



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**Proyecto genérico correspondiente:**

**Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos  
y productos biológicos**

Diseño y desarrollo de formas farmacéuticas

**Informe de Servicio Social**

**Efecto del tipo de aceite en la optimización de  
acarreadores lipídicos nanoestructurados mediante un  
diseño de experimentos 2<sup>3</sup>**

**Asesor interno:** Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón

**Asesor externo:** Dr. Abraham Faustino Vega

**Lugar de realización:** Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación  
Controlada. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

**Periodo de realización:** 1 de octubre de 2018 – 1 de abril de 2019

**Nombre del alumno:** Jennifer Janett Torres Cervantes

**Matrícula:** 2112032963

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**Proyecto genérico correspondiente:**

**Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y  
productos biológicos**

Diseño y desarrollo de formas farmacéuticas

**Protocolo de Servicio Social**

**Efecto del tipo de aceite en la optimización de acarreadores  
lipídicos nanoestructurados mediante un diseño de experimentos  
2<sup>3</sup>**

**Lugar de realización:** Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

**Periodo de realización:** 1 de octubre de 2018 – 1 de abril de 2019

**Nombre del alumno:** Jennifer Janett Torres Cervantes

**Matrícula:** 2112032963



---

Asesor Interno

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón



---

Asesor Externo

Dr. Abraham Faustino Vega

# Agradecimientos

---

Este trabajo refleja un esfuerzo en el cual participaron directa o indirectamente diversas personas a través de su opinión, guía, apoyo, dándome ánimo y acompañándome tanto en los momentos difíciles, como en los de felicidad. La realización del presente estudio me ha permitido aprovechar y aprender de la competencia y experiencia de diferentes personas, quienes me acompañaron durante su realización, a quienes deseo expresar mi agradecimiento en este apartado.

En primer lugar, a Oscar Santiago Villarreal, compañero y amigo, con quien estoy muy agradecida por su amistad, apoyo incondicional y acertados consejos a lo largo de la realización de este proyecto, por animarme a continuar y superar mis propios logros cada día.

A los doctores Abraham Faustino Vega y Jorge Esteban Miranda Calderón, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su tutela, y por su excelente guía, no sólo durante mi formación académica, sino también durante mi formación profesional y personal.

A Javier Aguila Rosas, por su amistad, por apoyarme en el desarrollo de ciertas habilidades necesarias para la realización de este proyecto, por animarme siempre a seguir adelante y alcanzar mis metas, y por su buena disposición para aconsejarme sin condición alguna.

Al maestro César Gazga Urioste, por la entrega que demuestra en el aula y la pasión característica de sus clases, las cuales cambiaron mi forma de pensar y me inculcaron un gran amor por la carrera. Por sus enseñanzas, las cuales no se limitaron únicamente al aspecto académico, sino también al desarrollo de valores y principios fundamentales, así como por todo el apoyo que me ha brindado fuera del aula, el cual ha contribuido a mi formación tanto personal como profesional.

Y por último a Mario Jiménez Santiago, por compartir conmigo esta y muchas otras experiencias, por comprender la importancia que tiene para mí esta etapa, por ser mi compañero de vida, por su comprensión y paciencia constante, por ser la persona en quien siempre he podido apoyarme sin importar la situación, quien me acompañó de principio a fin en la realización de este proyecto y caminó a mi lado proporcionándome siempre su muy valioso apoyo moral y por siempre creer en mí.

# Índice

---

1.	Introducción .....	1
2.	Antecedentes .....	2
3.	Objetivos .....	9
3.1.	<i>Objetivo general</i> .....	9
3.2.	<i>Objetivos específicos</i> .....	9
4.	Justificación .....	9
5.	Materiales y métodos.....	10
5.1.	<i>Materiales</i> .....	10
5.2.	<i>Métodos</i> .....	11
5.2.1.	<i>Elección de excipientes</i> .....	11
5.2.1.1.	<i>Prueba de solubilidad en aceites</i> .....	11
5.2.1.2.	<i>Compatibilidad de excipientes (lípidos sólido – lípidos líquidos)</i> .....	11
5.2.2.	<i>Optimización de la formulación</i> .....	11
5.2.3.	<i>Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados</i> .....	11
5.2.4.	<i>Caracterización de los acarreadores lipídicos nanoestructurados</i> .....	12
5.2.4.1.	<i>Determinación del tamaño de partícula</i> .....	12
5.2.4.2.	<i>Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga del fármaco</i> .....	12
5.2.4.3.	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	13
5.2.4.4.	<i>Perfil de liberación de los NLC</i> .....	13
6.	Resultados y discusión .....	13
6.1.	<i>Elección de excipientes</i> .....	13
6.1.1.	<i>Prueba de solubilidad en aceites</i> .....	14
6.1.2.	<i>Compatibilidad de excipientes (lípidos sólidos – lípidos líquidos)</i> .....	15
6.2.	<i>Optimización de la formulación</i> .....	15
6.3.	<i>Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados</i> .....	19
6.4.	<i>Caracterización de los acarreadores lipídicos nanoestructurados</i> .....	19
6.4.1.	<i>Determinación del tamaño de partícula</i> .....	19
6.4.2.	<i>Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de fármaco</i> .....	21
6.4.3.	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	22
6.4.4.	<i>Perfil de liberación</i> .....	23
7.	Conclusión .....	25
8.	Referencias.....	26

# 1. Introducción

---

Para administrar un fármaco es necesario incluirlo en una forma farmacéutica que posibilite la dosificación cómoda, segura y por la vía más adecuada, en una cantidad conocida y controlada, de forma tal, que el medicamento sea estable, seguro y eficaz.

De esta manera, a lo largo del tiempo, se han desarrollado diversas formas de administración de fármacos, las cuales en un inicio incluyeron al fármaco de manera libre dentro de la formulación. Sin embargo, con el avance de los conocimientos científicos y de la tecnología farmacéutica surgieron nuevos retos en la formulación de medicamentos, resaltando la necesidad de la obtención de nuevas formas farmacéuticas que liberen al fármaco en el lugar de acción del organismo, con el fin de asegurar una absorción adecuada, mientras se mantiene la seguridad y eficacia del medicamento. Es así como surge el concepto de sistema terapéutico, como formas de administración capaces de liberar al fármaco en un sitio específico de forma continua y durante un tiempo determinado. Así, actualmente se distinguen las formas farmacéuticas convencionales de las nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada.

Con el objetivo de cumplir con las características deseadas para las nuevas formas farmacéuticas, surgen los sistemas nanoparticulados, los cuales son capaces de proteger al fármaco de la degradación y a su vez, lo dirigen hacia un órgano o tejido blanco. Además, estos sistemas requieren de una menor cantidad de fármaco para alcanzar el efecto terapéutico, lo que trae consigo la reducción de los efectos adversos.

Entre los sistemas particulados resaltan las nanopartículas lipídicas (NL), las cuales comprenden a las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) y a los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC, por sus siglas en inglés). Las NL se desarrollaron por primera vez en 1990, con los experimentos desarrollados en paralelo por tres grupos de trabajo: Müller et al., Gasco et al. y Westensen, quienes desarrollaron la primera generación de NL, llamadas nanopartículas lipídicas sólidas, las cuales consisten en un solo lípido sólido o una combinación de éstos como formadores de la matriz, lo cual hace que ésta sea sólida tanto a temperatura ambiente como a temperatura corporal. Estos acarreadores combinan las ventajas de otros portadores nanométricos, mientras reducen las desventajas que presentan estos vehículos. Entre las ventajas se encuentran una biocompatibilidad buena, citotoxicidad baja, escalamiento

de producción fácil, modulación de la liberación del fármaco, procesos de preparación que no necesitan el uso de disolventes orgánicos y la capacidad de obtener diversas formas de administración (oral, dérmica, intravenosa, etc). Sin embargo, las NLS presentan desventajas tales como una capacidad de carga baja y la expulsión del principio activo durante el almacenamiento. Esto se debe a la modificación de la estructura sólida de los lípidos formadores de la matriz después de su producción, de un estado poco ordenado a un estado cristalino, en el cual quedan pocas imperfecciones en las que pueda depositarse el fármaco, por lo que se expulsa de la matriz. Para superar estas desventajas, se desarrolló la segunda generación de NL, los NLC, que consisten en la incorporación de un lípido líquido en el núcleo de una matriz lipídica sólida, lo cual incrementa el número de imperfecciones en la matriz, dando lugar a una mayor capacidad de carga del fármaco, mientras se conservan las ventajas de las NLS.

Los fármacos que se pueden incorporar en estos acarreadores son de carácter lipofílico, tal como el clorhidrato de terbinafina (CT), una alilamina sintética utilizada en el tratamiento de micosis cutáneas. Cabe destacar que las formulaciones tópicas convencionales no son capaces de retener al fármaco en la piel por un periodo prolongado, por lo que se necesitará de un tratamiento extenso, o complementarlo por vía oral. El uso de NLC en formulaciones tópicas aumenta la superficie de contacto con la piel, mejorando su absorción y al mismo tiempo, reduciendo la frecuencia de administración, lo que mejorará el cumplimiento por parte del paciente. Es por esto que la obtención de formulaciones de NLC ha ganado gran relevancia en el campo de la industria farmacéutica, ya que podría subsanar las deficiencias encontradas en las formulaciones convencionales.

El objetivo de este proyecto es optimizar la formulación de NLC cargados con terbinafina, mediante la aplicación de un diseño de experimentos  $2^3$ , utilizando el método de fusión – homogeneización en caliente, para determinar el efecto que tienen los parámetros de proceso y de la formulación sobre las características del producto final.

## 2. Antecedentes

---

En los procesos de fabricación de medicamentos siempre ha sido necesaria la obtención de una formulación que posibilite la administración de los fármacos, dotando al principio activo de una forma farmacéutica que permita la administración en una cantidad conocida y controlada,

por la vía más adecuada, de manera que el medicamento posea características de estabilidad, seguridad y eficacia. Debido a esto, a lo largo del tiempo se han desarrollado diversas formas de administración de medicamentos, tales como jarabes, suspensiones, tabletas, cápsulas, geles, cremas, etc (Suñé & Bel, 2002).

