen, 2004).

La formación de micelas en copolímeros en bloque es más compleja que en los tensoactivos convencionales y se produce a temperatura fija en un cierto intervalo de concentración (Pasquali et al., 2005); en la tabla 7.1 se aprecia que los valores de CMC obtenidos son cercanos por lo que se obtiene un intervalo estrecho para esta familia de copolímeros, la ligera variación de las concentraciones se puede atribuir a la preparación de las muestras, debido a la diferencia de masa molecular de cada copolímero no fue posible pesar la cantidad exacta de cada uno para alcanzar la concentración de 5.0×10^{-4} M, por lo que se partió un intervalo de concentraciones ($5.055 \pm 0.068 \times 10^{-4}$ M).

Tabla 7.1. Concentración Micelar Crítica determinada para cada copolímero a 14 °C

Copolímero (Cp)	Concentración $\times 10^{-4}$ [M]
39	2.39
41	2.40
42	2.46
44	2.41

Los valores de CMC mostrados en la tabla 7.1 son similares a lo reportado por Noguez en 2015 para copolímeros conformados por PAA – PBA por lo que se puede generalizar que para la mayoría de los copolímeros de esta familia la CMC se encuentra por encima de 2.0×10^{-4} M, confirmando que la CMC está relacionada con los monómeros que conforman el bloque (Levine et al., 2008, Noguez Mendez, 2015).

7.2 Síntesis del polimerosoma mediante un dispositivo en “T” de vidrio

Debido al tamaño esperado de los polimerosomas, no es posible corroborar su formación a simple vista, por lo que fue necesario observarlos en el microscopio óptico con un objetivo de 100x. Se utilizó una concentración cercana a la CMC con el fin de

garantizar la formación espontánea de los polimerosomas, tal como se aprecia en la figura 7.1 todos los copolímeros evaluados formaron polimerosomas.

Noguez et al (2015) mostraron que los copolímeros de PAA – PBA con valores de CMC cercanos a $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ forman polimerosomas en lugar de micelas. De acuerdo con los resultados obtenidos de CMC, se esperaba que todos los copolímeros evaluados presentaran la capacidad de formar polimerosomas, los resultados demostraron que de acuerdo con la CMC del copolímero de esta familia, es posible predecir si este formará micelas o polimerosomas (Noguez Mendez, 2015).

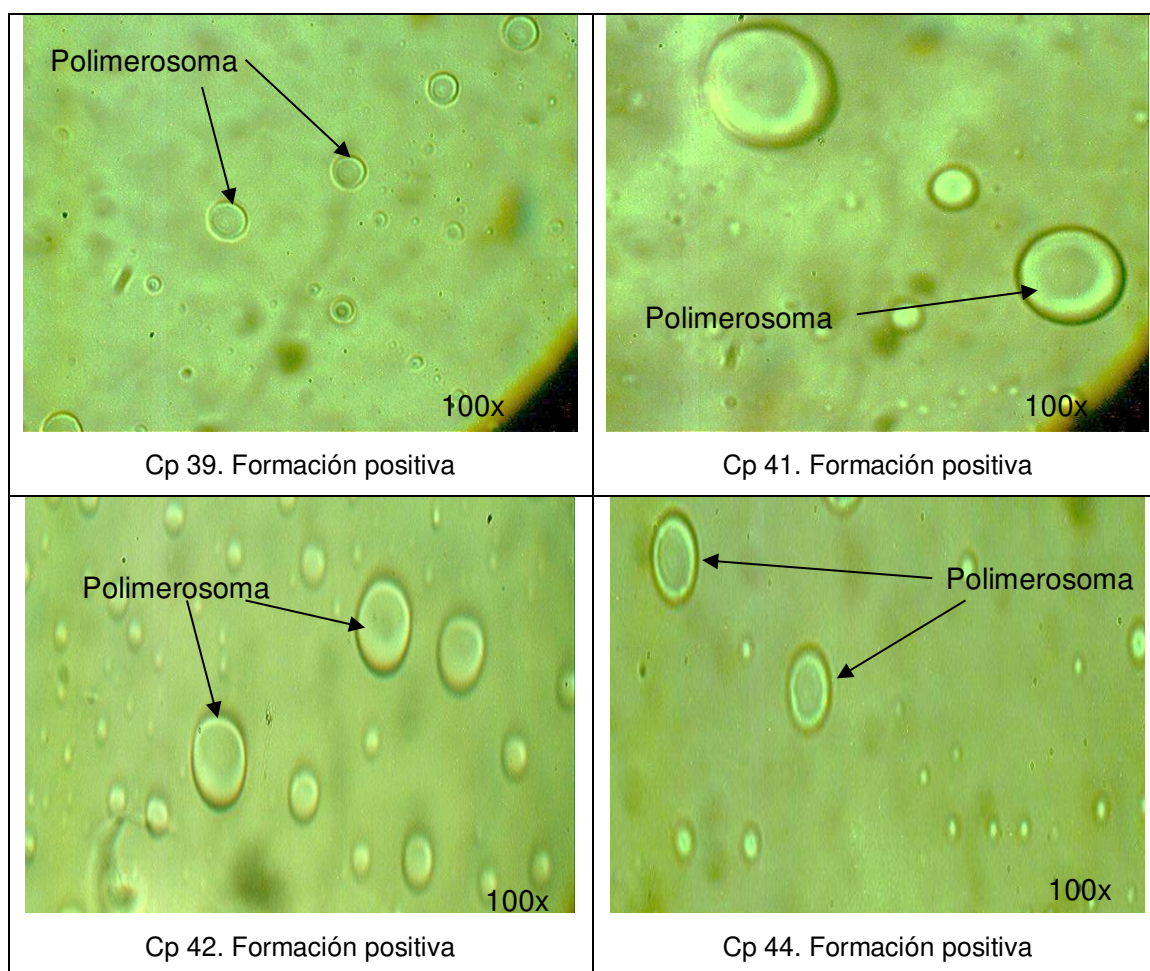


Figura 7.1 Imágenes observadas en el microscopio con el objetivo de 100x con filtro verde.

Con base en estos resultados, se seleccionaron los copolímeros Cp 41 y Cp 42 para las evaluaciones posteriores, ya que éstos presentaron mejor solubilidad y mayor número de vesículas formadas en las muestras observadas al microscopio.

7.3 Morfología del polimerosoma

En la figura 7.2 se aprecia que la morfología de los polimerosomas obtenidos es esférica con bordes regulares, sin vesículas atrapadas y membrana sintética polimérica definida. Con esta estructura, se esperaba que permitiera la encapsulación y protección de fármacos en el interior del polimerosoma. Noguez (2015) reportó la formación de este tipo de estructuras para otros copolímeros de la familia de PAA – PBA, capaces de formar polimerosomas por lo que se deduce que la morfología de la vesícula puede estar determinada por los copolímeros que la conforman y el método de síntesis, además presenta la capacidad de formar polimerosomas a bajos valores de CMC (Noguez Mendez, 2015).

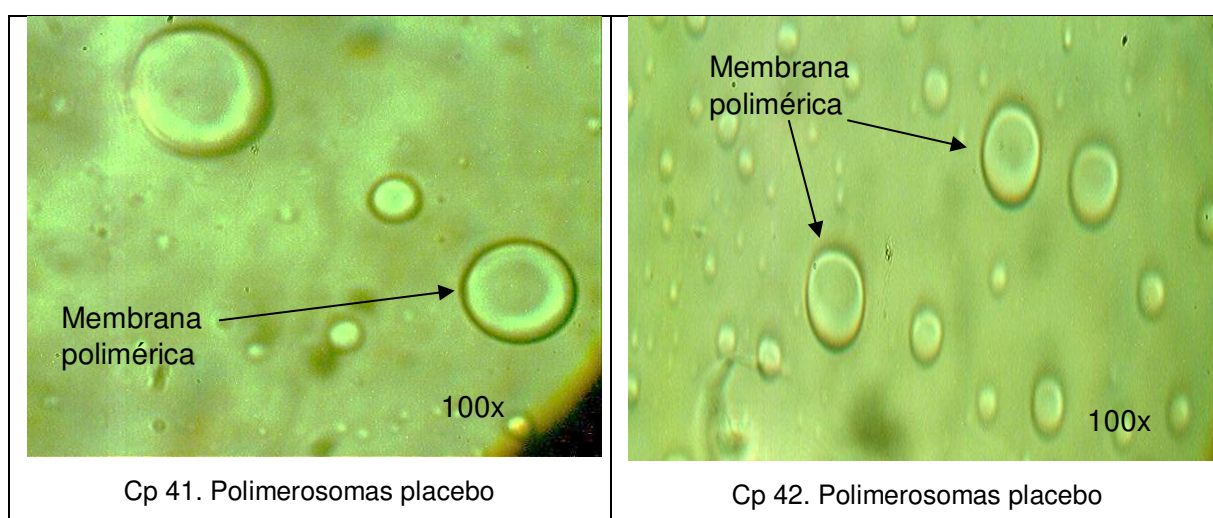


Figura 7.2. Morfología de las vesículas formadas

7.4 Distribución de tamaño de partícula

En la tabla 7.2 se presentan los resultados para la reproducibilidad observando que las mediciones cumplen con los requerimientos de la USP capítulo general <429> Medición del tamaño de partícula por difracción de luz, al presentar coeficientes de variación menor de 10 % para el D_{50} y menor del 15% para D_{10} y D_{90} (USP, 2011).

Tabla 7.2 Mediciones de tamaño de partícula para Cp 41 cargado con ciclofosfamida

Medición	1 (µm)	2 (µm)	3 (µm)	Promedio (µm)	Des. Est.	% CV
D ₁₀	3.4525	4.1870	4.4983	4.0459	0.5370	13.2721
D ₅₀	7.2904	7.7255	8.6215	7.8791	0.6787	8.6141
D ₉₀	16.2275	14.6898	17.087	16.0014	1.2145	7.5898

Con base en estos resultados se corroboró que la determinación de tamaño de partícula por este método es aplicable a los polimerosomas, obteniendo mediciones confiables, por lo que se procedió a realizar las mediciones en el resto de las muestras. Para la elaboración de la tabla 7.3 se partió del promedio de los tamaños de partícula obtenidos para diferentes lotes de polimerosomas. Cuya distribución de tamaños asemeja a una normal con una asimetría positiva lo que indica que un mayor número de datos se encuentran por encima del valor de la media aritmética; adicionalmente existe una baja concentración de datos en la media aritmética (platicúrtica) (Murray and Spiegel, 1994).

Tabla 7.3 Tamaño de partícula de los polimerosomas

Copolímero	Tamaño de partícula promedio (µm)	Desviación estándar	Mw (g/mol)	%AA	%BA
Cp 41 Placebo	1.4576	0.4187	4488.39	20.84	79.16
Cp 42 Placebo	2.2475	0.8665	2432.57	21.99	78.09
Cp 41 Ciclofosfamida	8.0440	1.4440			
Cp 42 Ciclofosfamida	9.4871	0.8332			
Cp 41 Fluorouracilo	8.7767	1.4241			
Cp 42 Fluorouracilo	9.9729	0.8225			

En la tabla 7.3 se aprecia que el tamaño de partícula determinado para los polimerosomas obtenidos a partir del copolímero Cp 42 son de mayor tamaño que para los de Cp 41, esto se debe a la diferencia en masa molecular de los copolímeros, ya que, a mayor masa molecular, menor tamaño de partícula y viceversa. Se observa un aumento de tamaño de partícula entre los polimerosomas cargados con fármaco y los polimerosomas vacíos, sin embargo, presentan tamaños semejantes entre los polimerosomas cargados, indicando que la relación con el aumento de tamaño no depende de la naturaleza del fármaco.

De acuerdo con la descripción de la formación del polimerosoma, el grosor de la membrana polimérica sintética varía de acuerdo con la masa molecular del copolímero, es más delgada si la masa molecular es baja, por lo que durante la formación de la vesícula, las fuerzas de repulsión son menores, y la esfera más estable tiene un mayor tamaño; el comportamiento inverso es observado con masas moleculares más grandes (Förster and Borchert, 2005).

En 2009 Cruz reporto polimerosomas de 18 μm cargados con ciclofosfamida con una morfología diferente al utilizar otro tipo de dispositivo de microfluidos y flujos distintos; mientras que Noguez (2015) reportó tamaños de 27.91 a 29.13 μm para polimerosomas cargados con hemoglobina utilizando un dispositivo en T diferente, esto indica que tanto el dispositivo y el flujo influyen directamente en el tamaño de partícula y morfología de los polimerosomas, sin embargo, a pesar de haberse obtenido los polimerosomas con menor tamaño para este copolímero, aún no es posible considerar una administración intravenosa de polimerosomas cargados, debido a que los diámetros internos de los vasos sanguíneos van de los 8 μm a los 5 mm y se corre el riesgo de bloquear la circulación (Silverthorn, 2008, Cruz Ruiz, 2009, Noguez Mendez, 2015).

7.5 Evaluación de la capacidad de carga del polimerosoma

7.5.1 Evaluación previa

Debido a que los fármacos estudiados no poseen grupos cromóforos en el espectro visible (390 a 750 nm), se utilizaron colorantes para evaluar en qué parte de la estructura se incorporan los compuestos de acuerdo con su naturaleza hidrofílica o hidrofóbica. Como se observa en la figura 7.3, los polimerosomas vacíos presentan un interior claro y una clara delimitación del exterior por una membrana sintética polimérica oscura (negra), mientras los cargados con azul de metileno poseen un interior opaco sin importar la cantidad de luz permitida por el microscopio y una membrana sintética polimérica idéntica a los vacíos por lo que se puede deducir que los compuestos hidrofílicos son incorporados en el interior de la vesícula.

Los cargados con sudan III presentan una ligera coloración rojiza en la bicapa con un interior claro, lo que pone en evidencia que la membrana sintética polimérica está conformada en su mayoría por grupos hidrofóbicos y estos fármacos se encapsulan en la misma.

Esto concuerda con lo reportado por Levine y colaboradores en 2008, los polimerosomas pueden encapsular componentes hidrofílicos en su interior acuoso y moléculas hidrofóbicas dentro de su membrana (Levine et al., 2008).

