



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“DESARROLLO DE UN NANOSISTEMA
POLIMÉRICO BIODEGRADABLE DE UNA NUEVA
MOLECULA CON ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA:

L.F. SARAI VIOLETA CRUZ MIRANDA

CODIRECTORES DE TESIS

Dr. Julio César Rivera Leyva

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

CUERNAVACA MORELOS

2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Compromiso al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 20 de enero de 2020

Folio: FF/D/SAc/ CIP /MF/001/2020

**L.F. SARAI VIOLETA CRUZ MIRANDA
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable de una nueva molécula con actividad antidiabética"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: M. en F. Edgar Barrera Bautista

SECRETARIO: Dr. Jesús Rivera Islas

V.1. Dra. Inés Fuentes Noriega

V.2. Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

V.3. Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.

Jefatura de Posgrado



ccp: archivo, jurado
mitv

**UA
EM**



DEDICATORIA

Dedico este proyecto con mucho amor y cariño a mi mamá quien ha sido la mayor fuente de motivación y fortaleza para llegar a la culminación de esta meta, gracias por todo mamita tus esfuerzos son impresionantes y tu amor para mí es invaluable siempre, te amo mamá.

A mi hermana Sitlali y a Enrique que de una u otra forma me han apoyado incondicionalmente gracias.

A Salvador gracias infinitas por todo tu amor, cariño, apoyo, pero sobre todo por creer en mí, te quiero.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado con la beca 894144.

A la Universidad Autónoma de Morelos (UAEM) por la oportunidad de pertenecer a esta prestigiada institución.

A la Facultad de Farmacia por el uso de sus instalaciones, servicios brindados y por contribuir a mi formación académica siendo como mi segundo hogar.

Agradezco a todos mis profesores, personas de gran sabiduría quienes se esforzaron por ayudarme a llegar al punto donde me encuentro, gracias por transmitirme sus conocimientos y por la confianza brindada en todo momento.

A mis codirectores de Tesis el Doctor Julio César Rivera Leyva y el Doctor Sergio Alcalá Alcalá por su apoyo incondicional, así como la paciencia, confianza y orientación para llegar a buen fin en este proyecto.

A mi comité tutorial integrado por la Doctora Adriana Valladares Méndez y el Maestro Edgar Barrera Bautista quienes conocieron y contribuyeron a la evolución de este trabajo.

A mis revisores de tesis por todas las sugerencias realizadas y el tiempo dedicado para la mejora de este trabajo a la Doctora Inés Fuentes Noriega, a la Doctora Angélica Berenice Aguilar Guadarrama y al Doctor Jesús Rivera Islas.

A mis revisores externos que aún sin conocerme me proporcionaron ayuda siendo muy accesibles y amables.

A todos y a cada uno de mis compañeros de laboratorio 4 por hacer la estancia de trabajo más agradable.

A mi familia y amistades que siempre han estado para apoyarme en cada proyecto de vida.



ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Diabetes.....	2
2.1.1 Prevalencia en México	3
2.1.2 Tratamiento de la diabetes	4
2.2 Antecedentes y propiedades de ATAC.....	8
2.3 Nanotecnología farmacéutica.....	9
2.3.1 Ventajas del uso de nanoformulaciones	10
2.3.2 Limitaciones del empleo de nanosistemas	10
2.4 Nanopartículas poliméricas	11
2.4.1 Composición de las nanopartículas	12
2.4.2 Polímeros de uso farmacéutico	12
2.5 Procesos de elaboración de nanopartículas	14
2.6 Caracterización de nanopartículas	15
2.6.1 Tamaño de partícula.....	16
2.6.1.1 Microscopía electrónica de barrido	16
2.6.1.2 Microscopía de fuerza atómica.....	16
2.6.2 Carga superficial	16
2.6.3 Capacidad de carga del fármaco.....	17
2.6.4 Liberación de Fármacos desde nanopartículas	17
2.6.4.1 Mecanismos de liberación de fármacos desde nanopartículas	18



2.6.4.2	Sistemas de liberación controlada	19
2.7	Biodisponibilidad Oral	19
2.8	Permeabilidad intestinal de Nps.....	19
2.8.1	Evaluación de la Permeabilidad <i>in vitro</i>	21
3.	JUSTIFICACIÓN	22
4.	HIPOTESIS	23
5.	OBJETIVOS	24
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	24
5.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
6.	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	25
7.	METODOLOGÍAS	26
7.1	Preparación de soluciones	26
7.2	Metodología para el desarrollo de nanopartículas biodegradables	27
7.3	Determinación de la longitud de onda de máxima absorción de ATAC.....	28
7.4	Selección de materiales	28
7.4.1	Prueba de solubilidad	28
7.5	Diseño experimental.....	28
	para la preparación de NPs.....	28
7.6	Preparación de nanopartículas de PCL por el método de nanoprecipitación	29
7.7	Optimización de las NPs	30
7.8	Caracterización	30
7.8.1	Tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica	30
7.8.2	Determinación de potencial Z	30
7.8.3	Determinación del rendimiento	31
7.8.4	Evaluación de la eficiencia de carga.....	31
7.8.5	Morfología de las NPs por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	31
7.8.6	Espectroscopia Infrarroja (IR)	32
7.8.7	Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP)	32



7.8.8 Calorimetría diferencial de barrido.....	32
7.9 Estudio de liberación <i>in vitro</i>	32
7.10 Estudio de permeabilidad <i>in vitro</i>	33
8. RESULTADOS.....	35
8.1 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción	35
8.2 Pruebas de solubilidad	35
8.3 Linealidad del método cromatográfico	36
8.4 Características del sistema nanoparticulado a desarrollar	39
8.5 Diseño experimental exploratorio en Statgraphics.....	40
8.5.1 Optimización.....	42
8.6 Espectroscopia Infrarrojo IR	43
8.7 Morfología de las NPs	46
8.8 Difracción de Rayos X de polvos	47
8.9 Calorimetria Diferencial de Barrido.....	48
8.10 Evaluación <i>in vitro</i> del perfil de liberación.....	49
8.11 Evaluación <i>in vitro</i> de la permeabilidad.....	51
9. CONCLUSIÓN GENERAL	53
9.1 CONCLUSIONES PARTICULARES.....	53
10. PERSPECTIVAS	54
11. BIBLIOGRAFÍA.....	55
12. ANEXOS	61
12.1 Linealidad del método analítico	61
12.2 Exactitud y precisión del método analítico.	61
2.3 Nps optimizadas.....	61
12.4 Evaluación de la talla y el potencial Z de las NPs optimizadas.	62
12.5 Modelos matemáticos de liberación.....	62
12.6 Permeabilidad de ATAC libre y de ATAC en NPS.	63
Constancias	64



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos más usuales en el tratamiento de la DM2 del cuadro básico y catálogos de insumos del sector salud	6
Tabla 2. Fármacos más usuales en el tratamiento de la DM	7
Tabla 3. Formas farmacéuticas de medicamentos para diabetes: ventajas y desventajas	7
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del análogo tetrazol del ácido clofíbrico (ATAC)	9
Tabla 5. Reactivos.....	25
Tabla 6. Equipos	25
Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de ATAC.....	26
Tabla 8. Condiciones Cromatográficas para cuantificar ATAC	27
Tabla 9. Factores, niveles y variables de respuesta del diseño experimental	29
Tabla 10. Matriz de diseño experimental	29
Tabla 11. Pruebas de solubilidad de los compuestos a utilizar	36
Tabla 12. Parámetros de desempeño del método analítico	37
Tabla 13. Características del sistema.....	39
Tabla 14. Materiales para el desarrollo de los nanosistemas	39
Tabla 15. Variables de respuesta obtenidos.....	40
Tabla 16. Valores óptimos vs valores reales	43
Tabla 17. Resultados de las formulaciones de NPs optimizadas.....	43
Tabla 18. Señales características en IR de ATAC	45
Tabla 19. Señales características en IR de PVA y PCL.....	46
Tabla 20. Valores obtenidos de la regresión de los perfiles de liberación.....	50
Tabla 21. Coeficientes de permeabilidad de NPs de ATAC y ATAC sin encapsular	52
Tabla 22. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales	52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Análogo tetrazol del ácido clofíbrico, nombre IUPAC: 2-(4-cloronenoxi)-2-metil-N-(1H-tetrazol-5-il) propanamida.....	8
Figura 2. Estructuras de nanopartículas poliméricas	11
Figura 3. Elaboración de NPs por nanoprecipitación	15
Figura 4. Mecanismos implicados en la captación celular y la permeación de diferentes tipos de nanoformulaciones.	21
Figura 5. Esquema del desarrollo de Nps.....	27
Figura 6. Bolsas de diálisis con Nps en suspensión, Bolsas de diálisis colocadas en el medio de liberación a agitación constante, Equipo utilizado para el estudio de liberación de las NPs.	33
Figura 7. Esquema de una celda de Franz vertical	34
Figura 8. Preparación del estudio de Permeabilidad	34
Figura 9. Espectros de absorción en UV	35
Figura 10. Curva de cuantificación de ATAC	37
Figura 11. Cromatogramas.....	38
Figura 12. Gráfico de Pareto estandarizada para la talla promedio	41
Figura 13. Gráfico de Pareto estandarizada para el potencial Z	41
Figura 14. Gráfico de Pareto estandarizada para la Eficiencia de encapsulación.....	41
Figura 15. Gráfico de contornos de la superficie de respuesta estimada.....	42
Figura 16. Espectros de IR de las materias primas (ATAC, PCL, PVA), de la mezcla física, y de NPs, con y sin ATAC	45
Figura 17. Espectros de las materias primas (ATAC, PCL, PVA), de la mezcla física, y de NPs, con y sin ATAC.....	45
Figura 18. Micrografías por SEM	46
Figura 19. Difractogramas	47
Figura 20. Termogramas.....	49
Figura 21. Perfiles de liberación de NPs de ATAC y ATAC	50
Figura 22. Perfiles de permeabilidad de NPs de ATAC y ATAC	51



SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

CV	Coeficiente de variación
ATAC	Análogo del Ácido Clofíbrico
DRX	Difracción de Rayos-X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
IR	Infrarojo
h	Hora
KDa	Kilodaltons
M	Molar
min	Minutos
NPs	Nanopartículas
pH	Potencial de Hidrógeno
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil
PCL	Policaprolactona
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
PDI	Índice de polidispersión (Polydispersity index)
PVA	Alcohol polivinílico
DM	Diabetes Mellitus
IC	Intervalo de Confianza
SUP	Superior
INF	Inferior
CC	Capacidad de carga
EE	Eficiencia de encapsulación
D.E	Desviación estándar



r	Coeficiente de correlación
r^2	Coeficiente de determinación
HbA1c	Hemoglobina glicosilada



RESUMEN

Las nanopartículas poliméricas (NPs) han tenido gran relevancia durante los últimos años en la innovación de los sistemas de liberación de fármacos, debido a la variedad de ventajas que estas ofrecen, siendo de interés sobre todo para tratamientos de enfermedades crónicas, tal es el caso de la diabetes mellitus que se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. En el presente trabajo se obtuvo y caracterizó un nanosistema polimérico biodegradable cargado de una nueva molécula con acción farmacológica antidiabética nombrada ATAC, la cual es un análogo tetrazol del ácido clofíbrico, debido a su baja solubilidad acuosa y pobre biodisponibilidad oral se busca mejorar sus propiedades de solubilidad y permeabilidad mediante la incorporación a NPs poliméricas de policaprolactona (PCL), un polímero biocompatible y biodegradable aprobado por la FDA para aplicaciones biomédicas y para el uso de liberación de fármacos de manera prolongada gracias a su lenta degradación.

Para comenzar la fabricación de nanopartículas (NPs) se implementó el método de nanoprecipitación y mediante pruebas de solubilidad en diferentes disolventes orgánicos se seleccionó la acetona para disolver ATAC y el polímero (PCL), mientras que para disolver el estabilizante alcohol polivinílico (PVA) se utilizó agua, debido a que mostraron ser los mejores disolventes para estos materiales y útiles para llevar a cabo el proceso; Posteriormente se realizó un diseño exploratorio de cribado el cual incluyó 3 factores (X1, X2, X3) que se consideran afectan las características deseadas del nanosistema, con base a la literatura se eligió; la concentración del polímero (PCL), del estabilizante (PVA) y la concentración de ATAC, explorando 2 niveles en cada factor.

Fueron fabricados 9 lotes de NPs mediante el método de nanoprecipitación, con las condiciones de la matriz experimental obtenida por el programa estadístico StatGraphics Centurion XVI. Estas fueron caracterizadas en tamaño promedio (Y1), potencial Z (Y2) y eficiencia de encapsulación (Y3). Los resultados sirvieron para optimizar la formulación con los objetivos de la talla más pequeña posible, el mayor potencial Z y la mejor eficiencia de encapsulación (EE%). Las NPs optimizadas se fabricaron por triplicado (L1, L2, L3) así como NPs sin carga de ATAC. Se evaluaron nuevamente las variables de respuesta (Y1, Y2, Y3) para asegurar el modelo del diseño. Las NPs optimizadas se caracterizaron por capacidad de carga (%CC), índice de polidispersión (PDI), morfología, así como el estado cristalino por Difracción de Rayos X (DRX), la interacción de componentes por Calorimetría Diferencial de



Barrido (DSC) e Infrarrojo (IR), así mismo se implementaron estudios *in vitro* de liberación y de permeabilidad a pH's fisiológicos.

Por otro lado, se implementó y modificó un método cromatográfico de cuantificación para ATAC por HPLC para los fines deseados en el proyecto. El método analítico implementado fue lineal ($r^2= 0.9998$), preciso (CV=1.88 %) y exacto (CV= 2.78%) con recobro del $101.43 \pm 2.82\%$.

Las NPs optimizadas se formularon bajo las siguientes condiciones; PCL 14.94 mg/mL, PVA 10 mg/ml y ATAC 26.49 mg, con rendimiento de $63.67 \pm 4.16 \%$. Estas mostraron un tamaño promedio de 359.63 ± 7.27 nm, un potencial Z de -10.23 ± 0.49 mV, un IPD de 0.36 ± 0.15 y una EE% de $62.60 \pm 3.48\%$.

De acuerdo con los resultados de IR se observó que no se generaron interacciones significativas entre los componentes y que ATAC se encuentra molecularmente disperso en las NPs ya que se pudo detectar una pequeña señal característica de este en los sistemas. Los estudios de DRX y DSC evidenciaron que ATAC se encuentra en estado amorfo al incorporarse a las NPs, esto debido a que en el difractograma y termograma de NPs con ATAC no se observan las señales características de este.

Los perfiles de liberación muestran que las NPs liberaron más del 90% de ATAC en aproximadamente 8 horas considerándose como una liberación prolongada, mientras que ATAC no encapsulado solo libera el 45%. En los estudios de permeabilidad las NPs de ATAC permearon en mayor porcentaje comparadas con ATAC libre en un 30%.

En conclusión, se logró desarrollar, caracterizar y evaluar NPs esféricas biodegradables de PCL, encapsulando ATAC para administrarse por vía oral con resultados aceptables y buena reproducibilidad.



ABSTRACT

Polymeric nanoparticles (PNs) have had great relevance in recent years in the innovation of drug delivery systems, due to the variety of advantages they offer, being of interest including all treatments of chronic diseases, such is the case of diabetes mellitus that has become a worldwide health problem. In the present work, a biodegradable polymeric nanosystem is loaded with a new molecule with antidiabetic pharmacological action named ATAC, which is a tetrazole analog of clofibric acid, was obtained and characterized. Due to its low aqueous solubility and poor oral bioavailability, it seeks to improve its properties of Solubility and permeability through incorporation into polymer PNs of Polycaprolactone (PCL), a biocompatible and biodegradable polymer approved by the FDA for biomedical applications and use of drug release in a prolonged manner thanks to its slow degradation. To begin the manufacture of nanoparticles (PNs), the nanoprecipitation method was implemented and, by means of solubility tests in different organic solvents, acetone was selected to dissolve ATAC and the polymer (PCL), while to dissolve the stabilizer polyvinyl alcohol (PVA), it used water, because they proved to be the best solvents for these materials and useful for carrying out the process; Subsequently, an exploratory screening design was carried out, which included 3 factors (X1, X2, X3) that are considered to affect the desired characteristics of the nanosystem. Based on the literature, it was chosen; the concentration of the polymer (PCL), the stabilizer (PVA) and the concentration of ATAC, exploring 2 levels in each factor.

9 batches of NPs were manufactured using the nanoprecipitation method, with the conditions of the experimental matrix obtained by the StatGraphics Centurion XVI statistical program. These were characterized in average size (Y1), Z potential (Y2) and encapsulation efficiency (Y3). The results served to optimize the formulation with the objectives of the smallest possible size, the highest Z potential and the best encapsulation efficiency (EE%). The optimized PNs were manufactured in triplicate (L1, L2, L3) as well as PNs without ATAC loading. Response variables (Y1, Y2, Y3) were re-evaluated to ensure the design model. The optimized PNs were characterized by load capacity (% CC), polydispersity index (PID), morphology, as well as the crystalline state by X-ray Diffraction (XRD), the interaction of components by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Infrared (IR), likewise in vitro studies of release and permeability at physiological pHs were implemented.

On the other hand, a quantification chromatographic method for ATAC by HPLC was implemented and modified for the desired purposes in the project. The analytical method implemented was linear ($r^2 = 0.9998$), precise (CV = 1.88%) and exact (CV = 2.78%) with



recovery of $101.43 \pm 2.82\%$. The optimized NPs were formulated under the following conditions; PCL 14.94 mg / mL, PVA 10 mg / ml and ATAC 26.49 mg, with a yield of $63.67 \pm 4.16\%$. These showed an average size of 359.63 ± 7.27 nm, a Z potential of -10.23 ± 0.49 mV, an IPD of 0.36 ± 0.15 and an EE% of $62.60 \pm 3.48\%$.

According to the IR results, it was observed that no significant interactions were generated between the components and that ATAC is molecularly dispersed in the PNs since a small characteristic signal of this could be detected in the systems. The XDR and DSC studies showed that ATAC is in an amorphous state when incorporated into PNs, this because in the diffractogram and thermogram of PNs with ATAC, the characteristic signals of this are not observed.

The release profiles show that the PNs released more than 90% of ATAC in approximately 8 hours, being considered as a prolonged release, while non-encapsulated ATAC releases only 45%. In the permeability studies, the PNs of ATAC permeated in a higher percentage compared to free ATAC in 30%.

In conclusion, it was possible to develop, characterize and evaluate biodegradable spherical PNs of PCL, encapsulating ATAC to be administered orally with acceptable results and good reproducibility.



1. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades crónico-degenerativas más importantes en la actualidad es la Diabetes Mellitus (DM). Esta enfermedad es un problema de salud pública a nivel mundial, tan solo en México, la DM es la tercera causa de defunción. (1) En 2016, ENSANUT publicó que existe una prevalencia del 10.3% de la población femenina y 8.4% de la población masculina que padece diabetes. (2)

Actualmente, existe un gran número de agentes antidiabéticos en el mercado para el tratamiento de esta afección, sin embargo se han observado una gran variedad de efectos adversos provocados por estos, por tal motivo existe la necesidad de encontrar nuevas moléculas con acción terapéutica antidiabética que disminuyan estos efectos.(3)

Navarrete y colaboradores sintetizaron una serie de nuevas moléculas bioactivas antidiabéticas, en el presente trabajo se trabajó con una de ellas, debido a que mostró una interesante actividad farmacológica y se cuentan con estudios *in vitro* e *in vivo* de farmacocinética, farmacodinamia, así como caracterización química donde se observó que este nuevo compuesto, podría ser un buen candidato a fármaco. (4,5,6)

ATAC, es un Análogo tetrazol del ácido clofíbrico el cual corresponde a una amida azaheterocíclica, se ha probado su actividad antidiabética en un modelo *in vivo* de DM no insulino dependiente; los resultados del estudio mostraron que el nuevo compuesto fue más efectivo para disminuir el porcentaje de glicemia con respecto a la glibenclamida.(7) además de mostrar una disminución en los niveles de lípidos en sangre.

Sin embargo, la eficacia del fármaco depende, en gran medida, de su forma de dosificación. Actualmente, se acepta de forma general, que la actividad farmacológica de un compuesto no es suficiente para asegurar una buena terapia, sino que depende del desarrollo de sistemas de dosificación adecuados, del tipo de formulación y de la selección de un sistema de liberación específico para el fármaco para conseguir un efecto terapéutico óptimo.(8) Por ello se plantea el desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable cargado con ATAC, para su posterior incorporación a una forma farmacéutica con mejores propiedades biofarmacéuticas, pretendiendo la obtención de nanopartículas (NPs) poliméricas, que por su pequeño tamaño, tienen como ventaja el poder cruzar barreras fisiológicas, siendo mejor captadas por las células que las micromoléculas, y por tanto son un mejor transporte efectivo para la liberación del fármaco disminuyendo los efectos adversos, además de que tienen la posibilidad de encapsular fármacos poco solubles y permeables, con una alta semivida biológica y ayudan a una liberación controlada del fármaco.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Diabetes

La OMS define a la diabetes como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. (9)

La diabetes de tipo 1 (DM1) (anteriormente denominada diabetes insulino dependiente o juvenil) se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina.