A mediados del siglo XX se empezaron plantear nuevas formas farmacéuticas en las que el fármaco ya no se caracteriza solamente por su farmacodinámica, sino también por su farmacocinética. Es así como surge la biofarmacia, la cual establece un nexo entre la farmacocinética y la tecnología farmacéutica y resalta la necesidad de la obtención de nuevas formas farmacéuticas que logren que el fármaco sea liberado en el lugar de acción en el organismo, asegurando su correcta absorción con el fin de obtener una concentración plasmática segura y efectiva (Suñé & Bel, 2002).

Mediante el uso de la tecnología farmacéutica, la cual estudia las operaciones tecnológicas y los componentes implicados en la fabricación de medicamentos, se deben alcanzar los siguientes objetivos para diseñar una forma farmacéutica:

- Administración en la dosis exacta y por la vía más adecuada.
- Asegurar la estabilidad del producto durante un tiempo establecido (vida de anaquel).
- Facilitar la administración de manera que sea cómoda y segura, con el fin de favorecer el cumplimiento por parte del paciente.
- Asegurar la homogeneidad de dosis en todas las unidades de administración.
- Proteger al fármaco de agentes externos.
- Controlar la liberación y absorción del principio activo.
- De ser posible, dirigir el principio activo a un órgano o tejido diana.
- Mejorar la acción farmacológica y reducir los efectos secundarios.

De esta manera, surge el concepto de sistema terapéutico, como formas de administración capaces de liberar uno o más fármacos de forma continua en un sitio específico y durante un tiempo determinado. Su desarrollo y aplicación ha tenido gran relevancia, de modo que actualmente se habla de formas farmacéuticas convencionales y de nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada (Suñé & Bel, 2002).

Uno de los desafíos más importantes al formular un medicamento son algunas propiedades fisicoquímicas o biológicas del fármaco, como solubilidad baja, biodisponibilidad baja, efectos secundarios graves, variaciones en la concentración plasmática del fármaco, eliminación rápida del organismo, dificultad al escalar la fabricación de la formulación, vida útil del producto corta, incapacidad para dirigir al fármaco a un sitio en específico, entre otros. Debido a esto, existe la necesidad de crear vehículos que sean fáciles de producir, puedan transportar diversos fármacos, sean físicamente estables y con la capacidad de poder ser producidos a gran escala; por lo que, en la década de 1990, se desarrollaron sistemas particulados para la administración y transporte de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos (Muller & Keck, 2004).

Los sistemas particulados como liposomas, emulsiones aceite en agua, nano y microsferas poliméricas o nanopartículas metálicas ofrecen diversas aplicaciones en diagnóstico y terapéutica, de manera que permiten la encapsulación de moléculas de diferentes tamaños, proporcionando protección contra la degradación del fármaco antes de llegar a su sitio de acción. Además, esta estrategia puede reducir la cantidad de principio activo necesario para alcanzar el efecto terapéutico, minimizando o eliminando los efectos adversos inducidos por el fármaco. El uso de sistemas particulados para la encapsulación de fármacos es una alternativa viable para la administración de sustancias terapéuticas que han sido descartadas por motivos de toxicidad alta, solubilidad baja e inestabilidad en circulación sistémica (Moghimi & Farhangrazi, 2014), sin embargo, la preparación de algunos de estos sistemas presenta inconvenientes tales como el uso de disolventes orgánicos, la obtención de sistemas de administración no biodegradables y baja estabilidad. Como una solución a estos problemas, en 1990 se desarrollan por primera vez las NL, las cuales se caracterizan por estar compuestas por una matriz lipídica sólida, la cual contiene al fármaco en su núcleo. La primera generación de NL están compuestas por un lípido sólido o una combinación de ellos como formadores de la matriz, en los que se encuentra disperso el principio activo y fueron llamadas NLS, las cuales fueron una alternativa viable como acarreadores del principio activo para vehículos como liposomas y micropartículas (Schubert & Müller-Goymann, 2005), debido a que éstas otorgan una mayor estabilidad al fármaco, pueden transportar cantidades considerables de principio activo, son biodegradables, no se requiere el uso de disolventes orgánicos y no son tóxicas para el organismo (Mukherjee et al., 2009). Sin embargo, estos acarreadores presentan la desventaja de que poseen una capacidad de carga de fármaco baja y son susceptibles a expulsar el

fármaco durante el almacenamiento, debido a que, durante este periodo, los lípidos sólidos adoptan estructuras cristalinas ordenadas, dejando pocas regiones amorfas en donde se pueda contener al principio activo, por lo cual, éste es expulsado. Para subsanar estas deficiencias se desarrolló una segunda generación de NL, los NLC, en los cuales se incluye un lípido líquido (aceite) en el núcleo del lípido sólido formador de la matriz (en una proporción que va de 30:70 hasta 0.1:99.9 lípido líquido: lípido sólido), lo que crea una mayor cantidad de regiones amorfas, aumentando la capacidad de carga de fármaco y disminuyendo el riesgo de expulsión del mismo durante el almacenamiento (Beloqui et al., 2016), además de que proporcionan mejores características en cuanto al control de la liberación del fármaco (Saedi et al., 2018).

Los NLC están compuestos por (i) un lípido sólido formador de la matriz o una combinación de éstos tales como los triglicéridos, acilgliceroles, ácidos grasos, ceras y complejos cíclicos; (ii) un lípido líquido en el cual se incluirá el fármaco (Villafuerte R. et al., 2008), y que pueden ser ácidos grasos naturales constituidos por cadenas de C<sub>14</sub> a C<sub>24</sub>, los triglicéridos como tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina y triestearina; los monoglicéridos como monoestearato de glicerol, behenato de glicerol, palmito-estearato de glicerol; ácidos grasos como el esteárico, palmítico, decanóico y behénico; ceras, como el palmitato de cetil; aceites como el alfa tocoferol y ésteres cáprico-caprílicos, son los materiales más utilizados (Garzón Serra & García Fernández, 2009); así como (iii) un agente emulsificante (en una concentración de 1.5 – 5 % (m/v)), entre los que se encuentran copolímeros de óxido de etileno – óxido de propileno (como el poloxámero) y copolímeros como el óxido de etileno y sorbitán / óxido de propileno (polisorbatos) (Beloqui et al., 2016). El tamaño de los NLC va desde 40 – 1000 nm (Weber et al., 2013) y su potencial  $\zeta$ , capacidad de carga y cinética de liberación se determinarán por la naturaleza de la matriz del lípido, la mezcla de tensoactivos, el tipo de aceite utilizado y los parámetros de producción (Garzón Serra & García Fernández, 2009).

Uno de los excipientes que puede ser utilizado para la formación de la matriz sólida en NLC es el Compritol® HD5 ATO (behenato de glicerilo pegilado) (Üstündağ Okur et al., 2015), una mezcla de Behenato de glicerilo y polietilenglicol (PEG). Es una sustancia anfifílica con un HLB de 5, característica que le permite una mejor dispersión en agua, en comparación con el Compritol® 888 ATO, que también suele utilizarse en la formulación de NLC; es sólido a temperatura ambiente y corporal, y posee una temperatura de fusión de entre 60 – 67 °C (Hamed et al., 2017).

El aceite utilizado en la formulación de los NLC debe seleccionarse cuidadosamente considerando su capacidad para disolver al fármaco, de tal modo que presente el coeficiente de partición más alto, o bien de su capacidad para crear regiones amorfas dentro de la estructura cristalina del lípido sólido, cuidando de que no existan incompatibilidades entre ambos lípidos o que el aceite sea expulsado cuando la matriz solidifique. La capacidad de carga se verá influenciada por el tipo de aceite utilizado, ya que éste será el que forme las regiones amorfas dentro de la matriz cristalina formada por el lípido sólido, dentro de las cuales quedará depositado el fármaco (Beloqui et al., 2016).

Para la fabricación de productos cosméticos y farmacéuticos de aplicación tópica, se han desarrollado productos que incluyen aceites vegetales entre sus materias primas, los cuales pueden ser extraídos de las plantas, éstos están compuestos por una combinación de triglicéridos de ácidos grasos saturados e insaturados con propiedades humectantes, antiinflamatorias y antioxidantes, las cuales tienen una influencia benéfica sobre la piel. Se ha demostrado que el tamaño de partícula de los NLC muestra una tendencia a aumentar cuando se utilizan aceites con una composición de ácidos grasos de mayor longitud de cadena (Pinto et al., 2018). Existen diversos estudios en los que se han logrado desarrollar NLC vacíos y cargados con diferentes principios activos, entre ellos el CT (Gaba et al., 2015), utilizando aceites vegetales como lípido líquido, dentro de los cuales podemos mencionar el aceite de coco (Pinto et al., 2018) y el de soya (Pimentel-Moral et al., 2019) (Kraisit & Sarisuta, 2018).

El aceite de coco ha sido ampliamente utilizado en formulaciones cosméticas y farmacéuticas de aplicación dérmica, y actualmente también se ha utilizado en la preparación de NLC (Pinto et al., 2018). Es muy estable frente a la oxidación atmosférica y contiene un 92% de ácidos grasos saturados (triglicéridos), de los cuales, alrededor del 70% son triglicéridos de cadena media (TCM), ésteres de ácidos grasos y glicerol con una longitud de entre 6 y 12 carbonos. Los TCM tienen excelentes cualidades de conservación, por lo que ayudan a prolongar la vida útil de los productos terminados que los contienen (Krishna et al., 2010).

Así mismo se han logrado desarrollar sistemas farmacéuticos que incluyen aceite de soya entre los excipientes que los componen, entre ellos, NLC cargados con distintos fármacos y sin carga, en donde el aceite de soya es utilizado para la formación de imperfecciones dentro de la matriz lipídica sólida. Este aceite se deriva de las semillas de la soya y se compone por una mezcla

de triglicéridos de cadena larga (longitud mayor a 12 carbonos), principalmente ácido linoleico (48% - 58%), oleico (17% - 30%), palmítico (9% - 13%), linolénico (4% - 11%) y esteárico (2.5% - 5.0%). Cabe mencionar que el aceite de soya es un excipiente aprobado por la FDA para uso clínico (Pimentel-Moral et al., 2019) (Kraisit & Sarisuta, 2018).