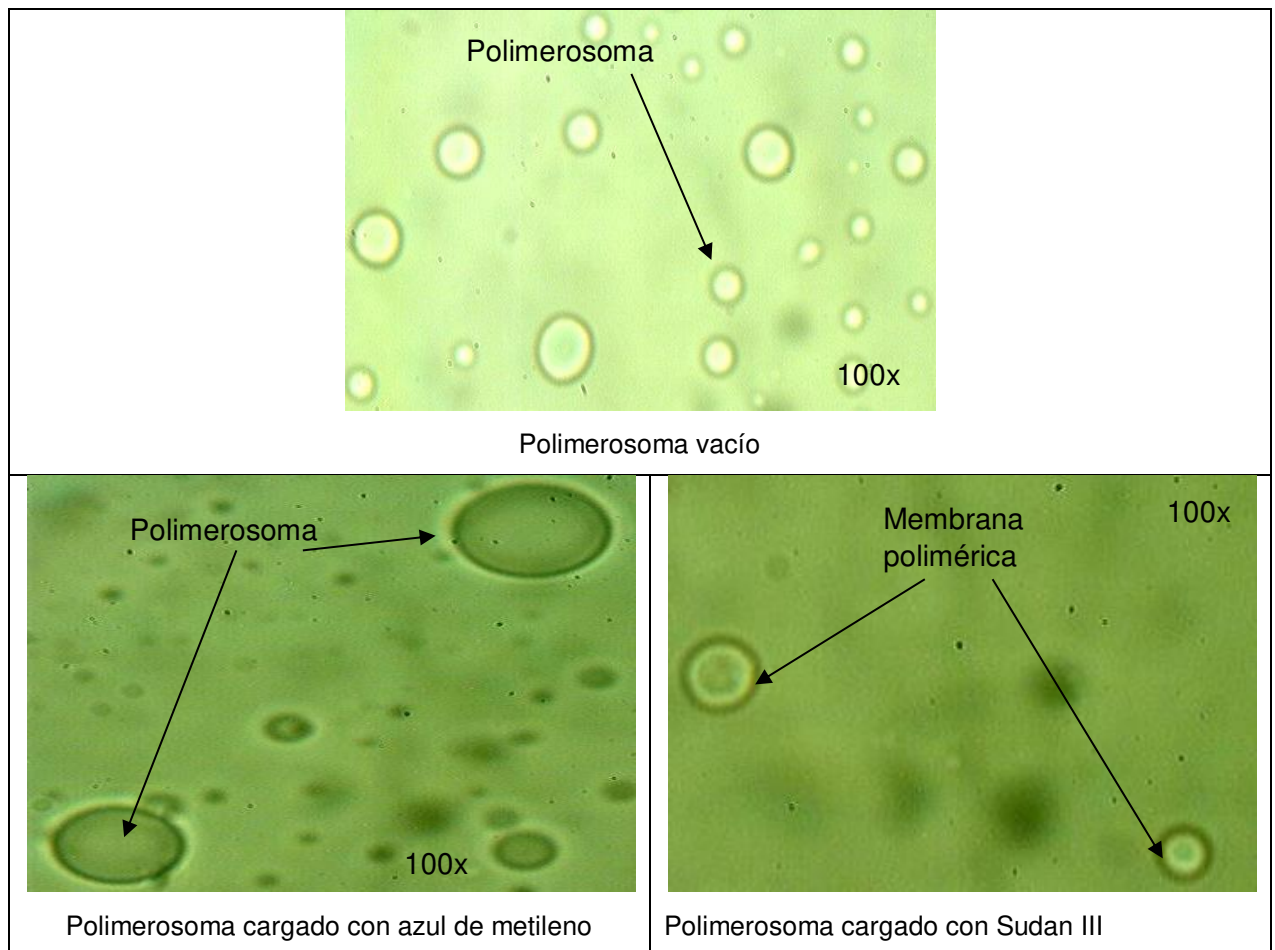


Figura 7.3 Comparación de polimerosoma vacío y cargados con colorantes

7.5.2 Carga con fármacos modelo

En la figura 7.4 se observa que tanto los polimerosomas cargados con ciclofosfamida, como los cargados con fluorouracilo, conservan la morfología de los polimerosomas vacíos al presentar un interior claro, una clara delimitación del exterior por una membrana sintética polimérica con forma esférica y bordes lisos; indicando que la morfología del polimerosoma no depende del tipo de molécula incluida, sino del

copolímero y el dispositivo de síntesis. Con base en los resultados obtenidos con los colorantes, se puede predecir que la ciclofosfamida se incorpora dentro del polimerosoma al ser hidrofílico y el fluorouracilo en la membrana sintética polimérica al ser hidrofóbico, aunque no pueda apreciarse en las fotografías.

Al realizar la carga del fármaco en diferente fase de acuerdo con su naturaleza se crea la posibilidad de cargar 2 fármacos de diferente solubilidad de forma simultánea en el polimerosoma, otorgándole mayores beneficios a los tratamientos.

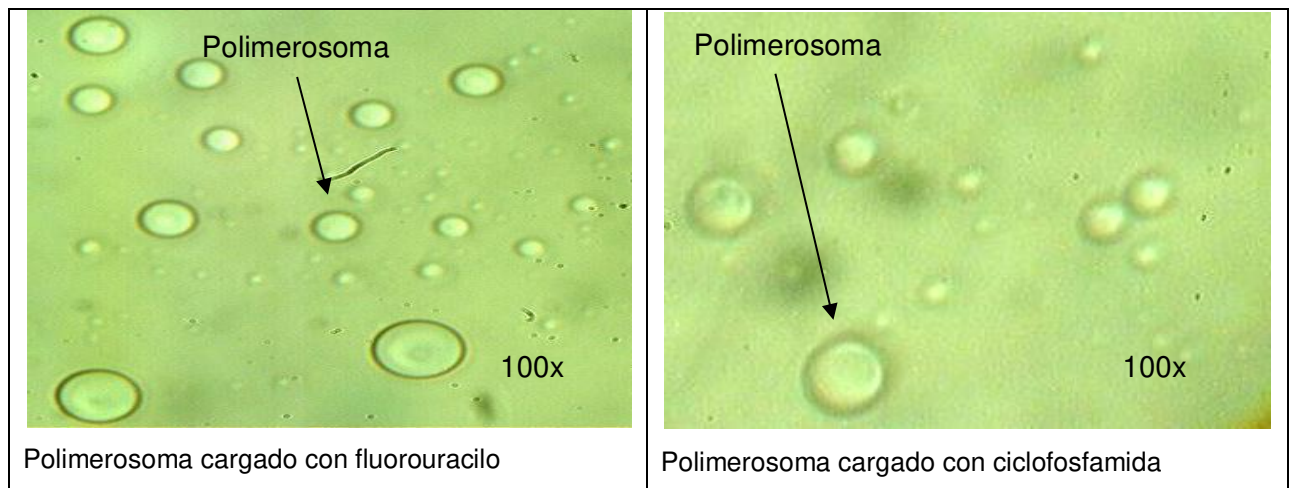


Figura 7.4 Comparación de polimerosomas cargados con fármacos modelo

En la tabla 7.4 se observa que los polimerosomas obtenidos a partir del copolímero Cp 42 poseen una mayor capacidad de carga que los obtenidos a partir de Cp 41 para ambos fármacos; esta información concuerda con lo obtenido en el apartado 7.4 al ser los polimerosomas de Cp 42 de mayor tamaño. Se aprecia que la diferencia de carga es mayor para fluorouracilo que para ciclofosfamida, debido a que el fármaco se encapsula en la membrana sintética polimérica y no sólo en el interior del polimerosoma, al ser más delgada la membrana permite que se incorporen un mayor número de moléculas de fármaco en la misma, adicionalmente, debido a que fluorouracilo es ligeramente soluble en agua, una parte se encapsula dentro del polimerosoma (Moffat et al., 2011). Con base en estos resultados, se deduce que la masa molecular del copolímero influye en el tamaño de la partícula y en su capacidad de carga; a menor masa molecular, mayor tamaño y capacidad de carga.

Para elegir el copolímero adecuado, se debe tomar en consideración la naturaleza del fármaco y la diferencia de capacidad de carga, con base en los resultados de esta evaluación, se propone a Cp 41 como el mejor candidato.

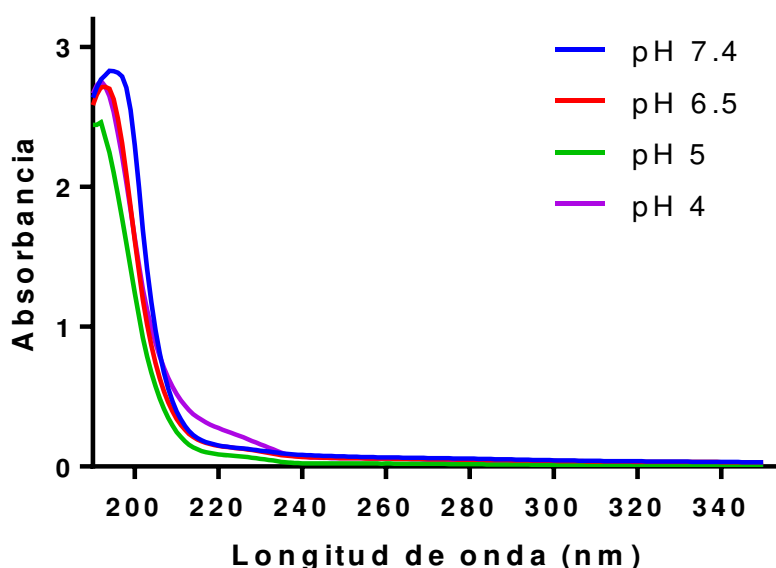
Tabla 7.4 Capacidad de carga de los polimerosomas

Copolímero	Porcentaje cargado en el interior	Desviación estándar
Cp 41 Ciclofosfamida	59.0937	0.4027
Cp 42 Ciclofosfamida	59.3120	0.8577
Cp 41 Fluorouracilo	71.8645	0.2961
Cp 42 Fluorouracilo	79.5571	0.7942

7.6 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de los activos

7.6.1 Ciclofosfamida

En la gráfica 7.2 se observa que los espectros de ciclofosfamida a los diferentes valores de pH son similares entre sí, las diferencias entre las absorbancias pueden deberse a que, para estos resultados, el ensayo se realizó utilizando agua destilada como blanco en lugar de una disolución amortiguadora por lo que no se realizó el ajuste de la absorbancia de la disolución amortiguadora, estableciéndose la longitud de onda de absorción máxima en un intervalo de 193 ± 1 nm para un espectrofotómetro UV- VIS.



Gráfica 7.2 Determinación de longitud de absorción máxima para ciclofosfamida

Una vez obtenida la longitud de onda de absorción máxima, se procedió a realizar las curvas de calibración; en algunos casos al utilizar un detector de arreglo de diodos la longitud de absorción máxima se desplaza, en este caso el método farmacopeico indica realizar las mediciones a 195 nm, por lo que se procedió a realizar las determinaciones a 195 nm como se describe en la monografía, en lugar de el intervalo

de longitudes determinadas, durante los ensayos no se observó que este cambio produjera algún efecto negativo en las mediciones (figura 7.5). Para evitar el efecto observado en la gráfica 7.2, las mediciones se realizaron utilizando la disolución amortiguadora como blanco para las mediciones en los diferentes medios.

Data File: C:\Enterprise\Projects\tecnofarm\Ciclofosfamida\Result\200616\Ciclofosfamida triplicado.seq.rsl\Ciclofosfamida trip006.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\tecnofarm\Ciclofosfamida\Method\Ciclofosfamida Pba.met
 Sample: Ciclofosfamida 250-1
 Acquired: 6/20/2016 4:18:08 PM (GMT -05:00)
 Printed: 6/21/2016 1:18:01 PM (GMT -05:00)

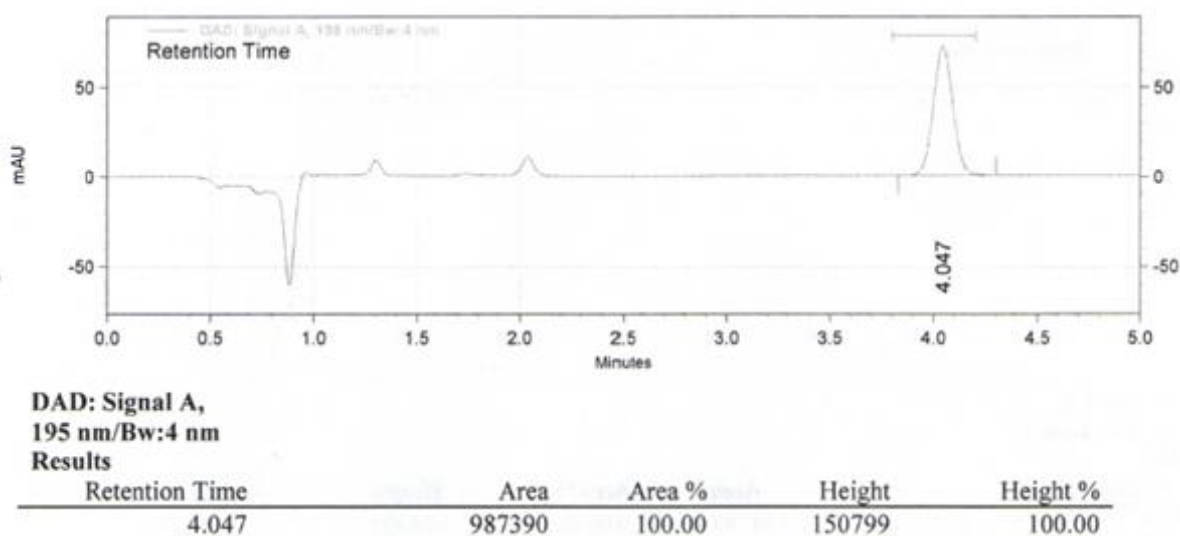


Figura 7.5. Cromatograma muestra de ciclofosfamida

Debido a que fue posible utilizar el método farmacopeico para la cuantificación de ciclofosfamida en agua destilada, en disolución amortiguadora y dentro del polimerosoma, se verificaron únicamente los siguientes parámetros: la precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema y linealidad del método; ya que de acuerdo con la FEUM (Salud, 2014), los métodos analíticos de la misma no requieren ser validados, sino únicamente verificar su aplicabilidad al producto, bajo las condiciones de operación del laboratorio y en función del método analítico deseado. En la tabla 7.5 se presentan los resultados de los parámetros de precisión y linealidad del sistema, en ella se observa que el coeficiente de variación (%CV) para la precisión es menor al 1.5 %, el valor del coeficiente de correlación (r^2) para la linealidad del sistema es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente (IC β_1) no incluye al cero; por lo que de acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos del

