



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

“Desarrollo y evaluación *in vitro* y *ex vivo* de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxi flavona con potencial uso antiasmático”

TESIS:

Para obtener el título de Maestra en Farmacia

PRESENTA:

L.F. Maria Fernanda Ahedo Arenas

Directores de tesis:

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

JURADO



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

Nombre del alumno: Maria Fernanda Ahedo Arenas

Título de la tesis: "Desarrollo y evaluación *in vitro* y *ex vivo* de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxi flavona con potencial uso antiasmático"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

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): _____

04 de marzo del 2021

Dr. Juan Gabriel Navarrete
Vázquez

Fecha

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

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2021-03-12 21:08:20 | Firmante

co+unHxKG+RZsv3CMpiz1yOR8B7mpmrU8UEmT8sNa2TiXtqRC0SWp77OnQ5DUtb6gOzi20nWFHOlxZw7ldD+P0uFbRb/YcscrsEh7hQ0sRQilIGSK9U928jXJTxoBDZxWg4c21
FUEFGcAEG20vh3vJGDlnsb2XnWpAc8kqvS4RZ17dk4Wfg9TPXmuD78m5WLqxaqQ5AI27hIEpMg5nmvT5I7IZbJZM4noy45hEM6ea686/ai95Z8BjUAM80ixLPgLSYX0Sbk9m
AFXMFe5/3VKAEn4YWivon7QLEHzmx0qS2jb7Nz8+thkoOywaLGyj8Ld6/rrQK4GjDBoE0y7xQ==

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



j12Kx4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/rwWDIW3EvHdk7wpE1HTEhhaS9xbCCxpR>



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

Nombre del alumno: Maria Fernanda Ahedo Arenas

Título de la tesis: "Desarrollo y evaluación *in vitro* y *ex vivo* de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxiflavona con potencial uso antiasmático"

Grado a obtener:

<input checked="" type="checkbox"/>	Maestría en Farmacia
<input type="checkbox"/>	Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Dea Herrera Ruíz

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

La tesis:

<input checked="" type="checkbox"/>	Si se aprueba tal como se presenta
<input type="checkbox"/>	Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

9 de abril del 2021

Dra. Dea Herrera Ruíz

Fecha



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

DEA HERRERA RUIZ | Fecha: 2021-04-09 17:29:45 | Firmante
yG0ZzejgZz4wOlkksScpngwzyDesF7cfOkNjblPq7pgirmYDmc1ITfn+yhOnKq9E641cT5yCbslATLBgfp3KQ0dBWB4k+psAUoeV17+h45uX3NlwzN7bYGaWIH+y5E2Owvclvz
TJ/3qXEAyOCdPyuMfJj8ELNcDgaZkecoXoP344GGGMXgnFCXbpf+8KUbsCZW3WIKJEt9BWMKtr49OvrNuv47SITik2FPzBl8PCsGCuroM37lvOYj8t5Jhnnw4PDTwpO+s9zZRFQ
6xliUrAOV2t9h/3qivZe4DT+fDN0z7NAKNxUWVf+4Enl7Aboxjz3TqMz3yeKFT9K29K2+Q==

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



rKJl3M

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tOUWPePolxbFXaMKJwOWxJ47buikRgc>





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

Nombre del alumno: Maria Fernanda Ahedo Arenas

Título de la tesis: "Desarrollo y evaluación *in vitro* y *ex vivo* de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxiflavona con potencial uso antiasmático"

Grado a obtener:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Maestría en Farmacia |
| <input type="checkbox"/> | Doctorado en Farmacia |

Miembro del jurado: Dra. Angélica Flores Flores

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

La tesis:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Si se aprueba tal como se presenta |
| <input type="checkbox"/> | Se rechaza |

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

04 de marzo del 2021

Dra. Angélica Flores Flores

Fecha



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

ANGELICA FLORES FLORES | Fecha:2021-03-08 10:31:56 | Firmante
fipU+RaO/FSvoxIN7BqBNEjs/BvKWVPPf15BbyH8LDb71p8niiNrgUdlu8CJ6b76+Sy3CYmAR9IBqIB/1xmD+66TXh+6+TaxTni/nmW2HH1oQu4IA8HTr2q2HSEuEec/LAe7svo5yHaY W7BA0LMZ/zjTzm09cEomuGku0zCeYwh4qYK/LNdkBgScE2V5X5ueqCvdrWwRuyex/QLEJUDZpaO6luz18o2yKXAEbqB7hIDXPpPz3cAh3w7TW14N3fdyyTc+w2Qv3cU8KyL3B 3MYnZZWOq4+XYK3rx9YRu+KSUQGBtEmUVEi/CXHDqywI3Qvhvg5U5/+zBysqYEs5ioIUdG==

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



HCbx9M

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ntHJFAS0ci1GIUxByeiQTVJl5xSFIDn>





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

Nombre del alumno: Maria Fernanda Ahedo Arenas

Título de la tesis: "Desarrollo y evaluación *in vitro* y *ex vivo* de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxi flavona con potencial uso anti asmático"

Grado a obtener:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Maestría en Farmacia |
| <input type="checkbox"/> | Doctorado en Farmacia |

Miembro del jurado: Dr. Julio César Rivera Leyva

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

La tesis:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Si se aprueba tal como se presenta |
| <input type="checkbox"/> | Se rechaza |

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

11 de marzo del 2021

Dr. Julio César Rivera Leyva

Fecha



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

JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2021-03-11 18:41:38 | Firmante
bEwoyTil2ux1cDBKJcLkTF+/7VzL8FRLH3TVJalgVPcGL0kGm34s5Dj4akd2DX7lmjD0bBBH65389K6T0jqlaP7IXOKT1366Zk83hG7Y7eYodlKINMwByFuxAE61JZN1eBovfh0tc2f2E8UnbJE4IQWw7ly51vg82nOqXKVMJtbnwJ09EypIf2ghFhs/ypX4+YQ5N6gFBU8edJmfCUIAx80TbrrFN4ipUa3+bcYEIHNq3vLCBh40oI0W7UyqK81hj2PHrdhzDtexi8pdQVkeMXHJIYPMKnBI2CY1a5claOGvmfeyWK8mu1wFSiiGSaarZmmLlqmEeLgbDg==



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

pDnMI8

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/luMrrvKAtmu3AZQVPhzRnuA4KDA0iehx>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

Nombre del alumno: Maria Fernanda Ahedo Arenas

Título de la tesis: "Desarrollo y evaluación *in vitro* y *ex vivo* de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxiflavona con potencial uso antiasmático"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

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): _____

22 de marzo del 2021

Dr. Germán Bernal Fernández

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

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2021-03-20 14:24:21 | Firmante
fCylzuAmWzpRuOijExRih/fe7UCFKcVz1MNa1J9fpZr9E0Z0twygpSw5Ik22AUIDClZ5yXhYUJkBXk6rnkAZyvReiZe0Tw84Xi2VO6DJ7MdTW9nlXN8S5uNqXWCMu7ZZ3VK
8T9Qy5H5qDp5m0y/BZ5f11FJKvp8KJp/A3T4RWkCRIHYKbZ59qovl2lxRMoA554lo+EmfISluXuH+x9+28dys4jZa/Ar8XHggVP+kkltladntqn7Bz22Vz84ZmjOYJvYH9XaFAAb1
h/6Zt5sLjSvJUBGJiFiRSa07v4RCR6VgwiDAwgL5X/mz5+KBI4rcZch13OLH87D5eAzm2nEAgQ==

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



5ScIkx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hzkZvWUlcWIVojb8zeYHQHr1ouKMulPF>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

*Soy de las que piensan que la ciencia tiene una
gran belleza.*

*Un científico en su laboratorio no es solo un
técnico: es también un niño colocado ante
fenómenos naturales que le impresionan como un
cuento de hadas.*

-Marie Curie

Lugar de trabajo

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio 1 de investigación en Tecnología Farmacéutica y en el laboratorio 12 de Farmacognosia, de la Facultad de Farmacia ubicada en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

DEDICATORIA

A mis padres, Blanca Arenas y Raúl Ahedo, porque gracias a ellos pude continuar con mis estudios. Por todas sus enseñanzas y por las lecciones que me brindaron en casa. No cabe duda que, yo me llevo el mejor ejemplo de una familia.

A mis hermanos, Raúl Ahedo y Aranza Ahedo, porque siempre creyeron en que podía llegar muy lejos y por luchar conmigo para obtener otro grado más.

A mi abuelita Yoyis, por todo su cariño y comprensión durante este trayecto. Por motivarme a continuar y nunca rendirme.

A Jesé, por ser mi novio, compañero de laboratorio, colega y, sobre todo, por ser mi soporte. En verdad que tus palabras siempre me incitaron a seguir y cumplir todo lo que me proponga.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado con la beca 736693.

Al Dr. Sergio Alcalá Alcalá por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por compartirme sus conocimientos y sobre todo por el apoyo que me brindó como asesor. Durante estos 5 años he aprendido muchas cosas de usted, de la tecnología farmacéutica y una pasión que compartimos, la nanotecnología.

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por permitirme conocer la farmacognosia y los estudios que ellos elaboran día con día en el laboratorio 12, por su apoyo total en los momentos más difíciles de mi trayecto, por estar pendiente de mi salud y la de mis familiares. Fue un gusto para mí, el enamorarme de algo de otra área de la farmacia, no lo hubiese logrado sin sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio Omar, Jesé y Cinthya por haberme apoyado en todo momento y por las grandes historias que compartimos durante mi primer año de posgrado. Gracias por siempre creer en mí y por apoyarme cuando los necesitaba.

A mis compañeros Irma y Andrés por el apoyo que me brindaron al realizar los difractogramas de rayos X de polvos.

A mi comité tutorial; el cDr. Sergio Bernal y la Dra. Angélica Flores, por aceptar formar parte de este, por los consejos, el apoyo y los comentarios enriquecedores de cada evaluación, así como, también fuera de este.

Al Dr. Jorge Moreno, por el apoyo en el análisis de varios estudios analíticos que se llevaron a cabo en este proyecto, por sus consejos y las pláticas.

A la Dra. Blanca Perkins y a la Dra. Angélica Flores, por permitirme conocer el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y hacerme parte de su equipo de seminarios y actividades antes del inicio de la pandemia.

A mi amiga Monserrat Hernández, por su ayuda en el estudio *ex vivo*, por sus consejos y sobre todo por llegar conmigo a las 6:30 am a la Facultad, en tiempos de pandemia.

A mi familia, porque durante 9 meses que restaban de maestría, hicieron que mis clases, seminarios y tutorales se llevaran a cabo en silencio. Por los nervios que compartieron conmigo en los dos últimos exámenes tutorales. Disculpen por correrlos para tener mejor internet y silencio total.