Los fármacos que se pueden incorporar en los NLC son principalmente de carácter lipofílico, con solubilidad baja en fluidos fisiológicos, inestables en la circulación sistémica, o con toxicidad alta. Sin embargo, es posible también incluir fármacos hidrofílicos modificados mediante la conjugación con compuestos lipofílicos e incluso aceites volátiles (Villafuerte R. et al., 2008).

Se han logrado incorporar diversas moléculas en estos acarreadores tanto para uso cosmético, como para uso terapéutico. Desde 2010 hasta 2017 ha sido reportada la encapsulación en NLC de diferentes moléculas para uso cosmético, tales como aceite de argán, octilmetoxicinamato, etil hexiltriazone, dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato, bemotrizinol, octilmetoxicinamato, avobenzona, coenzima Q10, licopeno, retinil palmitato y vitamina E, con el fin de mejorar la hidratación de la piel, proteger contra la radiación UV, como antioxidantes y agentes anti-edad. Por otro lado, entre los fármacos que se han utilizado en formulaciones de NLC para uso terapéutico desde 2013 hasta 2017, se pueden mencionar: adapaleno, cloroquina, ciclosporina, calcipotriol, meloxicam, minoxidil, progesterona, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF), plata (Garcês et al., 2018) y CT (Gaba et al., 2015), los cuales se han utilizado para diversos fines, sin embargo, se ha demostrado que al ser administrados mediante estos acarreadores, se ha mejorado la absorción en el sitio de acción, disminuyendo los efectos adversos y la absorción sistémica.

El CT es un antifúngico sintético derivado de la alilamina que ha demostrado ser el más eficaz antimicótico de esta clasificación química (Abonia et al., 2018). Es de naturaleza altamente lipófila, y al igual que otras alilaminas, inhibe la síntesis de ergosterol al inhibir la escualeno monooxigenasa fúngica (escualeno 2,3-epoxidasa), una enzima que es parte de la vía de síntesis de la pared celular de los hongos. Las preparaciones de CT pueden ser administradas por vía oral o tópica, sin embargo, por la vía oral, aproximadamente el 40% de la dosis sufre metabolismo de primer paso, mientras que por la vía tópica se puede alcanzar más fácilmente la concentración requerida para alcanzar la actividad antimicótica, siempre que la liberación y absorción del fármaco estén aseguradas (Andrade, 2016).

El CT, posee una solubilidad de  $7.38 \times 10^{-4}$  mg/mL en agua, es fácilmente soluble en etanol (30 mg/mL) y en metanol (50 mg/mL) y ligeramente soluble en acetona. Su vida media es de 36 horas; posee un pKa de 8.94 y logP de 5.52, lo cual quiere decir que presenta una mayor afinidad por los componentes oleosos. Los efectos secundarios son bien tolerados por el paciente, sin embargo, se puede presentar sensación de saciedad, pérdida de apetito, dispepsia, náusea, dolor abdominal leve, diarrea, sarpullido y urticaria (Wavikar & Vavia, 2013), se encuentra disponible en formulaciones de gránulos, tabletas, cremas tópicas, geles tópicos, soluciones tópicas y formulaciones en aerosol. El estrato córneo es el principal sitio de acción para el CT en infecciones fúngicas debido a que algunos hongos, como aquellos que pertenecen al género *Trichophyton*, son capaces de crecer en el estrato córneo. Debido al carácter altamente lipofílico del principio activo, éste tiende a acumularse en la piel, uñas y tejidos grasos. Los tratamientos con formulaciones convencionales oscilan entre una toma diaria de 6 a 12 semanas, dependiendo de la zona de crecimiento del hongo (Andrade, 2016). Cabe destacar que las formulaciones tópicas convencionales no son capaces de retener al fármaco en la piel por un periodo prolongado, por lo que se necesitará de un tratamiento extenso, o complementarlo por vía oral. El uso de NLC en formulaciones tópicas aumenta la superficie de contacto con la piel, debido a su composición lipídica y tamaño de partícula nanométrico, lo que mejora su absorción, adicionalmente, debido al estado sólido de la matriz, se obtiene una liberación controlada, pueden contener una mayor cantidad de fármaco, además de poseer propiedades oclusivas y aumentar la hidratación de la piel al reducir la pérdida de agua transepidermal (Gaba et al., 2015). Debido a lo anterior, la frecuencia de administración se verá reducida, lo que mejorará el cumplimiento por parte del paciente. Aunado a esto, las formulaciones tópicas que contienen NLC pueden ser utilizadas sobre piel irritada o lastimada, debido a que son preparadas utilizando lípidos no irritantes y no tóxicos (Montenegro et al., 2016).

Al incorporar el CT en NLC, y tras dispersarlos en un gel de aplicación tópica, se obtiene una liberación inicial rápida, debido a que una parte del fármaco puede quedar adsorbida en la superficie de las nanopartículas, por lo que se liberará rápidamente de la forma de administración. Posteriormente, se puede obtener una liberación sostenida por más de 24 h, debido al fármaco que ha quedado atrapado exitosamente en el núcleo de la matriz, dentro de las regiones amorfas formadas por el aceite. Se ha demostrado que la liberación *in vitro* desde

una formulación tópica de NLC cargados con CT es mejor y más rápida en comparación con una formulación comercial. Así mismo, muestra una mayor cantidad acumulada de fármaco permeado en experimentos *ex vivo*, debido a las propiedades oclusivas características de los NLC (Gaba et al., 2015).

Debido a lo expuesto a lo largo de este escrito y como una propuesta a la problemática planteada anteriormente, en este trabajo se pretende diseñar, desarrollar y optimizar la formulación de NLC cargados con terbinafina, con el objetivo de encontrar los parámetros de formulación óptimos para obtener un sistema farmacéutico que se apege al perfil del producto objetivo.

## 3. Objetivos

---

### 3.1. *Objetivo general*

Formular y caracterizar acarreadores lipídicos nanoestructurados por el método de fusión – homogeneización en caliente para incorporar clorhidrato de terbinafina.

### 3.2. *Objetivos específicos*

1. Seleccionar los excipientes adecuados para obtener acarreadores lipídicos nanoestructurados con un tamaño de partícula homogéneo.
2. Obtener acarreadores lipídicos nanoestructurados cargados con terbinafina mediante la técnica de fusión – homogeneización en caliente.
3. Optimizar la formulación de acarreadores lipídicos nanoestructurados cargados con terbinafina mediante un diseño de experimentos  $2^3$  para determinar los parámetros óptimos de proceso.
4. Caracterizar los acarreadores lipídicos nanoestructurados de acuerdo con su tamaño de partícula, forma, eficiencia de encapsulación del principio activo, capacidad de carga y perfil de liberación.

## 4. Justificación

---

La utilización de nanopartículas es un método innovador de elaboración de formas farmacéuticas que tiene una elevada importancia en la industria, ya que, disminuye la dosis y

frecuencia de administración de los medicamentos, que a su vez reduce los efectos secundarios. Por otro lado, al ser de tamaño nanométrico brinda ventajas asociadas al reconocimiento de las nanopartículas por medio del sistema de fagocitos mononucleares, aumentando la semivida de los fármacos en el cuerpo.

Los padecimientos dermatológicos son enfermedades comunes y entre todos ellos, la dermatofitosis es uno de los problemas más frecuentes por los cuales se busca asistencia médica (López-Martínez et al., 2009), es causada por diversos agentes etiológicos, capaces de producir deferentes formas clínicas y son micosis superficiales muy comunes en México (Carrillo-Cordova, 2017). Entre estas formas clínicas, se encuentra el pie de atleta, también conocido como tinea pedis, que es una enfermedad cutánea que afecta los espacios interdigitales del pie, éste perjudica al 10% de la población mundial (Arai et al., 2014), que, generalmente es causada por hongos, y a menudo se trata con agentes antifúngicos.

El CT es un fármaco que se utiliza para combatir infecciones micóticas en las que el tiempo de tratamiento para las formulaciones tópicas convencionales suele ser elevado (6 – 10 semanas), por lo que se han buscado alternativas para mejorar su liberación de la forma farmacéutica y su absorción a través de la piel (Chen et al., 2012). Este trabajo tiene como objetivo obtener NLC cargados con CT, los cuales se espera que tengan ventajas sobre las formulaciones convencionales, tales como mayor retención del fármaco, aumento de la superficie de contacto, mejor absorción, disminución de la dosis y frecuencia de administración, así como la reducción de los efectos secundarios.

## 5. Materiales y métodos

---

### 5.1. *Materiales*

Clorhidrato de terbinafina, Tween 80, lecitina de soya y aceite de soya donados por Alvaris Pharma. Compritol® HD5 ATO, Precirol® ATO5, Gelucire® 48/16 y Compritol® 888 ATO donados por Gattefossé. Aceite de coco USP, obtenido de Farmacias París. Poloxámero 407 donado por DVA. Metanol, obtenido de J. T. Baker. Membranas de celulosa Spectrum™ Spectra/Por™ 4 obtenidas de Fisher Scientific.

## 5.2. Métodos

### 5.2.1. Elección de excipientes

#### 5.2.1.1. Prueba de solubilidad en aceites

Determinar la solubilidad del CT en los lípidos líquidos (aceite de soya y aceite de coco). Añadir 0.5 g de CT en 10 mL de los distintos aceites en vasos de precipitados. Introducir los vasos tapados en un agitador oscilante a 25 °C durante tres días. Posteriormente, tomar el sobrenadante de cada muestra y filtrar mediante el uso de membranas de nylon de 0.45 µm, extraer el CT de las muestras filtradas con metanol y determinar la cantidad disuelta mediante espectrofotometría UV – vis a 223 nm. Obtener el dato de la longitud de onda de absorción máxima para el CT de la literatura (Gaba et al., 2015) y preparar la curva de calibración en metanol.