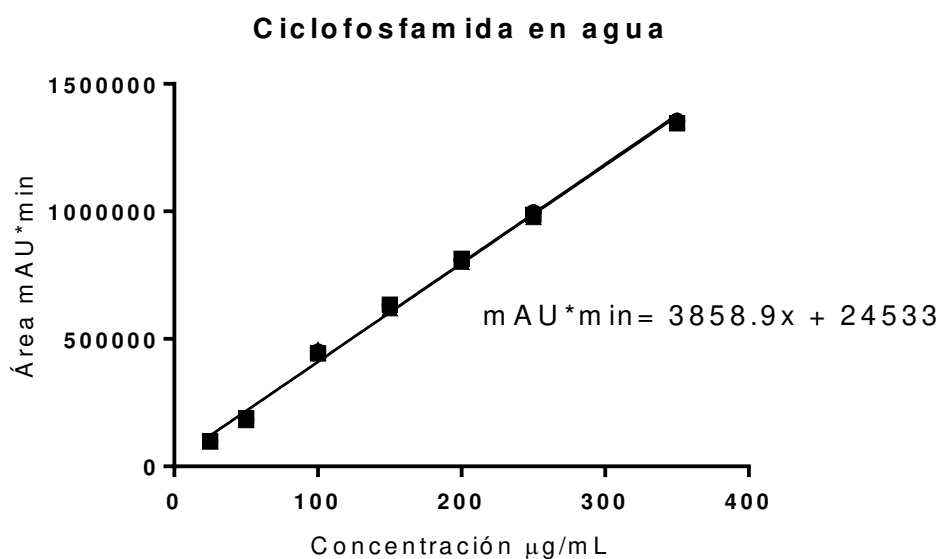
colegio de QFB todas las curvas preparadas cumplen con los criterios establecidos, para métodos fisicoquímicos (García et al., 2002).

Tabla 7.5 Comparación de las curvas de calibración ciclofosfamida

Medio	Precisión* (CV%)	Ecuación de la recta $y = mx + b$ Intervalo de concentración: 25 a 350 $\mu\text{g/mL}$	Coficiente de correlación	IC (β_1)
Agua	1.1681	$\text{mAU} \cdot \text{min} = 3858.9x + 24533$	0.9963	3734.0417 – 3974.7582
Amortiguador	0.9215	$\text{mAU} \cdot \text{min} = 3796.1x + 26242$	0.9972	3781.7919 - 3810.4080
Placebo	1.1379	$\text{mAU} \cdot \text{min} = 3852.3x + 21820$	0.9964	3837.8163 – 3866.7836

*determinada para el nivel de concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$

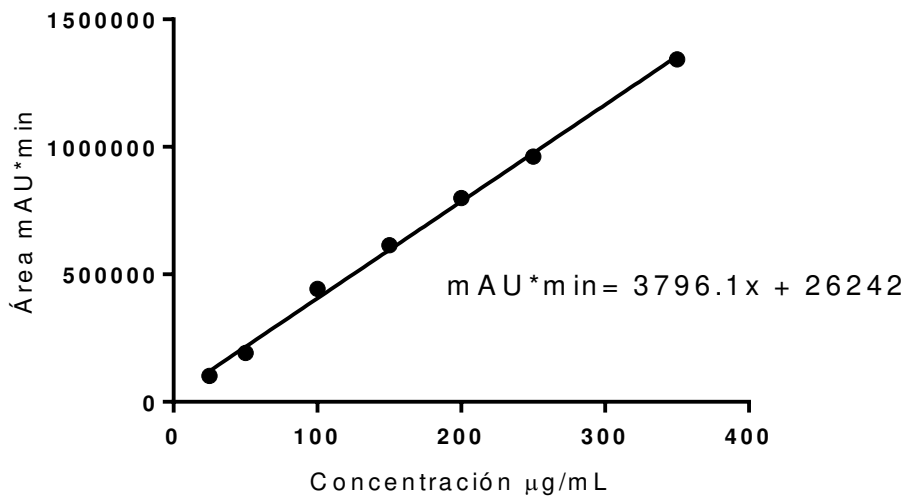
En la gráfica 7.3 se aprecia que la curva de calibración presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones propuesto aseverando que se cumple con la linealidad del sistema en agua destilada.



Gráfica 7.3 Triplicado de curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR (195 nm)

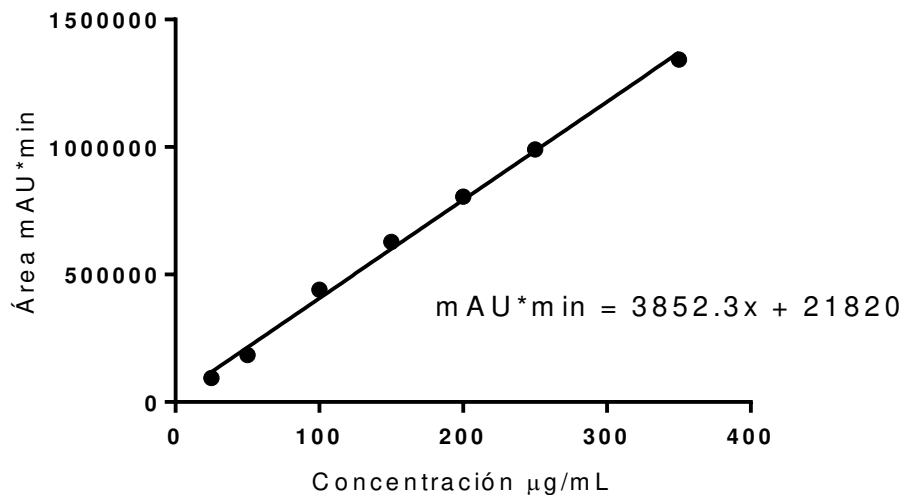
En las gráficas 7.4 y 7.5 se observa el comportamiento lineal de la curva de calibración preparada en la disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 y placebo respectivamente confirmando la linealidad del sistema para estos medios.

Ciclofosfamida en solución amortiguadora 6.5



Gráfica 7.4 Curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5

Placebo Ciclofosfamida



Gráfica 7.5 Curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR en placebo cargado

En la tabla 7.6 se presentan los resultados obtenidos para el parámetro de adecuabilidad del sistema, se observa que el coeficiente de variación es menor a 2, el factor de coleccionamiento también es menor a 2 y el factor de capacidad mayor a 2, estos resultados concuerdan con los criterios de la guía de validación de QFB, demostrándose que el método cumple con la adecuabilidad del sistema (García et al., 2002).

Tabla 7.6 Adecuabilidad del sistema de ciclofosfamida

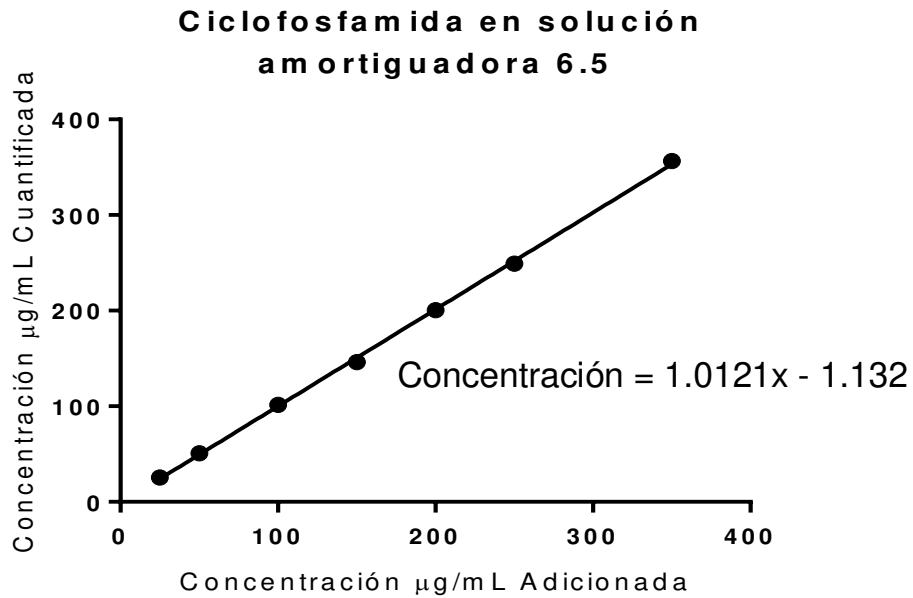
Parámetro	%CV	T (Factor de coleo)	N (platos teóricos)	K (factor de capacidad)
Resultado	0.5942%	0.6759	695.7345	2.9535

Por último, en la tabla 7.7 se presentan los resultados para el estadígrafo de linealidad del método, para este se recomienda trazar la gráfica de la cantidad adicionada (X) vs la cantidad cuantificada (Y) con la línea de ajuste y calcular los siguientes parámetros: el coeficiente de correlación, el cual se observa que es mayor a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente (IC β_1) incluye a la unidad, el intervalo de confianza para el intercepto (IC β_0) incluye al cero y el coeficiente de variación ($\%CV_{y/x}$) es menor al 2 %, estos resultados concuerdan con lo requerido para métodos cromatográficos. Adicionalmente para el porcentaje cuantificado se evalúan otros 2 criterios: el intervalo de confianza para la media (IC μ) indica la capacidad del método analítico para dar resultados con el menor sesgo debido a los errores de medición (analista, instrumental y equipo), el cual como se observa en la tabla 7.7 se encuentra entre 98 % - 102 % e incluye al 100 % y el coeficiente de variación recobro ($\% CV$ recobro) es menor al 2 % lo que indica que se cubren los requerimientos estipulados para métodos cromatográficos tanto para la disolución amortiguadora de fosfatos 6.5 como para placebo.

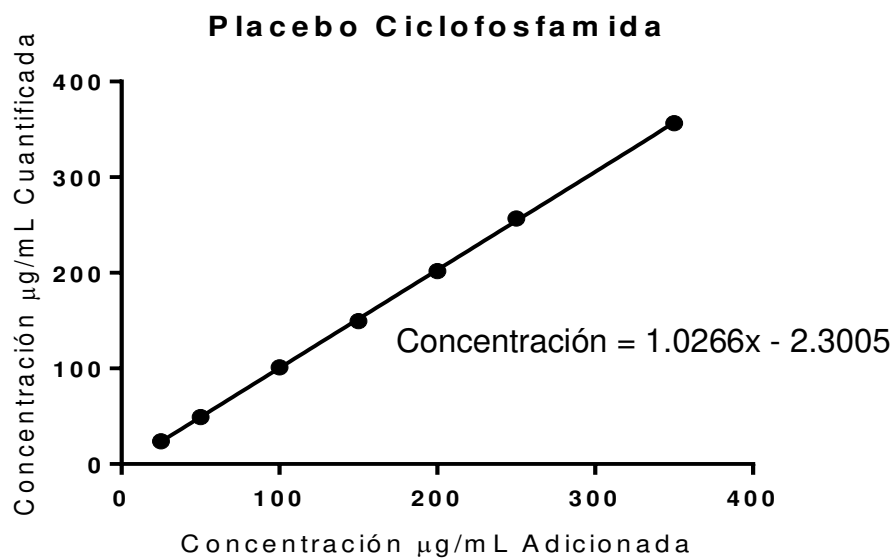
Tabla 7.7 Correlación de fármaco recuperado ciclofosfamida

Medio	Ecuación de la recta $y = mx + b$ Concentración 25 a 350 $\mu\text{g/mL}$	Coefficiente de correlación	IC (μ)	%CV recobro	%CV y/x
Amortiguador	1.0121x - 1.132	0.9994	99.15% - 102.00%	1.6930	1.9095
Placebo	1.0266x - 2.3005	0.9999	98.51% - 101.46%	1.5978	1.0009
IC β_0	-3.9495 a 8.5505		IC β_1	0.8188 a 1.2343	

En las gráficas 7.6 y 7.7 se presenta la relación concentración cuantificada en función de la concentración adicionada, observándose un comportamiento lineal, corroborando la linealidad del método en la disolución amortiguadora 6.5 y en el placebo.



Gráfica 7.6 Cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.5

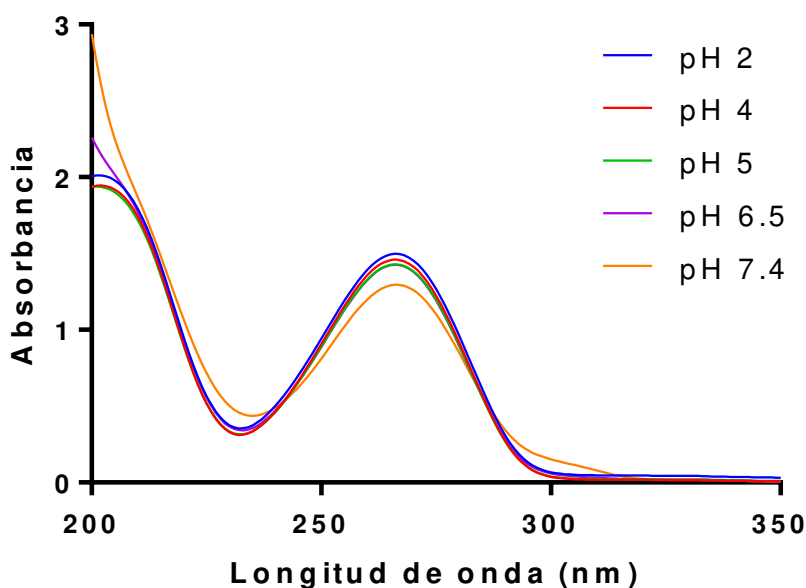


Gráfica 7.7 Cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para placebo

Conforme con los resultados presentados en la tabla 7.7 y en las gráficas 7.6 y 7.7 se asevera que cumple con todos los criterios establecidos para la linealidad del método. De acuerdo con los resultados obtenidos en este apartado, se acepta que el método es aplicable para el producto obtenido y es posible utilizar el mismo método para la cuantificación de ciclofosfamida en el polimerosoma y la evaluación de la cinética de liberación.