La diabetes de tipo 2 (DM2) (llamada anteriormente diabetes no insulino dependiente o del adulto) tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, lo que a menudo es consecuencia del exceso de peso o la inactividad física. (10)

La diabetes tipo 2 (DM2) es la que se observa más comúnmente en adultos mayores, pero se observa cada vez más en niños, adolescentes y adultos jóvenes por el incremento en los niveles de obesidad, sedentarismo y una dieta inadecuada. (11) Tanto en la DM1 y la DM2, diversos factores ambientales y genéticos pueden resultar en la pérdida progresiva de la función y/o la masa de células beta que se manifiesta clínicamente como hiperglucemia. Una vez que la hiperglucemia aparece, los pacientes con cualquier forma de diabetes se encuentran en riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas, aunque las tasas de progresión pueden diferir. (12)

La hiperglucemia, a largo plazo, puede provocar un gran daño en diversos órganos del cuerpo, llevando al desarrollo de varias complicaciones que ponen en peligro la vida, como enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía, y enfermedades en los ojos, que llevan a retinopatía y ceguera. Por el contrario, si se logra un manejo adecuado de la diabetes, estas complicaciones se pueden retrasar o prevenir. (12,13)

La DM2 representa el 90-95% de todos los casos de Diabetes. Esta forma engloba a los individuos que tienen una deficiencia de insulina relativa y que presentan resistencia periférica a la insulina. Estos individuos, al menos de inicio, y muy comúnmente durante el resto de su vida, no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. (11)

La mayoría de estos pacientes presentan sobrepeso u obesidad. El exceso de peso causa por sí mismo un grado de resistencia a la insulina. Los pacientes con Diabetes que no tienen sobrepeso u obesidad pueden tener un incremento en el porcentaje de grasa corporal



distribuida predominantemente en la región abdominal. Se han descrito múltiples factores de riesgo. Dentro de los más importantes están: la presencia de DM2 en familiares de primer grado, tener hipertensión arterial, sedentarismo, un índice de masa corporal mayor de 25, y una circunferencia de cintura de más de 102 cm en hombres y 88 en mujeres. (12) El padecer esta enfermedad aumenta el riesgo de presentar complicaciones como: cardiopatía y accidente vascular cerebral en un 50%, la neuropatía que, combinada con la reducción de los flujos sanguíneos, incrementa el riesgo de úlceras en los pies, y amputación en sus últimas instancias, afectando a un 50% de los pacientes; la retinopatía diabética afecta en un período de 15 años al 2% de los pacientes, ocasionando ceguera, y un 10% sufre solo deterioro visual, mientras que la insuficiencia renal afecta de un 10 al 20% de los pacientes. (12,13)

Actualmente, no existe cura para la diabetes, pero los diferentes recursos que existen (medicamentos, equipo para detección, técnicas de educación y mejores procedimientos) ayudarán a lograr el cambio. (13)

2.1.1 Prevalencia en México

La DM2 se encuentra entre las primeras 10 causas de muerte a nivel mundial y es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial.(9) La Federación Internacional de Diabetes (FID) refiere que México está en quinto lugar con mayor número de personas con diabetes a nivel mundial y se estima que para el año 2030 se incrementara 439 millones que representara el 7.7% de la población adulta del mundo. (10) En este contexto la prevalencia de DM2 es de 9.4% [10.3% mujeres y 8.4% hombres], según los datos de la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016. (2)

Expertos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y de la OMS, señalan que la carga de esta enfermedad crecerá sustancialmente en las próximas dos décadas.(14) En México en 2017 el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) como la segunda causa de muerte.(15)

La diabetes ocupa los primeros lugares en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres y las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente; de 98 mil 500 en 2015 a 105 mil 500 muertes en 2016 según la Secretaría de Salud, asimismo, el número de casos se incrementa anualmente. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica destaca que en 2017 los casos de diabetes en el país pasaron de 307 mil 247 a 335 mil 134. (16)

Según el informe “Panorama de la Salud 2017”, presentado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), casi el 16 por ciento de la población padece este problema, superando a naciones como Turquía, la más alta después de México, por casi



tres puntos porcentuales. México ocupa el primer lugar a nivel mundial de prevalencia de casos de diabetes, entre los países miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (14)

De acuerdo con los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) se encontró que la prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016.(2)

2.1.2 Tratamiento de la diabetes

La diabetes debe recibir un tratamiento integral, adecuado, seguro y en forma, ya que se trata de un padecimiento que afecta varias funciones del organismo y puede generar consecuencias negativas para la salud de quien la padece. Es necesario valorar y garantizar el tratamiento médico, y complementarlo con una valoración nutricional, así como revisiones médicas frecuentes con diferentes especialistas a fin de llevar un control adecuado, aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones. (17)

El control de la DM2 incluye:

- Alimentación saludable
- Actividad física regular
- Tratamiento farmacológico

Una dieta bien equilibrada y nutritiva permanece como un elemento fundamental de la terapéutica. Sin embargo, en más de la mitad de los casos, los pacientes diabéticos no logran seguir su dieta. En los pacientes obesos con hiperglucemia leve el objetivo de la terapéutica dietética radica en la reducción de peso mediante la restricción calórica. (17)

La mayoría de los estudios sugieren el ejercicio en pacientes con tolerancia a la glucosa o que mantengan cifras de glucosa menor de 200 mg / dl por tal motivo se recomienda el ejercicio físico programado al aire libre pues mejora la tolerancia a la glucosa, potencia la acción a la insulina y reduce sus requerimientos. (18)

La actividad física ayuda a los diabéticos a lograr metas metabólicas y se puede utilizar como una estrategia para un estilo de vida mejor, los parámetros metabólicos deben ser supervisados como la glucosa en sangre, hemoglobina, triglicéridos, la presión de sangre y peso corporal. (19)

Algunas personas que tienen DM2 pueden alcanzar sus niveles objetivos de azúcar en sangre únicamente con dieta y ejercicios; no obstante, muchos necesitan también medicamentos



para la diabetes o tratamiento con insulina. Decidir cuál es el medicamento más adecuado depende de numerosos factores como el nivel de azúcar en sangre y otros problemas de salud que se tengan, incluso, el médico puede combinar medicamentos de distintas clases para ayudar a controlar el nivel de azúcar en sangre de varias maneras.

Factores a considerar al elegir un fármaco en el tratamiento de la DM2

- Efectividad para disminuir la glucosa
- Efecto extragluicémico que pueda reducir las complicaciones a largo plazo
- Seguridad
- Tolerabilidad
- Costo-efecto sobre el peso corporal

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la DM2 van dirigidos a corregir una o más de las alteraciones metabólicas subyacentes. En la actualidad, existen distintos tipos de fármacos hipoglucemiantes orales; sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, tiazolidindionas, inhibidores de las alfa-glucosidasas. (17,18,19) En la tabla 1,2 se presentan algunos de los fármacos más usuales en el tratamiento de la DM2 del cuadro básico de insumos del sector salud, en donde se presentan el grupo al que pertenecen según su mecanismo de acción, las diferentes dosis que se utilizan y los efectos adversos que pueden generar, analizando estos esquemas podemos observar que no hay un medicamento perfecto y único para todos los pacientes con DM2, por ello la necesidad de crear alternativas novedosas en los tratamientos farmacológicos y la búsqueda de nuevos fármacos, así como formas farmacéuticas innovadoras que brinden a los pacientes la facilidad de controlar y tratar la diabetes cuyas complicaciones constituyen uno de los mayores desafíos de salud pública en México. En la tabla 3 se encuentran las principales ventajas y desventajas de las formas farmacéuticas en las que se encuentran los medicamentos para la diabetes en donde cabe resaltar que la vía oral es la forma más común de administración debido a su simplicidad y facilidad de administración. Alrededor del 80% de las formas de dosificación en el mercado mundial se administran por vía oral. Desde la perspectiva industrial, las formas sólidas también ofrecen las ventajas de una buena estabilidad y costos de producción generalmente moderados. Por estas razones, la mayoría de las nuevas entidades químicas en desarrollo están destinadas a comercializarse como formas farmacéuticas sólidas para administración oral. (12,20)



Tabla 1. Fármacos más usuales en el tratamiento de la DM2 del cuadro básico y catálogos de insumos del sector salud

Presentación farmacéutica: tabletas, Cápsulas orales				
Fármacos	Ejemplos	Mecanismo de acción	Dosis diaria (mg)	Efectos Adversos
Sulfonilureas	Clorpropamida Tolbutamida Glibenclamida Glipizida Glimepirida Glicacida	Estimulan la secreción de insulina, mediante la estimulación de las células beta de los islotes de Langerhans, del páncreas, a través de la inhibición de la bomba adenosintrifosfatasa (ATPasa).	100-500 500-3000 1.5-20 2.5-30 1-8 160-240	Hipoglucemia Incremento de peso de alrededor de 2 kg, urticaria, fatiga, debilidad, cefalea, náuseas, diarrea, hepatitis reactiva, anemia hemolítica e hipoplasia medular
Meglitinidas	Repaglinida Nateglinida	Estimulan la secreción de insulina al inhibir la bomba ATPasa de forma distinta a sulfonilureas, y de manera más rápida y corta. Reduce la HbA _{1c} alrededor de 1.5%.	Se toman antes de las tres comidas principales. 2-4 veces al día 0.5-12 60-180	Hipoglucemia, Incremento de peso
Biguanidas	Metformina	Disminuyen la producción de glucosa hepática, así como la resistencia a la insulina, con lo que reduce la glucemia en ayunas. Bajan la HbA _{1c} alrededor de 1.5%.	2-3 veces al día 500-2250	Gastrointestinales (diarrea, náuseas, estómago revuelto), sabor metálico, acidosis láctica, mala absorción de la vitamina B ₁₂) Pérdida de peso, está contraindicada en insuficiencia renal, hepática, respiratoria y cardíaca.
Tiazolidinedionas	Sitagliptina Vildagliptina	Incremento de captación de glucosa en el músculo estriado Actúan a nivel muscular y hepático al disminuir la resistencia a la insulina, y en menor medida, reduce de la glucosa hepática. Reduce la HbA _{1c} entre 0.5 y 1.4%.	1 o 2 veces al día 50-100	Anemia, retención de líquidos aumento de peso, problema del hígado, aumentan el riesgo de insuficiencia cardíaca.
Inhibidores de la alfa glucosidasa intestinal	Acarbosa	Disminuye el índice de digestión de polisacáridos en el intestino delgado proximal reduciendo la glucemia postprandial. Siempre y cuando la dieta sea rica en carbohidratos complejos. Reduce la HbA _{1c} entre 0.5 y 0.8%.	Tomar con el primer bocado de una comida. 3 veces al día 50-300	Flatulencias, dolor abdominal, diarrea, alergias, hipoglucemia y síndrome de absorción intestinal deficiente, malestar intestinal.

(Diagnóstico y Tratamiento Farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención IMSS, actualización 2018)



Tabla 2. Fármacos más usuales en el tratamiento de la DM

Presentación farmacéutica: Inyección SC,IV,IM				
Fármaco	Ejemplos	Mecanismo de acción	Dosis	Efectos secundarios
Insulina	Insulina humana Análogos de insulina Insulinas premezcladas	Se une a los receptores de insulina en células musculares y adiposas, facilitando la absorción de la glucosa e inhibiendo, simultáneamente, la producción hepática de glucosa.	0.3-0.6 UI/kg/día Se toma en cuenta la duración del efecto, dependiendo del tipo de insulina.	Hipoglucemia, lipodistrofia, angioedema, reacción anafiláctica, urticaria. Formación de anticuerpos antiinsulina.

Tabla 3. Formas farmacéuticas de medicamentos para diabetes: ventajas y desventajas

Formas farmacéuticas	Vía de administración	Ventajas	Desventajas
Tabletas Cápsulas Comprimidos	Oral	Estabilidad física, química y biológica. Exactitud en la dosificación. Modo de administración sencillo y práctico. Posibilidades de controlar la liberación del fármaco. Bajo costo de fabricación.	No se puede utilizar en pacientes con dificultad para deglutir, con vómitos o si están inconscientes. Algunos medicamentos pueden tener sabor desagradable y/o producir irritación gástrica.
Solución inyectable	Subcutánea Intravenosa Intramuscular	Es una técnica poco agresiva. Uso de agujas de pequeño calibre. Útil para pacientes con incapacidad para la deglución o disminución de nivel de conciencia, obstrucción intestinal pacientes con náuseas y vómitos.	Irritación local. El paciente debe ser entrenado en la preparación exacta de la dosis y en la forma de aplicación. Debe estar informado de todos los sitios en los cuales se puede administrar. Almacenar en un lugar frío, de preferencia en un refrigerador, pero nunca en el congelador. Conservar en un lugar alejado del calor y la luz. Las dosis deben ser ajustadas para cada paciente. El cambiar el tipo de insulina requiere de modificaciones en las dosis. La inyección subcutánea debe llevarse a cabo 15-20 minutos antes de las comidas. En altas concentraciones, la insulina humana y animal también se aglutina. Esta aglutinación provoca una absorción lenta e impredecible desde el tejido subcutáneo y una duración de la acción dependiente de la dosis.



2.2 Antecedentes y propiedades de ATAC (Análogo tetrazol del ácido clofíbrico)

ATAC es un tipo amida azaheterocíclica derivada del ácido clofíbrico, esta resultó tener una posible actividad terapéutica como agonista sobre PPAR- α además de inhibir la enzima 11 β -HSD1 confirmada de forma experimental. Dicha molécula lleva por nombre 2-(4-clorofenoxi)-2-metil-N-(1H-tetrazol-5-il) propanamida, esta se muestra en la figura 1.(4)

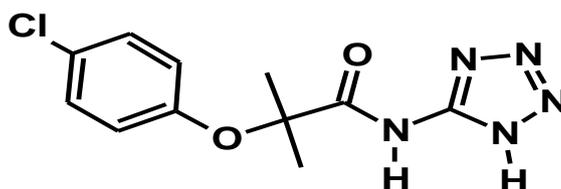


Figura 1. Estructura química del Análogo tetrazol del ácido clofíbrico, nombre IUPAC: 2-(4-clorofenoxi)-2-metil-N-(1H-tetrazol-5-il) propanamida.

ATAC presentó actividad antidiabética probada en modelo *in vivo* de DM2 no insulino dependiente; los resultados del estudio mostraron que el nuevo compuesto fue más efectivo para disminuir el porcentaje de glicemia respecto a la glibenclamida.

En un estudio *in vitro* en una línea celular HEK 293 (células que derivan de riñón de embrión humano) se observó la inhibición de la enzima 11 β -HSD1, la cual se encuentra involucrada en la activación de la glucogenólisis hepática. El ATAC presentó mayor porcentaje de inhibición contra la enzima que el mostrado por el clofibrato y el ácido clofíbrico. Por lo tanto, estos resultados experimentales aportaron evidencia de que el ATAC es un compuesto que probablemente pueda ser utilizado para el tratamiento de la DM2, así como en complicaciones asociadas a dicha enfermedad, tal es el caso de la dislipidemia. Es importante mencionar, que con base a lo anterior ATAC tiene una ventaja respecto al clofibrato, ya que puede tener una actividad dual sobre 2 blancos terapéuticos generando una disminución de la hiperglicemia así mismo como la disminución de lípidos en sangre y ayudar a la disminución de la polifarmacia. (7) Sin embargo, a pesar de haber mostrado una interesante actividad farmacológica en estudios *in vitro* e *in vivo* que muestra que este nuevo compuesto, podría ser buen candidato a fármaco, sus propiedades biofarmacéuticas tiene algunos inconvenientes como la baja absorción, lo cual resultaría en una baja biodisponibilidad, algunas de sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla 4 (4,5,6,7)



Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del análogo tetrazol del ácido clofibrico (ATAC)

Características fisicoquímicas de la molécula ATAC	
Nombre IUPAC	2-(4-cloronoxi)-2-metil-N-(1H-tetrazol-5-il)propanamida
Formula química	C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₅ Cl
Peso molecular	280.71 g/mol
Apariencia	polvo blanco cristalino
Punto de fusión	199.6 - 202.3 °C
pKa ₁	4.43
pKa ₂	6.08
Log D	1.7
Solubilidad acuosa	0.033 mg/mL
Solubilidad en otros disolventes	Metanol, acetona, diclorometano, dimetilsulfóxido

2.3 Nanotecnología farmacéutica

Actualmente, la industria farmacéutica ha apostado por el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas innovadoras que ofrecen ciertas ventajas a los pacientes, estas son desarrolladas con ayuda de ciencias emergentes como la nanotecnología.

La nanotecnología estudia el control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1 a 1000 nanómetros, en esta escala se muestran características y aplicaciones nuevas a las tradicionales o conocidas, se orienta al estudio y desarrollo de mejores materiales, dispositivos y de sistemas que explotan las nuevas propiedades a niveles físicos, químicos y biológicos.(21)

El estudio de la nanotecnología puede ser aplicable a diversas áreas, una de ellas es la farmacéutica, clasificándola como nanofarmacia o nanotecnología farmacéutica.

La encapsulación de fármacos por medio de nanopartículas sólidas ha sido en los últimos años un avance importante entre las nanoformulaciones. El impacto de la nanotecnología en las ciencias de la salud radica en la necesidad de mejorar los tratamientos existentes para las enfermedades actuales y así la calidad de vida del paciente.



2.3.1 Ventajas del uso de nanoformulaciones

Dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas cargadas con fármacos destacan:

- Poseer la capacidad de atravesar membranas biológicas, en particular las del epitelio intestinal por lo que pueden favorecer el proceso de absorción de algunas moléculas.(21)
- Mejorar la estabilidad física y química de los fármacos encapsulados, se adaptan fácilmente a los procesos industriales de fabricación y se puede controlar su tamaño por síntesis modificando sus propiedades seleccionando el polímero, surfactante y disolvente orgánico adecuado y la modificación de su superficie para modular sus propiedades.
- Actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de fármacos en sangre, ya que ayudan a la disminución de la dosis y la frecuencia de administración y por lo tanto a los efectos no deseados.
- Alcanzar tejidos/barreras específicas y penetran células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro.
- Disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre gracias a su biocompatibilidad con los tejidos y las células.
- Presentar una liberación controlada, dependiendo del polímero empleado para su formulación.
- Ayudar a enmascarar propiedades organolépticas.
- Otorgan protección de la molécula encapsulada, por ejemplo, contra la degradación enzimática, química o inmunológica. (22,23,24)

2.3.2 Limitaciones del empleo de nanosistemas

A pesar de las ventajas, las nanopartículas tienen limitaciones como:

- Alteran las propiedades físicas que conducen a agregación de partículas, haciendo la manipulación física de nanopartículas difícil en formas líquidas y secas debido al menor tamaño y mayor superficie.
- Las partículas son muy pequeñas lo que las hace muy reactivas en el entorno celular.
- El tamaño de partícula muy pequeña limita la carga de fármaco.
- El depósito de restos de polímero en órganos puede provocar graves reacciones biológicas adversas. (22,23,24)



2.4 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas (NPs) poliméricas son estructuras sólidas, coloidales con tamaños entre 10 a 1000 nm, que se utilizan como agentes de dosificación de fármacos, son objetos esféricos fabricados con materiales biodegradables, como proteínas (por ejemplo, albúmina o colágeno), grasas, o polímeros. El término nanopartícula engloba las nanoesferas y nanocápsulas. La figura 2 muestra la estructura de una nanocápsula y una nanoesfera. (25)

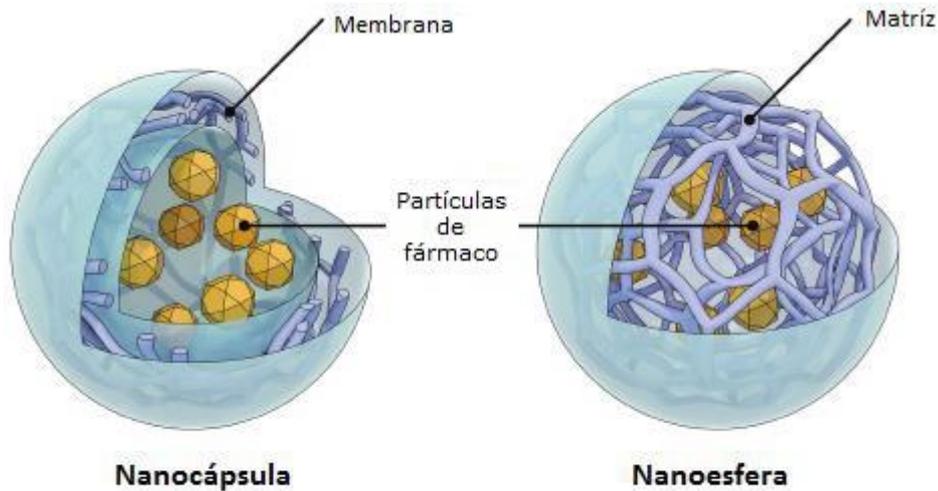


Figura 2. Estructuras de nanopartículas poliméricas

Las nanoesferas son sistemas matriciales, en donde el fármaco está disperso en una matriz polimérica. En el caso del empleo de polímeros biodegradables, la liberación del fármaco se produce ya sea por difusión a través de los poros de la matriz, por degradación o erosión del polímero, o bien por una combinación de ambos mecanismos. Cuando se emplean polímeros no biodegradables, la liberación se produce por un proceso de difusión lenta a través de la matriz.(26)

Las nanocápsulas por su parte, son sistemas de tipo reservorio, en donde el fármaco se encuentra en una cavidad central cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación dependiendo de su naturaleza química.