A la familia Arenas Pérez, por el apoyo económico que le dieron a mi hermana y a mí, durante el período de espera en la beca que otorga CONACyT. Gracias por siempre preocuparse por nosotros en mi primer año de maestría que fue duro sin mis papás en casa.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 ASMA, UN PROBLEMA DE SALUD.....	3
2.1.3 OTRAS ALTERNATIVAS PARA LA ATENCIÓN DEL ASMA.....	10
2.2 FLAVONOIDES Y FLAVONAS; USO EN LA MEDICINA Y EN LA FARMACIA.....	11
2.2.2.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS.....	14
2.3 VÍA PULMONAR PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	24
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
6. REACTIVOS Y EQUIPOS.....	25
6.1 REACTIVOS.....	25
6.2 EQUIPOS.....	25
7. METODOLOGÍA.....	27
7.1 METODOLOGÍA GENERAL.....	27
7.2 SELECCIÓN DE LOS MATERIALES PARA EL DESARROLLO DE NLC MEDIANTE PRUEBAS DE SOLUBILIDAD APARENTE.....	28
7.2.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	28
7.3 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UV PARA CUANTIFICAR 6-HF.....	29
7.4 OBTENCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE NLC MEDIANTE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DE DISOLVENTE.....	30
7.4.2 RECUBRIMIENTO CON UN POLÍMERO BIOADHESIVO.....	33
7.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS NLC OPTIMIZADOS.....	33
7.5.1 TAMAÑO PROMEDIO.....	33
7.5.2 POTENCIAL ZETA.....	33
7.5.3 MORFOLOGÍA.....	33
7.5.5 EFICIENCIA DE CARGA.....	34
7.5.6 RENDIMIENTO.....	34
7.5.7 INTERACCIÓN DE LOS COMPONENTES POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER FT-IR.....	35
7.5.8 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS(DRXP).....	35
7.5.9 DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS COMPONENTES POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	35
7.6 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA <i>IN VITRO</i> DE LOS NLC.....	35

7.6.1	PERFILES DE LIBERACIÓN	35
7.7	PRUEBAS DE BIOADHESIÓN	36
7.7.1	INTERACCIÓN CON MUCINA	36
7.8	FORMULACIÓN DE NLC COMO POLVO SECO PARA INHALACIÓN.....	37
7.8.1	PRUEBAS REOLÓGICAS	37
7.8.1.1	DENSIDAD APARENTE Y DENSIDAD COMPACTADA	37
7.8.1.2	ANGULO DE REPOSO	38
7.8.2	AEROLIZACIÓN Y MASA MEDIA AERODINÁMICA	38
7.9.1	EVALUACIÓN EX VIVO DEL EFECTO RELAJANTE DE LOS NLC SOBRE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CARBACOL 1 μ M; EN ANILLOS DE TRÁQUEA AISLADA DE RATA.....	40
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
8.1	SELECCIÓN DE LOS MATERIALES	43
8.1.1	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	43
8.2	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	44
8.2.1	IDENTIFICACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN	44
8.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE 6-HF	44
8.4	OBTENCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS NLC	46
8.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS NLC OPTIMIZADAS	50
8.5.1	TAMAÑO PROMEDIO Y POTENCIAL Z	50
8.5.2	EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN.....	50
8.5.3	EFICIENCIA DE CARGA	51
8.5.4	RENDIMIENTO DE PROCESO.....	51
8.5.5	MORFOLOGÍA	51
8.5.6	PRESENCIA E INTERACCIÓN DE LOS COMPONENTES POR FT-IR	55
8.5.7	DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE DIFRACCIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)....	57
8.5.9	RECUBRIMIENTO CON CHITOSÁN	60
8.5.10	PRUEBAS DE MUCOADHESIÓN	61
8.5.10.1	INCUBACIÓN POR MUCINAS	61
8.5.11	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS NLC <i>IN VITRO</i>	63
8.5.11.1	PERFILES DE LIBERACIÓN.....	63
9.	CONCLUSIÓN GENERAL	73
10.	PERSPECTIVAS	75
11.	REFERENCIAS	76
12.	ANEXOS	86
12.1	CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	86
12.2	ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA INCUBACIÓN CON MUCINAS COMPARANDO TAMAÑO PROMEDIO Y POTENCIAL ZETA.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CAMBIOS EN LAS VÍAS AÉREAS EN PACIENTES ASMÁTICOS (SOREN-PEDERSEN, 2018)	3
FIGURA 2. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS FÁRMACOS MÁS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DEL ASMA.....	9
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA 6-HF (PUBCHEM, 2020).....	14
FIGURA 4. ANATOMÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO (TODA MATERIA).....	16
FIGURA 5. COMPOSICIÓN ESTRUCTURAL DEL MUCUS PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO (TR) (SONG ET AL, 2015)	17
FIGURA 6. INHALADOR DE DOSIS MEDIDA PRESURIZADO (MULLER, 2004).....	21
FIGURA 7. INHALADOR DE POLVO SECO (MULLER, 2004).....	24
FIGURA 8. EJEMPLOS DE NEBULIZADORES (1) JET. (2) ULTRASÓNICO (MULLER, 2004).....	25
FIGURA 9. TIPOS DE DEPOSICIÓN DE PARTÍCULAS (TRONDE ET AL, 2003).....	27
FIGURA 10. COMPARACIÓN DE UNA SLN Y UN NLC (BELOQUI ET AL, 2016)	30
FIGURA 11. ESQUEMA DE LA ENCAPSULACIÓN DE NLC POR EL MÉTODO DE EMULSIÓN SIMPLE- EVAPORACIÓN DE DISOLVENTE	32
FIGURA 12. IMPACTADOR DE CASCADA DE ANDERSEN.....	39
FIGURA 13. ESQUEMA DE LA EVALUACIÓN EX VIVO (IMAGEN ELABORADA POR EMMANUEL GAONA).....	41
FIGURA 14. EVALUACIÓN DEL EFECTO TRAQUEORRELAJANTE DE LA 6-HF Y LOS NLC.....	42
FIGURA 15. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD APARENTE EMPLEADO DISTINTOS TIPOS DE LÍPIDOS Y DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	43
FIGURA 16. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LA 6-HF EN ESPECTROFOTÓMETRO UV EN UN RANGO DE 200 A 800 NM.....	44
FIGURA 17. ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV DE LOS MATERIALES EN LA FORMULACIÓN DE LOS NLC Y NLC- CH (200-800 NM)	46
FIGURA 18. GRÁFICO DE PARETO ESTANDARIZADO PARA EL TAMAÑO PROMEDIO.....	48
FIGURA 19. SUPERFICIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA EL TAMAÑO PROMEDIO CON CONTORNOS.....	49
FIGURA 20. TAMAÑO PROMEDIO DE LOS NLC CARGADOS CON 5 MG DE 6-HF PDI: 0.221	50
FIGURA 21. EFICIENCIA DE CARGA EN LOS NLC OPTIMIZADOS	51
FIGURA 22. MICROGRAFÍAS POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DONDE A Y B SON NLC, C Y D SON NLC-CH EN MEZCLA CON LACTOSA ML001.	53
FIGURA 23. MICROGRAFÍAS POR SEM DONDE A SE OBSERVA UNA MASA DE NLC AGLOMERADOS Y EN B SE OBSERVA LOS NLC-CH.....	54
FIGURA 24. ESPECTROS IR DE LA 6-HF, NLC LIBRES Y CON 6-HF Y NLC-CH.....	56

FIGURA 25. PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS DE LOS MATERIALES Y DE LAS FORMULACIONES (NLC Y NLC-CH).....	58
FIGURA 26. TERMOGRAMAS DE LA MEZCLA FÍSICA, NLC Y NLC-CH CON FÁRMACO Y DE LA 6-HF	60
FIGURA 27. TAMAÑO PROMEDIO Y POTENCIAL Z DE LAS NLC Y NLC-CH AL INTERACCIONAR CON MUCINAS	63
FIGURA 28. PERFILES DE LIBERACIÓN A PH 5.5 DE 6-HF A PARTIR DE LOS NLC Y NLC-CH EN COMPARACIÓN CON LA DISOLUCIÓN DEL POLVO DE FÁRMACO	65
FIGURA 29. EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS MEZCLAS DE LACTOSA-NLC.....	67
FIGURA 30. A) CRISTALES DE LACTOSA ML001 CON NLC-CH B) CRISTALES DE LACTOSA ML001 SIN NLC-CH	70
FIGURA 31.- EFECTO TRAQUEORRELAJANTE DE LOS NLC, NLC-CH, DE LA MEZCLA DE LACTOSA-NLC Y DE LA 6-HF	72
FIGURA 32. CURVA DE CALIBRACIÓN DE 6-HF	86
FIGURA 33. GRÁFICO DE TAMAÑO PROMEDIO DE NLC CARGADOS EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN CON SOLUCIÓN DE MUCINAS AL 1% (N=3)	90
FIGURA 34. GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA DE NLC CARGADOS EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN CON SOLUCIÓN DE MUCINAS AL 1% (N=3).....	91
FIGURA 35. PRUEBA POS-HOC PARA EL TAMAÑO PROMEDIO DE NLC-CH CARGADOS CON 6-HF EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN CON SOLUCIÓN DE MUCINAS AL 1% (N=3)	92
FIGURA 36. PRUEBA POS-HOC PARA EL POTENCIAL ZETA DE LOS NLC-CH CARGADOS CON 6-HF EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN CON SOLUCIÓN DE MUCINAS AL 1% (N=3)	92
FIGURA 37. PRUEBA POS-HOC PARA EL TAMAÑO PROMEDIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CHI. 93	
FIGURA 38. PRUEBA POS-HOC PARA EL POTENCIAL ZETA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CH.....	93
FIGURA 39. PERFILES DE LIBERACIÓN A PH 7.4 DE 6-HF A PARTIR DE LOS NLC Y NLC-CH EN COMPARACIÓN CON LA DISOLUCIÓN DEL POLVO DE FÁRMACO	94
FIGURA 40. GRÁFICO DE MODELO DE HIGUCHI.....	96
FIGURA 41. GRÁFICO DE MODELO DE ORDEN CERO.....	97
FIGURA 42. GRÁFICO DE MODELO DE PRIMER ORDEN.....	97
FIGURA 43. GRÁFICO DE MODELO DE HIXON-CROWELL.....	98
FIGURA 44. GRÁFICO DE MODELO DE KORSMEYER-PEPPAS.....	98
FIGURA 45. GRÁFICO DE MODELO DE WEIBULL	99
FIGURA 46. GRÁFICO DE MODELO DE BAKER LANSDALE.....	99
FIGURA 47. GRÁFICO DE MODELO DE HOPFENBERG.....	100
FIGURA 48. CONTRACCIÓN CON CARBACOL 1 MM DESPUÉS DEL ENSAYO.....	121

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DEL ASMA OCUPACIONAL	5
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DEL ASMA POR FENOTIPOS	6
TABLA 3. AGENTES ANTIALÉRGICOS, ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIASMÁTICOS	11
TABLA 4. TIPOS DE INHALADORES DE POLVO SECO Y SUS PATENTES	23
TABLA 5. FACTORES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL A CONSIDERAR EN LA FORMULACIÓN DE NLC.....	31
TABLA 6. MODELOS MATEMÁTICOS EMPLEADOS EN LOS PERFILES DE LIBERACIÓN DE 6-HF	36
TABLA 7. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN EL MÉTODO ANALÍTICO DE LA 6-HF (38)	45
TABLA 8. MATRIZ DEL DISEÑO EXPERIMENTAL 2 ³ CON RESULTADOS	47
TABLA 9. NIVELES ÓPTIMOS PREDICHOS Y VALORES ENCONTRADOS EN LA OPTIMIZACIÓN DE NLC.....	49
SEGÚN LOS FACTORES ESTUDIADOS MENCIONADOS ANTERIORMENTE, SE OBTUVO UNA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN EN UN RANGO DE 82 AL 90%, LO QUE INDICA QUE LA MOLÉCULA SE ENCUENTRA DENTRO DE LA MATRIZ PROPUESTA. ESTOS VALORES SE CONSIDERAN VIABLES PARA CONTINUAR CON LA OPTIMIZACIÓN DE DICHA VARIABLE RESPUESTA.	50
UNA VEZ OPTIMIZADA LA FORMULACIÓN SE OBTUVO UNA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DEL 82.88 ± 1.69 %.	50
TABLA 10. TAMAÑO PROMEDIO Y POTENCIAL ZETA DE LOS NLC A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CHI.	61
TABLA 11. MODELOS MATEMÁTICOS AJUSTADOS AL PERFIL DE LIBERACIÓN	66
TABLA 12. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS MEZCLAS EN UNA PROPORCIÓN 1:2 LACTOSA-NLC.....	68
TABLA 13. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS MEZCLAS EN UNA PROPORCIÓN 1:2 LACTOSA-NLC.....	69
TABLA 14. MMAD Y GSD DE LA FORMULACIÓN DEL POLVO SECO 1:2 ML001-NLC	70
TABLA 15. TAMAÑO PROMEDIO Y POTENCIAL ZETA DE LOS NLC Y NLC-CH AL 1% DE MUCINAS	95
TABLA 16. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:1.	100
TABLA 17. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:1 (RÉPLICA 2).	101