7.6.2 Fluorouracilo

En la gráfica 7.8 se presentan los espectros obtenidos para fluorouracilo a los diferentes valores de pH, se observa que son similares entre sí, las diferencias entre las absorbancias a pH 7.4 de los demás se deben a que, durante la preparación de las muestras, faltó una gota de la disolución estándar para la disolución a pH 7.4 por lo que se colocó una concentración menor a las otras preparaciones, a pesar de esta variación fue posible establecer la longitud de absorción máxima en 266 nm para el espectrofotómetro UV - VIS.



Gráfica 7.8 Determinación de la longitud de absorción máxima para fluorouracilo (266 nm)

Una vez obtenida la longitud de onda de trabajo, se procedió a realizar las curvas de calibración en la disolución amortiguadora de fosfatos pH 5 y en agua con placebo para evaluar el comportamiento. Al observar que las curvas presentan un comportamiento lineal y ninguna interferencia por parte de los componentes de la formulación, se procedió a validar el método de acuerdo con la finalidad del mismo, siguiendo lo establecido en la guía de validación de métodos analíticos del colegio de QFB; de acuerdo con este propósito se determinaron los siguientes estadígrafos: precisión y linealidad del sistema, exactitud y repetibilidad, especificidad y finalmente linealidad y precisión del método (García et al., 2002).

En la tabla 7.8 se presentan los resultados para los parámetros de precisión y linealidad del sistema, en ella se observa que el coeficiente de variación para la

precisión del sistema es menor a 1.5 %, mientras que el valor de coeficiente de correlación es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero, por lo que como se mencionó anteriormente, de acuerdo con la guía de validación del colegio de QFB, para métodos fisicoquímicos las curvas preparadas cumplen con los criterios, por lo que aprueban tanto precisión como de linealidad del sistema (García et al., 2002).

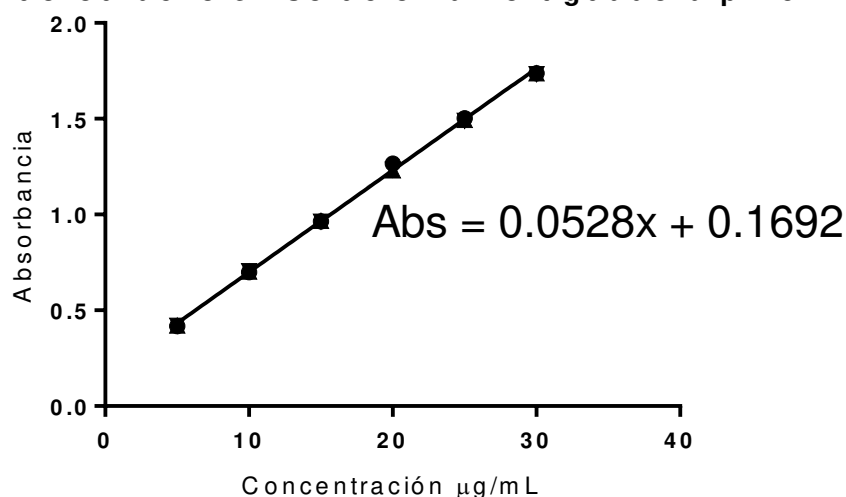
Tabla 7.8 Comparación de las curvas de calibración

Medio	Precisión* (CV%)	Ecuación de la recta $y = mx + b$ Intervalo de concentración 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$ 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$ placebo	Coefficiente de correlación
Amortiguador	0.4116	$\text{Abs} = 0.0528x + 0.1697$	0.999
Placebo	0.5208	$\text{Abs} = 0.0518x + 0.1859$	0.999
IC β_1 Buffer	0.0029 - 0.0031	IC β_1 Placebo	0.0488-0.0547

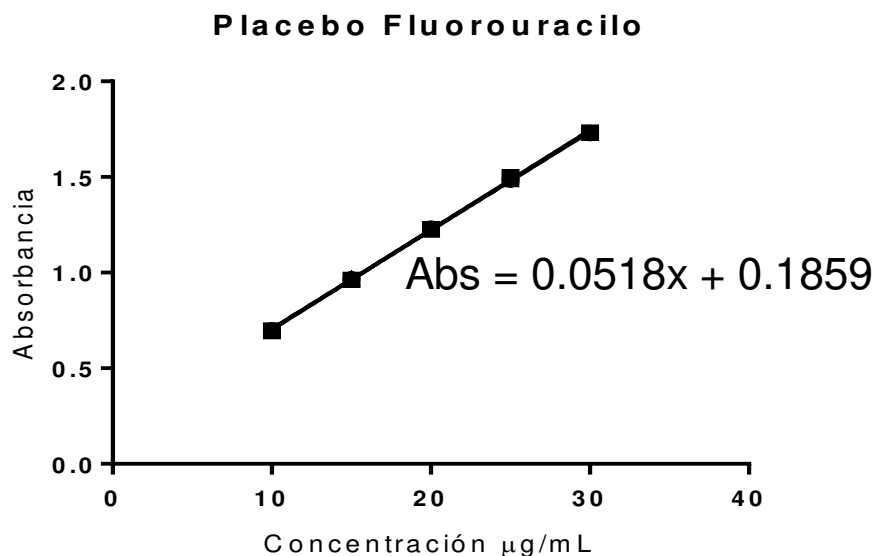
*determinada para el nivel de concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$

En las gráficas 7.9 y 7.10 se aprecia que las curvas de calibración presentan un comportamiento lineal en los intervalos de concentraciones propuestos aseverando que se cumple con la linealidad del sistema, en la disolución amortiguadora de fosfatos pH 5 y placebo respectivamente.

Fluorouracilo en solución amortiguadora pH 5



Gráfica 7.9 Curva de calibración en amortiguador pH 5 para fluorouracilo (266 nm)



Gráfica 7.10 Triplicado de curva de calibración en placebo para fluorouracilo (266 nm)

En la tabla 7.9 se presentan los resultados para los parámetros de exactitud y repetibilidad del método, se observa que el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor al 3% y el intervalo de confianza del promedio el cual indica las variaciones debidas a los errores de preparación de muestras, se observa que se encuentra entre el 97 -103 % e incluye el 100% del porcentaje cuantificado, estos resultados concuerdan con lo estipulado para los criterios de aceptación para métodos químicos o espectrofotométricos, demostrando que el método cumple, es exacto y reproducible de acuerdo con la guía de validación de QFB (García et al., 2002).

Tabla 7.9 Resultados de exactitud y repetibilidad fluorouracilo

Muestra	% Cuantificado	Intervalo de confianza IC (µ)
1	99.7325	99.5571 – 100.6505
2	99.8067	
3	100.2522	Promedio
4	100.4008	100.1038
5	100.9208	
6	99.5098	
%CV	0.5203	

En la tabla 7.10 se presentan los resultados para el estadígrafo de linealidad del método, para los criterios de la relación concentración adicionada y concentración

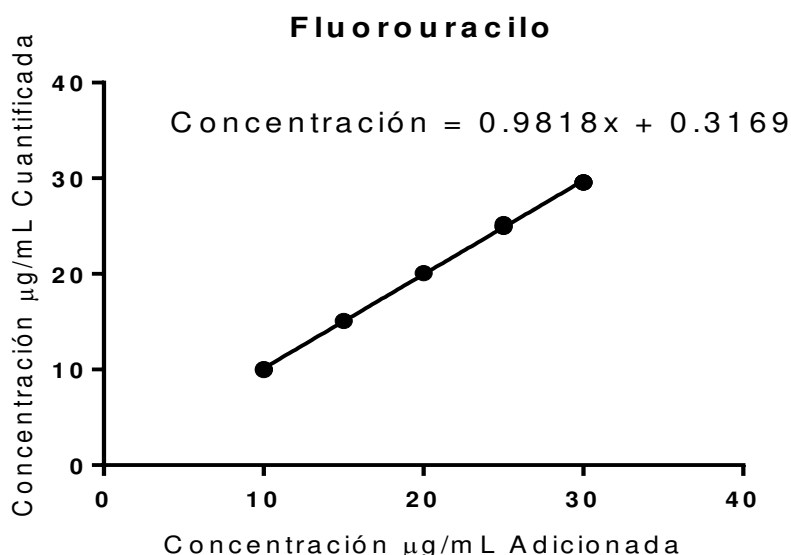
cuantificada, se observa que el coeficiente de correlación es mayor a 0.98, el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad, el intervalo de confianza para el intercepto incluye al cero y el coeficiente de variación es menor al 3%.

De forma adicional se observa que, para los criterios de porcentaje de recobro, el intervalo de confianza para la media se encuentra entre 97% -103% e incluye al 100% y el coeficiente de variación para el recobro es menor al 3%, todos los resultados presentados en la tabla 7.10 concuerdan con lo requerido para métodos químicos o espectrofotométricos, de acuerdo con la guía de validación del colegio de QFB por lo que se cumplen todos los criterios para la linealidad del método.

Tabla 7.10 Correlación de fármaco recuperado para fluorouracilo

Medio	Ecuación de la recta $y = mx + b$ Concentración 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$	Coeficiente de correlación	IC (μ)	%CV recobro	%CV y/x
Placebo	$0.9818x + 0.3169$	0.9995	99.49% - 100.38%	0.8005	0.8006
IC β_0	-1.4119 a 1.6207		IC β_1	0.9870 a 1.0173	

En la gráfica 7.11 se presenta la relación concentración cuantificada en función de la concentración adicionada observándose un comportamiento lineal, corroborando la linealidad del método en placebo.



Gráfica 7.11 Cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para placebo

El último estadígrafo evaluado para la validación, fue la precisión del método, en la tabla 7.11 se presentan los resultados obtenidos, observándose que el coeficiente de variación es menor al 3% lo que indica las variaciones por error del analista son aceptables, estos resultados concuerdan con lo estipulado para métodos químicos o espectrofotométricos por la guía de validación del colegio de QFB cumpliendo con precisión del método (García et al., 2002).

Tabla 7.11 Resultados de precisión del método fluorouracilo

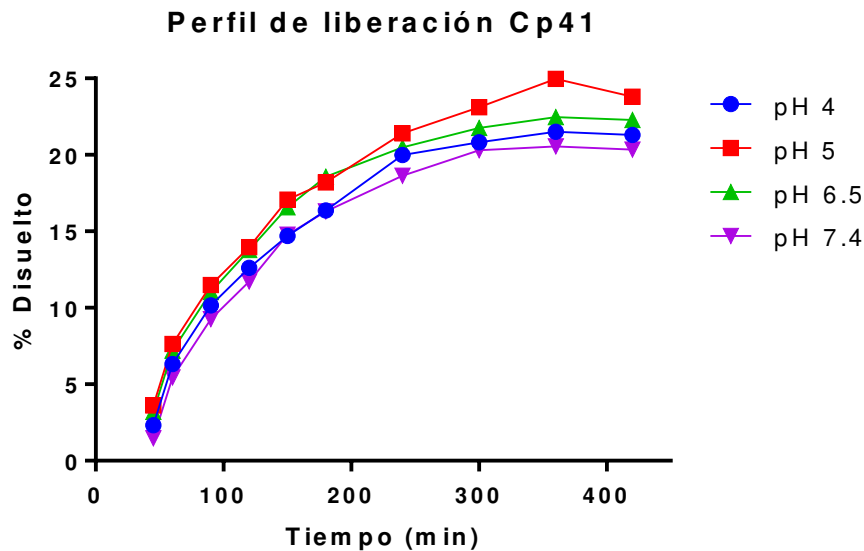
% Recuperado		ANALISTA			
		1	2	CV	Promedio
DÍA	1	99.3613 %	99.5841 %	0.8177 %	99.9059 %
		98.0986 %	100.4011 %		
		98.9899 %	100.0297 %		
	2	100.6239 %	100.6239 %	Desviación estándar 0.8169	
		99.5099 %	100.6239 %		
		100.2525 %	100.7724 %		

De acuerdo con los resultados obtenidos en este apartado, se acepta que el método cumple con la validación, es aplicable para el producto obtenido y es posible utilizar el mismo método para la cuantificación de fluorouracilo en el polimerosoma y la evaluación de la cinética de liberación.

7.7 Ensayo de liberación mediante la técnica de diálisis

7.7.1 Ciclofosfamida

En la gráfica 7.12, se muestra el promedio de las tres repeticiones para cada uno de los valores de pH evaluados en porcentaje del total liberado para ciclofosfamida de polimerosomas sintetizados con Cp 41 a partir de la membrana de diálisis. Se observa que el promedio del máximo porcentaje liberado se encuentra entre $21.9 \% \pm 1.5 \%$ en un periodo de 7 horas, el mayor porcentaje liberado corresponde a pH 5 y el menor a pH 7.4, con base en esto, se infiere que la composición del copolímero presenta mayor permeabilidad a pH 5 y menor permeabilidad del activo a pH 7.4.



Gráfica 7.12 Perfil de liberación de ciclofosfamida a los diferentes pH para el Cp 41

Un modelo matemático que describe el mecanismo de disolución/liberación es una ecuación planteada para intentar relacionar el porcentaje de fármaco disuelto en función del tiempo. Un modelo mecanicista o real es aquel en el que los parámetros que la constituyen surgen como resultado de un análisis teórico con base científica de los mecanismos implicados en el transporte de fármaco que tiene lugar (difusión, hinchamiento y erosión) (Iborra, 2008).

Conocer el modelo al que se ajustan los datos experimentales obtenidos de un perfil de disolución/liberación nos permite imaginar y comprender los mecanismos de transporte de fármaco que ocurren durante el proceso además de predecir los comportamientos cuantitativos de la cinética a través de la obtención de parámetros indicativos de acuerdo con cada modelo. Toda esta información permite caracterizar nuevas formulaciones y sistemas de liberación (Andreetta, 2003).

El promedio de las 4 curvas obtenidas en la gráfica 7.12 fue analizado aplicando a los resultados experimentales los modelos matemáticos de primer orden, Higuchi, Hixson – Crowell y Korsmeyer – Peppas (modelos mecanicistas).