Al igual que otras formulaciones, las nanopartículas pueden ser administradas por diferentes vías como la parenteral, oral, dérmica, ocular, pulmonar y rectal. En función del fármaco a incorporar y su vía de administración, estas nanopartículas pueden ser sintetizadas por diversas técnicas, que incluyen la homogeneización alta presión, nanoprecipitación, microemulsión, emulsificación y evaporación del disolvente o por difusión, el método de doble emulsión, agitación a gran velocidad y por ultrasonido.(27,28)



2.4.1 Composición de las nanopartículas

Existen diversos materiales a emplear para la fabricación de la matriz que formara las nanopartículas encapsulantes de las moléculas terapéuticas generalmente se busca que estos sean biodegradables, ya sean naturales (dextrano, quitosano), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos como los poli-acrilatos, poli-anhídridos, poli-acrilamidas y poli-ésteres. (29,30)

Los polímeros biodegradables son muy utilizados ya que estos se convierten en compuestos que el cuerpo elimina fácilmente sin causar efectos secundarios. Un polímero se define como grandes moléculas que están compuestas en general de moléculas más pequeñas, subunidades llamadas monómeros que se unen entre sí en un proceso que se conoce como polimerización. (31)

Es importante considerar que la estructura química del polímero determinará el comportamiento de las nanopartículas en términos de encapsulación, degradación y liberación del fármaco. Por ejemplo, el efecto positivo del quitosano sobre la liberación de fármacos a través de los epitelios se debe a una combinación entre sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para abrir las uniones estrechas entre células epiteliales, facilitando así el transporte de fármacos, sobre todo fármacos macromoleculares, a través del epitelio. (32)

Uno de los parámetros más importantes en la selección de un polímero es su coeficiente de difusión. Para que una sustancia activa pueda ser liberada de una matriz, es necesario que ésta pueda difundirse a través de ella para ello, las cadenas del polímero que conforman el dispositivo deberán moverse cooperativamente para permitir el transporte de la sustancia. Por lo general, mientras mayor es el coeficiente de difusión menores son las fuerzas intermoleculares, la masa molecular, la cristalinidad y el grado de reticulación del polímero. Sin embargo, la difusividad puede ser ajustada mediante aditivos como plastificantes y solventes que provocan el aumento de la movilidad de las cadenas o agentes de relleno que reducen la movilidad. (33)

2.4.2 Polímeros de uso farmacéutico

El uso de polímeros ayuda a desarrollar sistemas de liberación de fármacos más eficaces y confiables, mejorando la calidad de la formulación, ayudando a la protección del principio activo, a la estabilización física y química, así como a la solubilidad y participando en el efecto de liberación sostenida y la creación de sistemas de fármacos de entrega específica utilizando recubrimientos de alto rendimiento.



Los polímeros usados generalmente para estas formulaciones son biodegradables, es decir son materiales que permanece de forma temporal en el organismo, estos pueden degradarse parcialmente por alteración de su estructura química y no se acumulan en el cuerpo y por lo tanto evitan riesgos de reacciones adversas (34) además de ser biocompatibles es decir que no desencadene una respuesta inmunológica en el organismo.

La selección del material de la matriz inerte depende de muchos factores como: (a) el tamaño final de nanopartículas; (b) propiedades de solubilidad acuosa y estabilidad del fármaco; (c) la carga superficial y permeabilidad; (d) el grado de biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad; (e) la liberación de fármaco deseado; y f) la antigenicidad del producto final. (35)

Entre los polímeros más empleados en la fabricación de nanopartículas están: ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), colágeno, polihidroxibutirato (PHB), policaprolactona (PCL), polidioxanona (PDO), derivados de la quitina, quitosán, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), copolímeros de poli (óxido de etileno) y polibutilentereftalato (PEO/PBT). (36)

2.4.2.1 Policaprolactona

La policaprolactona es un polímero semicristalino biodegradable y biocompatible que presenta bajo punto de fusión (59 a 64°C) y una baja temperatura de transición vítrea (-60°C), por esta razón, en condiciones normales siempre se encuentra en estado gomoso. Esta naturaleza física contribuye a una elevada permeabilidad a un gran número de principios activos, y confiere también una alta resistencia y flexibilidad. Es térmicamente estable y compatible con otros polímeros. Es insoluble en agua, medio en el cual colapsa pudiendo ser así útil para atrapar entre sus cadenas a sustancias insolubles en disolventes acuosos. Es soluble en disolventes orgánicos como diclorometano, benceno, clofoformo, ácido acético, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, entre otros. La PCL forma parte de la familia de poliésteres alifáticos los cuales, debido a su reputación como materiales seguros y no tóxicos, se usan como portadores en muchos tipos de sistemas de administración de uso humano y veterinario (implantes, inyectables, microcápsulas, microesferas, nanopartículas entre otros). Sus productos de biodegradación no son tóxicos y este no es carcinógeno por ello cuenta con la aprobación de la FDA. (37,38,39)

La policaprolactona tiene propiedades de degradación lenta *in vivo* que lo hace un polímero adecuado para el diseño de dispositivos para entrega de fármacos de liberación prolongada, se degrada fácilmente por hidrolisis de sus enlaces éster. La velocidad de este proceso depende de los aditivos, de la forma y del tamaño del dispositivo final. El principal producto de biodegradación de PCL es el ácido 6-hidroxicapróico que es removido por el metabolismo. (40)



La degradación de la PCL tiene lugar por la enzima gluconolactonasa que la cataboliza transformándola en 6-hidroxihexanoato. Esta enzima se encuentra presente en distintos tipos de bacterias como en *Xanthomonas campestris* (bacteria patógena de plantas) o *Brucella melitensis* (bacteria patógena intracelular que produce la fiebre de Malta en humanos) formando parte de la vía de las Pentosas Fosfato. La ruta metabólica continúa con la formación de semialdehído adípico, adipato, y finalmente en CO_2

ya que van a ser eliminados por el organismo a través de la formación de productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO_2 y H_2O por las vías metabólicas usuales.

La policaprolactona se degrada a través de escisión hidrolítica de grupos éster en condiciones fisiológicas, la policaprolactona se somete a dos etapas de degradación, (i) hidrólisis no enzimática de enlaces éster, que se atribuyen a la escisión de la cadena aleatoria a causa de la disminución en el peso molecular; (ii) degradación intracelular cuando la policaprolactona tiene un bajo peso molecular (menos de 3000) y es altamente cristalina. (41,42)

2.5 Procesos de elaboración de nanopartículas

Los métodos de preparación de nanopartículas son actualmente numerosos, estos métodos pueden ser clasificados en dos categorías. Los de elaboración directa y aquellos a base de polímeros preformados. La elección de la técnica de preparación depende de las propiedades fisicoquímicas del polímero y de las características del fármaco. (43)

Entre los métodos de elaboración directa se puede mencionar la polimerización de una emulsión (que permite crear nanoesferas) y la polimerización interfacial a partir de monómeros (para formar nanocápsulas). (44)

Dentro de los métodos que emplean polímeros preformados destacan la emulsión evaporación de disolvente (simple o doble) que permite obtener nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente y la nanoprecipitación por inyección.(44,45)

2.5.1 Método de nanoprecipitación por inyección

El método de nanoprecipitación también llamado desplazamiento de disolvente o deposición interfacial se desarrolló por primera vez por Fessi et al. en 1998.

Este método requiere el empleo de dos disolventes miscibles entre sí. Su principio se fundamenta en la interdifusión de estos al estar en contacto. Tanto el polímero como el fármaco deben ser disueltos en un disolvente orgánico. El segundo disolvente debe ser elegido con base en su miscibilidad con el primero, pero el polímero no debe ser soluble en este último. Normalmente es una solución acuosa de un tensoactivo que permita la



estabilización de las partículas obtenidas por precipitación de la gota al entrar en contacto con el agua. La incorporación de la fase polimérica debe ser efectuada gota a gota bajo constante agitación. La utilización de soluciones diluidas permite la precipitación del polímero en la escala nanométrica la figura 3 muestra el esquema general de esta técnica. Este método permite la producción de partículas con alta reproducibilidad en el rango de nanoescala utilizando ingredientes de baja toxicidad (tensoactivos o solventes orgánicos). La principal ventaja de este método radica en que se pueden obtener nanopartículas de tamaño inferior a aquellas obtenidas por el método de emulsión evaporación de disolvente, lo cual ayuda a la estabilidad del sistema. Por lo tanto, representa un buen enfoque para diseñar partículas basadas en polímeros. A pesar de estas ventajas, la técnica de nanoprecipitación tiene algunos inconvenientes que son atribuidos a las propiedades de solubilidad de la molécula activa necesarias para encapsulación eficiente y la baja encapsulación de activos con respecto al método de emulsión evaporación de disolvente.(46,47)

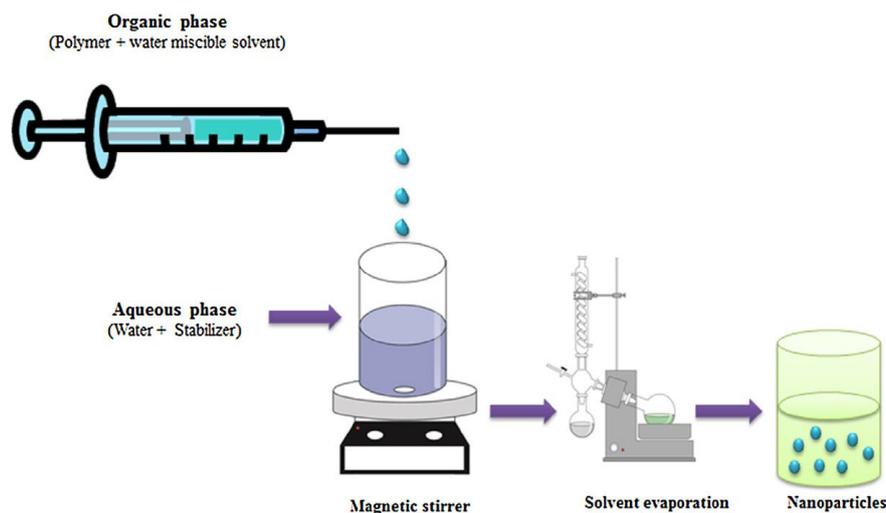


Figura 3. Elaboración de NPs por nanoprecipitación

2.6 Caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas son generalmente caracterizadas por su tamaño, morfología y la carga superficial, utilizando técnicas de microscopía avanzada tales como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). El diámetro medio de partículas, su tamaño y distribución de carga afectan la estabilidad física y la distribución *in vivo* de las nanopartículas. Las técnicas de microscopía electrónica son muy útiles para determinar la forma general de nanopartículas poliméricas,



que pueden determinar su toxicidad. La carga de la superficie de las nanopartículas afecta la estabilidad física y redispersibilidad del polímero, así como su rendimiento *in vivo*. (48,49)

2.6.1 Tamaño de partícula

La distribución del tamaño de las partículas y la morfología son los parámetros más importantes de la caracterización de nanopartículas. Se ha encontrado que el tamaño de las partículas afecta la liberación de fármacos esto debido a que las partículas más pequeñas ofrecen mayor superficie por lo tanto estarán expuestas a la superficie lo que conducen a una rápida liberación, por el contrario, en partículas de mayor tamaño el fármaco difunde lentamente. Como desventaja, las partículas más pequeñas tienden a agregar durante el almacenamiento y transporte, por lo tanto, existe un compromiso entre un tamaño pequeño y la máxima estabilidad de nanopartículas. (50)

Existen varias herramientas para determinar el tamaño de la nanopartícula entre ellas:

2.6.1.1 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) da un examen morfológico con visualización directa. Las técnicas basadas en microscopía electrónica ofrecen varias ventajas en caracteres morfológicos, el dimensionamiento y análisis; sin embargo, proporcionan información limitada acerca de la distribución de tallas y cierto promedio de población. (51)

2.6.1.2 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) ofrece ultra-alta resolución en la medición del tamaño de partícula y se basa en un análisis físico de muestras a nivel de sub-micrón utilizando una punta de sonda de escala atómica, el instrumento proporciona un mapa topográfico de la muestra basada en las fuerzas entre la punta y la superficie de la muestra lo cual genera un escaneo. La principal ventaja de la AFM es su capacidad para crear la imagen sin ningún tipo de tratamiento específico. (52)

2.6.2 Carga superficial

La naturaleza y la intensidad de la carga de la superficie de las nanopartículas es muy importante, ya que determina su interacción con el medio ambiente biológico, así como su interacción electrostática con compuestos bioactivos. La estabilidad coloidal es analizada a través de potencial zeta de nanopartículas, este potencial es una medida indirecta de la carga en la superficie y corresponde a la diferencia de potencial entre el exterior y la superficie del plano de Helmholtz de distorsión. La medición del potencial zeta permite el almacenamiento para las predicciones sobre la estabilidad coloidal de dispersión. Altos valores de potencial



zeta, positiva o negativa, debe lograrse a fin de asegurar la estabilidad y evitar la agregación de las partículas. La medida de la hidrofobicidad de la superficie puede ser predicha por los valores de potencial zeta. El potencial zeta también puede proporcionar información acerca de la naturaleza del material encapsulado dentro de las nanocápsulas o recubiertos en la superficie. (53)

2.6.3 Capacidad de carga del fármaco

Idealmente, un exitoso sistema nanoparticulado debe tener una alta capacidad de carga, con lo cual se reduce la cantidad de materiales de matriz en la administración, la carga de fármaco y la eficiencia de atrapamiento depende en gran medida de la solubilidad del fármaco, del estado sólido del polímero, así como de su composición, peso molecular del fármaco y de la interacción.

La carga de las nanopartículas generalmente se define como la cantidad de fármaco vinculado por masa de polímero (usualmente mg de fármaco por mg de polímero); también podría darse como porcentaje en relación con el polímero. La técnica utilizada para este análisis pueden ser métodos analíticos como la espectroscopia UV o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) después de ultrafiltración, ultracentrifugación o filtración en gel.(54)

2.6.4 Liberación de Fármacos desde nanopartículas

Mejorar la liberación del fármaco mediante la nanotecnología es una de las razones fundamentales para el desarrollo de mejores formulaciones por ello es importante conocer y comprender la forma y la medida en que las moléculas de fármaco son liberados de este tipo de sistemas.

Existen varios métodos que pueden utilizarse para el estudio *in vitro* de la liberación del fármaco de las nanopartículas algunos de ellos son:(55)

- Side-by-side de difusión con células artificiales o membranas biológicas.
- Técnica de difusión en bolsa de diálisis.
- Retroceso de la técnica de bolsa de diálisis.
- Agitación seguida por ultracentrifugación/ centrifugación.
- Técnicas de ultrafiltración



2.6.4.1 Mecanismos de liberación de fármacos desde nanopartículas

Hay diferentes mecanismos de liberación de fármacos:

- (a) Liberación controlada por difusión (difusión de las nanopartículas a través de la matriz, difusión a través de la pared de la nanocápsula del polímero)
- (b) Liberación controlada por la degradación del polímero (erosión de la matriz de las nanopartículas)
- (c) Liberación controlada por estímulos son algunos ejemplos más comunes.

a) Liberación controlada por difusión

La liberación de fármaco controlada por difusión se presenta en un sistema de depósito de tipo cápsula, en el cual el fármaco se disuelve o dispersa en un núcleo rodeado por una membrana polimérica. La difusión es dada por la diferencia en su concentración a través de la membrana, este sistema suele mostrar alta liberación inicial, seguido de una velocidad de liberación decreciente, con una difusión creciente para moléculas de fármaco situadas en el interior del vehículo portador.(57,58)

b) Liberación controlada por degradación

Muchos de los vehículos poliméricos usados en la industria farmacéutica tales como poliésteres, poliamidas y polisacáridos liberan fármacos por degradación hidrolítica y/o enzimática de enlaces éster, amida e hidrazona en su esqueleto. Las matrices de polímeros como el PLGA, el ácido poliláctico y la policaprolactona experimentan degradación en masa, lo cual da una degradación simultánea de la matriz. Por otra parte, los polianhídridos y poliésteres se erosionan desde la superficie hasta el núcleo una degradación superficial. La cinética de liberación del fármaco se determina por la velocidad de degradación de los polímeros, que dependen de su peso molecular, grupos funcionales, su composición monomérica y su cristalinidad. (57,58)

c) Liberación controlada por estimulación

La liberación de fármacos a partir de acarreadores sensibles a estímulos es controlada mediante estímulos internos o externos como son la temperatura, pH, fuerza iónica, sonido y campos eléctricos o magnéticos. Estos son específicos y la liberación es causada de acuerdo con el desarrollo para el cual estén destinados.(57,58)



2.6.4.2 Sistemas de liberación controlada

El diseño de los sistemas de dosificación controlada y de dirección localizada es uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas formas de medicación. Los sistemas de liberación controlada se basan en la idea de proveer la cantidad óptima del agente activo, en el momento preciso y en el lugar adecuado, buscando una liberación más lenta del fármaco. Esto disminuye el intervalo de dosificaciones lo cual es más cómodo para los pacientes, además que contribuye a una concentración de fármaco uniforme reduciendo el riesgo de una sobredosis o una dosis insuficiente, ayudando también a la optimización del uso de la sustancia activa. (57,58)

Para formar los sistemas de liberación controlada, es necesario que una sustancia activa (fármaco) pueda ser encapsulada, adjuntada, incorporada o mezclada con una sustancia transportadora. El fármaco es por tanto liberado sistemáticamente de forma continua y a concentraciones terapéuticas, pudiendo establecerse un patrón de liberación durante determinados periodos de tiempo. Esto permite que los efectos no deseados y tóxicos producidos por la administración convencional de algunos fármacos sean reducidos. (59)

2.7 Biodisponibilidad Oral

La biodisponibilidad sistémica de un fármaco depende de la fracción absorbida y del metabolismo intestinal o hepático que pueda darse. Esta fracción absorbida corresponde a la cantidad de fármaco que pasa del lumen intestinal al torrente sanguíneo y puede ser obtenida a partir de las concentraciones plasmáticas estimadas a partir de valores de permeabilidad (60). Este paso del fármaco del sitio de administración a la sangre involucra su absorción, definida a su vez por los procesos de disolución y permeación del mismo. Existen muchos factores del TGI que limitan tanto la velocidad de disolución de un fármaco como su velocidad de permeación. Esto es especialmente crítico para fármacos poco solubles en agua, para los cuales la solubilidad puede verse influida por variables como el volumen de los fluidos gastrointestinales, el pH y la presencia de sales biliares y alimentos. Incluso el vaciado gástrico y el tránsito gastrointestinal son aspectos importantes que se han de considerar al hablar de la absorción de fármacos (61).