TABLA 18. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:1 (RÉPLICA 3).	101
TABLA 19. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 2:1.	102
TABLA 19. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:1 (RÉPLICA 2).	102
TABLA 20. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 2:1 (RÉPLICA 3).	103
TABLA 21. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:2	103
TABLA 22. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:2 (RÉPLICA 2).	104
TABLA 23. PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:2 (RÉPLICA 3).	104
TABLA 24. PROMEDIO DE LAS PRUEBAS REOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES LACTOSAS CON UNA PROPORCIÓN 1:2	105
TABLA 25. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LACTOSA ML001.....	106
TABLA 26. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE ML001 (RÉPLICA 2).	107
TABLA 27. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE ML001 (RÉPLICA 3).	108
TABLA 28. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE ML006.	109
TABLA 29. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE ML006 (RÉPLICA 2).	110
TABLA 30. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE ML006 (RÉPLICA 3).	111
TABLA 31. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LH200.	112
TABLA 32. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LH200 (RÉPLICA 2).	113
TABLA 33. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LH200 (RÉPLICA 3).	114
TABLA 34. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LH201.	115
TABLA 35. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LH201 (RÉPLICA 2).	116
TABLA 36. MMAD Y GSD CALCULADOS POR % PESO ACUMULADO DE LH201 (RÉPLICA 3).	117

ABREVIATURAS

AD	Aerodynamic diameter, por sus siglas en inglés (Diámetro aerodinámico)
AHF	Antecedentes heredo-familiares
ANOVA	Análisis de varianza
APP	Antecedentes patológicos del paciente
CE50	Concentración Efectiva 50
CHI	Chitosán
CIQ	Centro de Investigaciones Químicas
DMMA	Diámetro de masa media aerodinámica
DPI	Polvo seco para inhalación
DRXP	Difracción de rayos X de polvos
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
%EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier
GSD	Desviación estándar geométrica
IC	Intervalo de confianza
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
kDa	Kilo Dalton
Log P	Coefficiente de partición

Lpm	Latidos por minuto
MDI	Inhalador de dosis medida
mV	Milivoltios
NLC	Acarreadores lipídicos nanoestructurados
NLC-CH	Acarreadores lipídicos nanoestructurados recubiertos con quitosán
nm	Nanómetros
NNI	national nanotechnology initiative, Iniciativa Nanotecnológica Nacional por sus siglas en inglés
OMS	Organización mundial de la salud
OVA	Ovoalbúmina
Pa	Pascales
PEF	Flujo espiratorio máximo
RADS	Síndrome de disfunción reactiva de la vía aérea
rpm	Revoluciones por minuto
r^2	Coefficiente de determinación
SLN	Nanopartículas lipídica sólida
TXB ₂	Tromboxano B ₂
6-HF	6-Hidroxiflavona

RESUMEN

El asma es una enfermedad de las vías respiratorias, en la cual se presentan diversos síntomas. Las vías respiratorias se encuentran recubiertas por una capa de mucosa que, al presentar dicha enfermedad, existe un incremento del mucus. La 6-hidroxi flavona es una molécula con potencial efecto antiasmático y broncodilatador, donde, según estudios de toxicidad, existe una dosis adecuada para generar el efecto sin producir daño en el organismo. El desarrollo de acarreadores lipídicos nanoestructurados ha tenido un gran impacto en la mejora de las nanopartículas lipídicas; los acarreadores lipídicos recubiertos de un polímero mucoadhesivo han tenido un gran potencial en el desarrollo de tratamientos para la vía pulmonar.

El objetivo de este proyecto fue obtener y caracterizar un polvo seco para inhalación formulado con NLC cargados con 6-HF, así como evaluar su eficacia *in vitro* y *ex vivo*.

En el desarrollo de los acarreadores lipídicos nanoestructurados se empleó el método de emulsión evaporación de disolvente, donde se utilizó como lípido líquido el miristato de isopropilo y lípido sólido por su nombre comercial "lipocire". Se probaron distintas proporciones de molécula lípido ($X_1= 1:1$ y $2:1$), así como distintas proporciones de lípidos ($X_2=5:50$ y $5:500$) y una velocidad de agitación(X_3) variando desde 6000 hasta 15000 rpm. Con un mezclador Ultraturax® se agitaron ambas fases, agregando por goteo la fase oleosa durante 10 minutos. La suspensión obtenida se vertió en un matraz bola, para poder evaporar el disolvente empleando el equipo Rotaevaporador IKA®, en donde se mantuvo a condiciones constantes (30 °C durante 25 min). Las partículas sin disolvente fueron utilizadas para la cuantificación de la molécula por el método de difusión por membrana de diálisis. En este estudio, se tomó el lote de nanopartículas y se colocó una bolsa de diálisis previamente lavada con agua destilada (24 horas a 25 °C). La bolsa fue colocada en 250 mL de H₂O destilada en un vaso de precipitado y se colocó en agitación magnética durante 4 horas. Posteriormente, a la suspensión se le agregó una solución de crioprotector (D-manitol) al 1% y se colocó en frascos ámbar para poder

ser liofilizado a una presión de 5 Pa y una temperatura de -80°C durante 24 horas. Las partículas optimizadas se caracterizaron por tamaño promedio (Y_1) y eficiencia de encapsulación (Y_2), además de estudios por DRX, DSC, FTIR para evaluar el estado sólido y sus interacciones. Los perfiles de liberación se realizaron a dos pH distintos (5.5 y 7.4) a 37°C , durante 72 h, cada uno con su respectivo modelado matemático. La mucoadhesión se determinó mediante la técnica de interacción por mucinas, empleando dos concentraciones distintas (1 y 2%) durante 4 horas a 37°C . También se llevaron a cabo las pruebas reológicas de los polvos y las pruebas de aerolización empleando la técnica de cascada de Andersen, en donde, se obtuvo la MMAD y el GSD de DPI. Finalmente, se realizó la evaluación *ex vivo* de las partículas en un modelo de tráquea de rata.

En los resultados que se obtuvieron, se encontraron tamaños de partículas desde 523 hasta 1038 nm. Utilizando MSR se optimizaron los niveles de los factores de estudio para obtener NLC de tamaño mayor a 500 nm y con la mayor eficiencia de encapsulación posible, de las cuales se obtuvieron nanopartículas de 621.13 ± 10.91 nm con una eficiencia del $82.88 \pm 1.69\%$. En la caracterización del estado sólido por FTIR no hay formación de nuevos enlaces. En la técnica de DRX se evidenció que el estado de los NLC es cristalino y que la molécula disminuye su cristalinidad. Por último, en la evaluación *ex vivo* se obtuvo un 30% de efecto traqueo relajante en los primeros 30 minutos de los acarreadores lipídicos nanoestructurados, de los recubiertos con polímero bioadhesivo y la mezcla con lactosa.

Los acarreadores lipídicos nanoestructurados obtenidos, fueron adecuados para una formulación de polvo seco, con una MMAD para ser depositada en tráquea.

ABSTRACT

Asthma is a disease of the respiratory tract, in which various symptoms are present. The respiratory tract is covered by a mucous layer and, when this disease occurs, there is an increase in mucus. The 6-hydroxyflavone is a molecule with potential antiasthmatic and bronchodilator effect, where, according to toxicity studies, there is an adequate dose to generate the effect without producing damage in the organism. The development of nanostructured lipid carriers has had a great impact on the improvement of lipid nanoparticles; lipid carriers coated with a mucoadhesive polymer have had great potential in the development of treatments for the pulmonary tract.

The objective of this project was to obtain and characterize a dry powder for inhalation formulated with 6-HF-loaded NLC, as well as to evaluate their efficacy *in vitro* and *ex vivo*.

In the development of the nanostructured lipid carriers, the solvent evaporation emulsion method was used, where isopropyl myristate was used as liquid lipid and solid lipid by its commercial name "lipocire". Different lipid molecule ratios ($X1= 1:1$ and $2:1$), as well as different lipid ratios ($X2=5:50$ and $5:500$) and agitation speed ($X3$) varying from 6000 to 15000 rpm were tested. With an Ultraturrax® mixer, both phases were agitated, adding the oily phase by dripping for 10 minutes. The suspension obtained was poured into a ball flask, in order to evaporate the solvent using the IKA® Rotaevaporator equipment, where it was kept at constant conditions (30 °C for 25 min). The particles without solvent were used for quantification of the molecule by the dialysis membrane diffusion method. In this study, the batch of nanoparticles was taken and placed in a dialysis bag previously washed with distilled water (24 h at 25 °C). The bag was placed in 250 mL of distilled H₂O in a beaker and placed under magnetic stirring for 4 hours. Subsequently, 1% cryoprotectant solution (D-mannitol) was added to the suspension and placed in amber vials so that it could

be lyophilized at a pressure of 5 Pa and a temperature of -80 °C for 24 hours. The optimized particles were characterized for average size (Y_1) and encapsulation efficiency (Y_2), in addition to XRD, DSC, FTIR studies to evaluate the solid state and their interactions. Release profiles were performed at two different pH (5.5 and 7.4) at 37°C, for 72 h, each with their respective mathematical modeling. Mucoadhesion was determined by the mucin interaction technique, using two different concentrations (1 and 2%) for 4 h at 37°C. Rheological tests of the powders and aerolization tests were also carried out using the Andersen cascade technique, where the MMAD and GSD of DPI were obtained. Finally, the *ex vivo* evaluation of the particles was performed in a rat trachea model.

In the results obtained, particle sizes from 523 to 1038 nm were found. Using MSR, the levels of the study factors were optimized to obtain NLC larger than 500 nm and with the highest possible encapsulation efficiency, from which nanoparticles of 621.13 ± 10.91 nm were obtained with an efficiency of $82.88 \pm 1.69\%$. In the solid state characterization by FTIR there is no formation of new bonds. In the XRD technique it was evidenced that the NLC state is crystalline and that the molecule decreases its crystallinity. Finally, in the *ex vivo* evaluation it was obtained a 30% of relaxing tracheal effect in the first 30 minutes of the nanostructured lipid carriers, those coated with bioadhesive polymer and the mixture with lactose.

The nanostructured lipid carriers obtained were suitable for a dry powder formulation, with an MMAD to be deposited in trachea.

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes vías de administración para los medicamentos, entre ellas, la vía pulmonar. En esta vía podemos encontrar diversas ventajas en comparación con vías más convencionales, como la oral, como es la gran superficie de absorción disponible en los sacos alveolares, debido a la alta vascularización, la baja actividad enzimática, la rápida absorción del fármaco y la capacidad de superar el metabolismo de primer paso. Esta vía sería recomendada para tratar las afecciones pulmonares, sin embargo, muchas de estas afecciones son tratadas por administración de medicamentos a través de la vía oral, lo que limita la biodisponibilidad y eficacia. Ya se conoce y se tiene experiencia para tratar los trastornos respiratorios de forma local, y recientemente se ha buscado atender algunas enfermedades sistémicas administrando medicamentos por vía pulmonar, como la insulina, hormonas de crecimiento humano y oxitocina. Sin embargo, la eficacia en la administración pulmonar de fármacos está condicionada a las propiedades fisicoquímicas del fármaco y a las tecnológicas de los sistemas que son administrados, principalmente forma y tamaño de las partículas.