En el modelo de primer orden se basa en el supuesto de que a medida que el fármaco no disuelto va disminuyendo, la disolución se va enriqueciendo de soluto y al ir incrementando la concentración se crea un gradiente el cual determina la velocidad a la que se realiza el proceso (Costa, 2001, Iborra, 2008).

El modelo de Higuchi es el más utilizado para describir la disolución/liberación de fármacos, el cual describe la disolución como un proceso de difusión basado en la ley de Fick, donde la transferencia del fármaco depende de la raíz cuadrada del tiempo (Costa, 2001, Fernández et al, 2009).

Hixon y Crowell propusieron un modelo para el ajuste de datos donde el área regular de la partícula es proporcional a la raíz cubica de su volumen, considerando que la forma geométrica se mantiene con el tiempo. Considerando que la velocidad de disolución se limita por la disolución de las partículas y no de la difusión a través de la matriz polimérica (Costa, 2001, Fernández et al, 2009).

En 1983 Korsmeyer y Peppas desarrollaron un modelo simple semi empírico relacionando exponencialmente la disolución dl fármaco con el tiempo transcurrido, y que puede seguir un comportamiento desviado de la ley de Fick. Este modelo intenta explicar mecanismos de disolución donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz (Costa, 2001, Fernández et al, 2009, Iborra, 2008)

El criterio más utilizado en el campo de identificación de modelos de disolución es el coeficiente de determinación ajustado (r^2 ajustado). Este se utiliza para discriminar el modelo más apropiado al comparar modelos con diferente número de parámetros, este a diferencia del coeficiente de determinación (r^2) no sólo se incrementa conforme mayor número de datos se ajustan al modelo, sino disminuye cuando ocurre un sobre ajuste, por lo que el mejor modelo será el que presente mayor r^2 ajustado, en la tabla 7.12 se presentan los resultados del ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos matemáticos, en donde se puede apreciar que los modelos que más se acercan a este criterio son Higuchi con un valor de r^2 ajustado = 0.8870 y Korsmeyer – Peppas con un r^2 ajustado = 0.8843 (Ferrando, 1996, Zhang et al., 2010a).

Tabla 7.12 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de ciclofosfamida Cp 41

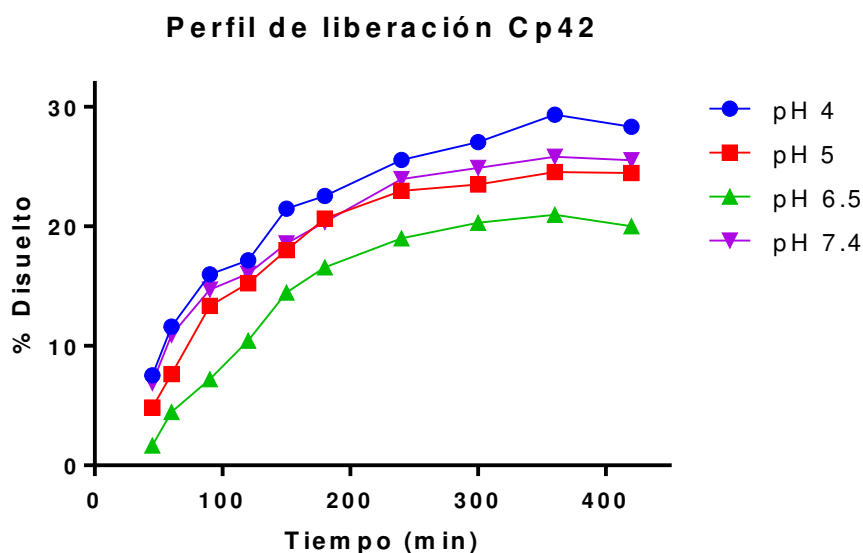
Criterio de Ajuste	Modelos cinéticos			
	1er Orden	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas
r^2 ajustado	0.7037	0.8870	0.6709	0.8843

Coeficiente de correlación (r^2)

En la gráfica 7.13 se muestran los resultados del mismo tratamiento para polimerosomas de Cp 42. Se observa que el máximo porcentaje liberado se encuentra

entre $24.59 \% \pm 3.46 \%$ en un periodo de 7 horas, el mayor porcentaje liberado corresponde a pH 4 y el menor a pH 6.5, con base en esto, se infiere que la composición del copolímero permite una mayor permeabilidad a pH 4 y una menor permeabilidad del activo a pH 6.5.

Los bajos porcentajes recuperados pueden deberse a los procesos de degradación, la literatura reporta que a temperaturas mayores a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, la ciclofosfamida monohidratada en disolución acuosa sufre procesos de hidrólisis, pérdida del ion cloruro o bien ambos procesos (Moffat et al., 2011). Se ha reportado que la degradación a estas condiciones sigue una cinética de primer orden, sin embargo no existen datos de la velocidad a la que se lleva a cabo dicho proceso en las condiciones trabajadas, sospechándose que el proceso de degradación se lleva a cabo a mayor velocidad que la liberación (García, 2009).



Gráfica 7.13 Perfil de liberación de ciclofosfamida a los diferentes pH para el Cp 42.

Al comparar las gráficas 7.12 y 7.13 se observa que la mayor permeabilidad se da a un pH más ácido en ambos casos y la menor permeabilidad a pH más cercano a un valor neutro.

La diferencia de comportamiento observadas en la liberación se deduce que está relacionada con las diferencias en peso molecular del copolímero y tamaño del polimerosoma, sin embargo, en ningún caso se observa un comportamiento pH dependiente, creciente o decreciente, por lo que se espera que el polimerosoma

responderá de forma similar dentro de las células cancerígenas, en su paso por el intestino y circulación sanguínea.

En la tabla 7.13 se presenta el análisis de ajuste de los resultados a los diferentes modelos matemáticos, en donde se puede apreciar que los datos experimentales presentan un ajuste a uno de mismos modelos que para Cp 41: Higuchi con un valor de r^2 ajustado = 0.9154.

Tabla 7.13 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de ciclofosfamida Cp 42

Criterio de Ajuste	Modelos Cinéticos			
	1er Orden	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas
r^2	0.5983	0.9154	0.5480	0.9052

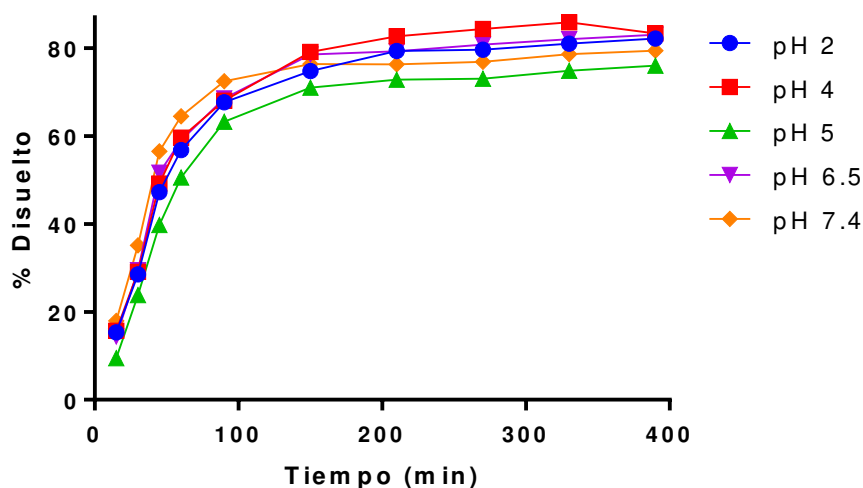
Coefficiente de correlación (r^2)

Por lo mencionado anteriormente, el modelo de Higuchi es el que se considera más adecuado para caracterizar el fenómeno de liberación. Este modelo se puede aplicar para describir diferentes tipos de formas farmacéuticas de liberación modificada. La ecuación que expresa este modelo es $F = K_H t^{1/2}$ donde F es la fracción de fármaco liberada, K_H es la constante de disolución de Higuchi y t = tiempo. Sustituyendo los valores para Cp 41 la ecuación toma la forma $F = 1.168_H t^{1/2}$ y para Cp 42 $F = 1.337_H t^{1/2}$ (Fernández et al., 2010).

7.7.2 Fluorouracilo

En la gráfica 7.14 se presenta el promedio de tres repeticiones para cada uno de los valores de pH evaluados en porcentaje del total liberado para fluorouracilo en polimerosomas sintetizados con Cp 41 a partir de la membrana de diálisis. Se observa que el máximo porcentaje liberado se encuentra entre 80.8052 % \pm 3.1016 % en un intervalo de 6.5 horas, el mayor porcentaje liberado corresponde a pH 4 y el menor a pH 5, con base en esto, se infiere que la composición del copolímero permite una mayor permeabilidad a pH 4 y una menor permeabilidad del activo a pH 5.

Cinética de liberación Cp41



Gráfica 7.14 Perfil de liberación de fluorouracilo a los diferentes pH para el Cp 41.

El promedio de las 5 curvas obtenidas fue analizado aplicando a los resultados experimentales los mismos modelos matemáticos que para ciclofosfamida. El análisis de ajuste de los resultados a los diferentes modelos matemáticos se presenta en la tabla 7.14 en donde se observa que los datos experimentales se ajustan a uno de los mismos modelos que para Cp 41 cargado con ciclofosfamida: Korsmeyer – Peppas (r^2 ajustado = 0.8081)

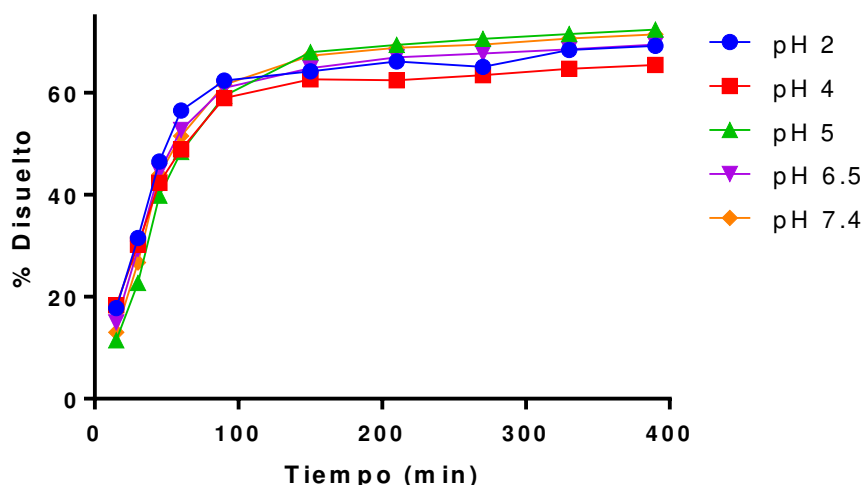
Tabla 7.14 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de fluorouracilo Cp 41

Criterio de Ajuste	Modelos Cinéticos			
	1er Orden	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas
r^2 ajustado	0.7512	0.6509	0.6094	0.8081

Coeficiente de correlación (r^2)

En la gráfica 7.15 se muestra el mismo tratamiento para Cp 42. Se observa que el promedio del máximo porcentaje liberado se encuentra entre $69.6121\% \pm 2.6709\%$ en un intervalo de 6.5 horas, el mayor porcentaje liberado corresponde a pH 5 y el menor a pH 4, con base en esto, se infiere que la composición del copolímero permite una mayor permeabilidad a pH 5 y una menor permeabilidad del activo a pH 4.

Cinética de liberación Cp42



Gráfica 7.15 Perfil de liberación de fluorouracilo a los diferentes pH para el Cp 42.

Al comparar las gráficas 7.14 y 7.15 se observa que el comportamiento no sigue un patrón claro dependiente del aumento de pH por lo que se espera respuesta de forma similar en el tracto gastrointestinal, dentro de la célula cancerígena y en la circulación sanguínea.

El análisis de ajuste de los resultados a los diferentes modelos matemáticos se muestra en la tabla 7.15 en donde se puede apreciar que los datos experimentales presentan el mejor ajuste al mismo modelo que para Cp 42 de fluorouracilo:

Korsmeyer - Peppas (r^2 ajustado = 0.9235 y AIC = 58.7094)

Tabla 7.15 Ajuste de datos a modelos matemáticos de la cinética de liberación de fluorouracilo Cp 42

Criterio de Ajuste	Modelos Cinéticos			
	1er Orden	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas
r^2	0.2960	0.5508	0.0312	0.7999

Coefficiente de correlación (r^2)

Para el caso de fluorouracilo el modelo de Korsmeyer - Peppas es considerado el más adecuado para caracterizar el fenómeno de liberación. Este modelo se considera como la forma generalizada de la ecuación de Higuchi para incluir los casos donde el comportamiento se desvía de la ley de Fick. La ecuación para este modelo se expresa como: $F = K \cdot t^n$ donde F es la fracción de fármaco liberada, K es la constante de velocidad de que incorpora características estructurales y geométricas del sistema,

n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso y t = tiempo en minutos. Sustituyendo los valores obtenidos las ecuaciones toman la forma $F = 13.454 \cdot t^{0.318}$ para Cp 41 y para Cp 42 $F = 13.342 \cdot t^{0.293}$ (Andreetta, 2008, Fernández et al, 2009).

La interpretación del exponente de difusión de Fick se realiza de acuerdo con lo presentado en la tabla 7.16, los valores de exponente de liberación obtenidos para Cp 41 y 42 presentan valores por debajo de 0.43 por lo que el tipo de mecanismo de transporte por el que liberan el fármaco sigue una difusión fickiana, la velocidad como función del tiempo sigue la forma $t^{1/2}$, indicando que la disolución se realiza siguiendo la ley de Fick de forma predominante. En conjunto la interpretación de los parámetros indica el aporte de transporte fickiano y permeabilidad de las cadenas (hinchamiento) debido a las bajas temperaturas de transición vítrea.

Tabla 7.16 Interpretación de mecanismos de liberación a partir de películas poliméricas

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte	Velocidad como función del tiempo
0.43	Difusión fickiana	$t^{1/2}$
$0.43 < n < 0.85$	Desviación de Fick	t^{n-1}
0.85	Transporte caso II	Liberación de orden cero

Modificado de Andreetta 2008 y Costa 2001

Con base en los resultados obtenidos, en los 2 últimos apartados se infiere que los polimerosomas desarrollados presentan un comportamiento cinético que sigue el modelo Higuchi para ciclofosfamida y de Korsmeyer – Peppas para fluorouracilo, sin embargo, el fundamento cinético es similar, ya que se observa aporte del proceso fickiano para ambos fármacos y un indicativo mayor de relajación de las cadenas poliméricas para fluorouracilo. Esta variación puede deberse a que el fluorouracilo se intercala en la membrana polimérica de la vesícula y no sólo en el interior.