2.8 Permeabilidad intestinal de Nps

La permeabilidad intestinal es el fenómeno por el cual la membrana intestinal actúa como barrera selectiva para la absorción de nutrientes y xenobióticos, el intestino proporciona una superficie de alrededor de 300 a 400 m² para la absorción. Las NPs tienen la capacidad de atravesar la mucosa intestinal mediante diferentes vías, estas incluyen:



Transporte transcelular representa el principal tipo de transporte de los compuestos hidrofóbicos este tipo de transporte ocurre a través de la membrana celular en donde las NPs pueden ser captadas por los enterocitos o por las células M de los parches de Peyer difundiendo sistémicamente por transporte activo hacia el sistema linfático en el tejido linfoide asociado al intestino superando el metabolismo hepático presistémico lo cual aumenta la biodisponibilidad de los fármacos. (62,63,64)

Transporte paracelular este tipo de transporte ocurre entre células adyacentes (uniones estrechas), las NPs utilizan potenciadores catiónicos y aniónicos para abrir el espacio entre las células, los factores que intervienen son el gradiente de potencial electroquímico (derivado de la diferencia en gradientes de concentración), el potencial eléctrico y la presión hidrostática, es un proceso pasivo que se rige por la Ley de Fick, donde las moléculas hidrofílicas en su mayoría de bajo peso molecular (200 Da) pueden permear mediante este mecanismo, el cual cabe mencionar, tiene una tasa de transporte reducida; sin embargo, existe evidencia de que el diámetro de las uniones estrechas puede incrementarse mediante un proceso regulatorio celular.(65)

Se ha demostrado que el efecto de administrar el medicamento en forma de nanopartículas ha tenido gran impacto sobre la biodisponibilidad debido al tamaño nanométrico de las partículas que aumenta el área de superficie de contacto con la membrana intestinal dando como resultado un aumento en el área de superficie de adhesión entre las células epiteliales intestinales y las nanopartículas.

La figura 4 muestra ejemplos de los mecanismos implicados en la captación celular y permeación de nanoformulaciones en donde se observa que el material utilizado para su manufactura determina la captación por las células. Por ejemplo, se ha observado que las nanopartículas fabricadas con policaprolactona (PCL) son reconocidas más fácilmente por los macrófagos en comparación con aquellas que están hechas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) debido a las diferencias de hidrofobicidad en ambos materiales. (25) y que las nanopartículas de quitosan tienen propiedades mucoadhesivas y actúan como potenciadores de la absorción por su capacidad de producir la apertura irreversible de la unión estrecha epitelial, ayudando a mejorar el transporte paracelular del fármaco contenida en las nanopartículas. (66,67)

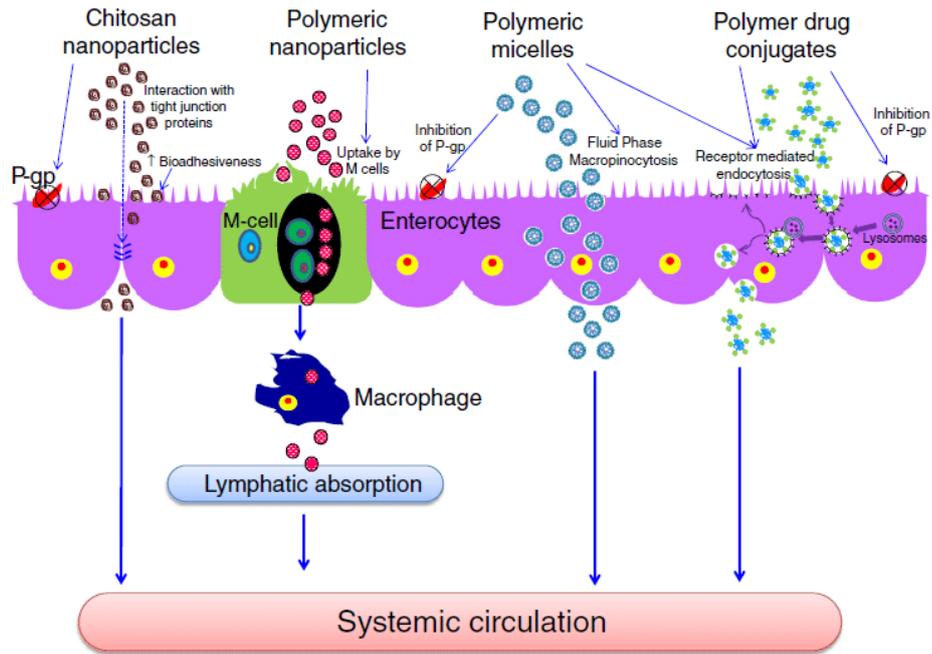


Figura 4 .Mecanismos implicados en la captación celular y la permeación de diferentes tipos de nanoformulaciones.

El tamaño y la carga superficial de las nanopartículas son cruciales para su absorción, los pequeños capilares en el cuerpo tienen 5-6 μm de diámetro. El tamaño de las partículas que se distribuyen en la circulación sanguínea debe ser significativamente menor a 5 μm , sin la formación de agregados, para garantizar que las partículas no produzcan una embolia. (68)

2.8.1 Evaluación de la Permeabilidad *in vitro*

Existen diferentes tipos de modelos *in vitro* y *ex vivo* que imitan epitelios del intestino delgado para la evaluación de la permeabilidad de moléculas. Uno de los modelos *ex vivo* utilizados para la investigación de la permeabilidad es el uso de las celdas de Franz, estas consisten en un compartimento donante y uno receptor. Entre estos compartimentos se inserta la mucosa del cerdo y se fija con un retenedor clip de tal manera que el epitelio se enfrenta al donante y la región del tejido conectivo mira hacia el compartimento receptor. El uso de mucosa porcina es debido a que es más similar a la del humano en estructura y actividad enzimática. (69,70,71)



3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se acepta de forma general, que la actividad farmacológica de un compuesto se ve beneficiada con el uso de formulaciones que conllevan a la selección de un sistema de liberación específico para el fármaco el cual debe ser capaz de liberar en tiempo y forma conveniente para así conseguir un efecto terapéutico óptimo, por lo cual surge la necesidad de la búsqueda de nuevos sistemas de liberación, siendo las nanopartículas un sistema que ha generado gran interés y relevancia en los últimos años en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación especialmente para patologías crónicas como la diabetes, gracias a las ventajas que incluyen: mejoras en la solubilidad, prolongación del tiempo de vida del fármaco en circulación sistémica, liberación controlada, reducción de los efectos adversos entre otros, los cuales ayudan a la modificación de la farmacocinética del fármaco y cuyos resultados finales se traducen en mayor biodisponibilidad y por lo tanto un aumento de los efectos terapéuticos.

Debido a la gran problemática existente en la sociedad generada a partir de la prevalencia de la DM2, resulta de gran interés estudiar la liberación y permeabilidad de ATAC que tiene actividad farmacológica antiglicémica, desarrollando y caracterizando un nanosistema polimérico biodegradable buscando mejorar sus propiedades de solubilidad y permeabilidad para futuros estudios de formulación.



4. HIPOTESIS

El sistema de nanopartículas poliméricas que se desarrollará permitirá encapsular el nuevo compuesto con actividad antidiabética ATAC, lográndose obtener una liberación modificada y al mismo tiempo mejorar la permeación intestinal.



5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de liberación modificada basado en un nanosistema polimérico biodegradable para la administración de ATAC.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Implementar, adecuar y optimizar el método analítico por cromatografía, para la cuantificación del principio activo (ATAC).
2. Mediante pruebas de solubilidad seleccionar los materiales para el desarrollo de la formulación del nanosistema (polímero, estabilizante y disolventes).
3. Desarrollar un diseño experimental para optimizar la preparación de nanopartículas.
4. Obtener las nanopartículas poliméricas biodegradables optimizadas, cargadas con la nueva molécula farmacológicamente activa ATAC.
5. Caracterizar físicamente las nanopartículas poliméricas obtenidas por distribución del tamaño de partícula, potencial Z, morfología, índice de polidispersión y eficiencia de encapsulación.
6. Realizar estudios de eficacia *in vitro*; cinéticas de liberación y permeabilidad.



6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Tabla 5. Reactivos

Reactivos	Marca
ATAC	Sin marca
Alcohol polivinílico	Aldrich mw~31 000
Agua destilada y tridestilada	Hycel
Acetona	Fermont
Metanol	Fermont
Policaprolactona	Aldrich~14 00
Fosfato de sodio dibásico	Fermont
Fosfato de potasio monobásico	JT. Baker
Cloruro de sodio	JT. Baker
Ácido fosfórico	Meyer
Ácido clorhídrico	Meyer
Alcohol etílico	Hycel

Tabla 6. Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	OHAUS	PA214 pioner
Bomba de vacío	MILLIPORE	
Centrifuga	EPPENDORF AG	22331 Hamburg
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución	WATERS	717
Potenciómetro	OAKTON	pH700
Sistema de filtración	MILLIPORE	16309
Sonicador	COLE – PARMER	8890
Vortex	COLE-PARMER	VORTEX MIXER
Parrilla de agitación	MULTI-MAGNESTIR	EQ-002
Zeta- sizer	MALVERN	Nano Series Nano-2590
Rota evaporador	IKA	RV 10 digital
Ultracentrífuga	BECKMAN	L80



7. METODOLOGÍAS

7.1 Preparación de soluciones

Solución stock de ATAC (Concentración: 1000 µg/mL)

Se pesó aproximadamente 10 mg de ATAC, posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL se disolvió con 5 mL de metanol, se sonicó por 3 minutos, y se llevó al aforo con metanol grado HPLC.

Solución de trabajo de ATAC (Concentración: 100 µg/mL)

Con micropipeta se tomó una alícuota de 1 mL de la solución stock y se diluyó a 10 mL con fase móvil posteriormente se sonicó por 3 minutos.

Solución amortiguadora 0.05 M de NaH₂PO₄ con 6% de etanol pH 3.5

Se pesó 6.9 g de NaH₂PO₄, se disolvió con aproximadamente 200 mL de agua tridestilada, después se agregaron 600 µL de alcohol etílico y se ajustó el pH a 3.5 con ácido fosfórico finalmente se aforó a 1 L

7.1.1 Curva de cuantificación

Se preparó una curva de cuantificación, como se muestra en la tabla 7

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de ATAC

Puntos de la curva de calibración	Concentración (µg/mL)	Vol. del sol. Trabajo de ATAC 100 (µg/mL) (µL)	Vol. sol aforo (µL) MeOH	Vol. Final (mL)
1*	0.5	100	1900	2
2*	1	200	1800	2
3*	2	400	1600	2
4*	4	800	1200	2
5	8	160	1840	2
6	15	300	1700	2
7	30	600	1400	2
8	50	1000	1000	2

*Concentraciones preparadas con solución de trabajo de concentración 10 µg/mL

Las condiciones cromatográficas con las que se cuantifico ATAC están en la tabla 8.



Tabla 8. Condiciones Cromatográficas para cuantificar ATAC

Columna	Zorbax CN de 4.6 x 250 mm
Fase móvil	Solución amortiguadora 0.05 M de NaH ₂ PO ₄ con 0.06% de etanol pH= 3.5 /metanol (50:50)
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda	223 nm
Temperatura	Ambiente
Intervalo de cuantificación	0.5-50 µg/ml

La figura 5 muestra el esquema general para el desarrollo de NPs

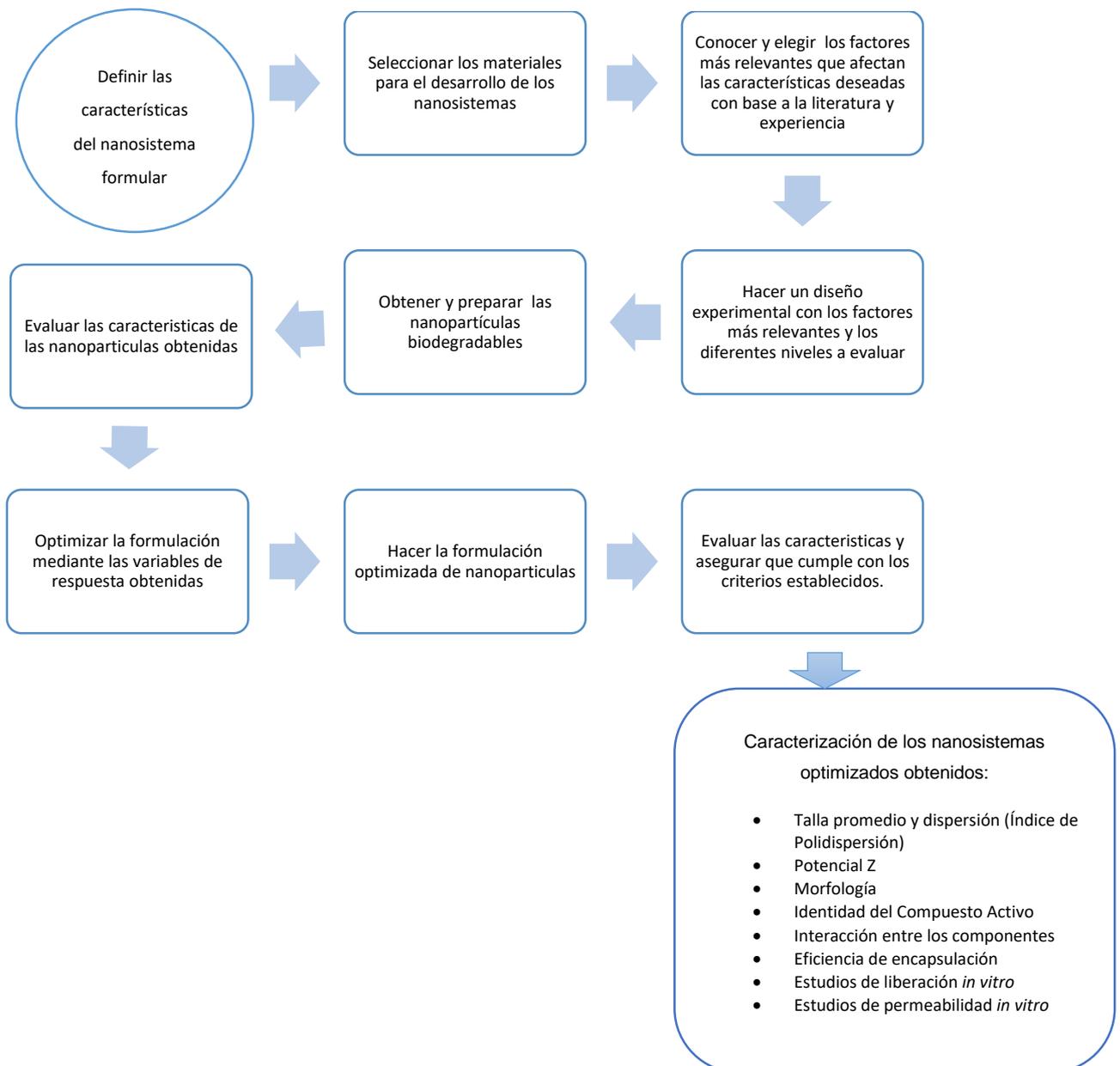


Figura 5. Esquema del desarrollo de Nps



7.3 Determinación de la longitud de onda de máxima absorción de ATAC

Para determinar la identidad del ATAC se obtuvieron los espectros de absorción de ATAC con un barrido en la luz UV y Visible, en un rango de 200 a 800 nm con la finalidad de obtener los máximos de absorción y comparar los espectros con las referencias existentes. Para ello se prepararon varias soluciones de ATAC con diferentes concentraciones (0.5, 2, 10, 25, y 50 $\mu\text{g/mL}$)

7.4 Selección de materiales

Los disolventes utilizados se eligieron a través de pruebas de solubilidad de la molécula ATAC y el polímero en diferentes disolventes orgánicos (etanol, acetona, acetato de etilo y agua). La solubilidad se determinó con el método de adición de volúmenes de disolvente hasta obtener la saturación del soluto.

7.4.1 Prueba de solubilidad

Se pesaron 10 mg de cada compuesto (ATAC, PCL Y PVA) cada uno se colocó en un tubo de ensayo y se agregaron los disolventes a evaluar en cantidades de 100 μL (etanol, metanol, agua, acetona, acetato de etilo, buffer pH 6.8) posteriormente se agito por 3 minutos en el vórtex, repitiendo el procedimiento de adición de disolvente hasta que el compuesto estuviera disuelto. Se registró la cantidad de microlitros agregados de cada disolvente evaluado.

7.5 Diseño experimental

para la preparación de NPs

El diseño experimental se obtuvo mediante el Software StatGraphics Centurion XVI, este fue un diseño de cribado, en la tabla 9 se muestran los factores y los niveles utilizados, así como las variables de respuesta a evaluar. La matriz experimental obtenida se encuentra en la tabla 10 en la que se muestran los nueve experimentos que se realizaron.



Tabla 9. Factores, niveles y variables de respuesta del diseño experimental

Factores	Niveles	Variables de respuesta
1. Concentración de polímero	4 y 16 mg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Talla promedio • Potencial Z • Eficiencia de encapsulación
2. Concentración de estabilizante	2.5 y 10 mg/ml	
3. Dosis del fármaco	10 y 30 mg	

Tabla 10. Matriz de diseño experimental

Experimento	PCL (X ₁)	PVA (X ₂)	Fármaco (X ₃)
1	4	2.5	10
2	16	2.5	30
3	16	10	10
4	10	5	20
5	4	2.5	30
6	16	10	30
7	4	10	30
8	4	10	10
9	16	2.5	10

Unidades: X₁ (µg/ml), X₂ (µg/ml), X₃ (mg)

7.6 Preparación de nanopartículas de PCL por el método de nanoprecipitación

Se pesó la cantidad de PCL y ATAC según la formulación a realizar de acuerdo a los niveles de cada factor en el diseño experimental estas cantidades fueron disueltas en 25 mL de acetona (Solución A).

Se pesó el estabilizador (PVA) a la concentración requerida para cada experimento y fue disuelto en 50 mL de agua destilada (solución B).

La solución A se cargó en una jeringa de 20 mL, en este caso se hizo la adaptación de un equipo Karl Fisher para tener un mejor control del volumen y agitación constante utilizados. Posteriormente desde este dispositivo se adicionó gota a gota la solución A (a una velocidad constante de 60 gotas/ min aproximadamente) sobre el vaso de la solución B que se encontraba en agitación. Al término de la adición de la solución A se dejó en agitación por 5 minutos más, obteniendo una suspensión A, la cual se sometió a la evaporación del disolvente en agitación constante en una parrilla manteniéndose en agitación constante por



aproximadamente 3 horas (hasta que el volumen utilizado de acetona se evaporara de la suspensión y el olor ya no estuviera presente) con una temperatura de aproximadamente 50°C y el cual no debía sobrepasar los 56 °C ya que el punto de fusión de la PCL es de 60°C.

En tubos para centrifuga de 50 mL se colocó la suspensión A obtenida, se centrifugó durante 1.5 horas a 11 000 rpm a 4°C en una ultracentrífuga. Se recuperó el pellet (estas son las NPs) y se resuspendió con agua destilada 5 mL aproximadamente, por cada 10 mL de nanopartículas resuspendidas se agregarón 100 mg de D-manitol para almacenarlas a -70°C para su posterior liofilización. Se tomó una alícuota de 1.5 mL para medir el potencial Z y el tamaño de partícula.

El sobrenadante que quedó después de centrifugar se guardó para cuantificación de ATAC libre. La liofilización se llevó a cabo por aproximadamente 24 horas a una temperatura de 40°C.

7.7 Optimización de las NPs

La optimización se hizo para conocer cuáles son los niveles adecuados a utilizar de los factores (X_1 , X_2 , X_3) para obtener las mejores variables de respuesta (Y_1 , Y_2 , Y_3) según los niveles explorados. Buscando la obtención de NPs con la talla más pequeña posible, el mayor potencial Z y la mejor EE %.

Para obtener la formulación optimizada se utilizó el método de superficie de respuesta de la matriz exploratoria en el software Statgraphics Centurion XVI, la producción de estas NPs fue por triplicado con la metodología de nanoprecipitación.

7.8 Caracterización

7.8.1 Tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica

Se colocó 1 mL de la suspensión de NPs en una celda de plástico de 1 cm de grosor y se leyeron en un equipo Zetasizer nano ZS90, a un ángulo de detección de 90°, con 3 repeticiones (de 11 lecturas cada una) para cada muestra y un tiempo de equilibrio de 30 s a una temperatura de 25°C.

7.8.2 Determinación de potencial Z

Se colocó la cantidad suficiente de la suspensión de NPs en una celda especial para determinación del potencial Z para cada muestra, estas se leyeron en el equipo Zetasizer nano ZS90, con 3 repeticiones (11 lecturas para cada una) y un tiempo de equilibrio de 30 s a una temperatura de 25°C.



7.8.3 Determinación del rendimiento

Una vez obtenidas las partículas liofilizadas se pesaron para determinar el rendimiento porcentual con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso de las NPs liofilizadas}}{\text{Peso teórico de sólidos}} \times 100$$

En donde el peso teórico de sólidos en la formulación corresponde a la suma de los pesos de cada componente empleado para la fabricación de las NPs (ATAC, PCL).