El asma es una de las afecciones que primordialmente se tratan de forma local, sobre las vías respiratorias medias y altas. Es una condición crónica de los pulmones que afecta a cerca de 339 millones de personas y el tratamiento más común es basado en broncodilatadores y antiinflamatorios administrados por la vía pulmonar, como corticoesteroides inhalados, modificadores de leucotrienos, agonistas beta de acción prolongada e inhaladores de combinación. Sin embargo, el uso de estos dispositivos y fármacos no han tenido un mayor impacto dado que no es depositado por completo en los pulmones, al igual que la biodisponibilidad de los fármacos empleados no es del 100%.

La 6-hidroxi flavona ha sido estudiada y se han encontrados diversos efectos a nivel respiratorio, donde, su toxicidad es muy baja y este podría tener un excelente uso antiasmático.

Por su parte, la tecnología farmacéutica como responsable del desarrollo de formulaciones para los fármacos y procesos de manufactura, ha integrado en sus estrategias tecnológicas la mejora de las propiedades de los fármacos, tanto físicoquímicas (como la baja solubilidad) como tecnológicas (como la fluidez o aerolización). Lo anterior mediante la ingeniería de partículas y el uso de tecnologías emergentes como la nanotecnología, la cual ha propuesto y creado sistemas novedosos de alto impacto debido a las nuevas propiedades que adquieren los materiales en la escala nano, conocidos como nanoacarreadores farmacéuticos, entre ellos las nanopartículas lipídicas. Una nueva generación de nanopartículas lipídicas conocidas como acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) poseen ventajas como una capacidad ilimitada de carga de fármacos, control en la liberación, estabilidad en el estado sólido y durante el almacenamiento.

Por otro lado, diferentes trabajos han reportado la ventaja de emplear polímeros biodegradables y mucoadhesivos para aumentar el tiempo de residencia en la zona de aplicación, estas características favorecen la vía pulmonar, ya que se conoce que los pulmones cuentan con una capa de mucus en el tracto respiratorio. El quitosán es un polímero catiónico que presenta buenas propiedades de biodegradación y bioadhesión que son favorables para su aplicación en el desarrollo de los sistemas de liberación.

En este proyecto se elaboraron NLC, libres y recubiertos con quitosán (NLC-CH) cargados con 6-hidroxi flavona (6-HF), esta ha reportado actividad traqueorrelajante y antiasmática en un modelo animal de asma alérgica. En este sentido, se diseñaron NLC por el método de emulsión simple mediante evaporación de disolvente. Obteniendo la optimización de sus características físicas y su formulación en polvos secos para inhalación para finalizar con la evaluación en un modelo *in vitro* y *ex vivo* de tráquea aislada de rata para corroborar su eficacia.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 Asma, un problema de salud

El asma es una enfermedad no transmisible de importancia mundial con importantes consecuencias para la salud pública tanto de niños como de adultos, incluida una alta morbilidad y mortalidad en casos graves. En ella el revestimiento de los bronquios se inflama y llena de moco (*figura 1*), lo que hace que las vías respiratorias se estrechen y disminuya el flujo de aire que entra y sale de los pulmones, dificultando la respiración. Lo anterior lleva como consecuencia una limitación en la actividad física, insomnio, fatiga, niveles reducidos de actividad y ausencia escolar y laboral, así como ataques continuos que, de no cuidarse, podrían empeorar la salud y la calidad de vida del paciente (**Soren-Pedersen, 2018; WHO, 2017**).

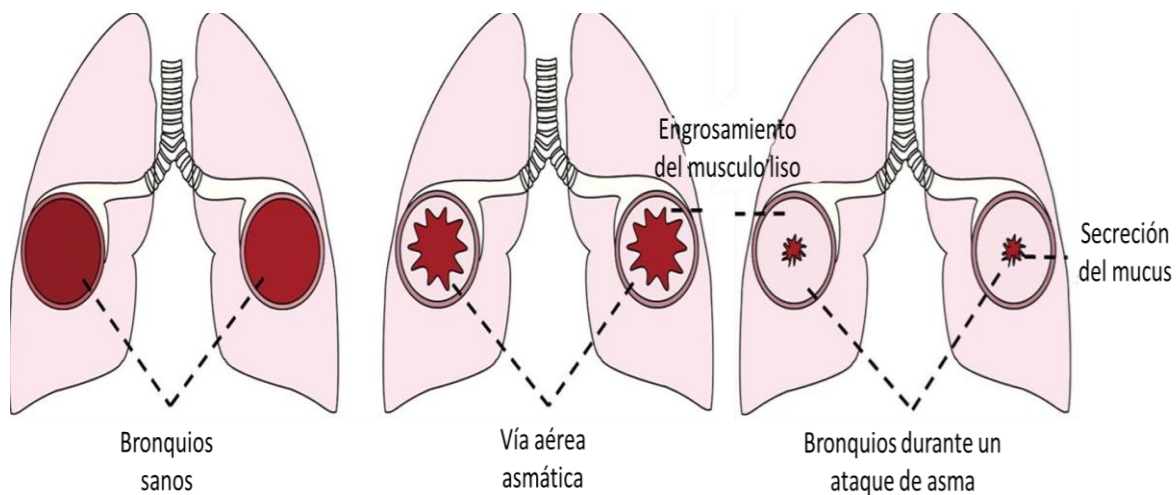


Figura 1. Cambios en las vías aéreas en pacientes asmáticos (Soren-Pedersen, 2018)

La OMS estima que 300 millones de personas padecen asma en el mundo, y es probable que para el año 2025 otros 100 millones puedan verse afectados. La incidencia y la prevalencia del asma son más altas en los niños y además es una población con pocas formas farmacéuticas disponibles, mientras que la morbilidad y la mortalidad es más alta en los adultos. El asma infantil es más común en los niños de 3 a 12 años, y en los adultos es más frecuente en las mujeres, justamente alrededor de la pubertad, lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden

desempeñar un papel en la etiología del asma **(WHO, 2017; Mancilla-Hernández, 2015)**. La epidemia mundial de asma que se ha observado tanto en niños como en adultos aún continúa, especialmente en países de ingresos bajos a medianos, aunque ha disminuido en algunos países desarrollados. En México hay fluctuaciones en la prevalencia de asma, siendo las áreas tropicales las que presentan hasta un 33% de los casos; en el año 2019 se reportaron 22 458 casos de asma, teniendo un mayor índice la población femenina con 12 523 casos **(Mancilla-Hernández, 2015; Secretaria de salud, 2019)**.

Para iniciar el manejo del paciente con asma se inicia con un tratamiento no farmacológico que consiste en modificar el estilo de vida del paciente evitando ciertas sustancias o factores que podrían irritar las vías aéreas incrementando las exacerbaciones de sus síntomas **(COMAAIPE, 2017)**.

El diagnóstico se basa en la observación de signos objetivos de obstrucción bronquial, básicamente por medio de la exploración física (signos de dificultad respiratoria, sibilancias, espiración prolongada e hipoventilación). Esto lo llevan a cabo mediante la técnica de espirometría forzada con prueba broncodilatadora; esta prueba consiste en medir la cantidad y la velocidad de salida del aire durante la espiración y uno de los parámetros que se utiliza para cuantificar la obstrucción de las vías aéreas es el volumen de aire exhalado en el primer segundo (FEV1) **(COMAAIPE, 2017)**.

2.1.1 Clasificación del asma

a) Asma ocupacional

El asma ocupacional se divide en dos:

Tabla 1. Clasificación del asma ocupacional (*Global Initiative for Asthma, 2019*)

Asma ocupacional	
Immunológica	No inmunológica
<ul style="list-style-type: none">• Inducida por la sensibilización a agentes específicos en el medio de trabajo.• Los agentes causales pueden ser de alto peso molecular o de bajo peso molecular.• Los agentes de alto PM son proteínas o glucopéptidos de > 10kDa (inducen la producción de IgE específica, resultando en una respuesta alérgica típica).	<ul style="list-style-type: none">• Es causada por irritantes.• El síndrome de disfunción reactiva de la vía aérea (RADS) es la forma más representativa.• El asma inducida por irritantes incluye casos de asma que se presentan después de una o más exposiciones a altos niveles de irritantes.

b) Clasificación del asma por fenotipos

Con el avance en los últimos años de las bases moleculares del asma, se conoce que existen varios mecanismos inmunológicos (endotipos) que pueden llevar a la inflamación bronquial y los síntomas clínicos (fenotipos). De tal forma, ya existen varios tratamientos específicos dirigidos a las alteraciones inmunológicas.

Dado que se trata de tratamientos biológicos, su costo es muy elevado y solo son costo-efectivos para pacientes con asma grave, cuyo tratamiento está en manos de especialistas.

Para un manejo biológico adecuado, la clasificación por endotipos es indispensable, sin embargo, para el manejo del paciente en los niveles 1 y 2 la clasificación por

endotipos no influye en el manejo, aunque es útil diferenciar algunos fenotipos, por ejemplo, asma alérgica o no alérgica (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación del asma por fenotipos (*Global Initiative for Asthma,2019*)

Clasificación de asma por fenotipos	
Asma alérgica	Asma no alérgica
Inicio temprano, Antecedentes patológicos del paciente (APP) y Antecedentes heredo familiares (AHF) positivos para atopia	Algunos adultos con asma eosinofílica, neutrofílica o pauci-granulocítica
Asma de inicio tardío	Asma con limitación fija al flujo de aire
Adulto, mujer	No-reversibilidad, después de años de asma
Asma con obesidad	
síntomas muy aparentes, pero no eosinofilia	

c) Clasificación clásica del asma

Por otro lado, existe la clasificación clásica de dicha enfermedad, donde según la *Global Initiative for Asthma* se divide en tres principalmente: asma leve, moderado y grave (*Global Initiative for Asthma,2019*).

Cuando se presenta la leve o moderada y hay crisis, el paciente habla con frases, prefiere estar sentado a acostado, no está agitado, su frecuencia respiratoria va aumentando, tiene una frecuencia de pulso de 100-120 lpm, tiene saturación de O₂ del 90-95% y la PEF > 50% del valor teórico o del mejor valor. Sin embargo, en la grave el paciente habla con palabras sueltas, se sienta encorvado hacia adelante y agitado. Tienen una frecuencia respiratoria > 30/min, su frecuencia de pulso > 120 lpm, tiene una saturación de O₂ <90% y una PEF <50% del valor teórico o del mejor valor.

Se ha comprobado que en el 50% de los pacientes entre 14 a 45 años tienen ritmos cardíacos entre 90 y 120 golpes por minuto; solamente 10% a 12% exceden este valor. La frecuencia respiratoria se encuentra entre 20 y 30 respiraciones por minuto en más del 50% de pacientes y más de 30 respiraciones por minuto en menos del 20%. La cianosis, las respiraciones de jadeo, y un pecho silencioso en un asmático indican enfermedad grave.

2.1.2 Tratamientos actuales, ventajas y desventajas

Para el tratamiento farmacológico los más utilizados durante una crisis se dividen en broncodilatadores de acción rápida y medicamentos antiinflamatorios y se ajusta la vía de administración según la velocidad y la potencia del efecto necesario en cada paciente **(INER, 2017)**.

Los broncodilatadores se dividen en de acción corta y acción prolongada.

Los broncodilatadores de acción corta se usan como un "alivio rápido" o mejor conocidos como "inhaladores de rescate", la acción de los broncodilatadores inhalados comienza unos minutos después de inhalarlos y dura de 2 a 4 horas y también son utilizados antes del ejercicio para prevenir el asma inducida por el ejercicio, algunos de ellos en el mercado son: albuterol (AccuNeb, Proair HFA, Proventil HFA, salbutamol (Ventolin HFA), también disponible como solución genérica para nebulizadores), metaproterenol, disponible como solución genérica para nebulizadores, levalbuterol (Xopenex HFA), pirbuterol (Maxair) **(WebMD, 2019; Almadhoun et al, 2020)**.