En la última década diversos investigadores han utilizado diversos copolímeros cargados con doxorubicina como fármaco modelo, en 2005 Du et al utilizaron un copolímero de poli-metacriloxi-etilfosforilcolina y poli-diisopropilamino-etilmetacrilato con el que obtuvieron una eficiencia de carga 16% adicionado después de la preformación de las vesículas con un tamaño de 115 nm, no se evaluó el modelo cinético, sin embargo, se obtuvo una máxima liberación de 35 % a 7 horas en amortiguador salino, pH 7.5 a 20 °C (Du et al., 2005).

Por su parte en 2006 Ghoroghchian et al, utilizaron un copolímero de poli óxido de etileno y policaprolactona evaluado a pH 5.5 y 7.4 a 37 °C observando una liberación inmediata de aproximadamente el 20% de la carga en las primeras 8 h y una liberación sostenida con una duración de hasta 10 días con un máximo de liberación de 75 % a pH 5.5 y 50 % a pH 7.4 (Ghoroghchian et al., 2006). Zheng et al., en 2009 utilizaron un copolímero de poli etilenglicol y polietilpara-aminobenzoato obteniendo polimerosomas de 305 nm con una eficiencia de carga del 87.2 %, la cinética de liberación mostró que la modificación de la pendiente de liberación se da a las 10 horas con un 60 % y una liberación sostenida durante 20 horas más, alcanzando un máximo de 70 % (Zheng et al., 2009).

Chen y colaboradores en 2010 emplearon un copolímero de poli etilenglicol y politrimetoxibenzildepentaeritrol- carbonato obteniendo polimerosomas de 1000 nm con una capacidad máxima de carga de 26.2 %, con un comportamiento de liberación inmediata durante las primeras 12 horas y sostenida durante los siguientes 4 días, obteniéndose un máximo de 90 % a pH 4, 75 % a pH 5 y 35 % a pH 7.4, con un comportamiento dependiente del pH (Chen et al., 2010).

Sanson et al en 2010 desarrollaron un copolímero de poli-trimetilen-carbonato y poliácido-glutámico obteniendo un 47 % de capacidad de carga, con 168 nm de tamaño de partícula obteniendo la modificación de la pendiente a las 6 horas y liberación sostenida hasta las 24 horas con un comportamiento de incremento de la liberación dependiente de la temperatura y pH mostrando los mejores resultados a 37 °C y pH 5.5 (Sanson et al., 2010).

A pesar de no presentar un modelo cinético en sus evaluaciones, los resultados de los diversos investigadores muestran que la composición del copolímero es el responsable de la modificación de la liberación. Los resultados obtenidos para el copolímero estudiado, demuestran que a pH entre 4 y 5 se obtiene una mayor liberación, lo que concuerda con la información recabada, sin embargo, la duración de la liberación es significativamente menor comparado con otros copolímeros y las cantidades máximas liberadas son similares; su capacidad de carga es superior a la mayoría de los copolímeros revisados, así como un tamaño de partícula micrométrico en lugar de

nanométrico como los reportados en los artículos citados, debido a esto no es posible una comparación completa.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que los polimerosomas sintetizados presentan características que permiten establecer generalidades para la familia del copolímero de PAA – PBA. Se demostró la capacidad de carga de fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas y su posterior liberación lo cual los convierte en una opción prometedora para la administración de diversos principios activos e incluso de forma simultánea. De manera adicional, se cuenta con información sobre la morfología y tamaño, características que pueden ser utilizadas para estudiar la funcionalización de los polimerosomas mediante la adición de algún agente o su utilización para activos con otros fines terapéuticos.

8. Conclusiones

- Se determinó que los copolímeros de PAA-PBA Cp 39, Cp 41, Cp 42 y Cp 44 presentan la capacidad de formación de polimerosomas.
- Se incorporó a los polimerosomas los fármacos modelo ciclofosfamida y fluorouracilo, obteniéndose tamaños de partícula de 8 a 9 μm , una capacidad de carga aproximada de 59 % para ciclofosfamida y 71 a 79 % para fluorouracilo.
- Se verificó la aplicabilidad del método analítico mediante CLAR para la de ciclofosfamida, se diseñó y validó el método por espectroscopia para fluorouracilo con el fin de cuantificar el activo cargado y el porcentaje liberado.
- Se determinó que la cinética de liberación de los activos antineoplásicos (ciclofosfamida y fluorouracilo) sigue un mecanismo de difusión fickiano, el modelo de Higuchi y un máximo disuelto de $24.59 \% \pm 3.46 \%$ para ciclofosfamida y el modelo de Korsmeyer – Peppas con un máximo disuelto de $80.05 \% \pm 3.10 \%$ para fluorouracilo.

9. Perspectivas

Los objetivos para este trabajo se cumplieron, sin embargo, quedan líneas de acción futura que lo pueden complementar:

- a) Optimizar el dispositivo y el flujo para obtener polimerosomas de menor tamaño para su administración intravenosa.
- b) Evaluar la velocidad de degradación de la ciclofosfamida en las condiciones trabajadas para predecir la liberación de los fármacos hidrofílicos
- c) Realizar una evaluación cinética con una diálisis previa de los polimerosomas.
- d) Estudiar el tipo de moléculas que pueden incrustarse en la membrana para mejorar su funcionalidad
- e) Realizar la evaluación de la efectividad en líneas celulares.

10. Referencias bibliográficas

- AHMED, F., PAKUNLU, R. I., BRANNAN, A., BATES, F., MINKO, T. & DISCHER, D. E. 2006. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of Controlled Release*, 116, 150-158.
- ANSETH, K. S., SCOTT, R. A. & PEPPAS, N. A. 1996. Effects of Ionization on the Reaction Behavior and Kinetics of Acrylic Acid Polymerizations. *Macromolecules*, 29, 8308-8312.
- ANDREETTA, H. A. 2003. Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22, 355-364.
- BERTRAM, G. 2005. Katzung. *Farmacología Básica y Clínica. Ed. Manual Moderno*. 954-956, 960
- BRUNTON, L. L. 2012. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica (12a*, McGraw Hill Mexico. 1323-1328, 1340-1344
- CARRERA, M., ROMERO, A., VILLEGAS, M., PARENTIS, M. & GONZO, E. Obtención de la tensión superficial mediante el método de Du Nouy y el método de la gota pendiente. 25-36
- COSTA, P. & LOBO, J. M. S. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13, 123-133.
- COUSTET, M. E. 2014. *Síntesis y propiedades de copolímeros en bloque constituidos por bloques hidrofílico-hidrofóbico*. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata, Argentina 1-8
- CRUZ RUIZ, G. 2009. *Desarrollo de polimerosomas como sistemas de liberación controlada de un agente antitumoral*. Maestría en Ciencias Farmaceuticas, Universidad Autonoma Metropolitana UAM. 7-8, 26, 38, 50-56
- CUADROS-MORENO, A., PIMENTEL, R. C., MARTÍNEZ, E. S. M. & FERNANDEZ, J. Y. 2014. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8, 14.

- CHEN, W., MENG, F., CHENG, R. & ZHONG, Z. 2010. pH-Sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: A comparative study with micelles. *Journal of Controlled Release*, 142, 40-46.
- CHIANG, W.-H., HUANG, W.-C., CHANG, C.-W., SHEN, M.-Y., SHIH, Z.-F., HUANG, Y.-F., LIN, S.-C. & CHIU, H.-C. 2013. Functionalized polymersomes with outlayered polyelectrolyte gels for potential tumor-targeted delivery of multimodal therapies and MR imaging. *Journal of Controlled Release*, 168, 280-288.
- DISCHER, D. E. & AHMED, F. 2006. Polymersomes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 323-341.
- DISCHER, D. E., ORTIZ, V., SRINIVAS, G., KLEIN, M. L., KIM, Y., CHRISTIAN, D., CAI, S., PHOTOS, P. & AHMED, F. 2007. Emerging applications of polymersomes in delivery: From molecular dynamics to shrinkage of tumors. *Progress in Polymer Science*, 32, 838-857.
- DU, J., TANG, Y., LEWIS, A. L. & ARMES, S. P. 2005. pH-Sensitive Vesicles Based on a Biocompatible Zwitterionic Diblock Copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 17982-17983.
- DU, Y., CHEN, W., ZHENG, M., MENG, F. & ZHONG, Z. 2012. pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. *Biomaterials*, 33, 7291-7299.
- ERFANI-MOGHADAM, V., NOMANI, A., ZAMANI, M., YAZDANI, Y., NAJAFI, F. & SADEGHIZADEH, M. 2014. A novel diblock of copolymer of (monomethoxy poly [ethylene glycol]-oleate) with a small hydrophobic fraction to make stable micelles/polymersomes for curcumin delivery to cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 9, 5541.
- FERNÁNDEZ, J. A., SANTOS, R. G. & ESTEVES, G. F. 2010. Estudio in vitro de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto Study in vitro of delivery drug from a compound biomaterial. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41, 1-8.

FERNÁNDEZ, J. A., SANTOS, R. G., GUERRA, N. B. & VALDÉS, L. O. 2009.

Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 10, 119-130.

FERRANDO, P. J. 1996. Evaluación de la unidimensionalidad de los ítems mediante análisis factorial. *Psicothema*, 8, 397-410.

FISHER SCIENTIFIC. 2006. Fisher surface tensiometer model 21. Dubuque, Iowa

FÖRSTER, S. & BORCHERT, K. 2005. Polymer vesicles. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 1-3, 13-15

GARCÍA, M., SOBERÓN, E., CORTÉS, M., RODRÍGUEZ, R., HERRERA, J., ALCÁNTARA, A., CHÁRVEL, A., MOTA, R. & GARZÓN, A. 2002. Guía de validación de métodos analíticos. *Colegio Nacional de Químicos Biólogos México, AC México*. 4-9, 23-27

GARCÍA, M. C. L. 2009. *Modelado farmacocinético de ciclofosfamida*. Yesis de Doctorado, Universidad de Valencia. España. 16-17

GEOGRAFÍA, I. I. N. D. E. Y. 2013. *Boletín de Estadísticas vitales 2011* [Online].

Available:

<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aProposito.asp?s=inegi&ep=185&c=2939> [15-Dic-15].

GHOROGHCHIAN, P. P., LI, G., LEVINE, D. H., DAVIS, K. P., BATES, F. S., HAMMER, D. A. & THERIEN, M. J. 2006. Bioresorbable Vesicles Formed through Spontaneous Self-Assembly of Amphiphilic Poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone. *Macromolecules*, 39, 1673-1675.

GÓMEZ-GAETE, C. 2014. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. 7, 12

HAMLEY, I. W. 2003. Nanostructure fabrication using block copolymers.

Nanotechnology, 14, R39-R54.

IBORRA, M. T. V. 2008. *Desarrollo Galénico de preparados obtenidos por interacción del Ácido 5-amino salicílico con Halloysita*. Tesis de Doctorado, Universidad de Granada. España. 9-27

INEGI, I. N. D. E. Y. G. 2016. *Estadísticas a proposito del día del cáncer* [Online].

Available:

http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf [15-Dic-15].

- ISO 2007. ISO 14488:2007 Particulate materials - Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties. 1-3
- ISO 2009. ISO 13320:2009 Particle Size Analyses; Laser Diffraction Methods. Part 1: General Principles. 1-3
- JAIN, J. P., AYEN, W. Y. & KUMAR, N. 2011. Self assembling polymers as polymersomes for drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 65-79.
- JAIN, J. P. & KUMAR, N. 2010. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 456-465.
- KALANT, H. 2012. *Principios de Farmacología Médica*, México, Oxford University Press. 757-763
- KRONBERG, B., HOLMBERG, K., LINDMAN, B., YTOR, S. P. K. M. O., FORSKNINGSINSTITUT, S. P. S. T. & RISE 2014. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*, GB, John Wiley & Sons Inc. 1-4, 234-236, 247-248
- KWON, G. S. 2002. Block copolymer micelles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 167-167.
- LALE, S. V., KUMAR, A., PRASAD, S., BHARTI, A. C. & KOUL, V. 2015. Folic Acid and Trastuzumab Functionalized Redox Responsive Polymersomes for Intracellular Doxorubicin Delivery in Breast Cancer. *Biomacromolecules*, 16, 1736-1752.
- LEE, J. S. & FEIJEN, J. 2012. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. *Journal of controlled release*, 161, 473-483.
- LEVINE, D. H., GHOROGHCHIAN, P. P., FREUDENBERG, J., ZHANG, G., THERIEN, M. J., GREENE, M. I., HAMMER, D. A. & MURALI, R. 2008. Polymersomes: a new multi-functional tool for cancer diagnosis and therapy. *Methods*, 46, 25-32.
- LIN, R. & CUI, H. 2015. Supramolecular nanostructures as drug carriers. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 7, 75-83.