7.8.4 Evaluación de la eficiencia de carga

La eficiencia de la carga de NPs se realizó pesando 10 mg de NPs los cuales fueron colocadas en tubos Corning con 5 mL de acetona y se pusieron en agitación durante 8 horas en un vortex. Posteriormente se colocaron 30 minutos en sonicación y se centrifugaron a 11000 rpm en una centrifuga durante 30 minutos, se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se llevó a volumen de 1 mL con acetona, esta última fue inyectada en el HPLC para cuantificar la concentración de ATAC disponible.

Con la siguiente fórmula se calculó la eficiencia de carga, la evaluación se realizó por cada lote.

$$EC (\%) = \frac{\text{Cantidad total de ATAC encapsulado}}{\text{Peso inicial de ATAC}}$$

7.8.5 Morfología de las NPs por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Se resuspendieron aproximadamente 0.5 mg de NPs liofilizadas (NPs con ATAC y NPs sin ATAC) en agua destilada, de la cual se tomaron aproximadamente 50 μ L y se colocaron en un portaobjetos, expandiendo la muestra por toda la superficie de este, se dejó secar y al día siguiente las muestras fueron recubiertas con oro con un espesor aproximado de 10 nm, en una máquina de pulverización catódica marca JEOL, modelo JFC-1100, durante 3 minutos para otorgar conductividad, después fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-7600F, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.



7.8.6 Espectroscopia Infrarroja (IR)

Para corroborar la identidad y obtener el patrón de referencia de cada compuesto a utilizar, así como la mezcla de estos. Se prepararon pequeñas cantidades de cada materia prima utilizadas para preparación de NPs (ATAC, PCL Y PVA) así como la Mezcla física y las NPs con y sin ATAC para obtener el espectro IR, cada muestra se colocó sobre un cristal ATR en un espectrómetro de infrarrojo, con las condiciones de 500-4000 cm^{-1} y 150 escaneos para cada muestra.

7.8.7 Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP)

Igual que para IR se prepararon pequeñas cantidades de cada materia prima utilizadas para la preparación de NPs (ATAC, PCL Y PVA) así como la Mezcla física y las NPs con y sin ATAC, cada muestra se colocó en la platina del difractor rayos X para polvos con condiciones de 5 a 45° (2θ) durante 20 minutos.

7.8.8 Calorimetría diferencial de barrido

Se pesaron crisoles herméticos de aluminio de baja masa cada uno con su respectiva tapa la cual fue perforada antes de ser pesada, posteriormente se pesaron aproximadamente 5 mg de cada muestra (materias primas, mezcla física, NPs con y sin ATAC), y con ayuda de una prensa los crisoles con su respectiva tapa fueron sellados, estos se colocaron en un calorímetro marca Mettler Toledo junto a un crisol de referencia. Las muestras se analizaron a una velocidad de 20°C/min, con un rango de temperatura de 30 a 250 °C, con un flujo de nitrógeno de 50 mL/min. Como referencia se usó indio para calibrar el equipo.

7.9 Estudio de liberación *in vitro*

El estudio de liberación se realizó por triplicado utilizando las NPs optimizadas de tres diferentes lotes, el compuesto ATAC en suspensión y un blanco de NPs sin ATAC. Se pesaron aproximadamente 10 mg de NPs de cada lote y 0.5 mg del compuesto ATAC, se colocaron en bolsas de diálisis (12 000 kDa) de 8 cm, resuspendiendo con 2 mL de buffer pH1.2 (figura 6 A). La liberación se hizo en buffer pH 1.2 las primeras 2 horas y enseguida la misma bolsa de diálisis fue colocada en el pH 6.8 con un volumen de 200 mL para cada vaso, al cual se le colocó un agitador magnético, enseguida se colocaron dentro de un sistema parecido a un equipo de disolución con una temperatura del baño de 37°C (figura 6 B), las bolsas de diálisis se adaptaron para ser sumergidas en los vasos de precipitado (figura 6 C) y se procedió a encender el equipo a una agitación aproximada de 100 rpm. Se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 20, 24, 30, 36, y 48 horas, las cuales se midieron por medio de HPLC. Es importante mencionar que la muestra tomada a cada tiempo (1mL)



fue remplazada con la misma cantidad de buffer correspondiente para mantener el volumen constante y condiciones Sink. Se reporta el perfil de liberación en gráficos de porcentaje liberado vs tiempo.

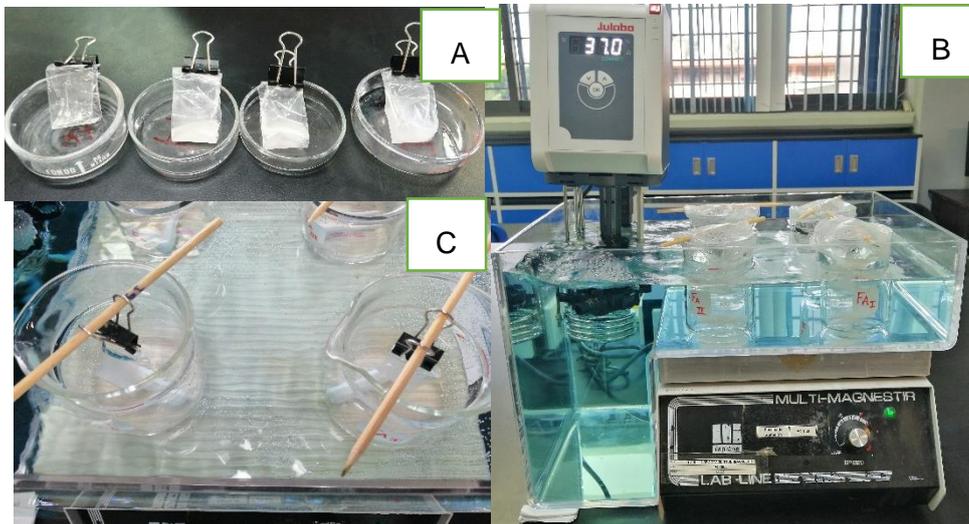


Figura 6. A) Bolsas de dialisis con Nps en suspensión, B) Bolsas de dialisis colocadas en el medio de liberación a agitación constante, C) Equipo utilizado para el estudio de liberación de las NPs.

7.10 Estudio de permeabilidad *in vitro*

El estudio de permeación se realizó en celdas de difusión de Franz la figura 7 muestra un esquema representativo del tipo de celda utilizada. El área de difusión fue de 12.56 cm² la cual fue recortada según el diámetro de las cámaras de la celda (figura 8 A). En cada cámara receptora se colocó un agitador magnético pequeño y después la cámara receptora se llenó con 11 mL de buffer pH 6.8, se puso la membrana cuidadosamente del lado correcto según cada cámara (figura 8 B). La membrana utilizada fue intestino de cerdo específicamente el duodeno, este se consiguió en un rastro el cual fue entregado lavado y colocado en solución salina.

En el compartimento donador se adicionaron 2 mL de una suspensión de NPs la cual se preparó de la siguiente manera; Se pesaron aproximadamente 10 mg de cada uno de los 3 lotes de NPs y 1 mg del compuesto ATAC por triplicado en tubos ependorf se resuspendieron y con ayuda de una micropipeta de 1mL se adicionaron a la cámara donadora de las celdas, se taparon y se colocaron en el baño del equipo a 37°C a 100 rpm durante 48 horas (figura 8 C). Los tiempos de muestreo fueron los mismos que en el estudio de liberación tomando una alícuota de 200 µL y con reposición del medio.

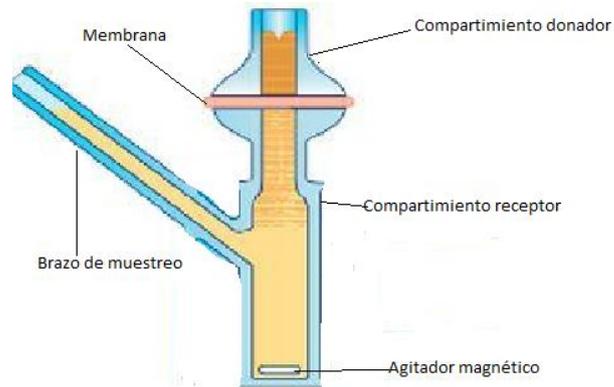


Figura 7. Esquema de una celda de Franz vertical

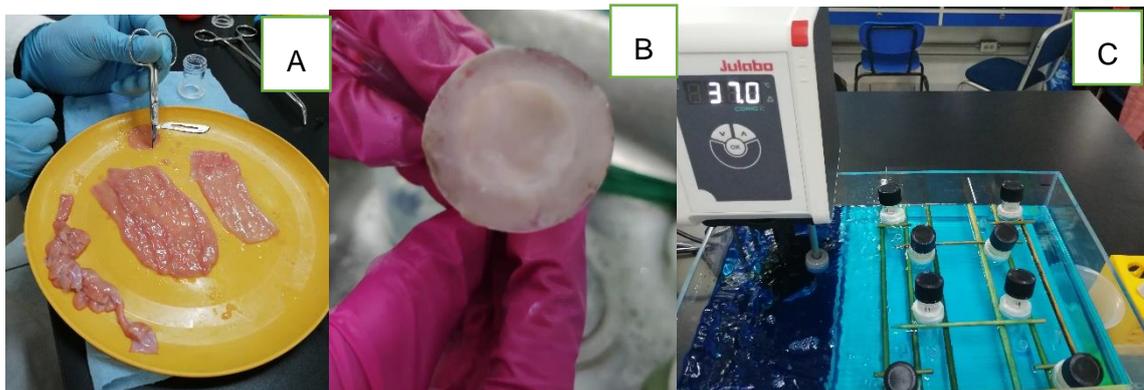


Figura 8. Preparación del estudio de Permeabilidad A) Corte de intestino de cerdo, B) Colocación de un área determinada de intestino en la parte receptora de la celda de Franz, C) Equipo para la prueba de permeabilidad.



8. RESULTADOS

8.1 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción

En la figura 9 se muestra el espectro de absorción de ATAC, en un rango de 200 a 400 nm. La longitud de máxima absorción de ATAC es de 223 nm.

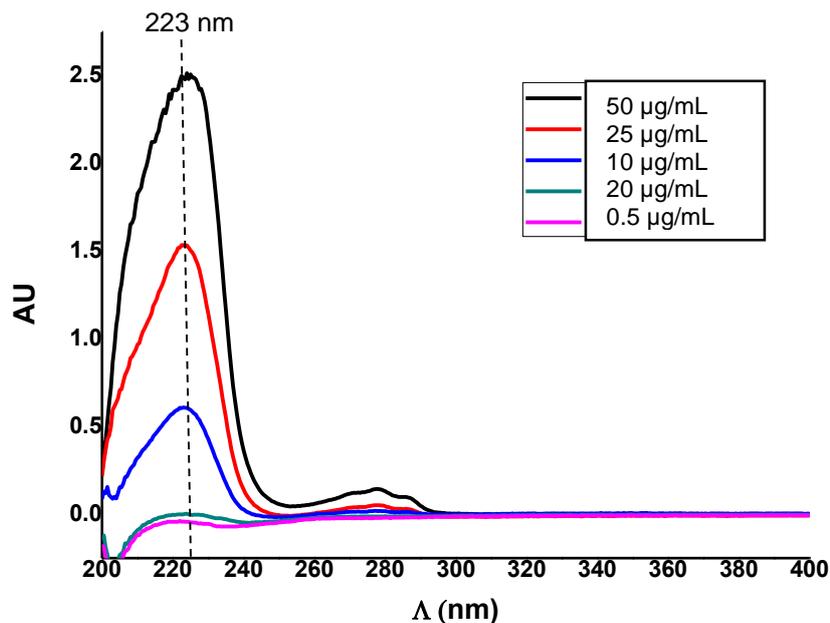


Figura 9 . Espectros de absorción en UV de ATAC en la región de 200 nm a 400 nm a distintas concentraciones

8.2 Pruebas de solubilidad

Se realizó la solubilidad de los materiales a utilizar en varios disolventes. La tabla 11 muestra los resultados de solubilidad obtenidos, con base a los resultados se decidió usar acetona como disolvente para obtener las NPs, ya que tanto el polímero (PCL) como el compuesto ATAC fueron solubles en este, siendo además un disolvente que es miscible en agua y volátil para evaporar, características que son deseables para llevar a cabo la formación de NPs por el método de nanoprecipitación.



Tabla 11. Pruebas de solubilidad de los compuestos a utilizar

Compuesto (5 mg)	Volumen de disolvente (µL)								
	Alcohol etílico	Diclorome- tano	Acetato de etilo	Acetona	Metanol	Buffer fosfatos pH 7	Agua destilada	Buffer de fosfatos pH1.2	Buffer de fosfatos pH6.8
ATAC	800	NS	1200	500	400	5000	NS	NS	5000
POLI- CAPROLACTONA	NS	700	400	200	NS	NS	NS	NS	NS
PVA	NS	NS	NS	NS	NS	300	300	500	300

NS: No soluble

Otra de las pruebas de solubilidad importantes fue la de las materias primas en los Buffers a utilizar para llevar a cabo los estudios de liberación y permeabilidad (Buffers de fosfatos pH1.2 y pH 6.8) en donde se observó que la solubilidad de ATAC es mejor en pH 6.8 debido a su naturaleza ácida lo cual sugiere tendrá mejor disolución en pH 6.8, en cuanto a policaprolactona esta no es soluble en ninguno de los dos buffers sin embargo existen diversos estudios en donde se usa como portador en muchos tipos de sistemas de administración de fármacos de uso humano y veterinario dando buenos resultados.

8.3 Linealidad del método cromatográfico

La figura 10 y la tabla 12 muestran los parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de ATAC, en donde se observa que el método cumple con los criterios establecidos de linealidad, precisión y exactitud, bajo los rangos especificados tomando como guía la NOM 177-SSA1-2013 asegurando resultados confiables.

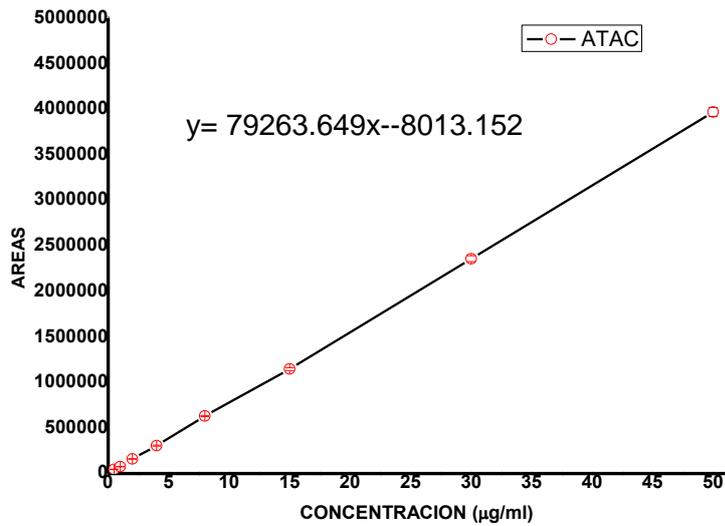


Figura 10. Curva de cuantificación de ATAC

Tabla 12. Parámetros de desempeño del método analítico

PARÁMETRO	CRITERIO	RESULTADO
Coefficiente de correlación (r)	0.99	0.9999
Coefficiente de determinación (r ²)	0.98	0.9998
Precisión	≤2	1.88
Exactitud	≤3	2.78

	IC	SUP	INF
IC (m)	1979.42	81243.07	77284.23
IC(b)	10647.45	2634.29	-18660.60

Para asegurar que el método es selectivo para la cuantificación de ATAC se inyectaron muestras blanco de los diferentes estudios, la figura 11 muestra una serie de los cromatogramas más importantes de las diferentes muestras procesadas donde se observa que no hay interferencia de algún otro analito para la cuantificación de ATAC el cual tuvo un tiempo de retención de 7 ± 0.5 minutos.

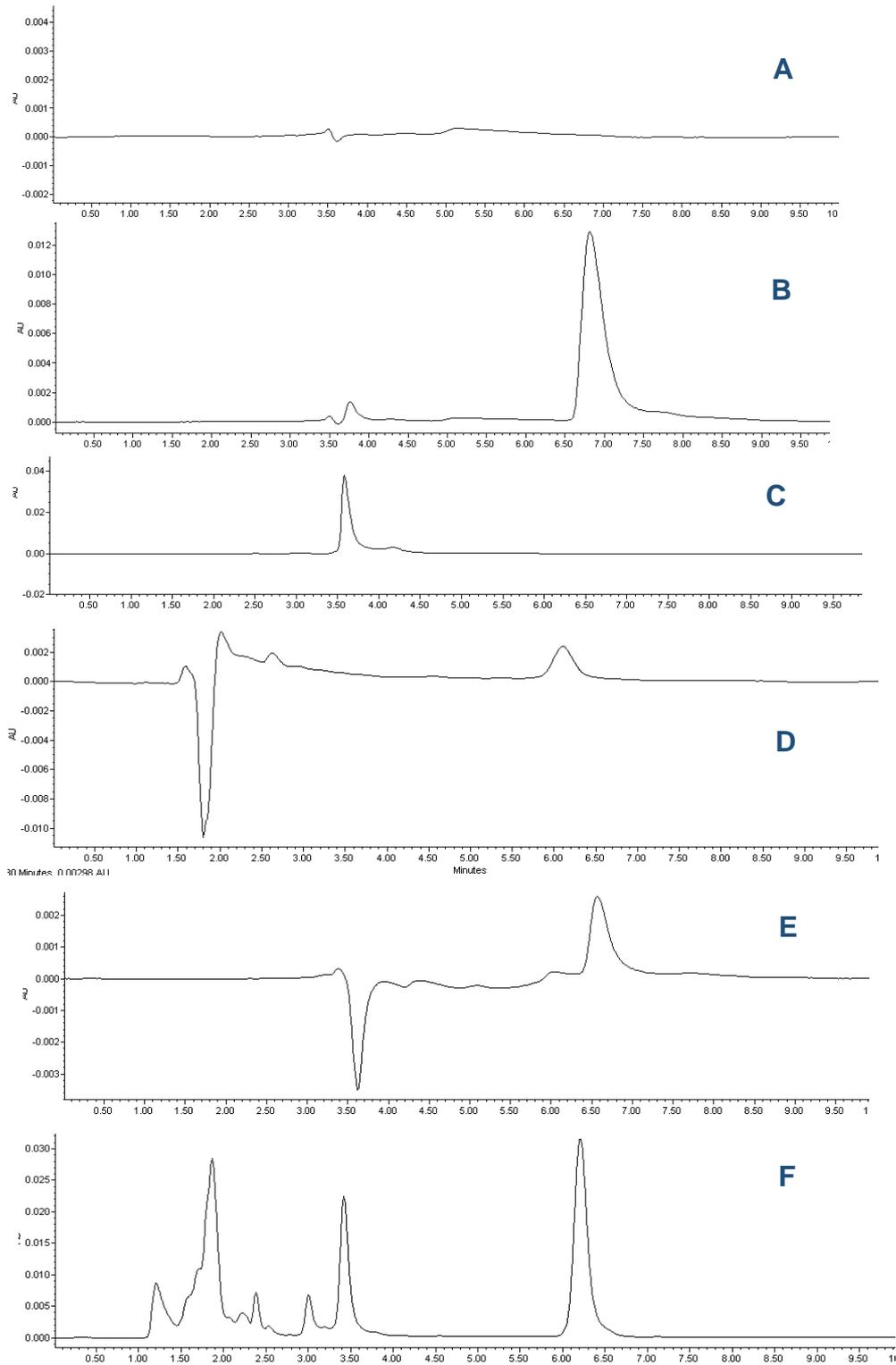


Figura 11. Cromatogramas; (A) Blanco, (B) Estándar de ATAC, (C) NPs sin ATAC, (D) NPs con ATAC, (E) Muestra de liberación, (F) muestra de permeabilidad *in vitro*.



8.4 Características del sistema nanoparticulado a desarrollar

La tabla 13 y 14 especifica las características planteadas en un inicio del tipo de nanosistema que se quería formular tomando en cuenta la vía de administración, los materiales disponibles, el método de elaboración del tipo de nanopartícula y la solubilidad de las materias primas. La elección de todos los parámetros fue con ayuda de información bibliográfica, enfocando la formulación a una posible incorporación a una vía de administración oral.