#### 5.2.1.2. Compatibilidad de excipientes (lípido sólido – lípido líquido)

Realizar mezclas de diferentes lípidos sólidos (Precirol® ATO5, Gelucire® 48/16, Compritol® 888 ATO y Compritol® HD5 ATO) con aceite de coco y soya en proporciones 3:1 y 2:1 (sólido – líquido), fundir la mezcla en baño María y una vez incorporados los lípidos, dejar enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, dejar reposar las muestras durante 24 h y, transcurrido este tiempo, analizarlas visualmente, buscando la presencia de gotas de aceite que hayan sido expulsadas. Seleccionar la mezcla binaria que presente mejor homogeneidad y ausencia de gotas de aceite expulsadas en la superficie del sólido.

### 5.2.2. Optimización de la formulación

La optimización de la formulación se lleva a cabo mediante la aplicación un diseño de experimentos con tres factores y dos niveles ( $2^3$ ) utilizando el software estadístico Minitab®, cada experimento debe realizarse por triplicado, dando un total de 24 corridas. Las variables de entrada seleccionadas son la velocidad de corte, tiempo de homogeneización y porcentaje de estabilizador y la respuesta evaluada fue el tamaño de partícula obtenido en cada experimento.

### 5.2.3. Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados

Preparar los NLC mediante la técnica de fusión – homogeneización en caliente. Mezclar la base lipídica sólida con el lípido líquido, calentar la mezcla en baño María hasta que la temperatura se encuentre 10 °C arriba de la temperatura de fusión del lípido sólido. Una vez fundido, se

añade la lecitina de huevo, y posteriormente el CT previamente disuelto en metanol y se mezcla hasta incorporar los componentes y alcanzar la temperatura de trabajo. En seguida, se añade una disolución acuosa del estabilizador a la concentración necesaria, previamente llevada a la temperatura de trabajo, y se homogeneiza bajo las condiciones de velocidad y tiempo elegidas.

#### 5.2.4. Caracterización de los acarreadores lipídicos nanoestructurados

##### 5.2.4.1. Determinación del tamaño de partícula

Determinar la distribución del tamaño de partícula mediante la técnica de difracción de luz láser con el analizador de tamaño de partícula HORIBA® Partica LA – 950V2, utilizando la celda de fracción. Utilizar la fase dispersante (agua) para blanquear. Establecer el valor de índice de refracción de 1.6, que corresponde a una emulsión aceite en agua; en seguida, colocar la cantidad necesaria de formulación de NLC para llenar la celda (aproximadamente 16 mL) y realizar la medición. Hacer las mediciones por triplicado y con agitación.

##### 5.2.4.2. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga del fármaco

Colocar 5 mL de la formulación de NLC cargados con CT en un matraz volumétrico de 50 mL y llevar al aforo con metanol. Posteriormente, centrifugar a 15,000 rpm y 25°C durante 1 h. Finalmente, determinar la concentración de CT en el sobrenadante mediante espectrofotometría UV – vis a 223 nm, tomando como referencia la curva de calibración realizada para la prueba de solubilidad en aceites.

La eficiencia de encapsulación y capacidad de carga se calculan utilizando las siguientes fórmulas:

$$EE\% = \frac{P(Total) - P(Libre)}{P(Total)} \times 100$$

$$CF\% = \frac{(P(Total) - P(Libre))}{P(Lípido)} \times 100$$

Dónde:

- EE% = Eficiencia de encapsulación
- CF% = Carga del fármaco
- P(Total) = Peso del p.a. añadido a la formulación
- P(Libre) = Peso del p.a. encontrado en el sobrenadante
- P(Lípido) = Peso de la mezcla de lípidos formadores del acarreador

#### 5.2.4.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Determinar la morfología y estructura de los NLC por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Para la preparación de la muestra, realizar una dilución 1:10 de la formulación de NLC, y colocar 1 µL de ésta sobre una rejilla de cobre recubierta con película de carbono y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron analizadas utilizando el microscopio JEOL JEM-2010 TEM.

#### 5.2.4.4. Perfil de liberación de los NLC

Determinar el perfil de liberación mediante el método de diálisis. Utilizar membranas de celulosa (intervalo de peso molecular (MWCO) de 12,000 – 14,000 Da, de 45 mm de grosor y 29 mm de diámetro) para la formación de bolsas cargadas con 5 mL de la formulación de NLC, introducirlas en 600 mL de disolución amortiguadora de fosfatos – etanol (10%), pH 7.4 agitar utilizando el disolutor Vankel VK 7000, equipado con propela, a 50 rpm y 37.5 °C durante 24 h. Establecer los tiempos de muestreo del medio de disolución, y tomar muestras de 5 mL, reponer con volúmenes iguales de medio de disolución nuevo. Llevar a cabo la determinación del perfil de disolución bajo condiciones de no saturación (condiciones sink) en todo momento. Analizar las muestras mediante espectrofotometría UV – vis a 223 nm para determinar su concentración. Preparar la curva de calibración del CT en el medio de disolución empleado. Analizar los resultados utilizando el software Microsoft Excel utilizando el complemento DDSolver. Determinar el perfil de liberación de los NLC por triplicado.

## 6. Resultados y discusión

---

### 6.1. *Elección de excipientes*

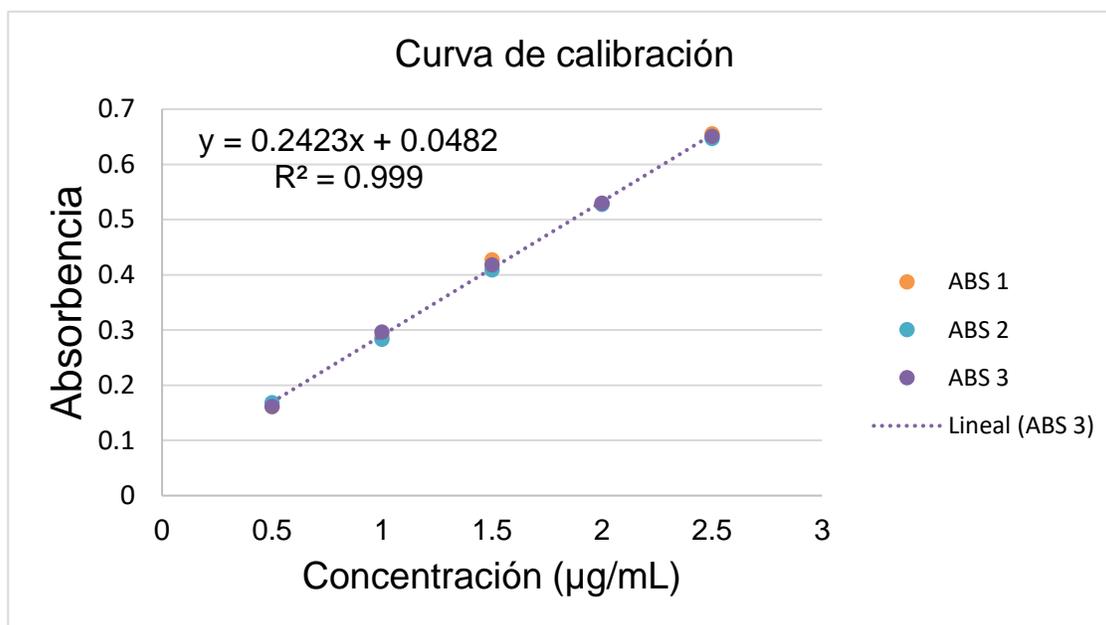
Uno de los primeros pasos en el desarrollo de un sistema farmacéutico es la etapa de la preformulación, en donde se debe analizar y determinar cuáles serán los componentes que formarán parte del sistema de entrega del fármaco. Para ello, es necesario examinar la compatibilidad de los excipientes, la cual se puede determinar mediante una revisión bibliográfica o experimentalmente. Uno de los métodos experimentales más ampliamente utilizado para la elección de excipientes en el desarrollo de NLC es la evaluación de la solubilidad del principio activo en el aceite, para asegurar la incorporación del mismo dentro del

acarreador. Otro criterio importante es la compatibilidad de los lípidos formadores del acarreador, la cual se puede determinar mediante la evaluación física de mezclas binarias de los lípidos que pueden ser utilizados para la obtención de los NLC (Joshi et al., 2019) (Gaba et al., 2015) (Kovačević et al., 2020).

En este estudio, el criterio de elección de los excipientes para la formulación de NLC cargados con CT se basó en la compatibilidad del lípido sólido con el lípido líquido. Se eligió la mezcla binaria que presentó mejor homogeneidad y que no expulsó el aceite.

### 6.1.1. Prueba de solubilidad en aceites

La solubilidad del CT en los aceites de coco y soya se evaluó mediante el método descrito en el apartado 5.2.1.1. La curva de calibración fue lineal en un intervalo de concentración de 0.5 – 2.5 µg/mL, con una  $R^2 = 0.999$ . Los resultados de la curva de calibración se muestran en la gráfica 1, mientras que los de solubilidad se muestran en la tabla 1.



**Gráfica 1.** Curva de calibración de clorhidrato de terbinafina en metanol

<b>Tabla 1.</b> Solubilidad de clorhidrato de terbinafina en aceites de soya y coco	
<b>Aceite</b>	<b>Solubilidad (µg/mL)</b>
<b>Soya</b>	23.868
<b>Coco</b>	11.256

La solubilidad del principio activo en los diferentes aceites fue descartada como un criterio de elección de excipientes, debido a que, se descubrió que el CT es retenido por los filtros de nylon, por lo que los datos de solubilidad obtenidos no son acertados.

### 6.1.2. Compatibilidad de excipientes (lípidos sólido – lípidos líquidos)

La compatibilidad de excipientes se determinó mediante la observación visual de las mezclas binarias lipídicas. Dichas observaciones se presentan en la tabla 2:

Lípido sólido \ Aceite	Soya		Coco	
	2:1	3:1	2:1	3:1
<b>Precirol® ATO5</b>	☺	HE	☺	HE
<b>Gelucire® 48/16</b>	EA	EA	EA	EA
<b>Compritol® 888 ATO</b>	EA	☺	☺	EA
<b>Compritol® HD5 ATO</b>	☺	☺	☺	☺

EA: Expulsa el aceite, HE: Heterogeneidad, ☺: No expulsa el aceite y es homogéneo.