- LIU, G., MA, S., LI, S., CHENG, R., MENG, F., LIU, H. & ZHONG, Z. 2010. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes. *Biomaterials*, 31, 7575-7585.
- LIU, R. H., STREMLER, M. A., SHARP, K. V., OLSEN, M. G., SANTIAGO, J. G., ADRIAN, R. J., AREF, H. & BEEBE, D. J. 2000. Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 9, 190-197.
- LORENCEAU, E., UTADA, A. S., LINK, D. R., CRISTOBAL, G., JOANICOT, M. & WEITZ, D. A. 2005. Generation of Polymerosomes from Double-Emulsions. *Langmuir*, 21, 9183-9186.
- MENG, F., HIEMSTRA, C., ENGBERS, G. H. M. & FEIJEN, J. 2003. Biodegradable Polymerosomes. *Macromolecules*, 36, 3004-3006.
- MENG, F., ZHONG, Z. & FEIJEN, J. 2009. Stimuli-responsive polymerosomes for programmed drug delivery. *Biomacromolecules*, 10, 197-209.
- MENGER, F. M. & ANGELOVA, M. I. 1998. Giant Vesicles: Imitating the Cytological Processes of Cell Membranes. *Accounts of Chemical Research*, 31, 789-797.
- MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D., WIDDOP, B. & WATTS, J. 2011. *Clarke's analysis of drugs and poisons*, Pharmaceutical Press. 1182-1183, 1422
- MORÓN RODRÍGUEZ, F., BORROTO REGALADO, R., CALVO BARBADO, D., CIRES PUJOL, M., CRUZ BARRIOS, M. & FERNÁNDEZ GARCÍA, A. 2009. Farmacología clínica. *La Habana: Editorial Ciencias Médicas*, 426.
- MURRAY, S. & SPIEGEL, M. 1994. Probabilidad y estadística. *Méjico: Mc. Graw Hill*. 84-86
- NOGUEZ MENDEZ, N. 2015. *Estudio Comparativo de la Capacidad de Transporte de Oxígeno de una Célula Artificial a partir de Polimerosomas*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 26-28, 31-32, 36-37, 57, 65-71, 78
- OLIVEIRA, H., PÉREZ-ANDRÉS, E., THEVENOT, J., SANDRE, O., BERRA, E. & LECOMMANDOUX, S. 2013. Magnetic field triggered drug release from polymerosomes for cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 169, 165-170.

- OMS. 2005. *Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for the who model list of essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms. Working document QAS/04.109/Rev.1* [Online]. Available:
http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_109Rev1_Waive_invivo_bioequiv.pdf [Accessed 02 Junio 2015].
- ONACA, O., ENEA, R., HUGHES, D. W. & MEIER, W. 2009. Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *Macromolecular bioscience*, 9, 129-139.
- PASQUALI, R. C., CHIAPPETTA, D. A. & BREGNI, C. 2005. Los copolímeros en bloques anfifílicos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta farmacéutica bonaerense*, 24, 610.
- PRATTEN, M. K., LLOYD, J. B., HÖRPEL, G. & RINGSDORF, H. 1985. Micelle-forming block copolymers: Pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes. *Die Makromolekulare Chemie*, 186, 725-733.
- QIAO, Z.-Y., JI, R., HUANG, X.-N., DU, F.-S., ZHANG, R., LIANG, D.-H. & LI, Z.-C. 2013. Polymersomes from Dual Responsive Block Copolymers: Drug Encapsulation by Heating and Acid-Triggered Release. *Biomacromolecules*, 14, 1555-1563.
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J., CHÉCOT, F., GNANOU, Y. & LECOMMANDOUX, S. 2005. Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. *Progress in Polymer Science*, 30, 691-724.
- ROSEN, M. J. 2004. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, US, Interscience. 1-6, 105-110
- SALUD, O. O. M. D. L. 2015a. *Cáncer* [Online]. Available:
<http://www.who.int/cancer/en/#> [Accessed 24 mayo 2015].
- SALUD, O. O. M. D. L. 2015b. *Cáncer Definición* [Online]. Available:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [24-May-15].
- SALUD, O. O. M. D. L. 2015c. *Citotóxicos (antineoplásicos)* [Online]. Available:
<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/12.2.html#> [24-May-15].

- SALUD, S. D. 2014. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11. Ed.*, México: , Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2789-2796
- SALUD., O. O. P. D. L. 2014b. *Manejo Integrado de Enfermedades: Cáncer* [Online]. Available:
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=1866&Itemid=3904 [24-May-15].
- SANSON, C., SCHATZ, C., LE MEINS, J.-F., SOUM, A., THÉVENOT, J., GARANGER, E. & LECOMMANDOUX, S. 2010. A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. *Journal of Controlled Release*, 147, 428-435.
- SILVERTHORN, D. U. 2008. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*, Argentina Dee Unglaub, Editorial Médica Panamericana. 502-503
- SOCIETY, A. C. 2014. *Tratamientos contra el cáncer* [Online]. Available:
<http://www.cancer.org/espanol/servicios/comohablarsobrecancer/fragmentado/cuando-alguien-en-su-trabajo-tiene-cancer-questions-and-answers-about-cancer-treatment> [24-May-15].
- STANIER, R. Y. & VILLANUEVA, J. R. 1996. *Microbiología*, Reverté. 39-41
- STEWART, B. & WILD, C. P. 2014. World cancer report 2014. 16-20
- UPADHYAY, K. K., BHATT, A. N., CASTRO, E., MISHRA, A. K., CHUTTANI, K., DWARAKANATH, B. S., SCHATZ, C., LE MEINS, J. F., MISRA, A. & LECOMMANDOUX, S. 2010. In vitro and in vivo evaluation of docetaxel loaded biodegradable polymersomes. *Macromolecular bioscience*, 10, 503-512.
- USP 2011. General Chapter <429>, "Light diffraction measurement of particle size. USP34. 1234
- YU, Y., PANG, Z., LU, W., YIN, Q., GAO, H. & JIANG, X. 2012. Self-Assembled Polymersomes Conjugated with Lactoferrin as Novel Drug Carrier for Brain Delivery. *Pharmaceutical Research*, 29, 83-96.

ZHANG, Y., HUO, M., ZHOU, J., ZOU, A., LI, W., YAO, C. & XIE, S. 2010a.

DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal*, 12, 263-271.

ZHANG, Y., WU, F., YUAN, W. & JIN, T. 2010b. Polymersomes of asymmetric bilayer membrane formed by phase-guided assembly. *Journal of Controlled Release*, 147, 413-419.

ZHENG, C., QIU, L. & ZHU, K. 2009. Novel polymersomes based on amphiphilic graft polyphosphazenes and their encapsulation of water-soluble anti-cancer drug. *Polymer*, 50, 1173-1177.

11. Anexos

Parte de este trabajo fue presentado como poster en el VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica Encuentro Nacional de Química Ambiental, bajo el nombre de **“Cuantificación de Fármacos Antineoplásicos en Sistemas de Liberación Modificada”** el cual se llevó a cabo en el Centro de Convenciones de Cancún, del 15 al 18 de noviembre de 2016.



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

La Red Iberoamericana de Química Analítica
a través de la Facultad de Química

Otorga la presente

Constancia

a

Xochitl Citlali Palomec Reyes, Norma Angélica Noguez Méndez, Abraham Faustino Vega,
Alejandro Rubio Martínez

por haber presentado el trabajo

Cuantificación de fármacos antineoplásicos en sistemas de liberación modificada

en el marco del

**VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y
Encuentro Nacional de Química Ambiental,**

celebrado del 15 al 18 de noviembre de 2016

Cancún, Quintana Roo; 18 de noviembre de 2016

Dr. en C. Carlos Eduardo Barrera Díaz
Director de la Facultad de Química



Dr. Jorge Javier Ramírez García
Presidente del Comité Organizador

CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

Xochitl Citlali Palomec Reyes ⁽¹⁾, Norma Angélica Noguez Méndez ^{(1)*}, Abraham Faustino Vega ⁽¹⁾, Alejandro Rubio Martínez ⁽²⁾

- 1) Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Ciudad de México C.P. 04960. México.
Tel. +52 (55) 5483 7000, ext. 7280, correo: citlali_xpr@yahoo.com; nanoguez@yahoo.com.mx; abrafave@gmail.com
- 2) Instituto Tecnológico de Querétaro, Departamento de Ciencias Básicas. Av. Tecnológico s/n, Col. Centro. Querétaro C.P. 76000. México
Tel. +52 (442) 227 44 00, correo: rumal65@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

Los amplios efectos tóxicos de los principales agentes antineoplásicos son el principal problema de la terapia contra el cáncer, la mayoría de estos están relacionados no sólo con los mecanismos de acción, sino también con las dosis y los esquemas de administración de los mismos [1]. La ciclofosfamida es un claro ejemplo ya que se administra en una dosis alta que va de 500 a 3500 mg/m² vía intravenosa u oral [2]. Esta pertenece a la familia de los alquilantes los cuales son los más utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, linfomas no hodgkinianos, cáncer de mama, leucemia y cáncer de ovario. Y sus efectos tóxicos incluyen esterilidad, leucemia aguda no linfocítica, mielosupresión, alopecia, náusea y vómitos [3].

Los sistemas de liberación modificada como los polimerosomas están siendo ampliamente estudiados como acarreadores de fármacos para disminuir la toxicidad al mejorar la forma de transporte y las concentraciones necesarias para su efecto terapéutico [4]. Los polimerosomas son vesículas artificiales formadas por bloques anfífilos de copolímeros sintéticos. Se conforman de una bicapa creada por la fracción hidrofílica del copolímero lo que resulta en un interior aislado del medio. Esta conformación permite una amplia versatilidad de encapsulación de moléculas [5].

La ciclofosfamida no presenta absorción significativa en el rango de 230 a 360 nm [6] sin embargo de acuerdo al método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) onceava edición [7] es posible su cuantificación a una longitud de onda de 195 nm. La matriz de los polimerosoma elaborados presentó interferencia para la cuantificación por UV requiriendo separación.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Esto se debe a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad a sustancias de interés en la industria incluyendo a la farmacéutica [8].

Al reducir la concentración incluida en un sistema de liberación modificada se hace necesario desarrollar métodos de cuantificación más confiables por lo que se requiere utilizar técnicas de cuantificación más avanzadas (CLAR) que nos proporcionen la sensibilidad adecuada para la cuantificación del fármaco contenido.

EXPERIMENTACIÓN

La síntesis del polimerosoma se realizó empleando la técnica de microfluidos con un dispositivo en T de vidrio con flujos convergentes y un flujo volumétrico aproximado de 1.5 mL/min.

El copolímero de ácido acrílico - butil acrilato (sintetizado en el laboratorio) se disuelve en una mezcla de Tetrahidrofurano: Tolueno (grado reactivo) (50:50) como fase orgánica, una solución de ciclofosfamida de 5 mg /ml en agua destilada como fase interna acuosa y una fase externa de (80: 20) glicerol (grado reactivo): agua en agitación constante. Al finalizar el proceso se colocó en un desecador a vacío para la evaporación de los solventes orgánicos. Para la determinación del tamaño de partícula se utilizó un analizador de distribución de tamaño de partícula por difracción de luz láser modelo LA-950 (Horiba Ltd. Japón).

Para la cuantificación de ciclofosfamida se utilizó el método por (CLAR) para disolución reportado en la onceava edición FEUM [7] al requerirse concentraciones por debajo de lo recomendado para la valoración. Se realizó la curva de calibración por separado en 3 medios: agua, buffer de fosfatos pH 6.5 y agua con placebo con el fin de determinar si presentaba alguna variación en función del medio.

Condiciones cromatográficas: equipo Agilent modelo 1260 equipado con un detector acoplado a diodos; columna C₁₈ (Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 4.6 x 50 mm, tamaño de partícula de 2.7 µm); fase móvil: acetonitrilo: agua (HPLC) (30:70); velocidad de flujo: 0.7 mL/min; volumen de inyección: 5 µL; temperatura: 20 °C; longitud de onda: 195 nm. Se preparo una solución stock de ciclofosfamida en agua con una concentración de 1000 µg/mL tomando alícuotas de 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3.5 mL llevando al aforo a 10 mL con agua para obtener una curva de calibración con un intervalo de concentraciones de 25 a 350 µg/mL con el fin de poder realizar la cuantificación del fármaco dentro del sistema y la cinética de liberación con el mismo método. Para la curva en buffer se sustituyo el agua por buffer de fosfatos pH 6.5 (fosfato dibásico de sodio – fosfato monobásico de sodio) de acuerdo a la FEUM pagina 174 [7]. A la curva con placebo se adicionó 0.5 mL del preparado sin activo a cada matraz. Para la valoración se utilizó una alícuota de 0.5 mL y se llevó al aforo a 10 mL con agua. Se filtro e inyectó en las mismas condiciones.

La evaluación de la cinética de liberación del activo a partir de los polimerosomas, se realizó utilizando una membrana de diálisis Spectra/Por de Spectrum Labs con tamaño de poro de 1 kDa cortadas en porciones de 120 mm de largo y cerradas por el extremo inferior con hilo cáñamo, colocando 10 mL de la solución de polimerosoma en su interior y cerrando el otro extremo de la misma forma. Una vez cerradas las membranas, se colocaron en el disolutor Vankel modelo VK 7000, utilizando vasos para disolutor Varian de 250 mL, con 200 mL de buffer de fosfatos a pH 4, 5, 6.5 y 7.4 (preparados de acuerdo a la FEUM), a 37 °C (± 0.5 °C) y con agitación a 50 rpm. El esquema de muestreo fue de: 45, 90, 150, 210, 270, 330, 450 y 570 min; para cada muestreo se tomaron 3 mL de alícuota con reposición de medio. Las alícuotas se filtraron con acrodisco e inyectaron en el cromatógrafo bajo las mismas condiciones que las curvas de calibración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Mediciones de tamaño de partícula

Medición	1	2	3	Promedio	Des. Est.	% CV
D ₁₀	3.4525	4.187	4.4983	4.04593333	0.53698162	13.2721323
D ₅₀	7.2904	7.7255	8.6215	7.87913333	0.6787188	8.61413009
D ₉₀	16.2275	14.6898	17.087	16.0014333	1.21448407	7.58984553

Para la determinación de tamaño de partícula existen actualmente dos guías aceptadas internacionalmente para el uso de la difracción láser la ISO 13320 [9,10] y USP<429> [11]. Ambos estándares establecen que las muestras deberán ser medidas al menos tres veces y la reproducibilidad debe estar de acuerdo con la guía que se siga. De acuerdo con los requerimientos de USP<429>, el coeficiente de variación para la medición deberá ser menor de 10 % para el D₅₀ y menos del 15% para D₁₀ y D₉₀. En la tabla 1 se observa que las mediciones cumplen con dichos requerimientos, al presentar coeficientes de variación menor de 10 % para el D₅₀ y menos del 15% para D₁₀ y D₉₀.

Tabla 2. Resultados de valoración

Medición	1	2	3	Promedio	Des. Est
Valoración	59.2376066 %	59.4048045 %	58.6388867 %	59.0937659 %	0.40270969 %

En la tabla 2 se presentan los resultados de las mediciones para la valoración de los sistemas, se observa que se obtiene una capacidad de carga del 59.4048 % con una desviación estándar de 0.4027 %. Al ser un copolímero de nueva introducción este resultado se considera dentro de la caracterización.