Tabla 13. Características del sistema

Tipo de nanopartícula	Nanoesferas
Objetivo del sistema	aumentar la liberación y permeabilidad
Enfoque de elaboración	Bottom up (producción de abajo hacia arriba)
Método de elaboración	Nanoprecipitación
Vía de administración	Oral
Tamaño de partícula deseado	200-500 nm
Potencial Z óptimo	±30 mv

Tabla 14. Materiales para el desarrollo de los nanosistemas

Polímero biodegradable	Policaprolactona (PM:14000)
Disolvente orgánico	Acetona
Disolvente acuoso	Agua
Estabilizantes	Alcohol polivinílico



8.5 Diseño experimental exploratorio en Statgraphics

Se eligieron los factores considerados como más relevantes para la fabricación de las NPs con base a la literatura. Esto con el fin de establecer el tipo de diseño experimental a realizar tomando en cuenta los niveles a explorar y las variables de respuesta.

Se decidió realizar un diseño exploratorio para observar los factores que influyen en el proceso del desarrollo de las NPs y poder llevar a cabo el proceso de optimización, con el software Statgraphics Centurion XVI cuya matriz de diseño corresponde a la tabla 15 la cual muestra los parámetros de los 9 experimentos realizados y los resultados de cada variable de respuesta analizada.

Tabla 15. Variables de respuesta obtenidos

Experimento	PCL (X ₁)	PVA (X ₂)	Fármaco (X ₃)	Talla (Y ₁)	Potencial Z (Y ₂)	% EE (Y ₃)
1	4.0	2.5	10.0	272.3	-27.3	48.6
2	16.0	2.5	30.0	420.0	-24.9	48.6
3	16.0	10.0	10.0	346.0	-29.2	40.9
4	10.0	5.0	20.0	336.0	-31.3	44.5
5	4.0	2.5	30.0	251.0	-23.8	28.2
6	16.0	10.0	30.0	325.0	-27.7	59.2
7	4.0	10.0	30.0	249.0	-22.6	50.7
8	4.0	10.0	10.0	255.0	-27.7	24.1
9	16.0	2.5	10.0	381.0	-27.7	23.5

Unidades de las variables; X₁ (µg/mL), X₂ (µg/mL), X₃ (mg)

Posteriormente los datos obtenidos se analizaron con el mismo software antes mencionado para obtener la optimización de NPs de ATAC, así como analizar los factores que tienen impacto en la formulación.

La magnitud del efecto de los factores y sus interacciones se pueden ver con las gráficas de Pareto (figuras 14,13 y 14), donde los factores significativos son aquellos que pasan la línea en color azul, observando que en el gráfico que corresponde para la talla la PCL es el factor que más influye en el tamaño promedio de las NPs obtenidas. Las barras color gris indican que existe un efecto positivo en el tamaño, es decir el tamaño aumenta cuando los niveles del factor aumentan, mientras que las barras en color azul indican que existe un impacto negativo (la respuesta disminuye cuando los niveles del factor aumentan).

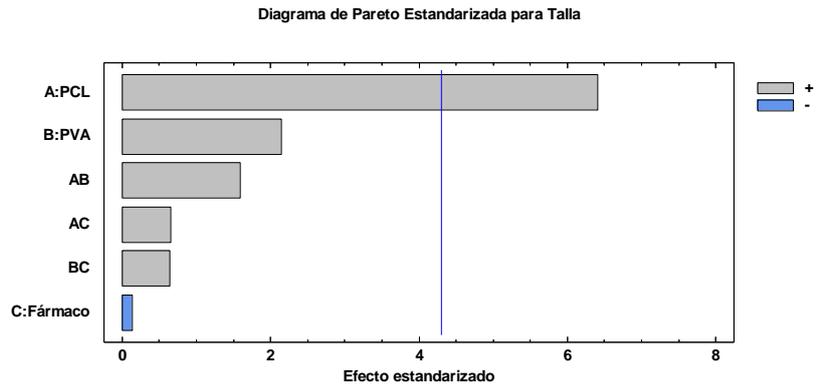


Figura 12. Gráfico de Pareto estandarizada para la talla promedio

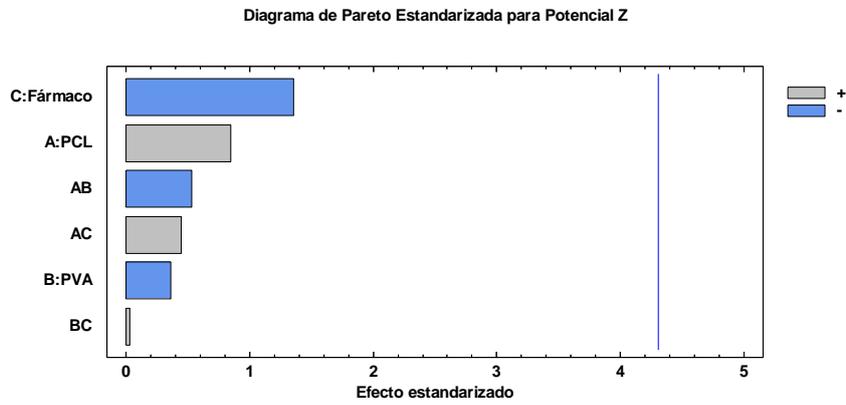


Figura 13. Gráfico de Pareto estandarizada para el potencial Z

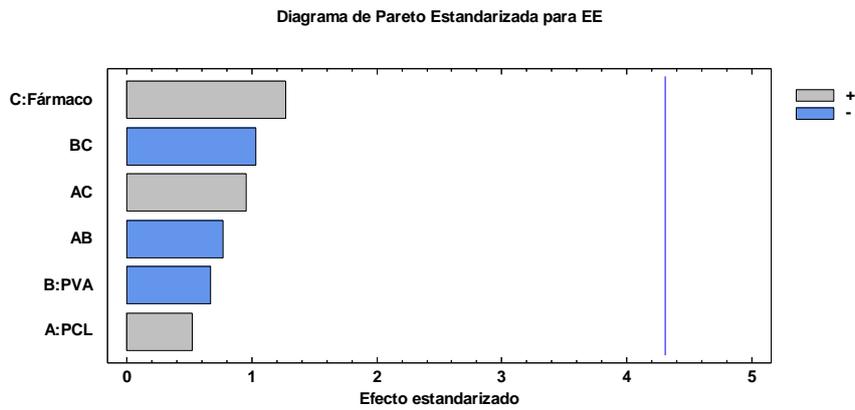


Figura 14. Gráfico de Pareto estandarizada para la Eficiencia de encapsulación



8.5.1 Optimización

Para obtener NPs optimizadas es decir con las mejores características evaluadas en cuanto a eficiencia de encapsulación, talla y potencial Z, así como el índice de polidispersión se utilizó el método de superficie respuesta en el software Statgraphics Centurion XVI, con el cual se predijeron los niveles óptimos de los factores, la tabla 16 muestra dichos valores. Cabe mencionar que el factor concentración de PVA se coloca el nivel más bajo utilizado en los experimentos exploratorios ya que se observó que no afecta la respuesta esperada según el grafico de la figura 15 que muestra el contorno de superficie de respuesta estimada donde se observa el grado de deseabilidad que tenemos al realizar la formulación optimizada, es decir que tanta probabilidad hay de que los resultados sean los predichos, en este caso obtuvimos una deseabilidad del 0.72 por lo tanto asumimos que existía un 72% de probabilidad de obtener la formulación optimizada con las respuestas esperadas. La tabla 16 muestra las condiciones para formular las NPs optimizadas esperando el menor tamaño de talla, el mayor potencial Z y el mayor % de eficiencia de encapsulación. La producción de NPs se llevó a cabo por triplicado mediante el método de nanoprecipitación.

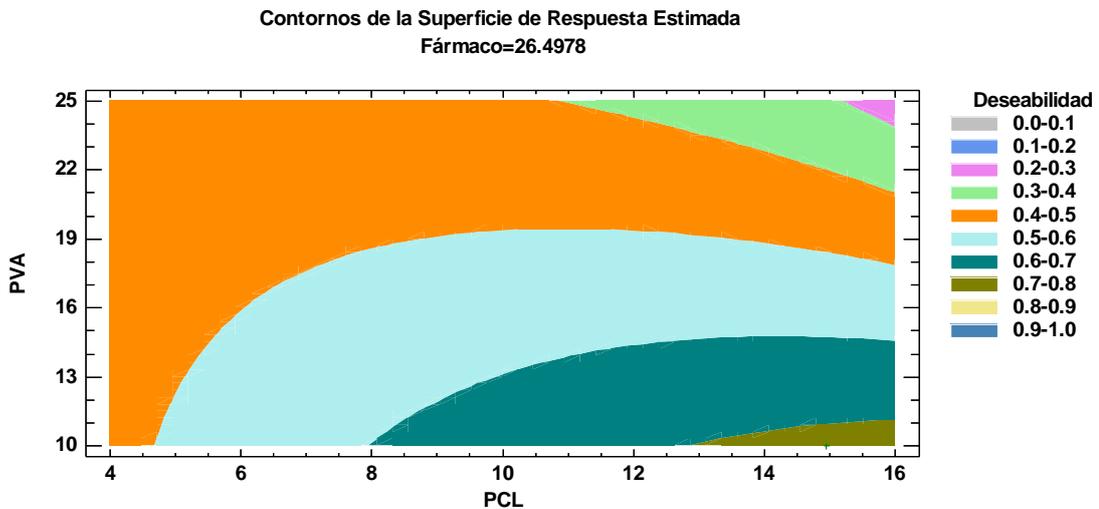


Figura 15. Gráfico de contornos de la superficie de respuesta estimada.



Tabla 16. Valores óptimos vs valores reales

Factores óptimos Deseabilidad = 0.724775		Variables de Respuesta	Valor predicho	Valor experimental	Error de la predicción
PCL (mg/mL)	14.94	Talla (nm)	329.451	359.63 ± 7.27	22.909- 37.449
PVA (mg/mL)	10.00	Potencial Z (mVs)	27.9253	-10.23 ± 0.49	17.20-18.18
ATAC (mg)	26.49	EE (%)	59.2	62.60 ± 3.48	0.08-6.88

Se muestran valores promedio (n=3) ±D.E.

La tabla 17 contiene los resultados de las formulaciones optimizadas tomando en cuenta datos adicionales como el PDI, %CC y el % de rendimiento

Tabla 17. Resultados de las formulaciones de NPs optimizadas

Experimento	Talla	PDI	Potencial Z	%EE	% CC	Rendimiento %
F I A	361.2	0.441	-9.89	58.96	4.385	65.28
F I B	351.7	0.448	-10.8	65.90	4.737	66.78
F I C	366	0.182	-9.99	62.93	5.177	58.95
Promedio	359.63	0.36	-10.23	62.60	4.77	63.67
D.E	7.2776	0.1516	0.4990	3.4808	0.3965	4.1565
%CV	2.0236	42.4635	-4.8797	5.5605	8.3183	6.5283

8.6 Espectroscopia Infrarrojo IR

Los estudios de IR nos brindan información estructural de los compuestos, permiten detectar algunos de los grupos funcionales que están presentes en las moléculas y posibles interacciones, por lo tanto a menudo se usa para identificar y o caracterizar estructuras. En esta técnica, un haz de luz infrarroja incide sobre la materia y provoca vibraciones de los átomos de la molécula. Las vibraciones son específicas a determinadas frecuencias de los enlaces químicos, que corresponden a niveles de energía de la molécula que serán detectados por el equipo, las señales dependen de la forma de la superficie de energía



potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional. La cantidad de luz absorbida es registrada continuamente, el rango de longitudes de onda de interés, por lo general, $4000-400\text{ cm}^{-1}$. (35) Según la fortaleza de los enlaces y la masa de los átomos implicados será necesaria más o menos energía para que se produzca la absorción de la radiación. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia. Además de que cada cambio es propio de cada molécula nos puede dar información sobre la formación de nuevos enlaces y los cambios que pudieran ocurrir al mezclarse físicamente o al convertirlas en partículas.(34,36)

En la figura 16 se muestran los espectros de infrarojo de ATAC, PCL,PVA, la mezcla física, NPs con y sin ATAC en donde cada pico representa un tipo de vibración específica.

De 1500 cm^{-1} a 500 cm^{-1} se encuentran las huellas dactilares de las materias primas, de la mezcla física y de las NPs, se pueden observar las diferencias que hay entre las bandas de ATAC, PVA, Y PCL y en menor medida se aprecian las diferencias entre las bandas de PCL y las NPs con y sin ATAC ya que parecen ser muy similares, esto debido a que en su mayoría contienen PCL, sin embargo el espectro de NPs con ATAC muestra una señal característica a 1590 cm^{-1} que también fue visible en el espectro de ATAC lo cual indica la presencia de ATAC en las NPs, es decir comprueba que la incorporación de ATAC realmente se llevo a cabo. Respecto a señales de PVA en las NPs estas no se esperaban ver ya que la finalidad de los lavados a las NPs en el método de fabricación era la eliminación de PVA.

La región del espectro situada entre 4000 y 1500 cm^{-1} es de gran utilidad para la identificación de la mayoría de los grupos funcionales presentes en las moléculas orgánicas. Las absorciones que aparecen en esta zona, provienen fundamentalmente de las vibraciones de estiramiento. En las tablas 18 y 19 se muestran los números de onda específicos de las señales generadas por cada compuesto de acuerdo a sus grupos funcionales.

En el espectro de PCL, NPs con y sin ATAC se observa una señal a 1693 cm^{-1} la cual corresponde al estiramiento de dobles enlaces $C=C$, las señales en 1718 cm^{-1} corresponden a un carbonilos $C=O$, sin embargo, en el caso de ATAC la señal es más débil 1693 cm^{-1} debido a la existencia de resonancia en la molécula, las señales en 3240 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace $C-H$, la señal en 3345 cm^{-1} en el PVA corresponde al estiramiento de un grupo $-OH$ donde se aprecia una banda ancha característica de este grupo, también se observan señales de $C=C$ en 1650 cm^{-1} en del espectro de ATAC y señales en 2949 cm^{-1} indicando enlaces $C-H$ en todos los espectros.

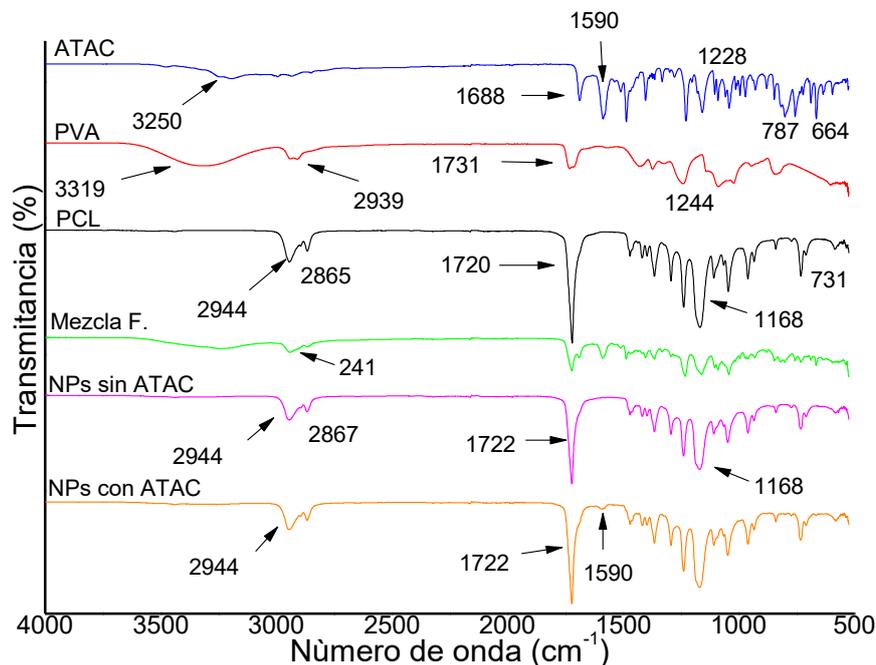


Figura 16 Espectros de IR de las materias primas (ATAC, PCL, PVA), de la mezcla física, y de NPs, con y sin ATAC

Tabla 18. Señales características en IR de ATAC

ATAC	
Señal cm ⁻¹	Enlace
664	C-Cl
787	Sistema aromático <i>para</i> -sustituido (posición 1,4)
675-900	C-H (Ar)
650-1000	C=C (Ar)
1000-1250	C-O (Ar)
1350	N-C
1475-1600	C=C
1688	C=O
3250	N-H

Figura 17. Espectros de las materias primas (ATAC, PCL, PVA), de la mezcla física, y de NPs, con y sin ATAC.



Tabla 19. Señales características en IR de PVA y PCL

PVA		PCL	
Señal cm^{-1}	Enlace	Señal cm^{-1}	Enlace
1000-1250	C-O	1168	C-O-C
1380	C-H (CH)	1000-1250	C-O
1466	C-H (CH ₂)	1466	C-H (CH ₂)
2909-2939	C-H (CH ₃)	1720	C=O
3319	O-H	2865-2944	C-H (CH ₃)

8.7 Morfología de las NPs

La morfología de las NPs fue determinada por microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual nos proporciona información sobre la topografía de las NPs de ATAC la figura 18 A muestra NPs sin ATAC mientras que la figura 18 B NPs cargadas con ATAC en ambas se observaron estructuras esféricas y sólidas de tamaño nanométrico, lo cual confirma la formación de NPs por el método de nanoprecipitación con las condiciones de trabajo propuestas. Cabe mencionar que las NPs de la figura 18 A son más pequeñas y menos aglomeradas que la figura 18 B, debido a que a estas últimas se les adicionó el crioprotector al liofilizarlas y esta aglomeración posiblemente sea debido a este último tratamiento.

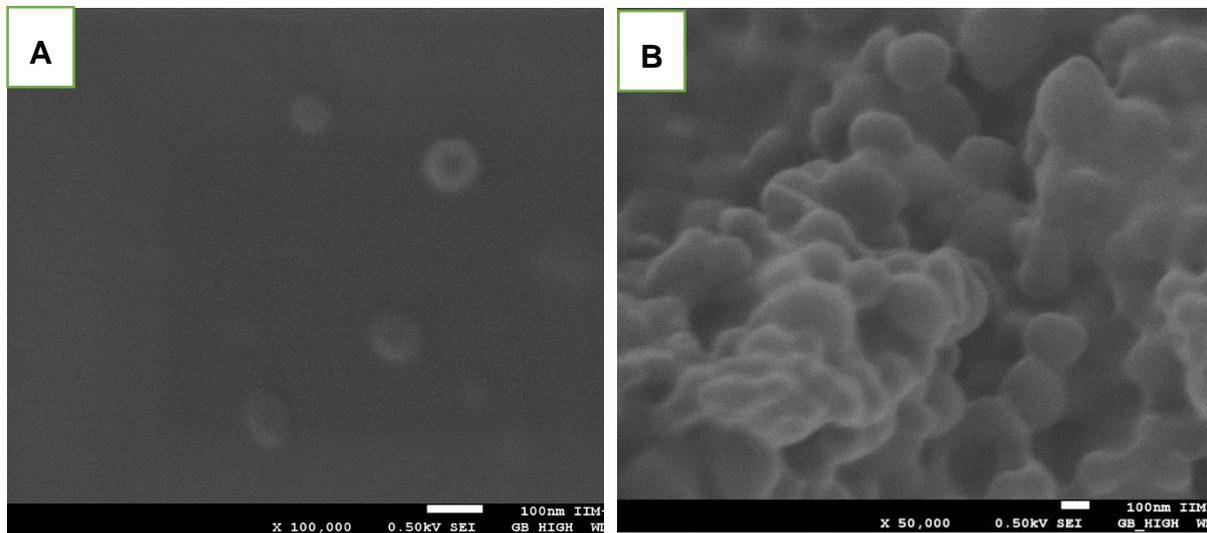


Figura 18. Micrografías por SEM de (A) Nps sin ATAC (B) Nps cargadas con ATAC



8.8 Difracción de Rayos X de polvos

Los resultados difracción de rayos X se muestran en la figura 19 en donde se observaron los difractogramas de PCL, ATAC, PVA, y NPs con y sin ATAC los cuales tienen una serie de picos con diferentes ángulos de difracción atribuidos a los planos cristalográficos de cada muestra, especialmente debido a la presencia de PCL que es un polímero semicristalino dando un patrón de difracción intenso y definido para la muestra pura a 21.37° y 23.67° . ATAC muestra un patrón de difracción con picos más pequeños y con bandas más anchas lo cual indica baja cristalinidad o posibles impurezas. El difractograma de la mezcla física muestra todas las señales esperadas de PCL, ATAC y PVA.

Las muestras de NPs con y sin ATAC parecen ser muy similares mostrando picos menos intensos indicando que la cristalinidad de PCL disminuyó después de la formación de las NPs, el difractograma de NPs con ATAC muestra ligeramente mayores señales de ruido indicando una posible fase amorfa de PCL y ATAC al estar en contacto.