Se eligió el Compritol® HD5 ATO como el lípidos sólido formador del nanoacarreador, debido a que presentó la mejor compatibilidad con los dos aceites y en ambas proporciones evaluadas.

Para la elección del aceite se tomó en cuenta que en la literatura se menciona que los NLC formulados con aceites vegetales compuestos por ácidos grasos con longitudes de cadena menores muestran una tendencia a disminuir el tamaño de partícula en comparación con los aceites vegetales compuestos por ácidos grasos con longitudes de cadena mayores (Pinto et al., 2018), por lo que, a pesar de que tanto el aceite de coco como el de soya muestran compatibilidad con el Compritol® HD5 ATO, finalmente se eligió el aceite de coco debido a que está compuesto por ácidos grasos de cadena media, mientras que el aceite de soya se constituye principalmente por ácidos grasos de cadena larga, por lo cual se intuye que al utilizar este aceite, se logrará obtener un tamaño de partícula más pequeño, lo cual es importante para la entrega de fármacos en el tratamiento de micosis cutáneas.

## 6.2. Optimización de la formulación

Durante el desarrollo de nuevas formulaciones es importante adoptar un método sistemático que permita determinar los parámetros de trabajo y definir el espacio de diseño de manera eficaz y confiable, con la finalidad de establecer un procedimiento de fabricación que pueda

asegurar la calidad y reproducibilidad del producto final. El diseño de experimentos es una herramienta estadística adecuada para alcanzar el propósito mencionado, ya que permite comprender la influencia de las variables de la formulación y el proceso sobre el producto final con un número mínimo de ensayos experimentales, así como la optimización de los mismos. Debido a lo mencionado anteriormente, se puede determinar que mediante el enfoque de diseño de experimentos se logrará identificar la mejor combinación de factores para obtener la respuesta deseada, optimizando la formulación (Deshmukh & Naik, 2015).

Para la optimización de la formulación se llevó a cabo el diseño de experimentos como se indica en el apartado 5.2.2. Se realizaron los experimentos indicados por el software (Minitab® 18) de manera aleatoria y la información sobre tamaño de partícula se midió después de un mes. El resumen del diseño se muestra en la tabla 3 y los resultados del análisis de varianza en la tabla 4.

**Tabla 3.** Resumen del diseño de experimentos

Factores:	3	Diseño de la base:	3, 8
Corridas:	24	Réplicas:	3
Bloques:	1	Puntos centrales (total):	0

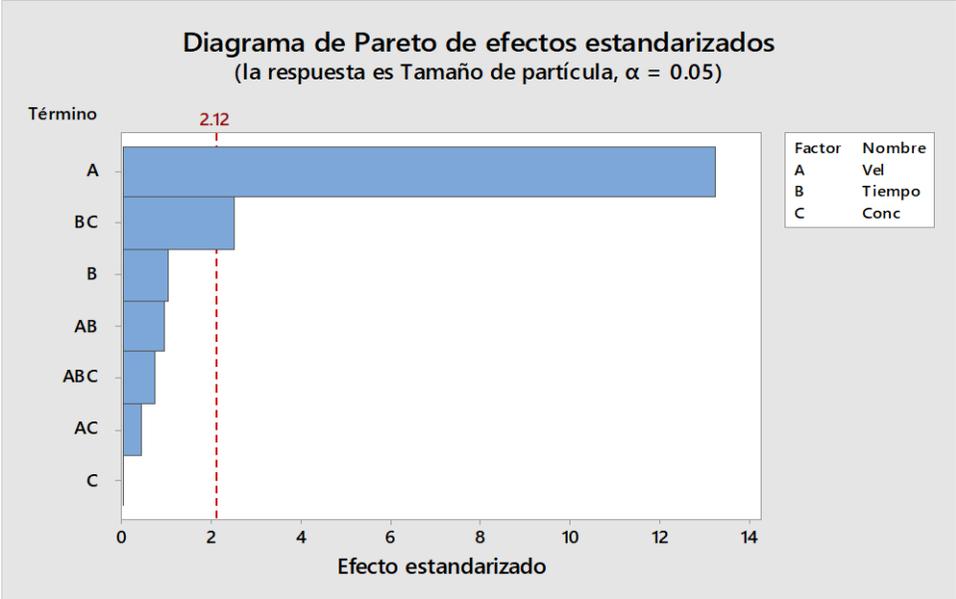
**Tabla 4.** Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
<b>Modelo</b>	7	80.8061	11.5437	26.16	0.000
<b>Lineal</b>	3	77.3526	25.7842	58.43	0.000
<b>Vel</b>	1	76.8984	76.8984	174.27	0.000
<b>Tiempo</b>	1	0.4537	0.4537	1.03	0.326
<b>Conc</b>	1	0.0004	0.0004	0.00	0.976
<b>Interacciones de 2 términos</b>	3	3.2292	1.0764	2.44	0.102
<b>Vel*Tiempo</b>	1	0.3800	0.3800	0.86	0.367
<b>Vel*Conc</b>	1	0.0748	0.0748	0.17	0.686
<b>Tiempo*Conc</b>	1	2.7744	2.7744	6.29	0.023
<b>Interacciones de 3 términos</b>	1	0.2243	0.2243	0.51	0.486
<b>Vel*Tiempo*Conc</b>	1	0.2243	0.2243	0.51	0.486
<b>Error</b>	16	7.0603	0.4413		
<b>Total</b>	23	87.8663			

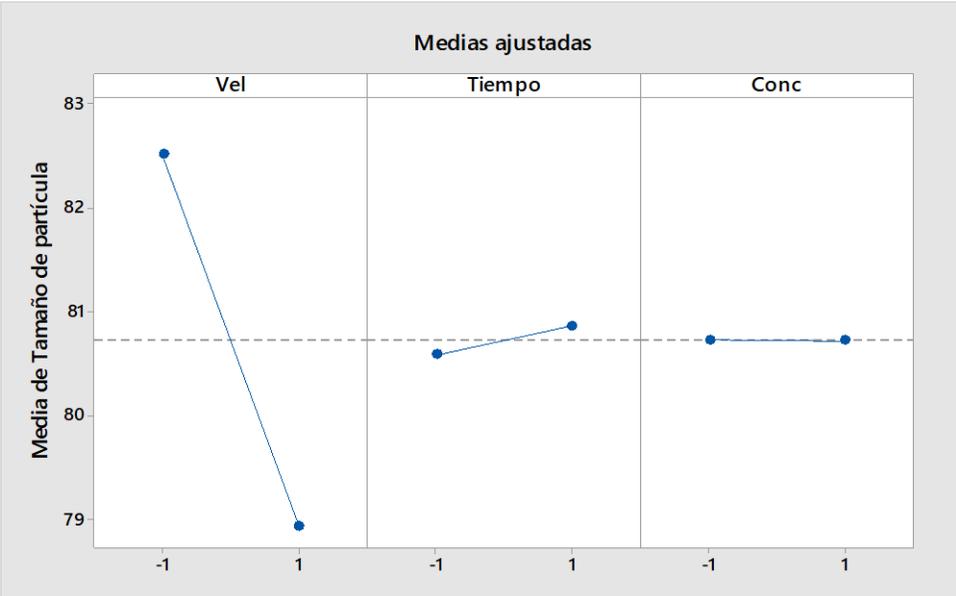
Vel: Velocidad de corte, Tiempo: Tiempo de homogeneización, Conc: Concentración de tensoactivo.

Como se puede apreciar en la tabla 4, los factores que tienen significancia estadística son la velocidad de corte y la interacción de la velocidad de corte (resaltados en color amarillo) con la concentración de tensoactivo, lo cual indica que estos factores son los que pueden tener un impacto sobre el tamaño de partícula del producto terminado, por lo que, en consecuencia,

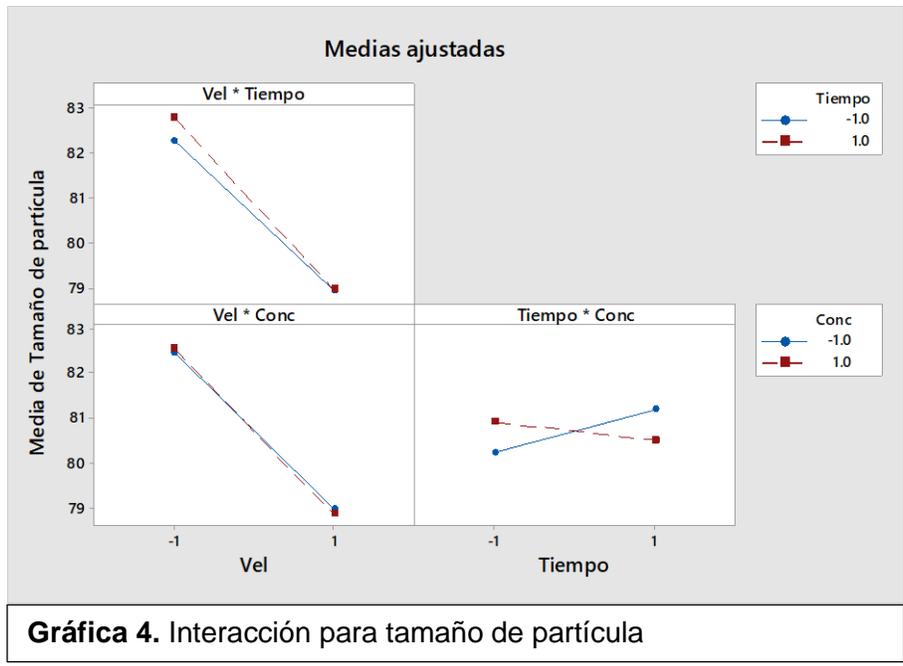
puede influir en la calidad del mismo. Se puede observar el mismo efecto en el diagrama de Pareto (gráfica 2), así como en las gráficas de efectos principales (gráfica 3) y de interacción (gráfica 4).