De acuerdo a la FEUM [7], los métodos analíticos de la misma no requieren ser validados, sino únicamente verificar su aplicabilidad al producto, bajo las condiciones de operación del laboratorio y en función de método analítico deseado. Por esta razón se verificaron los siguientes parámetros la precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema y linealidad del método.

Tabla 3. Comparación de las curvas de calibración

Medio	Precisión* (CV%)	Ecuación de la recta $y = mx + b$ Rango de concentración 25 a 350 $\mu\text{g/mL}$	Coefficiente de correlación
Agua	1.1681	$3858.9x + 24533$	0.9963
Buffer	0.9215	$3796.1x + 26242$	0.9972
Placebo	1.1379	$3852.3x + 21820$	0.9964

*determinada para el nivel de concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$

De acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos del colegio de QFB [12] el coeficiente de variación para la precisión debe ser menor a 1.5 % para métodos fisicoquímicos y el valor de r^2 para la linealidad del sistema debe ser ≥ 0.98 . En la tabla 3 se observa que todas las curvas preparadas cumplen con este criterio por lo que se considera que se cubren los parámetros de precisión del sistema y linealidad del sistema. En el gráfico 1 se asevera que la curva de calibración presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones propuesto.

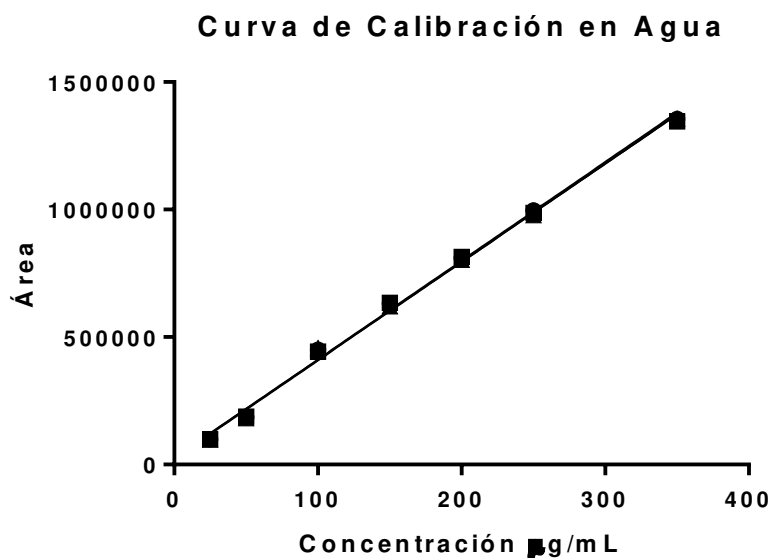


Gráfico 1. Triplicado de curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR (195 nm)

En los gráficos 2 y 3 se corrobora el comportamiento lineal de la curva de calibración preparada en Buffer de fosfatos pH 6.5 y placebo respectivamente.

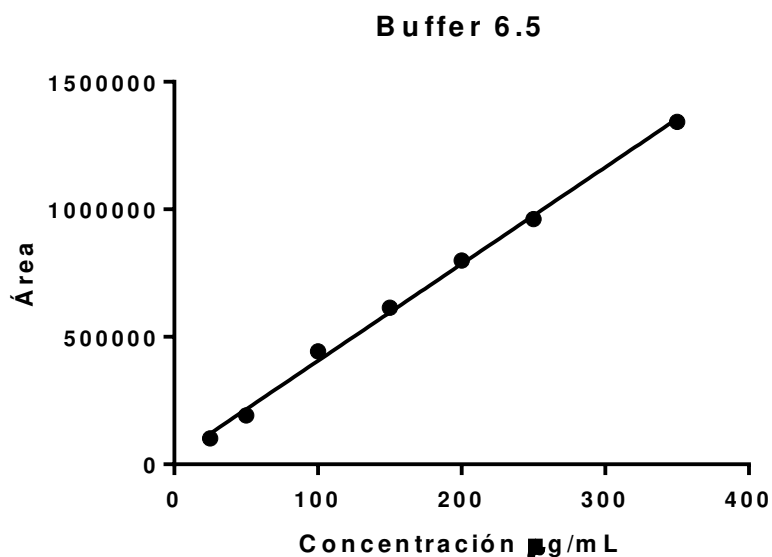


Gráfico 2. Curva de Calibración para ciclofosfamida por CLAR buffer fosfatos pH 6.5 (195 nm)

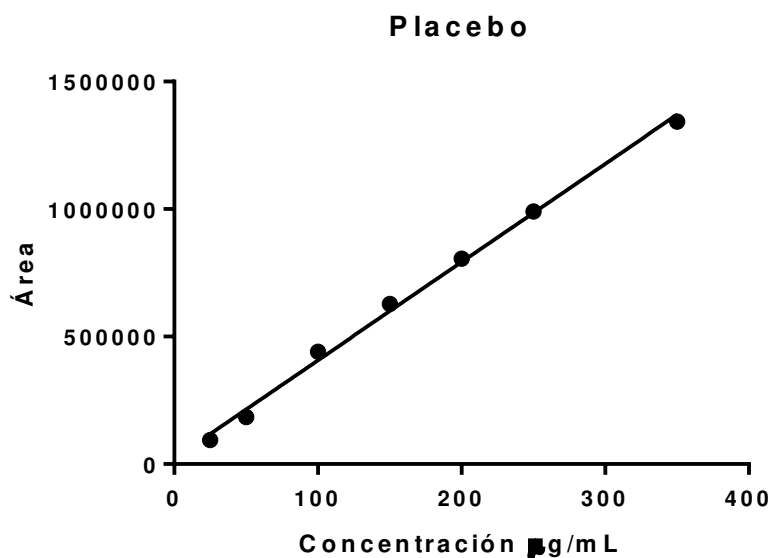


Gráfico 3. Curva de calibración para ciclofosfamida por CLAR en placebo cargado (195 nm)

Tabla 4. Adecuabilidad del sistema

Parámetro	%CV	T(Factor de coleo)	N (platos teóricos)	K (factor de capacidad)
Resultado	0.5942%	0.6759	695.7345	2.9535

Siguiendo los criterios de la guía de validación de QFB [12] para la adecuabilidad se consideran que se cumple si él %CV \leq 2, un factor de coleo menor a 2 y un factor de capacidad mayor a 2. Los resultados observados en la tabla 4 demuestran que se cumple con dichos criterios.

Por último para la linealidad del método se recomienda trazar la gráfica de la cantidad adicionada (X) vs la cantidad recuperada (Y) con la línea de ajuste y calcular el coeficiente de correlación. En los gráficos 4 y 5 se presentan dichas gráficas observando un comportamiento lineal.

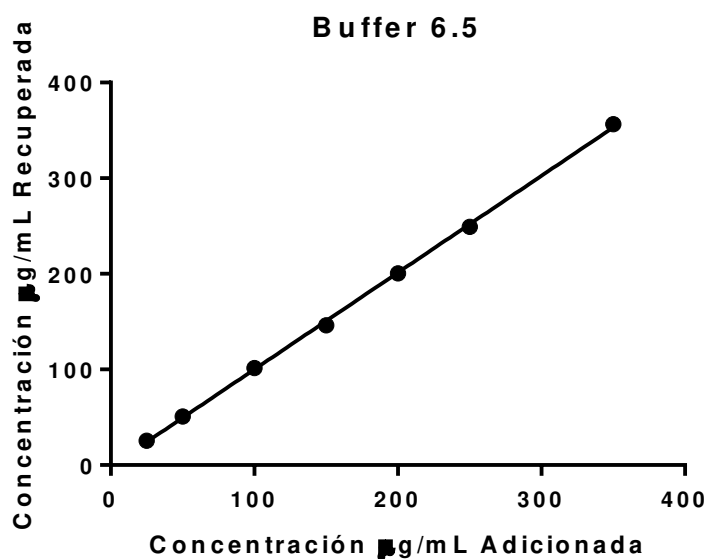


Gráfico 4. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para buffer

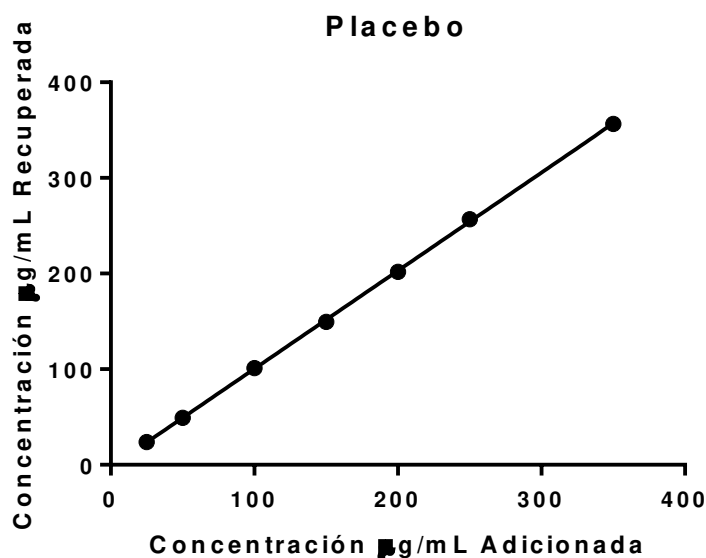


Gráfico 5. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada para placebo

Tabla 3. Correlación de fármaco recuperado

Medio	Ecuación de la recta $y = mx + b$ Concentración 25 a 350 $\mu\text{g/mL}$	Coefficiente de correlación	Intervalo de % recobro	%CV recobro	%CV y/x
Buffer	$1.0121x - 1.132$	0.9994	99.15% - 102.00%	1.6930	1.9095
Placebo	$1.0266x - 2.3005$	0.9999	98.51% - 101.46%	1.5978	1.0009

Los criterios de aceptación incluyen un coeficiente de correlación mayor a 0.98, un intervalo de recobro entre 98 y 102%, un %CV recobro menor a 2 y un %CV y/x menor a 2%. De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 3 se cumple con los criterios de linealidad del método.

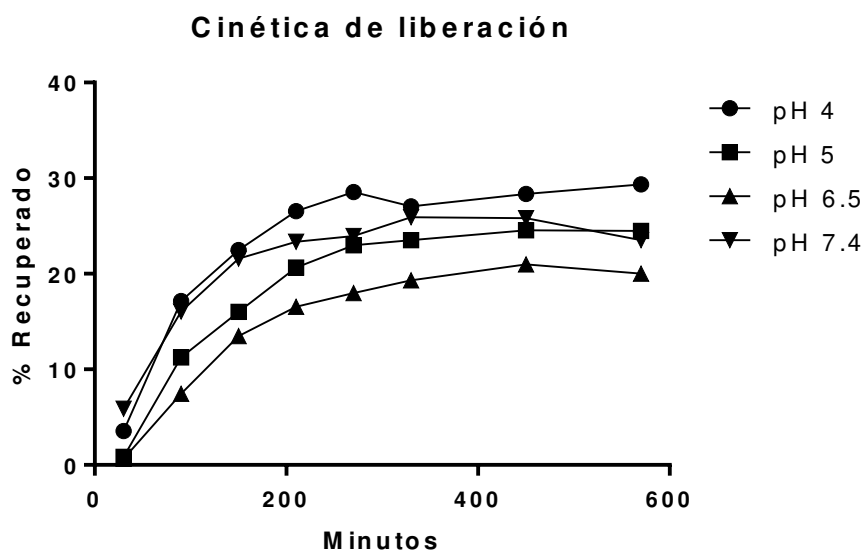


Gráfico 6. Perfil de liberación de ciclofosfamida a los diferentes pH.

En el gráfico 6 se observa que el mayor porcentaje liberado corresponde a pH 4 y el menor a pH 6.5 en base a esto se deduce que la composición del polímero permite a la ciclofosfamida mayor permeabilidad a pH 4 y una menor permeabilidad a pH 6.5. El máximo porcentaje liberado corresponde a 29.33% estos porcentajes tan pequeños pueden deberse a que el fármaco se hidroliza a temperaturas por encima de los 30 °C. La cinética de liberación presenta un comportamiento que sigue el modelo de Korsmeyer -Peppas con un cambio de pendiente a los 270 minutos. Por lo que el proceso de liberación depende del proceso de relajación de las cadenas poliméricas.

CONCLUSIONES

El método desarrollado para la cuantificación de ciclofosfamida en un sistema de liberación modificada (polimerosoma) permitió la cuantificación adecuada y confiable obteniéndose resultados característicos del comportamiento del sistema.

REFERENCIAS

- [1] OMS (2015) Organización Mundial de la Salud Cáncer Definición. Disponible en línea en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Consulta: 24 mayo 2016
- [2] Kalant H. Principios de Farmacología Médica Sexta ed. México: Oxford University Press; 2012. 956 p.
- [3] OMS (2015) Organización Mundial de la Salud. Citotóxicos (antineoplásicos) . Disponible en línea en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/12.2.html#>. Consulta: 24 mayo 2016
- [4] Levine DH, Ghoroghchian PP, Freudenberg J, Zhang G, Therien MJ, Greene MI, et al. Polymersomes: a new multi-functional tool for cancer diagnosis and therapy. *Methods*. 2008;46(1):25-32.
- [5] Lee, J. S. & Feijen, J. 2012. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. *Journal of controlled release*, 161, 473-483.

Memorias in extenso del VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental. Editadas por la Facultad de Química de la UAEMex. México. 2016.

[6] Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B. & Watts, J. 2011. *Clarke's analysis of drugs and poisons*, Pharmaceutical Press.

[7] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11a Ed. tomos I y II, México (2014).

[8] Skoog, D. A., Holler, F., Stanley, R. D. A., Aucejo, M., Estellés, A., Hernández, M. H., Aucejo, R. M., Estellés, M. L., Hernández, R. H. & Alonso, S. 2008. *Principios de análisis instrumental*, Cengage Learning.

[9] ISO 13320:2009 Particle Size Analyses; Laser Diffraction Methods. Part 1: General Principles (2009)

[10] ISO 14488:2007 Particulate materials - Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties.

[11] USP34, 2011, General Chapter <429>, "Light diffraction measurement of particle size: pp 161.

[12] Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México (2002).