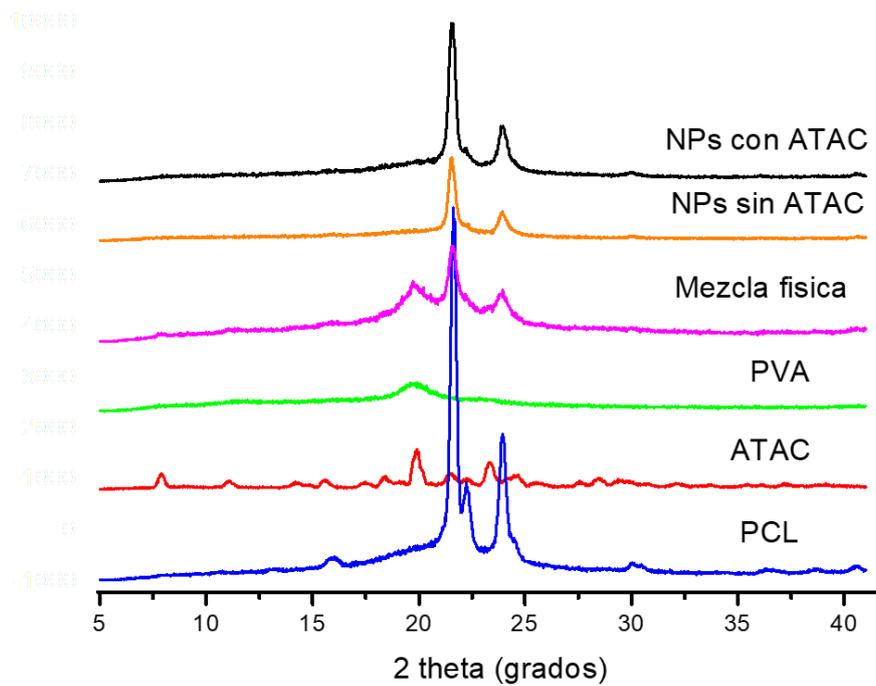


Figura 19. Difractogramas de las materias primas, las mezclas físicas y las NPs con y sin ATAC.



8.9 Calorimetría Diferencial de Barrido

En la figura 20 se muestran los termogramas de PCL, ATAC, PVA y NPs con y sin ATAC en donde se observan los distintos comportamientos de los fenómenos térmicos que se presentan y las temperaturas a las que estos ocurren. En el caso de PCL se presenta un pico endotérmico a 66.07°C el cual corresponde a su temperatura de fusión indicando ser un material homogéneo, la señal particular de transición vítrea (T_g) característica de los polímeros no fue posible detectarla ya que esta ocurre a -60°C . El termograma correspondiente a ATAC muestra dos señales que son menos definidas lo cual hace referencia a un material menos cristalino, la primera podría asociarse a la pérdida de agua, mientras que la segunda al punto de fusión que es precedida por una línea con tendencia ascendente indicando su descomposición. El termograma de PVA muestra de manera clara la señal correspondiente a su T_g (temperatura de transición vítrea) en aproximadamente 192°C . En el termograma de la mezcla física se observan señales menos definidas, el pico exotérmico que se atribuye a la presencia de PCL a 53.60°C y una señal más a 189.18°C además de la tendencia ascendente que indican el contenido de PVA y ATAC respectivamente. En los termogramas de las NPs con y sin ATAC estos son muy similares solo se observó un pico endotérmico definido que se encuentra muy cerca del punto de fusión de PCL a 53°C este desplazamiento podría deberse al proceso de fabricación de las NPs, es importante mencionar que no se observó ninguna otra señal característica de ATAC en estos dos últimos, por lo cual con base a estos termogramas y a los estudios de DRX, ATAC podría estar generando una fase amorfa al incorporarse con PCL.

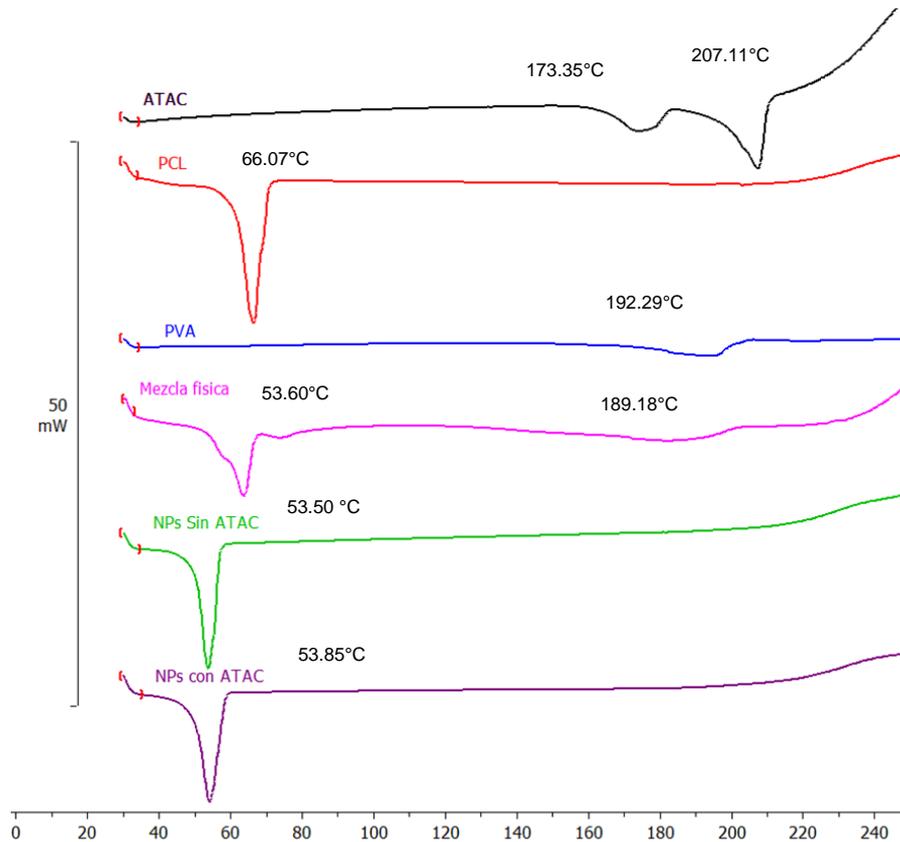


Figura 20. Termogramas de las materias primas, mezclas físicas y NPs con y sin ATAC

8.10 Evaluación *in vitro* del perfil de liberación

Se evaluó el perfil de liberación de las NPs cargadas con ATAC (lote óptimo, por triplicado) así como de ATAC libre (por triplicado), y NPs sin ATAC este último utilizado como blanco para comprobar que no había interferencias en las señales generadas por parte del polímero o del medio de disolución en el transcurso del tiempo que interfirieran con la cuantificación de ATAC. Este estudio se realizó a pH 1.2 durante las primeras dos horas y a pH 6.8 hasta 24 horas. La figura 21 muestra los resultados de dichas evaluaciones en donde se observa que las NPs liberaron más del 90% de ATAC en aproximadamente 4 horas, mientras que ATAC no encapsulado libera aproximadamente 45% de ATAC, esto puede deberse a la baja solubilidad de ATAC, evidenciando que las NPs de ATAC ayudan en este proceso al tener un mayor porcentaje de ATAC liberado, al relacionar este resultado con los estudios de caracterización anteriormente mencionados se concluye que ATAC en NPs se encuentra en estado amorfo mencionando como dato importante que los compuestos en este estado disuelven más rápido que los que se encuentran en forma cristalina.

También se observó que la liberación de ambas formas en las que se encuentra ATAC ocurre la liberación a ambos pHs 1.2 y 6.8 .

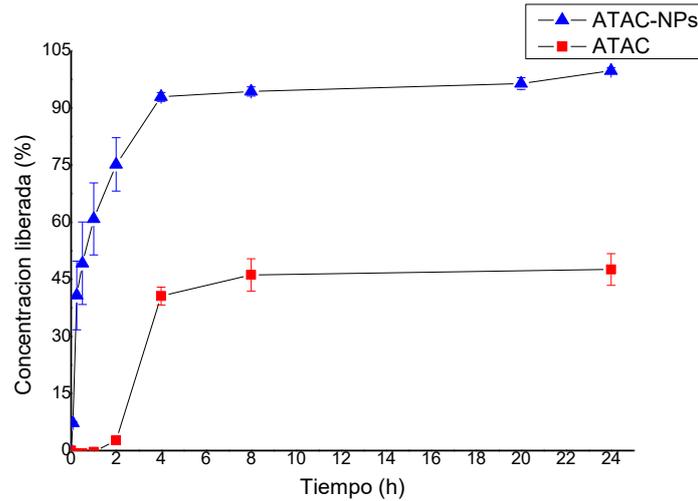


Figura 21.Perfiles de liberación de NPs de ATAC y ATAC. Se muestran valores promedios de NPs ±EE
n=3

Una vez obtenidos los perfiles de liberación, estos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos con la finalidad de proponer un mecanismo por el cual ocurre la liberación de ATAC desde las NPs. En la tabla 20 se muestran los valores de r^2 obtenidos para cada modelo, así como la respectiva constante, observando que el que tiene mejor ajuste fue el modelo de Baker con una r^2 de 0.957 este modelo describe la liberación del compuesto a partir de matrices esféricas por difusión. Respecto al tiempo de liberación se esperaba que fuera más prolongado; sin embargo, es importante tomar en cuenta que la velocidad de degradación de PCL, la cual ocurre por hidrólisis de sus enlaces éster, depende de varios factores como son: los aditivos, la forma y del tamaño de las NPs, para obtener una liberación más prolongada se requieren NPs con mayor tamaño. Otro de los motivos por los cuales no se vio este tipo de liberación puede ser debido a que ATAC se encontraba en las capas superficiales externas de las NPs.

Tabla 20. Valores obtenidos de la regresión de los perfiles de liberación

Modelo matemático	r2	Constante
Orden Cero	0.467	$K_0=2.852 \text{ h}^{-1}$
Primer Orden	0.214	$K_1=0.034 \text{ h}^{-1}$
Higuchi	0.697	$K_H=0.178 \text{ h}^{-1/2}$
Hixon-Crowell	0.881	$K_{HC}=0.031^{-1/3}$
Baker	0.957	$K=0.330 \text{ h}^{-1/2}$



8.11 Evaluación *in vitro* de la permeabilidad

En la figura 22 se encuentra la gráfica de permeabilidad que muestra que las NPs de ATAC permearon en mayor porcentaje comparadas con ATAC libre en un 30% al cabo de 56 horas esto se debe a que la naturaleza química de la NPs es más afín a la membrana que la naturaleza de la molécula ATAC libre, además de que la capacidad de carga de la NPs ayuda a la permeabilidad de más de una molécula de ATAC lo cual facilita el transporte y hace que se incremente la permeabilidad. En la tabla 21 se encuentra el promedio de las constantes de permeabilidad en donde se observan que son muy similares, (NPs= 0.00140 cm/h, ATAC=0.00137 cm/h) esto ocurre debido a que el calculo se hace tomando la región lineal de las primeras 8 horas en donde los perfiles son muy parecidos, al realizar un estadístico para comparar estos resultados se obtuvo que no existe diferencia significativa ($p_{valor} > 0.05$) en estas constantes (ver tabla 22), sin embargo, cabe mencionar que a pesar de que existe una mayor velocidad de permeabilidad en un inicio por ATAC, este va disminuyendo conforme pasa el tiempo y a las 15 horas las Nps de ATAC tienen un porcentaje acumulado de permeación mayor.

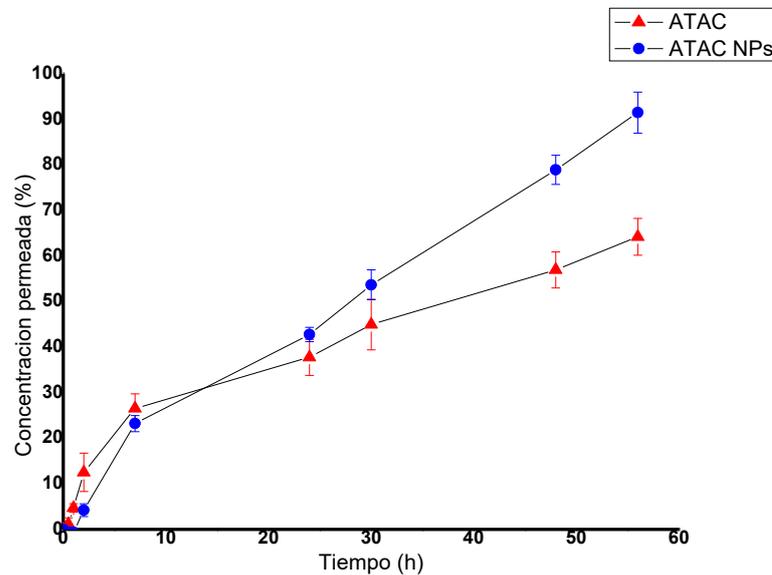


Figura 22 Perfiles de permeabilidad de NPs de ATAC y ATAC. Se muestran valores promedios de NPs \pm EE n=3



Tabla 21. Coeficientes de permeabilidad de NPs de ATAC y ATAC sin encapsular

Coeficientes de permeación K_p (cm/h)		
	NPs	ATAC
R1	0.00139	0.00134
R2	0.00149	0.00137
R3	0.00132	0.00140
Promedio	0.00140	0.00137

Tabla 22. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	NPs	ATAC
Media	0.001401939	0.00137142
Varianza	7.22031E-09	6.584E-10
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	3.93935E-09	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0.59561595	
P(T<=t) una cola	0.291747956	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.583495912	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	



9. CONCLUSIÓN GENERAL

Se obtuvieron NPs poliméricas esféricas biodegradables de policaprolactona logrando la incorporación de ATAC en un $62.60 \% \pm 3.48 \%$, se caracterizaron y evaluaron, comprobándose que al encapsular ATAC en NPs se genera una modificación en la liberación y permeabilidad intestinal con una mejora del 40% y 30% respectivamente comparada con ATAC libre.

9.1 CONCLUSIONES PARTICULARES

- Se implementó y adecuó el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de ATAC en las muestras analizadas en estudios de liberación y permeabilidad desde una la matriz polimérica de policaprolactona
- Los materiales que se seleccionaron para el desarrollo de la formulación del nanosistema por el método de nanoprecipitación fueron; policaprolactona, alcohol polivinílico, ATAC, acetona y agua.
- Se optimizaron NPs de policaprolactona cargadas con ATAC mediante un diseño exploratorio eligiendo como factores críticos; la cantidad de polímero, estabilizante y ATAC (X1, X2, X3) y como factores de respuesta; la talla, el potencial Z y la eficiencia de encapsulación (Y, Y2, Y3).
- Las nanopartículas optimizadas que se caracterizaron presentando un tamaño promedio de 359.63 ± 7.27 nm, donde el fármaco se encuentra disperso molecularmente en la matriz polimérica en una fase amorfa, sin interacciones significativas entre el fármaco y el polímero con un potencial Z de -10.23 ± 0.49 mV, con una eficiencia de encapsulación del $62.60 \pm 3.48 \%$, un índice de polidispersión de 0.36 ± 0.151 y un rendimiento de $63.67 \pm 4.16\%$.
- Las NPs poliméricas de PCL liberaron alrededor del 90% de ATAC al cabo de 8 horas en pH 6.8.



10. PERSPECTIVAS

- Probar este sistema en modelos *in vivo* para obtener una mejor visión de la eficacia y seguridad de los mismos.
- Llevar a cabo el escalamiento de las NPs optimizadas.
- Formular estos sistemas en alguna forma farmacéutica que facilite su administración.
- Ampliar los niveles de estudio del diseño exploratorio para mejorar la eficiencia de encapsulación.
- Probar otros métodos para la elaboración de NPs y compararlas con los resultados de este trabajo.
- Realizar estudios de permeabilidad en celdas de Franz de controles de moléculas de alta y baja permeabilidad.
- Utilizar esta metodología para la incorporación de otras moléculas de estructura similar en NPs de policaprolactona.



11. BIBLIOGRAFÍA

1. Fundación para la Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID 6.a edición. Actualización de 2014, www.fundaciondiabetes.org/general/material/61/atlas-de-la-diabetes-de-la-fid-6-edicion--actualizacion-de-2014-1
2. ENSANUT. Últimas cifras de diabetes en México – ENSANUT MC 2016 OMENT Informe Final de Resultados. 2016 www.oment.uanl.mx/ultimas-cifras-de-diabetes-en-mexico-ensanut-mc-2016/
3. Zárate A, Islas S, Saucedo R. Eficacia y efectos adversos de los antidiabéticos orales. *Gaceta Médica de México*. 2014; 150:5-7
4. Navarrete-Vázquez G, Alaniz-Palacios A, Hidalgo-Figueroa S, González-Acevedo C, Ávila-Villarreal G, Estrada-Soto S, et al. Discovery, synthesis and in combo studies of a tetrazole analogue of clofibric acid as a potent hypoglycemic agent. *Bioorganic Med Chem Letters* (23) 2013; 3244-3247
5. Martínez E. Tesis de licenciatura: Determinación del pka de nuevos compuestos con actividad farmacológica. UAEM; 2015
6. Lara E. Tesis de licenciatura: Determinación del coeficiente de partición de nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2015
7. Vara-Gama N, Valladares-Méndez A, Navarrete-Vazquez G, Estrada-Soto S, Orozco-Castellanos LM, Rivera-Leyva JC. Biopharmaceutical characterization and bioavailability study of a tetrazole analog of clofibric acid in rat. *Molecules*. 2017;22(2)
8. Mainardes RM, Silva LP. Drug delivery systems: past, present, and future. *Curr Drug Targets* 449–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15216911>
9. OMS. La diabetes muestra una tendencia ascendente en las Américas [Internet]. 2012 www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7453&Itemid=259&lang=es
10. Informe Mundial sobre la Diabetes. Resumen de Orientación. Organización Mundial de la Salud. www.who.int/diabetes/global-report World Health Organization 2016 WHO/NMH/NVI/16.3 Consenso de Expertos
11. IDF Diabetes Atlas, octava edición 2017, International Diabetes Federación. Consenso de Expertos



12. Diagnóstico y Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México, Instituto Mexicano del Seguro Social; www.imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc
13. Taylor, S. (2005) Diabetes Mellitus Texto Básico y Clínico. (2ª ed.) México: Mc Graw Hill
14. Indicators O. OECD indicators • Health at a Glance 2015
15. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Características de las defunciones registradas en México durante 2017 www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf
16. Soto-Estrada G, Moreno-Altamirano L, Pahua Díaz D. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. Rev Fac Med. 2016;59(6)
17. Harrison, L. (2006). Principios de medicina Interna. (16ª ed.) México: Mc Graw Hill. México.
18. Lawrence, M. (2004) Diagnóstico Clínico y Tratamiento (39 ed.) México: Manual Moderno.
19. Norma Oficial mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. (2010) Secretaria de salud.
20. Hernández Herrero G. Tratado de medicina farmacéutica. Primera ed. Madrid España: Editorial Médica Panamericana; 2011
21. Reinier Oropesa Nuñez UJJH. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas | Revista CENIC Ciencias Biológicas. CENIC Ciencias Biol. www.revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/las-nanopartículas-como-portadores-de-fármacos-características-y-perspectivas
22. Roco, M.C. (2003) Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. Current Opinion in Biotechnology, núm. 14: 337-346.
23. Riehemann, K., Schneider, S.W., Luger, T.A., Godin, B., Ferrari, M., Fuchs, H. (2009) Nanomedicine-Challenge and perspectives. Angewandte Chemie International Edition, núm. 48: 872-897
24. S.K. Sahoo, S. Parveen, J.J. Panda, The present and future of nanotechnology in human health care, Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 3 (2007)



25. Alcalá-Alcalá S., Quintanar Guerrero D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. *www.mundonano.unam.mx* | Vol. 7, No. 12, enero-junio, 2014
26. F. Rocha Formiga, E. Ansorena AE-H de M y otros. Nanosistemas a base de poliésteres. *Nanotecnología Farm Real y posibilidades Farmacoter.* 2009;(February):41–101
27. M.S. Singh, D. Peer, RNA nanomedicines: the next generation drugs *Curr.Opin. Biotechnol.* 39 (2016)
28. K. Miladi, S. Sfar, H. Fessi, A. Elaissari, Encapsulation of alendronate sodium bynanoprecipitation and double emulsion: from preparation to in vitro studies,*Ind. Crops Prod.* 72 (2015)
29. López Gasco P. Preparación, Caracterización Y Evaluación Biológica De Nanopartículas Poliméricas Para La Liberación Controlada De Paclitaxel. Universidad Complutense de Madrid; 2011
30. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights* 2007 www.journals.sagepub.com/doi/10.1177/117739280700200002
31. Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem Eng Sci.* www.dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046
32. Konwar R, Ahmed A. Nanoparticle: An overview of preparation, characterization and application. *Int Res J Pharm.* 2013;4(4)
33. Claudia Ishizawa, Javier Nakamatsu Matrices Poliméricas para Liberación Controlada de Sustancias Activas *Revisto de QUÍMICA* Diciembre 2002
34. Gómez-gaete C. Nanopartículas Poliméricas: Tecnología y Aplicaciones Farmacéuticas. *Rev Farmacol Chile.* 2014;7(2):7–16
35. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res.* 2009;26(5):1025–58
36. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998) 1113–1128
37. Woodruff M. A., Hutmacher D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 2010; 35: 1217–1256