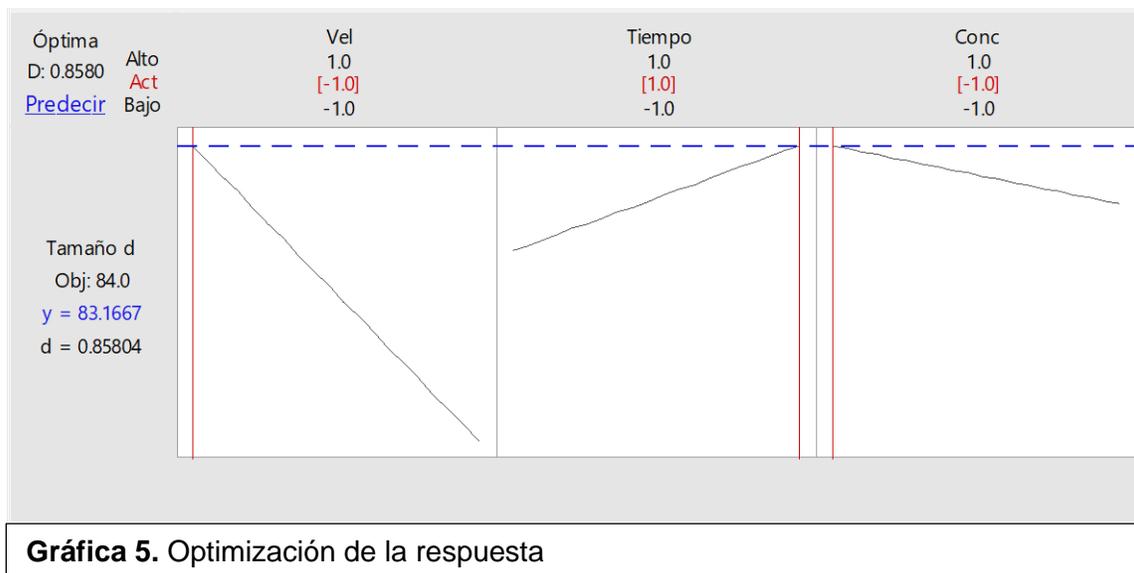
**Gráfica 2.** Diagrama de Pareto



**Gráfica 3.** Efectos principales para tamaño de partícula



Como se indicó anteriormente, los datos de tamaño de partícula analizados en el diseño de experimentos fueron obtenidos después de un mes, con la finalidad de obtener los parámetros óptimos de fabricación de manera que el tamaño de partícula de los NLC no excediera los 84 nm después de mantener el producto en almacenamiento durante dicho tiempo, lo cual es considerado como un indicativo de estabilidad física. La gráfica 5 muestra en color rojo los niveles óptimos para alcanzar el objetivo mencionado. Los valores para la optimización de la respuesta se muestran en la tabla 5.



**Tabla 5.** Valores de los niveles para los factores del diseño de experimentos

Factor Nivel	Velocidad de corte	Tiempo de homogeneización	Concentración de estabilizador
-1	10,000 rpm	15 min	1.5 %
1	15,000 rpm	20 min	1.25 %

### 6.3. Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados

Existen diversos métodos para la fabricación de NLC, sin embargo, el método de fusión – homogeneización en caliente es uno de los métodos más sencillos, económicos y adecuado para escala de laboratorio, además de que evita el uso de disolventes orgánicos y las complicaciones que conlleva el uso de éstos.

Debido a lo mencionado anteriormente, se eligió el método de fusión – homogeneización en caliente para la fabricación de los NLC cargados con CT, utilizando el equipo IKA® T-25 digital ULTRA TURRAX®, siguiendo los parámetros de fabricación obtenidos de la optimización de la respuesta, a una velocidad de corte de 10,000 rpm, tiempo de homogeneización de 20 min y a temperatura de trabajo de 65 °C. El producto obtenido fue una emulsión acuosa de color blanquecino ligeramente traslúcido. Los componentes de la formulación se indican en la tabla 6.

**Tabla 6.** Formulación cuali – cuantitativa de NLC cargados con Clorhidrato de terbinafina

Sustancia	Función	Cantidad (g)	Cantidad (%)
<b>Compritol® HD5</b>	Formadores de la matriz acarreadora	1.7	1.7
<b>Aceite de coco USP</b>		0.3	0.3
<b>Lecitina de huevo</b>	Cotensoactivo	0.5	0.5
<b>Poloxámero 407</b>	Estabilizador polimérico	0.3	0.3
<b>Clorhidrato de terbinafina</b>	Principio activo	1.25	1.25
<b>Agua</b>	Medio de dispersión	Cbp 100	Cbp 100

### 6.4. Caracterización de los acarreadores lipídicos nanoestructurados

#### 6.4.1. Determinación del tamaño de partícula

La importancia de determinar el tamaño de partícula radica en que es un atributo crítico de los NLC, ya que puede tener impacto en sus características de calidad, tales como estabilidad, eficiencia de encapsulación, perfil de liberación y biodistribución (Mozafari et al., 2018). Estos datos se representan típicamente como una distribución del tamaño de partícula en

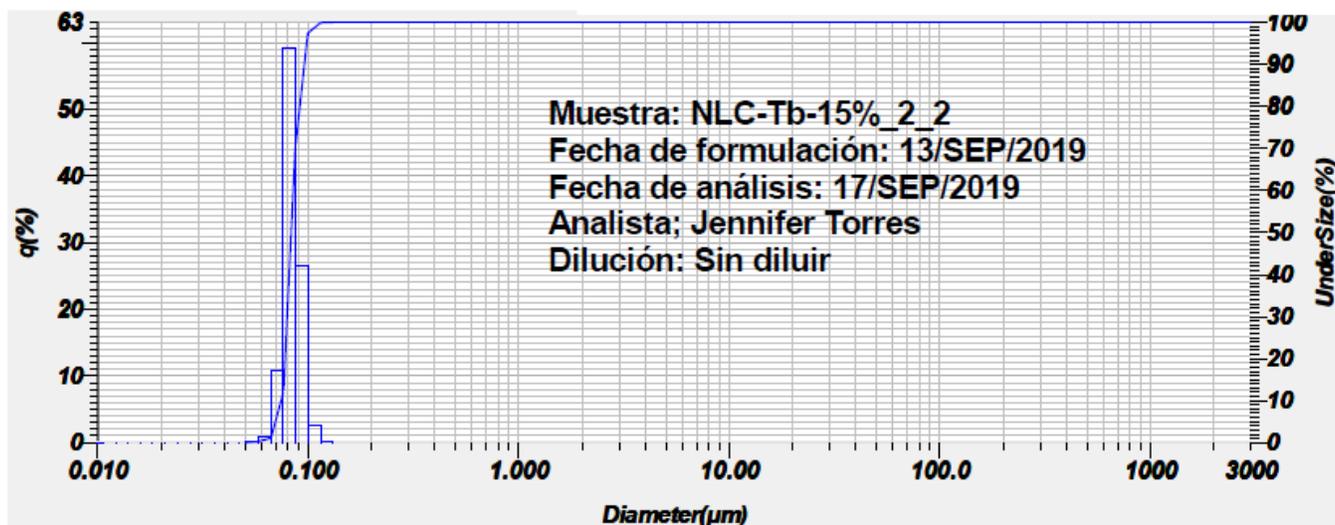
combinación con medidas de tendencia central. Existen diferentes métodos para determinar la distribución del tamaño de partícula de los sistemas coloidales, entre los cuales destacan los de dispersión de luz. Se considera que el método más adecuado es el de dispersión de luz dinámica, aunque el método de dispersión de luz estática también es de utilidad y ha sido ampliamente utilizado (McClements & McClements, 2016).

El tamaño de partícula de los NLC fue medido mediante el método de dispersión de luz láser utilizando el analizador de tamaño de partícula HORIBA® Partica LA – 950V2, como se indica en el apartado 5.2.4.1. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7 y la distribución del tamaño de partícula, en la gráfica 6.

<b>Tabla 7. Análisis del tamaño de partícula de los NLC (diámetro)</b>			
<b>Moda</b>	83.10 nm	<b>D<sub>10</sub></b>	74.5 nm
<b>Media (Tamaño promedio)</b>	84.06 nm	<b>D<sub>50</sub></b>	83.2 nm
<b>Mediana</b>	83.21 nm	<b>D<sub>90</sub></b>	96.3 nm
<b>Desviación estándar</b>	0.81 nm	<b>Transmitancia</b>	51.2 %
<b>CV</b>	9.59 %	<b>Índice de polidispersidad (IPD)</b>	0.26

El tamaño de partícula tiene influencia en la tendencia de los NLC a acumularse en el tejido diana, por lo cual, se requiere que el producto final presente una población de nanopartículas monodispersa. El parámetro utilizado para describir el grado de uniformidad de una distribución de tamaño de partícula se denomina índice de polidispersidad (IPD), el cual es un valor adimensional. Para el caso de nanoacarreadores lipídicos, se considera que si el IPD es de 0.3 o menor, entonces se tiene una población homogénea (Mozafari et al., 2018)

Como se indica en la tabla 7, los valores de la moda, media y mediana del tamaño de partícula de los NLC obtenidos tienen valores muy próximos entre sí, lo cual indica que la distribución de tamaño de partícula es homogénea y estrecha, como se puede apreciar visualmente en la gráfica 6, y que el índice de polidispersidad es de 0.26, lo cual indica que se ha obtenido un sistema monodisperso.



**Gráfica 6.** Distribución de tamaño de partícula de los NLC

Para el caso específico de la vía de administración transdermal, la importancia del tamaño de partícula de los acarreadores recae en que ésta tendrá influencia sobre la ruta a través de la cual el principio activo llegue al sitio de entrega, el impedimento de la absorción sistémica, el aumento del área superficial de contacto con la piel y la reducción de efectos secundarios. El tamaño promedio de los NLC obtenidos fue de 84.06 nm, por lo que se intuye que el producto será adecuado para la entrega del principio activo en el sitio de acción, y que tendrá la ventaja de que podrá ser utilizado tanto en el tratamiento de micosis cutáneas como subcutáneas, ya que se ha reportado que los nanoacarreadores con tamaños de entre 70 – 300 nm tienen la capacidad de entregar su contenido tanto en capas dérmicas como epidérmicas viables (Mozafari et al., 2018).