Los broncodilatadores de acción prolongada se pueden usar todos los días para controlar el asma, junto con un esteroide inhalado. Solo deben usarse con esteroides inhalados para el control a largo plazo de los síntomas del asma. Para tratar los síntomas del asma, existen tres tipos de broncodilatadores; β agonistas, anticolinérgicos y teofilina (*figura 2*); estos se pueden encontrar en distintas formas farmacéuticas como tabletas, soluciones y suspensiones, sin embargo, la más empleada es la inhalada. Algunos de ellos en el mercado son Advair, Dulera y

Symbicort (una combinación de un broncodilatador beta-agonista beta de acción prolongada y un esteroide inhalado), salmeterol (Serevent), formoterol (Foradil) **(WebMD,2019; Almadhoun et al, 2020; Perez-Padilla y Menezes, 2019)**

El mecanismo de acción de los broncodilatadores se inclina principalmente en la activación del receptor β_2 y así lograr la relajación del musculo liso, sin embargo, el uso constante de estos reduce su eficacia debido a la baja regulación del receptor en las vías respiratorias. Los broncodilatadores de acción corta tienen una vida media de 3 a 6 horas, mientras que los broncodilatadores de acción más larga tienen una vida media de 18 a 24 horas **(Almadhoun et al, 2020)**.

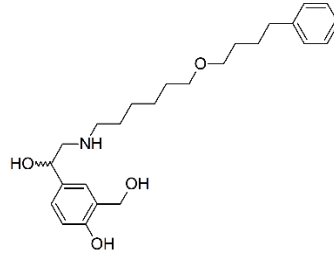
Por otro lado, presentan diversos efectos adversos. Los más frecuentes incluyen temblores, nerviosismo, palpitaciones cardíacas repentinas y notables y calambres musculares. Los efectos más graves incluyen la constricción repentina de las vías respiratorias bronquiales, o broncoespasmo paradójico, hipocalcemia y, en casos raros infarto de miocardio **(WebMD, 2019; Almadhoun et al, 2020)**.

Los inhibidores de leucotrieno son medicamentos que disminuyen la inflamación al prevenir la acción de los leucotrienos. Estos tipos de medicamentos no se usan para aliviar los síntomas agudos, pero se pueden usar para prevenir sus síntomas.

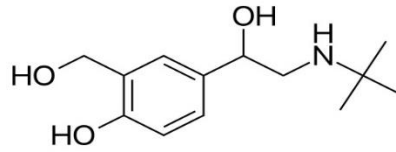
Algunos ejemplos de inhibidores de leucotrieno que están disponibles incluyen:

- Montelukast (Singulair)
- Zafirlukast (Accolate)
- Zileuton (Zyflo)

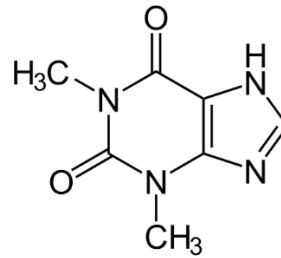
Salmeterol



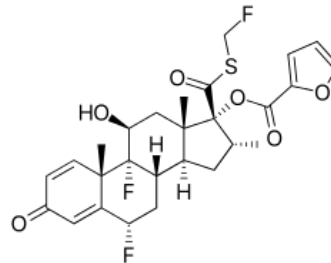
Salbutamol



Teofilina



Fluticasona



Montelukast

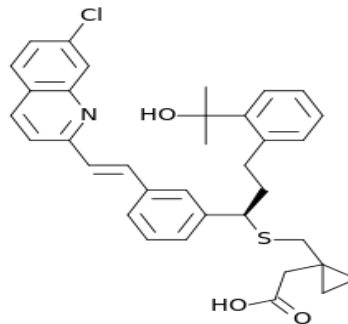


Figura 2. Estructuras químicas de los fármacos más empleados en el tratamiento del asma

2.1.3 Otras alternativas para la atención del asma

Los medicamentos que se usan actualmente como terapias presentan desventajas, como el alto costo y los efectos secundarios, que comprometen el cumplimiento del tratamiento. Últimamente, la medicina tradicional ha informado el uso de productos naturales como tratamiento alternativo o complementario. A pesar del amplio progreso científico en el área de tecnología química y farmacéutica en la síntesis de nuevas moléculas, los medicamentos elaborados con productos naturales todavía contribuyen enormemente al descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos.

Los productos naturales han llamado la atención en las compañías farmacéuticas debido a su uso fácil y económico, lo que les permite realizar muchos estudios que evalúan sus actividades terapéuticas, su toxicidad y su seguridad. Estos productos naturales, vitaminas y otros suplementos utilizados como tratamientos auxiliares representan alrededor del 40% de las terapias convencionales; entre las enfermedades para las que se utilizan los productos naturales, se pueden destacar aquellas de carácter alérgico e inflamatorio **(Ventola, 2010; Mainardi, 2010)**.

En los últimos años, ha habido un mayor interés en el estudio de los flavonoides, que son metabolitos secundarios de compuestos polifenólicos de plantas, y se han reportado más de 6000 estructuras. Los flavonoides han exhibido actividades farmacológicas importantes, como antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antiasmáticos y agente relajante del músculo liso vascular, entre muchos otros **(Flores-Flores et al, 2018)**. Se ha comprobado que algunas alternativas herbales empleadas en el asma proporcionan alivio sintomático y también ayudan a inhibir el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, estas plantas tienen un papel multifacético en el manejo del asma, lo que sugiere diferentes sitios de acción dentro del cuerpo **(Amaral-Machado, 2020)**.

En la *tabla 3* podemos observar algunas plantas medicinales previamente estudiadas en el cual se ha encontrado un potencial efecto antiinflamatorio, antiasmático y antialérgico. En donde se observa que en recientes estudios de la *Barleria prionitis* se ha encontrado con abundancia en sus hojas distintos tipos de flavonoides y flavonas.

Tabla 3. Agentes antialérgicos, antiinflamatorios y antiasmáticos

Nombre común de la planta	Parte usada/extracto/fracción	Constituyente químico principal	Referencia
<i>Pavetta crassipes</i>	hoja/acuoso	Flavonoides, taninos, antraquinonas.	Amos et al. 1998 (50)
<i>Thymus vulgaris</i>	etanol	Flavanonas	Meister et al. 1999 (54)
<i>Asystasia gangetica</i>	hoja/metanol,acetato de etilo	Isoflavona glucósido, dalhorinina	Akah et al. 2003 (53)
<i>Pavetta crassipes</i>	hojas/acuoso	Flavonoides, taninos, antraquinona	Amos et al. 1998 (50)
<i>Nelsonia canescens</i>	hoja/extracto de etanol	Flavonoides	Owoyele et al. 2005 (52)
<i>Barleria prionitis</i>	Hojas y raíces	Flavonas (6-hydroxiflavona)	Savithramma et al. 2007 (51)

2.2 Flavonoides y flavonas; uso en la medicina y en la farmacia

Se sabe que cuando existe el padecimiento de alguna enfermedad crónica degenerativa la primera recomendación es el mantener una dieta saludable alta en frutas y verduras. Sin embargo, no se sabe que compuestos se encuentran en ellos y son responsables de los beneficios que nos brindan. Los compuestos potencialmente responsables de contribuciones significativas a estos resultados incluyen vitaminas, minerales, fibras solubles e insolubles y fitoquímicos como los carotenoides e índoles (**Peris et al 1995**). Actualmente, la atención se ha enfocado en compuestos polifenólicos, particularmente los flavonoides. los compuestos potencialmente responsables de contribuciones significativas a tales resultados incluyen varias vitaminas y minerales, fibras solubles e insolubles y fitoquímicos como los carotenoides e índoles. La atención creciente se ha centrado

recientemente en compuestos polifenólicos, particularmente los flavonoides (**Peris et al, 1995; Ajay, 2003**).

Los flavonoides son sintetizados por diferentes tipos de plantas y están presentes a lo largo de nuestra dieta en frutas, verduras, nueces, semillas, hierbas, especias y granos integrales. Son sustancias sólidas cristalizadas o amorfas de color blanco o amarillento. Sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares, siendo insolubles en los apolares. Sin embargo, cuando están en estado libre, son poco solubles en agua, pero son solubles en disolventes orgánicos más o menos oxigenados, dependiendo de su polaridad.

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular como efecto protector de la pared vascular, también tienen efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. Por otro lado, ejercen otros efectos como diuréticos, antiespasmódica, antiulcerosa y antiinflamatoria (**Peris et al, 1995**).

Con base a la bibliografía se ha observado el efecto relajante traqueal y antiasmático de distintas flavonas. En estos estudios se comparó el efecto de la 6-hidroxi flavona, 6-aminoflavona, 6-metoxiflavona, 6-cloroflavona, 7-hidroxi flavona, 3-hidroxi flavona, crisina y quercetina; en los cuales se ha visto un efecto mayor en la 6-hidroxi flavona (6-HF) (**Flores-Flores et al, 2019; Flores-Flores et al, 2018**).

2.2.1.1 Fuentes de obtención y usos comunes

La obtención de flavonas se basa principalmente en el uso de las plantas enriquecidas en dichos compuestos y la previa búsqueda de información para la extracción de estos. Una vez teniendo la planta, estas se someten al proceso de limpieza y secado a temperatura ambiente bajo sombra. Posteriormente se pulveriza y se extrae mediante maceraciones sucesivas con disolventes específicos (hexano, diclorometano, metanol, etanol, entre otros), por un tiempo determinado que puede ir desde 24 hasta 72 horas. La extracción de estos compuestos se puede realizar con metanol al 85 %, con posterior filtración. El filtrado se concentra y todo el metanol se remueve; la capa acuosa es sucesivamente compartimentada con

una serie de disolventes orgánicos como: n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. Después se lleva a cabo la preparación del extracto hidroalcohólico, para después ser eliminado el disolvente **(Ajay, 2003)**.

La ruta biosintética de la cual se derivan los flavonoides es del ácido shikímico, la cual es la responsable de la secuencia de carbonos que da origen al segundo anillo, mientras que la cadena lateral de la estructura de un flavonoide proviene de la ruta del acetato de malonato, la cual forma el primer anillo. Los usos más comunes de esta flavona son como antiinflamatorio, broncodilatador, tratamiento para osteoporosis, antihipertensivo y antiasmático **(Flores-Flores, 2018; Chien-Hung, 1996)**.

2.2.2 La 6-hidroxi flavona como broncorrelajante

La 6-HF es un derivado de un producto natural de tipo flavonoide (*figura 3*), la cual en estudios previos mostró una actividad antiasmática en un modelo de asma alérgica, disminuyendo de manera significativa el índice de broncoconstricción (CE50= 84.14 Mmol), además de que no presenta efectos de toxicidad a dosis de hasta 2000 mg/kg de peso en un modelo de toxicidad aguda. Se determinó el mecanismo de acción *ex vivo*, el cual sugiere que su efecto relajante puede ser mediado por un posible bloqueo de canales de calcio en el músculo liso de la tráquea y activación de segundos mensajeros **(Flores-Flores, 2019)**.

En estudios previos se observó que una dosis de 50 mg/kg en el modelo de cobayos por vía intragástrica no presentaban alteraciones significativas en perfiles de glucosa y lípidos en sangre ni en enzimas marcadoras de hígado indicando que el metabolismo y la función hepática no fueron alterados. Además, no se documentaron muertes ni síntomas de toxicidad durante los 28 días de tratamiento por vía oral con 6-HF. El estudio aportó pruebas sólidas en términos de la seguridad y la eficacia farmacológica del 6-HF como posible fármaco antiasmático y también demostró sus actividades no tóxicas a nivel fisiológico y celular **(Flores-Flores, 2019; Flores-Flores, 2018; Avila-Villareal, 2016)**.