38. Mondal D., Griffith M., Venkatraman S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2016; 65: 255–265
39. Mohamed R. M., Yusoh K. A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). *Adv. Mater. Res.* 2016; 249–255
40. Mahapatro A., Singh D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology.* 2011; 9: 55
41. Ranjith Ramanujam, Balraj Sundaram, G. Biodegradable Polycaprolactone Nanoparticles Based Drug Delivery Systems, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, September 2018. Vol. 15(3), p. 679-685
42. Abedalwafa M., Wang F., Wang L., Li C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2013; 34: 123–140
43. Villafuerte-Robles L. *Nanotecnología Farmacéutica. Razón y Palabra.* 2009;68(01)
44. Ahlin Grabnar P, Kristl J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *J Microencapsul.* 2011;28(4):323–35.
45. Suri S, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Médico Toxicológico* 2007;2(1):16. Available from: <http://occup-med.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6673-2-16>
46. Urrejola, m. c.; Soto, I. V; Zumarán, c. c.; Peñaloza, J. P.; Álvarez, B.; Fuentevilla, I. Haidar, Z. S. *Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: estructura, métodos de elaboración, características, propiedades, biofuncionalización y tecnologías de auto-ensamblaje capa por capa (layer-by-layer self-assembly).* *Int. J. Morphol.*, 36(4):1463 1471, 2018
47. López Gasco, P. (2011). *Preparación, caracterización y evaluación biológica de nanopartículas poliméricas para la liberación controlada del paclitaxel.*
48. Medina, M. D. (2010). *Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas*
49. Bhatia S. *Natural polymer drug delivery systems: Nanoparticles, plants, and algae.* *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae.* 2016. 1-225 p
50. Singh R, Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 2009; 86(3): 215-23



51. Chella N., gránulos de dispersión Tadikonda R. Melt: formulación y evaluación para mejorar la administración oral de fármacos poco solubles: un estudio de caso con valsartán. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2015; 41: 888-897
52. F. A. Dimer, A. R. Pohlmann, and S. S. Guterres, Characterization of Rheology and Release Profiles of Olanzapine-Loaded Lipid-Core Nanocapsules in Thermosensitive Hydrogel *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* Vol. 13, 1–10, 2013
53. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm al Res* [Internet]. 2013;12(2):265–73. Available from: <http://www.bioline.org.br/pdf?pr13041>
54. Mora-Huertas CE, Garrigues O, Fessi H, Elaissari A (2012) Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik* e. 80(1):235-9
55. Lee, J. H., & Yeo, Y. (2015). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical engineering science*, 125, 75-84
56. Paños, N. Acosta, A. Heras, New drug delivery systems based on chitosan, *Curr. Drug Discov. Tech.* 5 (2008) 333-341
57. Date, AA., Hanes, J., Ensign, LM. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *Journal of Controlled Release.* 2016; 240:504-526
58. Saéz et al. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen* 5(1) 2004
59. Mi F-L, Kuan C-Y, Shyu S-S, Lee S-T, Chang S-F. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydr Polym* 2000;41(4):389–96. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861799001046>
60. Morishita M., Peppas NA Avances en la administración oral de medicamentos: biodisponibilidad mejorada de medicamentos mal absorbidos por la optimización celular y tisular. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64: 479
61. Kawabata Y., Wada K., Nakatani M., Yamada S., Onoue S. Diseño de formulación para fármacos poco solubles en agua basados en el sistema de clasificación biofarmacéutica: enfoques básicos y aplicaciones prácticas. *En t. J. Pharm.* 2011; 420: 1–10
62. Ensign, L., Cone, R., Hanes, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012; 64:557-570



63. Lundquist, P., Artursson, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106:256-276
64. R.J. Soane, M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis, L. Illum, Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans, *Int. J. Pharm.*, 178 (1999) 55-65
65. Herrera Ruiz, Dea; Hernández Baltazar, Efrén; Espinosa Lara, Julio Cesar; Martínez, Ixchel de la Luz; Beltrán Torres, Adela Ayulia; Martínez Alejo, Juan Manuel Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 43, núm. 1, 2012, 18-32
66. S.M. van der Merwe, J.C. Verhoef, J.H. Verheijden, A.F. Kotze, H.E. Junginger. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 58 (2004), 225–235
67. Erel, G., et al. Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016; 36:161-167
68. K. Matter, M.S. Balda, Functional analysis of tight junctions, *Methods* 30 (2003) 228-234
69. P. Lundquist, P. Artursson, Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2016)
70. Lee Jia Nanoparticle Formulation Increases Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs: Approaches, Experimental Evidences and Theory *Current Nanoscience*, 2005, 1, 237-243
71. European Center for Nanotoxicology, EURO-NanoTox-Letters. Assessment of Toxicological Effects by in vitro and in vivo Assays and Open Flow Microperfusion 4th revised and expanded edition (2015) www.bionanonet.at



12. ANEXOS

12.1 Linealidad del método analítico

ATAC (ug/ml)	ÁREAS			Promedio	D.E	%CV	FACTOR DE RESPUESTA		
	D1	D2	D3				D1	D2	D3
0.5	48421	47150	48162	47911.000	671.648	1.402	96842	94300	96324
1	95223	97870	96139	96410.667	1344.249	1.394	95223	97870	96139
2	193387	190471	195440	193099.333	2496.959	1.293	96693.5	95235.5	97720
4	377379	377614	365150	373381.000	7129.223	1.909	94344.75	94403.50	91287.50
8	757218	764447	760206	760623.667	3632.553	0.478	94652.25	95555.88	95025.75
15	1382655	1390612	1396545	1389937.333	6969.534	0.501	92177.00	92707.47	93103.00
30	2852835	2739189	2796761	2796261.667	56824.645	2.032	95094.50	91306.30	93225.37
50	4723817	4715071	4706220	4715036.000	8798.552	0.187	94476.34	94301.42	94124.40
m	94558.09	93562.85	93890.54	94003.82			PROM	DE	CV%
b	-2216.67	-2033.85	-1285.16	-1845.23			94672.18	1782.95	1.88
r	0.99996	0.99983	0.99998	0.99997					
r2	0.99992	0.99967	0.99995	0.99993					

12.2 Exactitud y precisión del método analítico.

ATAC (ug/ml)	ÁREAS			CONCENTRACION RECUPERADA						% RECUPERADO		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	PROM	DE	CV	D1	D2	D3
0.5	48421	47150	48162	0.536	0.522	0.533	0.530	0.007	1.340	107.10	104.42	106.56
1	95223	97870	96139	1.030	1.058	1.040	1.043	0.014	1.363	103.05	105.85	104.02
2	193387	190471	195440	2.069	2.038	2.090	2.066	0.026	1.278	103.43	101.89	104.52
4	377379	377614	365150	4.014	4.017	3.885	3.972	0.075	1.898	100.36	100.42	97.13
8	757218	764447	760206	8.031	8.108	8.063	8.067	0.038	0.476	100.39	101.35	100.79
15	1382655	1390612	1396545	14.646	14.730	14.793	14.723	0.074	0.501	97.64	98.20	98.62
30	2852835	2839189	2796761	30.194	30.049	29.601	29.948	0.309	1.033	100.65	100.16	98.67
50	4723817	4715071	4706220	49.980	49.888	49.794	49.887	0.093	0.187	99.96	99.78	99.59
m	94558.08505	94304.04510	93890.53658						1.009		PROM	101.438
b	-2216.67477	228.37704	-1285.16152								DE	2.820
r	0.99996	0.99998	0.99998								CV	2.780
r2	0.99992	0.99996	0.99995									

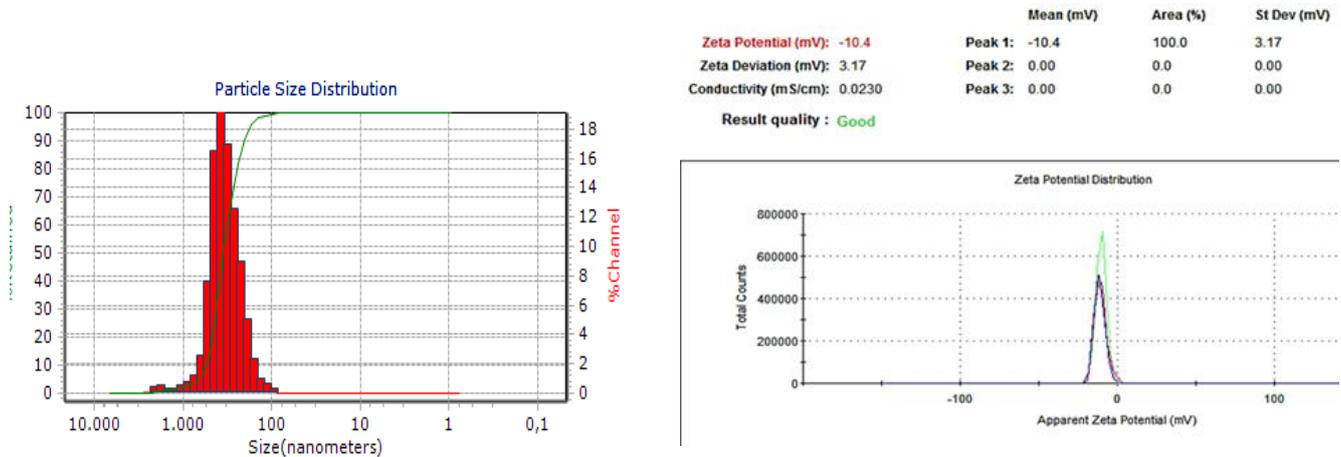
2.3 Nps optimizadas

MUESTRAS (Sobrenadantes) NPS OPTIMIZADAS					Vol	Sobrenadante				
#	Áreas		Relación	ATAC (ug/ml)	FD:	Con FD	42	No encapsulado	ATAC	%Eficiencia de E.
	ATAC	EI	Áreas			ATAC (ug/ml)	Masa (ug)	Masa (mg)	(mg)inicial	
FIA	2427453	2504355	0.96929	26.262	10	262.618	11029.97	11.03	26.878	58.96
FIB	1980716	2485858	0.79679	21.595	10	215.948	9069.81	9.07	26.5978	65.90
FIC	2132650	2443665	0.87273	23.649	10	236.492	9932.65	9.93	26.7978	62.93

				Sobrenadante	Liofilizado
(mg) encapsulado	Masa (mg) liofilizado	%Capacidad de carga	Formulación	%Eficiencia de E.	% Eficiencia
15.85	361.4	4.385	1	58.96	49.38
17.53	370	4.737	2	65.90	37.43
16.87	325.8	5.177	3	62.93	33.97

Formulación	PCL	FX	Masa total	Masa Liofilizado NPs	Rendimiento %
FIA	374.70	26.878	402	361.4	89.99
FIB	375.00	26.5978	402	370	92.13
FIC	374.10	26.7978	401	325.8	81.27

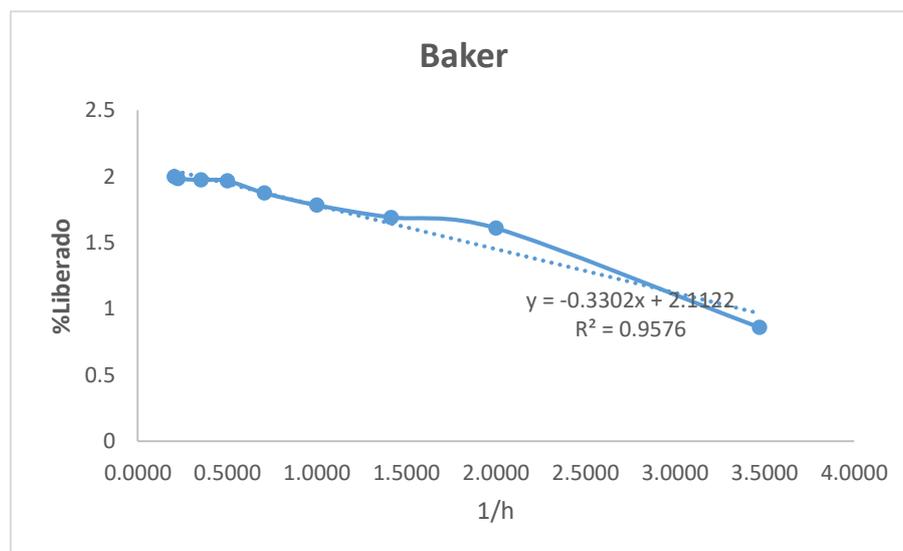
12.4 Evaluación de la talla y el potencial Z de las NPs optimizadas.



12.5 Modelos matemáticos de liberación.

Nps ATAC		Orden 0	Primer Orden	Higuchi		Hixson-Crowell	mg	Baker	
Tiempo (h)	%Liberado	%Liberado	Log%lib	t(1/2)	%lib	Raiz3 C0:	0.3000	raiz(1/t)	%Li
0	0	0	0	0	0	0.289	0.661	0.0000	
0.083	7.2568	7.257	0.8607	0.2881	7.257	0.267	0.644	3.4711	0.86074695
0.25	40.7603	40.760	1.6102	0.5000	40.760	0.167	0.551	2.0000	1.61023769
0.5	49.2035	49.204	1.6920	0.7071	49.204	0.142	0.521	1.4142	1.691996
1	60.8472	60.847	1.7842	1.0000	60.847	0.107	0.474	1.0000	1.78424038
2	75.1728	75.173	1.8761	1.4142	75.173	0.064	0.399	0.7071	1.8760609
4	92.8928	92.893	1.9680	2.0000	92.893	0.011	0.219	0.5000	1.96798219
8	94.3222	94.322	1.9746	2.8284	94.322	0.006	0.184	0.3536	1.97461378
20	96.4028	96.403	1.9841	4.4721	96.403	0.000	0.000	0.2236	1.98408978
24	99.7953	99.795	1.9991	4.8990	99.795	-0.010	-0.217	0.2041	1.99911022

12.5.1 Gráfico con mejor ajuste al tipo de liberación de ATAC en NPs.





12.6 Permeabilidad de ATAC libre y de ATAC en NPS.

Permeabilidad de NPS		ATAC					
Tiempo (h)	CELDA 2	CELDA 3	CELDA 4	PROMEDIO	D.E	%CV	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	#j DIV/0!	
0.25	-0.569	-0.534	-0.683	-0.384	0.427	-111.312	
0.5	-0.617	-0.578	-0.740	-0.359	0.577	-160.746	
1	-0.617	-0.578	-0.740	-0.234	0.825	-353.146	
2	3.405	6.986	2.265	3.664	2.297	62.687	
7	26.599	22.439	20.620	19.164	8.487	44.285	
24	40.309	42.331	45.703	38.086	9.651	25.339	
30	56.024	47.229	57.850	47.776	12.725	26.635	
48	73.239	79.195	84.370	71.201	16.122	22.643	
56	90.926	83.997	99.604	82.632	18.868	22.833	
Permeabilidad		ATAC					
Tiempo (h)	CELDA 5	CELDA 6	CELDA 7	PROMEDIO	D.E	%CV	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	#j DIV/0!	
0.25	1.047	-0.122	-0.131	0.261	0.553	212.073	
0.5	3.852	-0.132	-0.142	1.019	1.912	187.580	
1	6.453	3.271	4.355	3.770	2.270	60.227	
2	20.933	7.468	9.171	9.893	7.971	80.568	
7	32.888	22.965	23.861	21.678	10.763	49.648	
24	44.687	37.621	30.987	34.324	8.869	25.839	
30	55.140	43.824	35.939	41.226	10.868	26.362	
48	57.897	49.729	63.305	54.733	7.162	13.085	
56	68.155	56.111	68.395	62.165	7.056	11.350	



Constancia de exposición en seminario



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS
A través de la Facultad de Farmacia



Hace constar que el:

L.F. Saraí Violeta Cruz Miranda

Participó en el ciclo de seminarios de la Facultad de Farmacia
con la ponencia:

**"Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable
cargado con un nuevo fármaco con actividad antidibética".**

Cuernavaca, Morelos a 4 de marzo 2019.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director





Constancia de exposición de cartel



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia



Otorga la presente:

C O N S T A N C I A

a:

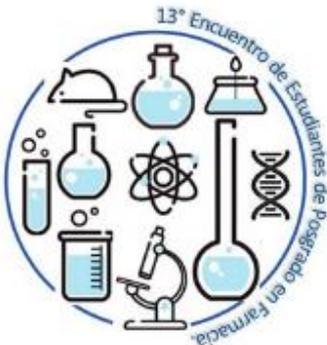
*Sarai Violeta Cruz Miranda. Rivera Leyva Julio César. Alcalá Alcalá Sergio.
Valladares Méndez Adriana y María de la Cruz Rojas Maldonado*

*Por su participación en la presentación del cartel titulado "DESARROLLO DE UN
NANOSITEMA POLIMÉRICO BIODEGRADABLE DE UNA NUEVA MOLÉCULA CON
ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA" en el 13° Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia.*

Cuernavaca, Morelos a 21 de noviembre del 2019.



*Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director de la Facultad de Farmacia*



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Saraí Violeta Cruz Miranda

Título de la tesis: "Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable de una nueva molécula con actividad antidiabética"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

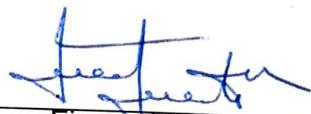
Miembro del jurado: Dra. Inés Fuentes Noriega

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

14/05/2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Saraí Violeta Cruz Miranda

Título de la tesis: "Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable de una nueva molécula con actividad antidiabética"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

21. Febrero. 2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Saraí Violeta Cruz Miranda

Título de la tesis: “Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable de una nueva molécula con actividad antidiabética”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

12-mayo-2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Saraí Violeta Cruz Miranda

Título de la tesis: “Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable de una nueva molécula con actividad antidiabética”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Jesús Rivera Islas
Firma del miembro del jurado

12 de mayo de 2020
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2020-05-16 19:22:17 | Firmante

OOkQWWUdYn0YmYn2eVbe+iCC3n2EKgmE7QrREMAAdjPWohUT+oW0LbUw37fEotQCrcAM2SQxLmA1AqS6h3+W042oK0ueW2rKWUrZ0QKFQLqGQAq+3clikIE+mQW
tI60py0sJBAdbpARUhWsnY8SbSfNLNeP4N/le2YwepqmNCOFz3NMea+/0hMedWshjkcw8jw8g2yX4eQvkOSYJiNKCuYomCirtbwTKBWssUYSQ5YAoueSPuunnAcEZ/x4bY
DTcQ9GQ6WT5gZrzje/jp0A7r1JRMWmYQmScaPgaMgFYznxhmBJNmsuB2ZZIHZr4RLy1AMMIFiT1YSLPI9jsysowtug==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ZTvz9!sqBaf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/R3BGTpg1uWoTFOKrVHuDIH1c79JNpVjy>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Saraí Violeta Cruz Miranda

Título de la tesis: “Desarrollo de un nanosistema polimérico biodegradable de una nueva molécula con actividad antidiabética”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: M. en F. Edgar Barrera Bautista

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

12/05/2020
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR BARRERA BAUTISTA | Fecha:2020-05-12 22:41:52 | Firmante

1pSSN06Ri0a9QFh/YjTDI4H1jTe7veqP1i2IACSaJ6eOiiHfSY8vImqWbrkcDT4kgW/MLP/ObOIR5SCMzxQ0BCejm4exEL3Erl3Mvg6lpTPADcrKQozIz6S41XdxS0yjK6PuqV
CZ85VrigkjfyOEdEym+1HC5D6nrPvxRMRBAGW9uWi0o3SGIITp0UEmlqXf+DquH7s8032LVjKI63vwMlyTe3LcOK7wtqDGFgFCNUdsAvHMFRjJwSKpHJ1Is43Vfowr3i7Pz
MV6QLYYQX4MXHff19khcDcxtL3Tajv124H59Rw/ERutusNouQK7nG3QfNRtSS0rqz9lesfwkl+w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[bY#ml4c\(3hl](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jnMva7Y5iz5z1f2JfYzvxvFLkW4Gidtu>