#### *6.4.2. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de fármaco*

La medición de la eficiencia de encapsulación es importante para determinar la cantidad de fármaco que se ha logrado incorporar dentro del acarreador con relación a la que se adiciona a la formulación. La capacidad de carga del fármaco se refiere a la cantidad de principio activo que es posible incorporar en el nanoacarreador en relación con la cantidad total de los lípidos utilizados para la formación del mismo. Para este estudio, ambos parámetros son importantes para determinar si el sistema de entrega de fármaco será adecuado para el tratamiento de

micosis cutáneas, ya que es de gran relevancia que el sistema pueda cargar la cantidad necesaria de fármaco para asegurar que se ha incluido la dosis adecuada para el tratamiento.

La eficiencia de encapsulación de los NLC y la capacidad de carga de fármaco se calcularon como se indica en el apartado 5.1.1. y fueron de 88.93% y 13.34% respectivamente, según lo obtenido al aplicar las fórmulas correspondientes:

$$EE\% = \frac{300 \text{ mg} - 33.2 \text{ mg}}{300 \text{ mg}} \times 100 = 88.93 \%$$

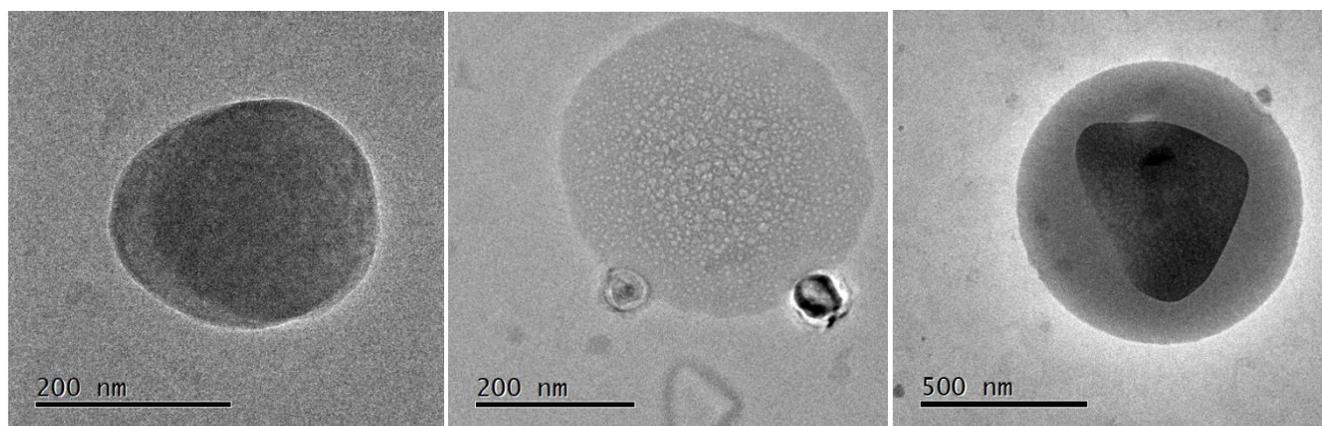
$$CF\% = \frac{300 \text{ mg} - 33.2 \text{ mg}}{200 \text{ mg}} \times 100 = 13.34 \%$$

Estos resultados se pueden atribuir a la estructura matricial característica de los NLC, en la cual, el aceite crea imperfecciones dentro de la estructura cristalina del lípido sólido, dentro de estas imperfecciones se favorece la encapsulación del principio activo, debido a que su solubilidad o dispersión se ven favorecidas en los espacios creados por el aceite, lo que, en consecuencia, aumenta la capacidad de carga de fármaco, al permitir que una mayor cantidad del mismo quede atrapado dentro del acarreador (Bahari & Hamishehkar, 2016).

#### *6.4.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

La TEM es el método más adecuado para obtener información sobre estructuras nanoparticuladas, ya que es capaz de proporcionar información sobre la morfología, textura y organización de las nanopartículas (McClements & McClements, 2016).

Las imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de transmisión (figura 1), muestran que los NLC tienen una morfología esférica y textura rugosa. Estos datos coinciden con los reportados en la literatura acerca de la obtención y caracterización de diferentes NLC (Gaba et al., 2015), (Karimi et al., 2018; Rodrigues da Silva et al., 2017). Se cree que el aceite forma imperfecciones dentro de la matriz sólida, formando espacios en donde se sospecha que quedó encapsulado el principio activo (Gaba et al., 2015).

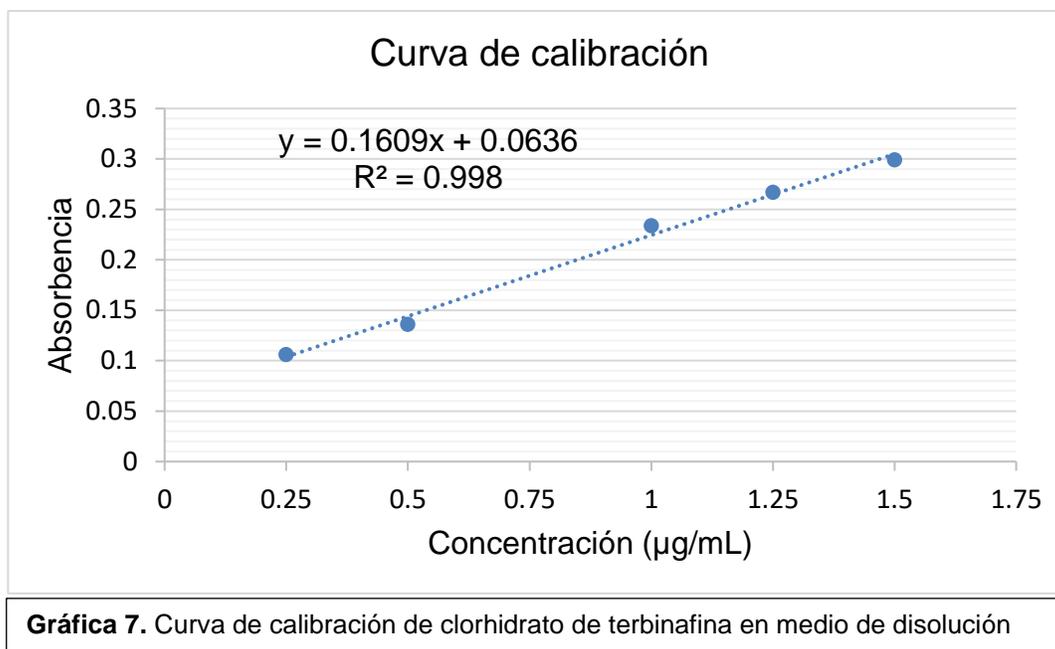


**Figura 1.** Microscopía electrónica de transmisión de los NLC. Se observan estructuras esféricas con textura rugosa.

#### *6.4.4. Perfil de liberación*

El estudio de la liberación del principio activo desde la forma farmacéutica es un paso importante durante la etapa de desarrollo de nuevas formulaciones, que tiene como objetivo caracterizar el perfil de liberación que rige al sistema farmacéutico, con la finalidad de determinar que éste se adapta a la terapia que atiende el medicamento y a las necesidades del paciente, así como de asegurar la uniformidad y reproducibilidad del producto durante la etapa de producción (Lasoñ et al., 2017).

Existen diferentes métodos para la determinación de la liberación de fármacos desde nanoacarreadores, uno de los más empleados es el de diálisis, el cual consiste en introducir las nanopartículas dentro de una bolsa de diálisis permeable sellada, la cual posteriormente se introduce en un volumen adecuado de medio de disolución a temperatura corporal y con agitación. Se deben realizar muestreos del medio de disolución en tiempos determinados, para cuantificar la cantidad de principio activo liberado y construir la curva de liberación (D'Souza, 2014). En consecuencia, para determinar el perfil de liberación del CT desde los NLC mediante el método de diálisis, se realizó una curva de calibración mediante espectrofotometría UV – vis. La curva de calibración del CT en el medio de disolución fue lineal en un intervalo de concentración de 0.25 – 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , con una  $R^2 = 0.998$ . Los resultados de la curva de calibración se muestran en la gráfica 7.

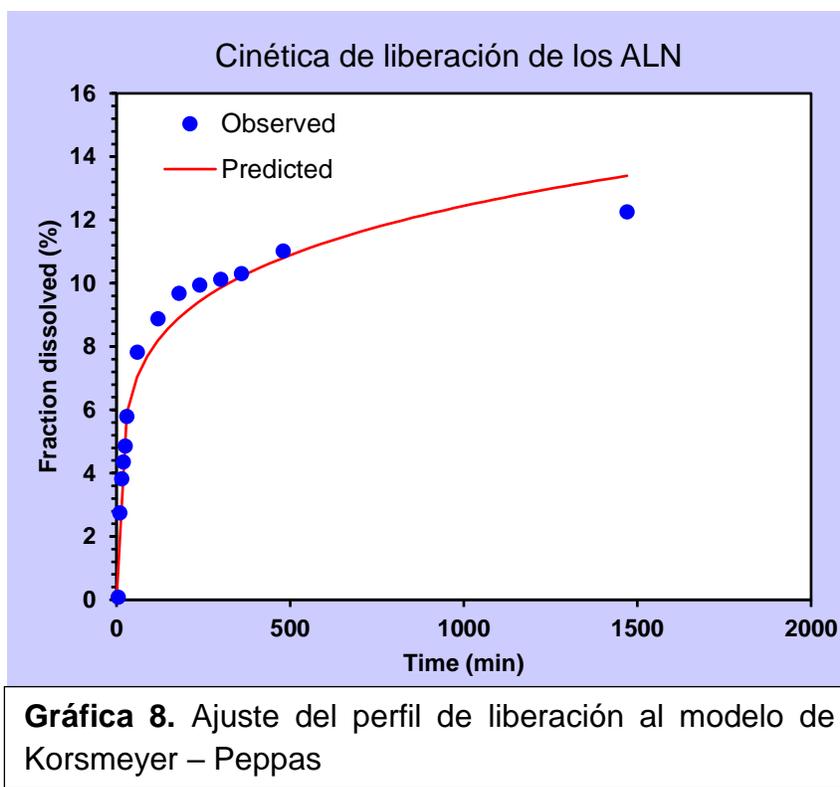


Los resultados del perfil de liberación de los NLC se muestran en la gráfica 8. Se puede notar una liberación rápida al inicio, seguida de una liberación lenta. Este comportamiento se puede explicar suponiendo que el CT no quedó atrapado solamente dentro de la matriz lipídica, sino que una parte se encuentra adherido a la superficie de la nanopartícula, lo cual explicaría la liberación inicial rápida. Posteriormente se puede observar una liberación lenta a causa de la salida del fármaco desde el interior del acarreador. Se cree que la liberación del CT se puede mantener por más de 24 debido a la incorporación profunda del fármaco dentro de las nanopartículas. Tras llevar a cabo el estudio durante 24 h, se pudo observar que se libera el 13.17 % del fármaco en promedio.