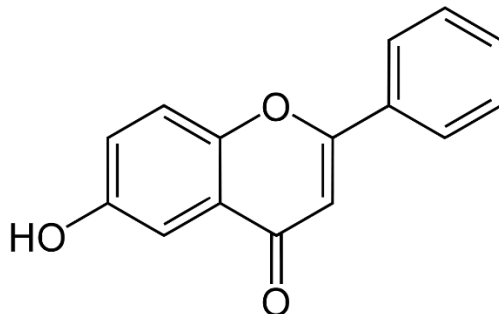


Figura 3. Estructura de la 6-HF (PubChem, 2020)

2.2.2.1 Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas

Esta molécula es un compuesto aromático, tiene un peso molecular de 238.2 g/mol, un log P de 3.17 y la biodisponibilidad de esta flavona no se conoce, pero Isaac y cols han demostrado que el promedio de las concentraciones pico de los flavonoides se da a las 1.75 horas después de haber sido administradas por vía oral (Jiménez et al, 2009). La 6-HF es prácticamente insoluble en agua, lo cual ha menguado su biodisponibilidad cuando se administra de forma oral (Ahedo-Arenas, 2019).

2.3 Vía pulmonar para la administración de fármacos

La vía pulmonar supone la administración de medicamentos a través de la nariz o la boca hacia los pulmones con la finalidad de generar el efecto a lo largo de este. Inicialmente esta vía fue implementada para tratar enfermedades respiratorias y actuar como efecto local. Además, la administración de medicamentos por esta vía ofrece grandes ventajas en el tratamiento de enfermedades respiratorias en comparación de las demás vías como evitar el metabolismo de primer paso, una alta absorción debido a la gran irrigación sanguínea y la posibilidad de generar efectos locales y sistémicos. A pesar de las grandes ventajas, esta vía suele presentar irritación de las mucosas del tracto respiratorio, pérdida de dosis debido a que parte de esta puede ser deglutida, además que debido a su rápida absorción se pueden presentar efectos indeseables que no podrían ser revertidos (Joshi, 2019).

La administración de fármacos por vía inhalatoria o pulmonar, es la primera vía de elección para tratar las enfermedades respiratorias crónicas, como son el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Esto es debido a sus ventajas comparando con la convencional, ya que ofrece una actuación directa sobre la vía aérea y consigue un efecto rápido sin la necesidad de usar grandes dosis, además de disminuir los efectos secundarios **(Patil, 2010)**. Además, a diferencia del suministro oral, donde un fármaco puede ser fuertemente metabolizado y alterado por las enzimas del intestino y el hígado, los pulmones tienen solo una pequeña fracción de la actividad del metabolismo del fármaco y del transportador de flujo de salida del intestino y el hígado. Por lo tanto, las moléculas pequeñas se pueden administrar de manera adecuada y eficiente en el cuerpo a través de los pulmones sin la producción de una compleja serie de metabolitos **(Joshi, 2006)**.

La vía de administración pulmonar de medicamentos se ha convertido de gran interés científico y biomédico en el área de la investigación médica, esto es debido a que el pulmón es capaz de absorber productos farmacéuticos para poder favorecer el efecto local y sistémico **(Patton, 2004)**.

2.3.1 Sistema respiratorio: anatomía y fisiología de los pulmones

Las superficies epiteliales de los pulmones están en contacto directo con el medio ambiente y están sujetas a fuerzas físicas a medida que los tubos de las vías respiratorias y los alvéolos se estiran y comprimen durante la ventilación (*figura 4*). Se ha prestado cada vez más atención al potencial de la vía pulmonar como administración no invasiva para la administración sistémica y local de agentes terapéuticos, debido a la alta permeabilidad y la gran área de superficie de absorción de los pulmones (aproximadamente 70-140 m² en humanos adultos con membrana mucosa) y buen suministro de sangre **(Hogan, 2014)**.

El material que no llega a los pulmones se deposita en el dispositivo o en la orofaringe del paciente. La barrera más importante para la absorción de fármacos inhalados es el epitelio del pulmón **(Patton, 1996)**.

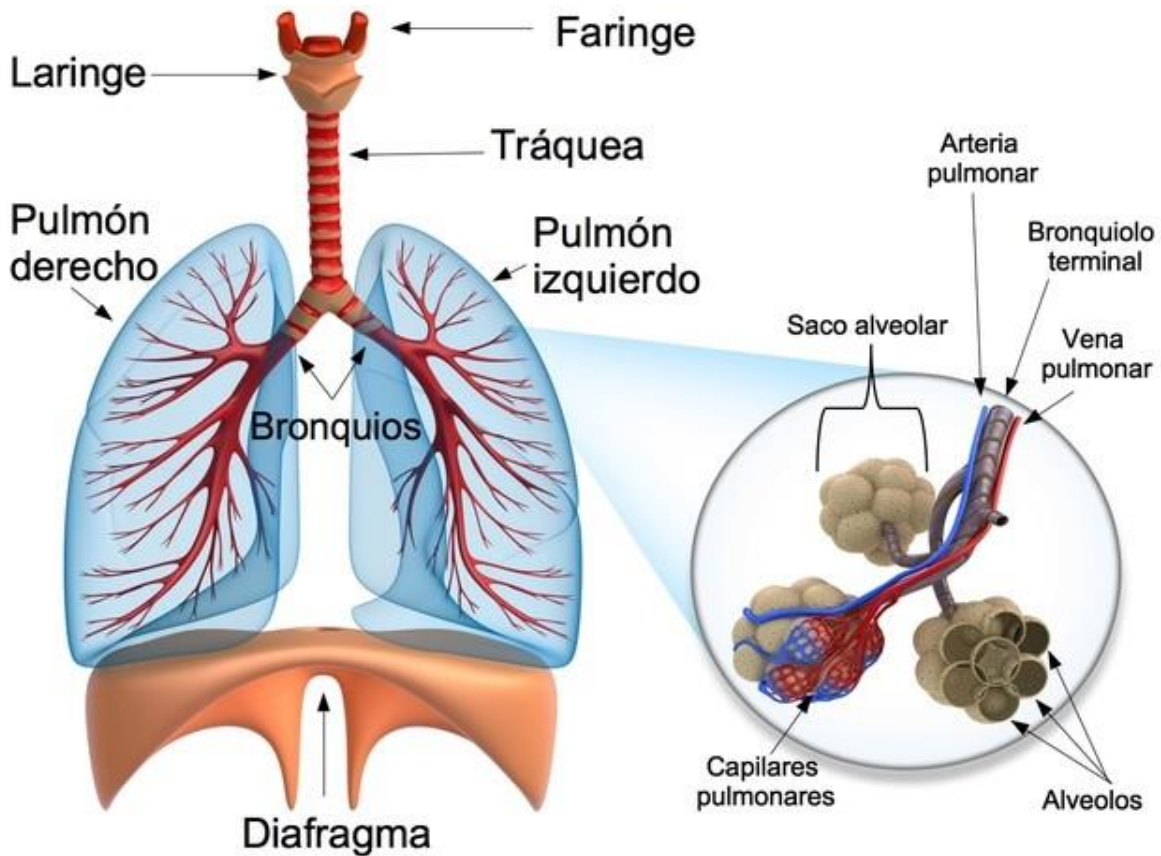


Figura 4. Anatomía del sistema respiratorio (*toda materia*)

2.3.2 El mucus como barrera de protección

Las superficies de los conductos de las vías respiratorias, así como los gastrointestinales y reproductivos, están en contacto con agentes extraños como microbios o partículas que deben ser eliminadas, cerca de 100 mil millones de partículas entre agentes patógenos y químicos se encuentran suspendidos en el aire, donde se ha reportado que más de 12 mil litros de aire son inhalados al día, siendo el tracto respiratorio responsable de dicho proceso. Con la finalidad de mantener un pulmón sano, dichas vías se encuentran protegidas por un gel extracelular, conocido como la barrera mucosa. Esta forma una capa discontinua y es de suma importancia mantenerla, debido a la función protectora epitelial, ya que es considerada la primera línea de defensa innata, evitando así la invasión y el daño del tejido subyacente (Turner et al, 2007).

El mucus es una secreción proteica, lipídica con contenido de iones y agua, donde las glicoproteínas ligadas a las mucinas son aquellas sustancias orgánicas principales componentes del mismo, donde más del 95% de su composición es agua y el restante conteniendo lípidos, sales inorgánicas y mucinas (*figura 5*) (Song X et al, 2015).

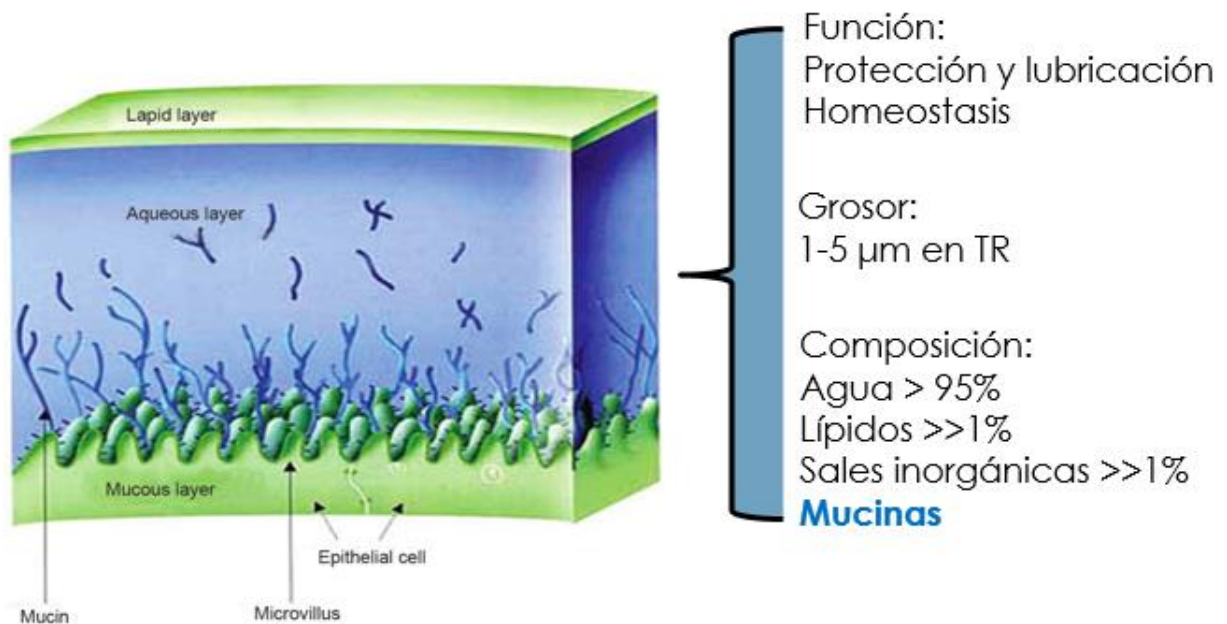


Figura 5. Composición estructural del mucus presente en el tracto respiratorio (TR) (Song et al, 2015)

La producción de moco en las vías respiratorias es normal. Sin ella, las vías respiratorias se secan y trabajan de manera incorrecta. Pero a veces el moco se produce en exceso, provocado por cambios en la naturaleza o enfermedades del tracto respiratorio, esto provoca la necesidad de toser y expectorar este moco como esputo. El tracto respiratorio produce alrededor de dos litros de moco al día, el alto contenido de agua ayuda a humedecer el aire inspirado que pasa. El moco contiene glucoproteínas conocidas como mucinas, así como proteínas derivadas del plasma.

Las mucinas secretadas y asociadas a células sirven para crear una barrera, y las "balsas" biofísicas de glicoconjugados poliméricos se unen y transportan patógenos desde las vías aéreas conductoras hacia el exterior. Las mucinas presentes en el moco están directamente involucradas en los fenómenos de adhesión. El término

"mucinas" generalmente se aplica para incluir un grupo algo heterogéneo de glicoproteínas que están codificadas por la familia de genes MUC pero difieren en sus secuencias de glucosilación y polipéptidos **(Richardson, 2013)**.