Para determinar la cinética de liberación de los NLC se ajustaron los datos experimentales a las ecuaciones que describen diferentes órdenes cinéticos y se compararon los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ). En la tabla 8 se muestran los valores de  $R^2$  para diferentes modelos de liberación.

Modelo Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer – Peppas
$R^2$	-1.3372	-1.1970	0.3951	0.9740

Se concluyó que la cinética de liberación se ajusta al modelo de Korsmeyer – Peppas, ya que presentó el valor de  $R^2$  más cercano a entre los modelos evaluados ( $R^2 = 0.9740$ ), lo cual indica que el mecanismo de liberación predominante es a través de difusión. Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, en donde se determina que uno de los principales modelos de liberación para NLC es el de Korsmeyer – Peppas (Lasoñ et al., 2017). La gráfica 8 ilustra la cinética de liberación de los NLC.



## 7. Conclusión

En este estudio se obtuvieron NLC cargados con terbinafina mediante el método de fusión – homogeneización en caliente, utilizando Compritol® HD5 ATO y aceite de coco como formadores del acarreador, mediante el uso de un diseño de experimentos  $2^3$  de manera exitosa. Los NLC obtenidos presentan una distribución de tamaño de partícula homogénea y estrecha, con un IPD de 0.26, lo cual indica que se ha obtenido un sistema monodisperso. En las imágenes obtenidas a través de TEM, se observan estructuras de forma esférica y textura rugosa. La eficiencia de encapsulación de principio activo y capacidad de carga de los

acarreadores fueron de 88.93% y 13.34% respectivamente. Se determinó que la cinética de liberación de los NLC se ajusta al modelo de Krosmeier – Peppas, lo cual concuerda con el tipo de sistema obtenido y lo reportado en la literatura.

Debido a lo expuesto anteriormente, se puede concluir que, mediante el uso del diseño de experimentos es posible establecer los parámetros de proceso óptimos para la obtención de NLC utilizando el método de fusión – homogeneización en caliente, para obtener un producto con las características de tamaño de partícula, morfología, eficiencia de encapsulación, capacidad de carga y cinética de liberación adecuados para la administración del fármaco a través de nanoacarreadores.

## 8. Referencias

---

- Abonia, R., Garay, A., Castillo, J. C., Insuasty, B., Quiroga, J., Nogueras, M., Cobo, J., Butassi, E., & Zacchino, S. (2018). Design of Two Alternative Routes for the Synthesis of Naftifine and Analogues as Potential Antifungal Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 520. <https://doi.org/10.3390/molecules23030520>
- Andrade, E. (2016). Eficacia y seguridad de la terbinafina oral en pauta intermitente o pulsátil versus pauta continua para el tratamiento de la onicomicosis en mayores de 18 años. *Revista de La Facultad de Medicina*, 64, 59–66. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v64n1.47890>
- Arai, S., Yoshino, T., Fujimura, T., Maruyama, S., Nakano, T., Mukuno, A., Sato, N., & Katsuoka, K. (2014). Mycostatic effect of recombinant dermcidin against *Trichophyton rubrum* and reduced dermcidin expression in the sweat of tinea pedis patients. *The Journal of Dermatology*, 42. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12664>
- Bahari, L., & Hamishehkar, H. (2016). The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6, 143–151. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.021>
- Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Préat, V. (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics.

*Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), 143–161.  
<https://doi.org/10.1016/J.NANO.2015.09.004>

Carrillo-Cordova, J. (2017). Prevalence of Dermatophytosis in Primary Care: An Observational Study in Mexico City. *Journal of Dermatology and Pigmentation Research*, 1, 101.

Chen, Ying Chen, Liu, D.-Z., Liu, J., Chang, T.-W., Ho, H.-O., & Sheu, M.-T. (2012). Development of terbinafine solid lipid nanoparticles as a topical delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4409–4418. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33682>

Deshmukh, R. K., & Naik, J. B. (2015). The impact of preparation parameters on sustained release aceclofenac microspheres: A design of experiments. *Advanced Powder Technology*, 26(1), 244–252. <https://doi.org/10.1016/J.APT.2014.10.004>

D'Souza, S. (2014). A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 304757. <https://doi.org/10.1155/2014/304757>

Gaba, B., Fazil, M., Khan, S., Ali, A., Baboota, S., & Ali, J. (2015). Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 53(2), 147–159. <https://doi.org/10.1016/J.BFOPCU.2015.10.001>

Garcês, A., Amaral, M. H., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2018). Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 159–167. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2017.11.023>

Garzón Serra, M. L., & García Fernández, B. (2009). LAS NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LÍPIDICAS Y LOS ACARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUCTURADOS EN USOS TERAPÉUTICOS. *Razón y Palabra*, 68, 1–14. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199520297008>

Hamed, R., Al-Samydai, A., Albaraghteh, T., Tarawneh, O., & Sunoqrot, S. (2017). Influence of HPMC K100LV and Compritol® HD5 ATO on Drug Release and Rheological Behavior of HPMC K4M Matrix Tablets. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 12. <https://doi.org/10.1007/s12247-016-9269-2>

Joshi, M., Prabhu, R., & Patravale, V. (2019). Fabrication of Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gels from Microemulsion Template for Delivery Through Skin. In *Methods in*

*molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 2000, pp. 279–292). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9516-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9516-5_19)

Karimi, N., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Mehramuz, B., & Kafil, H. S. (2018). Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Turmeric Extract-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC). *Colloid and Interface Science Communications*, 22, 18–24. <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2017.11.006>

Kovačević, A. B., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2020). Formulation development of lipid nanoparticles: Improved lipid screening and development of tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers (NLC). *International Journal of Pharmaceutics*, 576, 118918. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.118918>

Kraisit, P., & Sarisuta, N. (2018). Development of Triamcinolone Acetonide-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Buccal Drug Delivery Using the Box-Behnken Design. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(4), 982. <https://doi.org/10.3390/molecules23040982>

Krishna, A. G. G., Raj, G., Singh, B. A., Kumar, P. K. P., & Chandrashekar, P. (2010). Coconut oil: chemistry, production and its applications - a review. *Indian Coconut Journal*, 53(3), 15–27.

Lasoń, E., Sikora, E., Miastkowska, M., Socha, P., & Ogonowski, J. (2017). NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 532, 57–62. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2017.06.083>

López-Martínez, R., Manzano-Gayosso, P., Hernández-Hernández, F., Bazán-Mora, E., & Méndez-Tovar, L. (2009). Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: An analysis of 2084 cases. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 48, 476–479. <https://doi.org/10.3109/13693780903219006>

McClements, J., & McClements, D. J. (2016). Standardization of Nanoparticle Characterization: Methods for Testing Properties, Stability, and Functionality of Edible Nanoparticles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1334–1362. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.970267>

- Moghimi, S. M., & Farhangrazi, Z. S. (2014). Nanoparticles in Medicine: Nanoparticle Engineering for Macrophage Targeting and Nanoparticles that Avoid Macrophage Recognition. *Nanoparticles and the Immune System*, 77–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408085-0.00006-6>
- Montenegro, L., Lai, F., Offerta, A., Sarpietro, M. G., Micicchè, L., Maccioni, A. M., Valenti, D., & Fadda, A. M. (2016). From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 100–112. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2015.10.003>
- Mozafari, M., Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., & Khorasany, S. (2018). *Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems.*
- Mukherjee, S., Ray, S., & Thakur, R. (2009). Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71, 349–358. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.57282>
- Muller, R. H., & Keck, C. M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113(1–3), 151–170. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2004.06.007>
- Pimentel-Moral, S., Teixeira, M. C., Fernandes, A. R., Borrás-Linares, I., Arráez-Román, D., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., & Souto, E. B. (2019). Polyphenols-enriched Hibiscus sabdariffa extract-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): Optimization by multi-response surface methodology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, 660–667. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2018.12.023>
- Pinto, F., de Barros, D. P. C., & Fonseca, L. P. (2018). Design of multifunctional nanostructured lipid carriers enriched with  $\alpha$ -tocopherol using vegetable oils. *Industrial Crops and Products*, 118, 149–159. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.03.042>
- Rodrigues da Silva, G. H., Ribeiro, L. N. M., Mitsutake, H., Guilherme, V. A., Castro, S. R., Poppi, R. J., Breikreitz, M. C., & de Paula, E. (2017). Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.06.066>

- Saedi, A., Rostamizadeh, K., Parsa, M., Dalali, N., & Ahmadi, N. (2018). Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers as drug delivery system: Influence of liquid lipid types on loading and cytotoxicity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 216, 65–72. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2018.09.007>
- Schubert, M. A., & Müller-Goymann, C. C. (2005). Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61(1–2), 77–86. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2005.03.006>
- Üstündağ Okur, N., Gokce, E., Bozbıyık, D., Egrilmez, S., Ertan, G., & Ozer, O. (2015). Novel nanostructured lipid carrier-based inserts for controlled ocular drug delivery: Evaluation of corneal bioavailability and treatment efficacy in bacterial keratitis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1059419>
- Villafuerte R., L., García F., B., Garzón S., M. de L., Hernández L., A., & Vázquez R., M. L. (2008). Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(1), 38–52. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57939107>
- Wavikar, P., & Vavia, P. (2013). Nanolipidgel for enhanced skin deposition and improved antifungal activity. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 222–233. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9908-y>
- Weber, S., Zimmer, A., & Pardeike, J. (2013). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.013>