Las mucinas son glicoproteínas heterogéneas de alto peso molecular (106-107 g / mol) en donde el 75% es de carbohidratos y el 25% de residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces *glucosídicos* entre *acetilgalactosamina* y residuos de serina o treonina las cuales presenta regiones densamente recubiertas con glicanos cortos (la estructura en forma de "cepillo" con aproximadamente 3-10 nm de diámetro y 50-200 nm de longitud **(Hanisch, 2000)**).

Las mucinas secretadas en las vías respiratorias (MUC5B, MUC5AC y MUC2), están codificadas por genes ubicados en una región del cromosoma 11, forman un gel mucoso que interrumpe la adhesión de ciertas partículas a las superficies celulares, como el caso de algunos patógenos. Aunque las mucinas secretadas en las vías respiratorias se asocian notablemente con las células caliciformes que contienen abundantes gránulos de mucina, las células club (MUC5AC) y las células alveolares (MUC1) en las vías aéreas conductoras y periféricas y las células caliciformes en las glándulas submucosas también producen mucinas **(Kreda, 2012)**.

2.3.2.1 Ventajas de la mucoadhesión para partículas farmacéuticas

En el sector farmacéutico, el desarrollo de sistemas novedosos es de necesidad terapéutica ya que los sistemas de administración convencionales presentan parámetros farmacocinéticos que puede verse alterados o modificados por la formulación. Formulaciones novedosas que han sido desarrolladas se incluyen excipientes que coadyuvan a la formulación a mejorar propiedades y/o generar una funcionalización del producto **(Dash, 2010)**.

El amplio estudio sobre la composición, función, estructura y entre otras propiedades del mucus presente en el sistema respiratorio ha sido considerado en el desarrollo de productos funcionalizados como una estrategia para generar, ya sea; un efecto local, retardo en la liberación del fármaco y/o reducción de efectos adversos debido al metabolismo de primer paso en sistema circulatorio. De tal forma

que diversos polímeros con propiedades mucoadhesivas, es decir que presenten características de adhesión a aquellas membranas mucosas se han empleado en el desarrollo de formulaciones con diversas funciones como las mencionadas anteriormente. Las ventajas que se presentan mediante el uso de estos polímeros en las formulaciones van estrictamente ligadas a la función, por ejemplo si se requiere generar un efecto local o sistémico, el empleo de estos aditivos le proporciona a la formulación una liberación local en el sitio diana con la finalidad de ser específico, permanecer en contacto con el sitio de absorción, disminuir la frecuencia de administración, generar un apego al tratamiento por parte del paciente e incluso reducir efectos adversos(**Cook, 2017**).

Algunos polímeros empleados en el desarrollo de nanopartículas son (**Kumar, 2014**):

Por su excelente fuerza de bioadhesión

- Carbopol®
- Alginato de sodio
- Carboximetilcelulosa
- Hidroxilpropilmetilcelulosa
- Policarbofil

Algunos otros con muy buena fuerza de bioadhesión son (**Kumar, 2014**):

- Goma guar
- Poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico)
- Gelatina

Otros con buena fuerza de bioadhesión (**Kumar, 2014**):

- Pectina
- Chitosán

2.3.3 Dispositivos y formulaciones en la administración pulmonar

Los medicamentos inhalados son esenciales en las enfermedades respiratorias. Existe una variedad de medicamentos para la vía pulmonar, los cuales consisten en inhalar la sustancia para ser depositada en el tracto respiratorio lo más rápido posible y así poder ser absorbidos. Existen dispositivos para mejorar la administración de los fármacos por esta vía. Entre los más conocidos se encuentran los inhaladores de dosis medida presurizados (pMDI), los inhaladores de polvo seco (DPI), los nebulizadores y los inhaladores de niebla suave

Inhaladores de dosis medida presurizados (pMDI): Los pMDI se introdujeron por primera vez en la década de 1950 y actualmente se prescriben como sistemas portátiles para tratar afecciones pulmonares. Consisten en una formulación que contiene el fármaco disuelto o resuspendido en un propelente o una mezcla de diversos, además, se incluyen agentes amortiguadores, conservadores, saborizantes y la sustancia activa que se emplea, lo que comprende cerca del 1% del contenido total. Dicha formulación permite la entrega de dosis eficiente y consistente al paciente. El cartucho del dispositivo es un bote de tamaño apropiado para contener la formulación suficiente para el número requerido de dosis. En la *figura 6* se pueden observar los componentes de este tipo de dispositivos; la cámara de expansión es representada en el espacio A: en la cual al momento de activarlo, se suministra el medicamento ; la letra B representa la boquilla por donde se liberan las partículas de aerosol, sirviendo como un conducto entre el dispositivo y el paciente, la válvula dosificadora es la que libera la dosis deseada, ubicado en el diagrama como la letra C, finalmente la formulación líquida es contenida en el apartado D donde están contenidos los excipientes antes mencionados **(Mullen et al 2018; Stein et al, 2014; Doan et al, 2011; Muller, 2004)**.

Una de las desventajas que pueden presentar este tipo de dispositivos es la falta de coordinación entre la respiración del paciente y la actuación del inhalador, aunque este problema ya se ha solucionado con la nueva generación de dispositivos pMDI que son activados por la respiración, es decir, funcionan coordinando la frecuencia respiratoria del paciente y automáticamente la sensibilidad del disparador es

ajustada para suministrar la formulación. Otra desventaja con mayor impacto es que se puede perder hasta el 30% de la formulación al momento de utilizar este dispositivo **(Muller, 2004)**.

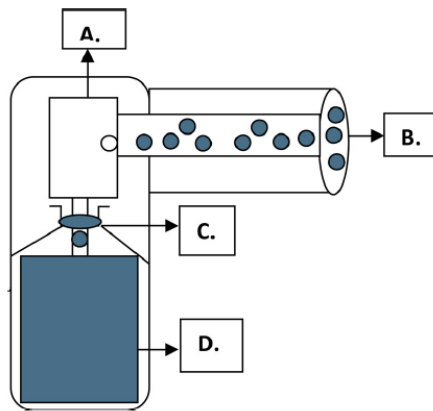


Figura 6. Inhalador de dosis medida presurizado **(Muller, 2004)**

Inhaladores de polvo seco (DPI): Los inhaladores de polvo seco son dispositivos que permiten la aerolización y entrega de medicamentos hacia los pulmones en forma de polvo seco para el tratamiento de las enfermedades respiratorias, sin necesidad del empleo de propelente. Se caracterizan por ser de fácil manejo, portátiles y duraderos, además este tipo de dispositivos requieren una mínima coordinación entre la respiración del paciente y la actuación del inhalador, donde la formulación siendo sometida a una mayor dispersión, obliga a desaglomerarla a partículas más pequeñas **(Muñoz, 2006)**.

Algunos ejemplos diseñados como el Clickhaler, Multihaler y Diskus tienen la capacidad de suministrar el polvo a altos flujos de aire que divide las partículas agregadas provenientes de la formulación para lograr ser respiradas por el paciente, existen ya patentes que han sido formulados en dichos dispositivos con el uso de diferentes fármacos y dosis, mostrados en la *tabla 4*. La composición de la tecnología DPI basada en cápsula se puede observar en la *figura 7*, que consiste en lo siguiente; una boquilla que funciona como el canal entre la boca y el dispositivo y es donde la administración tiene lugar (A), un botón que acciona el dispositivo (B),

un filtro que se encarga del intercambio en la resistencia del flujo interno (C), la cámara donde se deposita la capsula (D), la letra E representa la cápsula y la F, la entrada de aire, donde el impacto tiene lugar y a su vez es significativo en la aerolización del polvo con base a los demás excipientes que lo conforman. A pesar de las grandes ventajas que estos dispositivos presentan, una limitación debe ser considerada en el sentido del equilibrio entre la resistencia del inhalador y el caudal en el dispositivo. En estos dispositivos para lograr la desaglomeración particular se requiere de un flujo de aire rápido, logrando una fracción más fina debido a las impactaciones. Sin embargo, el llegar a flujos de aire muy elevados compromete a las partículas a ser depositadas en la región orofaríngea y a su vez, reduce la cantidad de activo que debería llegar al órgano diana **(United States Pharmacopeial Convention, 2012)**.

Tabla 4. Tipos de inhaladores de polvo seco

#	Dispositivo	Patente	Especificaciones	Dosis	Fármacos disponibles
1	Spinhaler	Aventis	Tiene la forma de un polvo seco contenido en cápsulas claras de color naranja y blanco llamadas spincaps. Es un dispositivo inhalador accionado por la respiración que libera medicamentos del Rotacap	1 capsula	Cromoglicato de sodio
2	Rotahaler	GlaxoSmithKline	Es un inhalador de polvo seco que contiene pequeñas bolsas (o ampollas), cada una con una dosis de medicamento, en un disco.	1 cápsula	Salbutamol Dipropionato de beclometasona
3	Diskhaler		No lo use para tratar problemas respiratorios repentinos por asma o EPOC.	Blister 4,8	Salbutamol Salmeterol
4	Diskus		El uso del dispositivo puede ser difícil para niños pequeños o en adultos con falta de aliento. Se recomienda usar el amortiguador y el espaciador disponibles para emergencias	60 blisters	Salbutamol Salmeterol
5	Turbuhaler	Astra Zeneca	El uso del dispositivo puede ser difícil para niños pequeños o en adultos con falta de aliento. Se recomienda usar el amortiguador y el espaciador disponibles para emergencias	200 depósitos	Formoterol Budesonida Formoterol

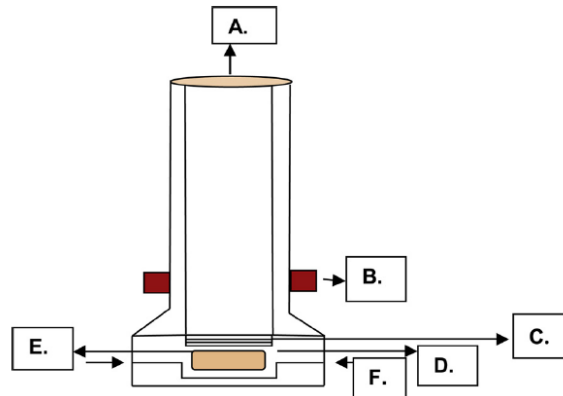


Figura 7. Inhalador de polvo seco (Muller, 2004)

Nebulizadores: Otro tipo de dispositivos utilizados para generar el suministro de aerosol de una formulación, son los nebulizadores. Que de forma específica cuando el paciente realiza el proceso de inspiración, se generará el suministro del aerosol cuando éste cruce el dispositivo. Mientras que, al momento de exhalar, el aire dentro del aerosol expulsa la formulación hacia el exterior de la atmósfera, por lo que puede haber pérdidas o fugas del residual del activo en condiciones atmosféricas **(Boonyo,2007)**.

Uno de los dispositivos que fueron desarrollados para producir aerosoles inicialmente es el nebulizador de chorro donde su mecanismo principal para el flujo de gas es con el empleo de un compresor. Este tiene como finalidad generar la atomización de la formulación, el gas debe pasar a través de una abertura en el dispositivo que será el mismo por el cual la expulsión de la nube de la formulación tendrá lugar, donde las partículas que son atomizadas constan de gotas de poco o gran tamaño que llegan al deflector previamente impulsadas por aire. Dicha impactación causada por los deflectores afecta las gotas más grandes y luego se fuerza hacia el otro lado, destinado a ser reciclado en forma líquida dentro del nebulizador. En la *figura 8* se representan los esquemas sobre la conformación de los nebulizadores existentes; El nebulizador Jet (1) o nebulizador de chorro consta de un dispositivo el cual presenta una vía de entrada de aire inhalado adicional (A),

la boquilla (B), que es aquel apartado del dispositivo destinado a que el paciente logre la inhalación de la formulación, La liberación del aerosol se da mediante un conducto donde el gas a presión pasa a través de él (C), El deflector es aquel medio por el cual el suministro de aerosol atraviesa hacia el conducto de liberación (D), como se ha observado en los dispositivos antes mencionados, este dispositivo contiene un deposito (E) que contiene la formulación completa y como se logra observar, en este tipo de dispositivos, el suministro de aire a presión que se ejercerá sobre la formulación tomara lugar en la parte inferior del mismo (F) y consta de un equipo externo al dispositivo que funciona mediante energía eléctrica llamado compresor **(Muller, 2004)**.

Una ventaja que presentan los nebulizadores ultrasónicos es su mayor capacidad de salida que los anteriores, sus características están representadas en la *figura 7* (2). Estos nebulizadores poseen un generador de ondas ultrasónicas (A) donde las últimas son representadas en (B). Además, estos sistemas presentan dos boquillas (C y E) donde un ventilador (D) genera el flujo de la boquilla C a la E, que esta última es la boquilla para inhalación, por último, el generador debe ir conectado a una fuente de alimentación (F) **(Muller, 2004)**.

Una variedad de medicamentos se encuentra disponibles en forma nebulizada, beurer® y respironics®. La desventaja de estos dispositivos es que algunos tienden a ser grandes y voluminosos, además de que comúnmente requieren de energía eléctrica para su funcionamiento **(Mullen, 2018)**.

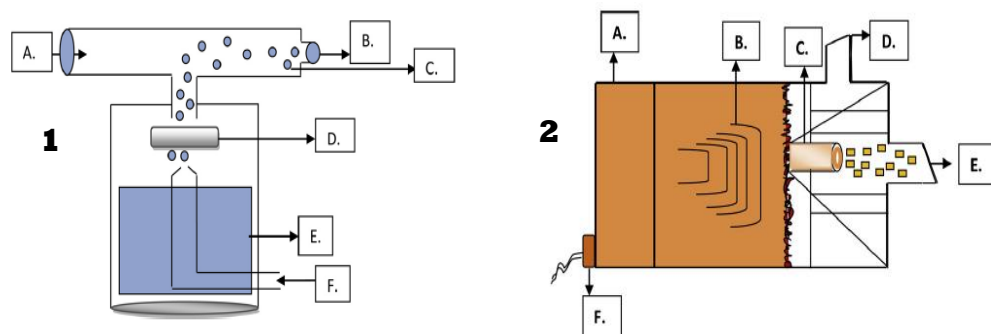


Figura 8. Ejemplos de nebulizadores (1) Jet. (2) Ultrasónico **(Muller, 2004)**

2.3.4 Mecanismos de deposición de partículas; impacto del tamaño y forma

Las partículas de los dispositivos utilizados para la administración de fármacos por la vía oral se depositan en el tracto respiratorio dependiendo del tamaño, la densidad, la forma, la carga y las propiedades de la superficie de las partículas y el patrón de respiración del individuo.

El diámetro de masa media aerodinámica (AD) de las partículas inhaladas es de gran importancia dado que de esto dependerá la deposición de estas al ingresar al organismo. Existen cinco mecanismos de deposición los cuales son: impactación inercial, sedimentación, difusión, intercepción (*figura 9*); y precipitación electrostática, que está relacionada con la carga de partículas. La impactación inercial es un mecanismo de deposición significativo para partículas con un AD mayor de 2 μm . Como estas partículas son demasiado grandes para poder permanecer en la corriente de aire en movimiento, tienden a impactarse inercialmente en las vías respiratorias extratorácicas y traqueobronquiales superiores. Para partículas con una AD de 1 μm , la gravedad y la sedimentación son los mecanismos dominantes para su deposición en las vías aéreas de conducción más pequeñas del tracto traqueobronquial. Las partículas con una AD de 0,5 a 1 μm se someten a una deposición difusa de browniana o se exhalan (**Alcalá-Alcalá, 2014**).

El tamaño de estas partículas se define mediante lo que se denomina diámetro de la masa media aerodinámica (DMMA) o diámetro de una partícula de masa igual a la mediana de las partículas de una población, es decir, aquel diámetro de la partícula en el que el 50% de la masa del aerosol se encuentra por encima del mismo y el otro 50% por debajo.

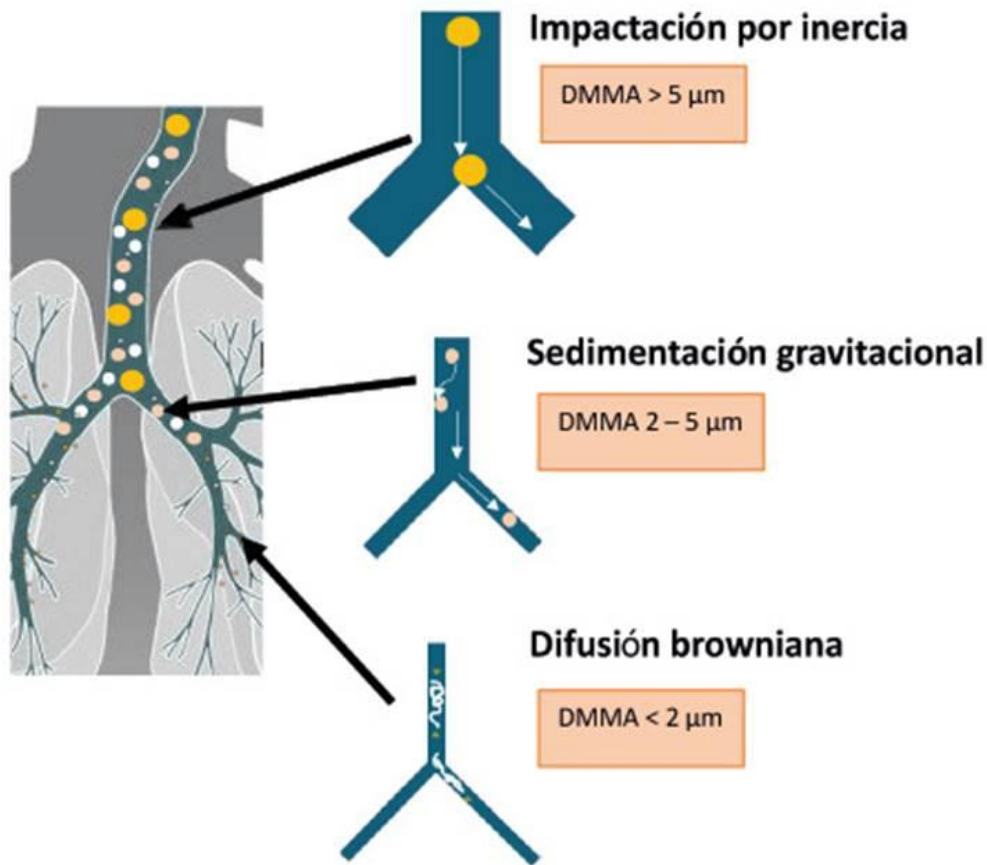


Figura 9. Tipos de deposición de partículas (Tronde et al, 2003)

Actualmente existe un mercado amplio en dispositivos para la administración de medicamentos por esta vía, por ejemplo; cartuchos presurizados, inhaladores de polvo seco, cámaras espaciadoras, nebulizadores de diferentes tipos. Por otro lado, es importante mencionar los factores que influyen en el depósito pulmonar de las formulaciones contenidas en estos dispositivos

- Tamaño de las partículas: los inhaladores y nebulizadores generan aerosoles de partículas de distinto tamaño que se clasifican por el diámetro de masa media aerodinámica (DMMA). El tamaño óptimo para que las partículas se depositen en los alveolos y pequeñas vías respiratorias es de 0.,5-5 μm de DMMA, las partículas de diámetro entre 0.5 y 2 μm se desplazan de forma errática por las vías aéreas y alvéolos (movimiento browniano) depositándose en las zonas más periféricas (figura 8).

- Técnica de inhalación: es uno de los factores más importantes que determina la biodisponibilidad del fármaco en la vía aérea inferior y la eficacia terapéutica de los inhaladores.
- Flujo inspiratorio: el ideal es entre 30 y 60 L/min (**Cook et al, 2017**).

En general, para la descripción del depósito respiratorio de partículas, se requieren tres componentes: modelo geométrico del pulmón, características aerodinámicas y comportamiento de las partículas

2.3.4.1 Ingeniería de partículas en el desarrollo de sistemas pulmonares; micro y nanotecnología

La nanotecnología es una tecnología que se concibió en los años con la idea de conocer y manipular la materia a escala atómica o molecular, para que sea aplicada en distintas áreas de la tecnología. La “national nanotechnology initiative (NNI)”, la define como el área encargada del estudio, diseño, caracterización, síntesis y aplicación de sistemas y materiales, que poseen propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas debido a su tamaño (escala nanométrica) (**Weiss et al, 2008**).

Las nanopartículas orgánicas se consideran materiales interesantes debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y facilidad de preparación. El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), el quitosán (CHI) y los liposomas son nanopartículas orgánicas que han sido ampliamente investigadas recientemente. El CHI es uno de los buenos candidatos como adyuvante para la aplicación nasal y pulmonar debido a su mucoadhesividad, biocompatibilidad, baja toxicidad y efectividad en el transporte de antígenos, ya que es capaz de abrir las uniones estrechas de la membrana nasal y pulmonar (**Mahapatro & Singh, 2011; Boonyo et al, 2007**). Este polímero es soluble en medio ácido, en donde los grupos amino son protonados y produce cargas positivas; donde estas cargas positivas obtenidas dan buenos resultados en la mucoadhesión al formar una fuerte interacción electrostática con los residuos de ácido siálico cargados negativamente de la mucina, lo cual provoca un aumento del tiempo en la eliminación (**Soane et al, 2000; Van Der Lubben et al, 2003**).

La aplicación de esta ciencia a la farmacia ha permitido diseñar novedosos sistemas de liberación de fármacos, entre ellos los que se encuentran son los liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas y dentro del grupo de los nanotransportadores basados en lípidos han llamado la atención los acarreadores lípidos nanoestructurados (NLC), debido a que presenta ventajas distintas a los demás acarreadores como son la gran cantidad de carga en el sistema y la gran estabilidad que presentan.

Estos acarreadores son una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, lo que produce más imperfección en la matriz para acomodar más moléculas de fármaco en comparación de las nanopartículas lipídicas sólidas. Las nanopartículas lipídicas muestran una alta eficiencia de encapsulación de fármacos y una alta estabilidad y no requieren el uso de disolventes orgánicos durante la producción, por lo que su producción es económica y fácil de escalar.^{4,6} Además, las nanopartículas lipídicas están hechas de lípidos endógenos o lípidos similares a los que tenemos en el organismo y por esta razón, se consideran biocompatibles, biodegradables y no tóxicos **(Song et al, 2015; Muller et al, 2004)**.

2.4 Acarreadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC)

Los NLC son un nanosistema compuesto por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos (*figura 10*) lo que permite tener una mejor encapsulación del fármaco que cualquier otro sistema lipídico, sobre todo para fármacos de baja solubilidad (Clase II y IV). Son nanopartículas con una baja toxicidad, biodegradación, protegen al fármaco, cuentan con métodos de manufactura de fácil y escalable preparación, pueden encapsular fármacos lipófilos e hidrófilos, se puede controlar el tamaño de partícula, generan una liberación controlada y evitan el uso de disolventes orgánicos. Sin embargo, podrían provocar una reacción irritante, sensibilidad a algunos tensoactivos **(Schäfer-Korting et al, 2017)**. Para su preparación existen métodos como la homogenización a alta presión, homogenización en caliente, homogenización en frío, emulsión simple-evaporación de disolvente, ultrasonificación y doble emulsión-evaporación de disolvente **(Zhuang et al, 2010)**.

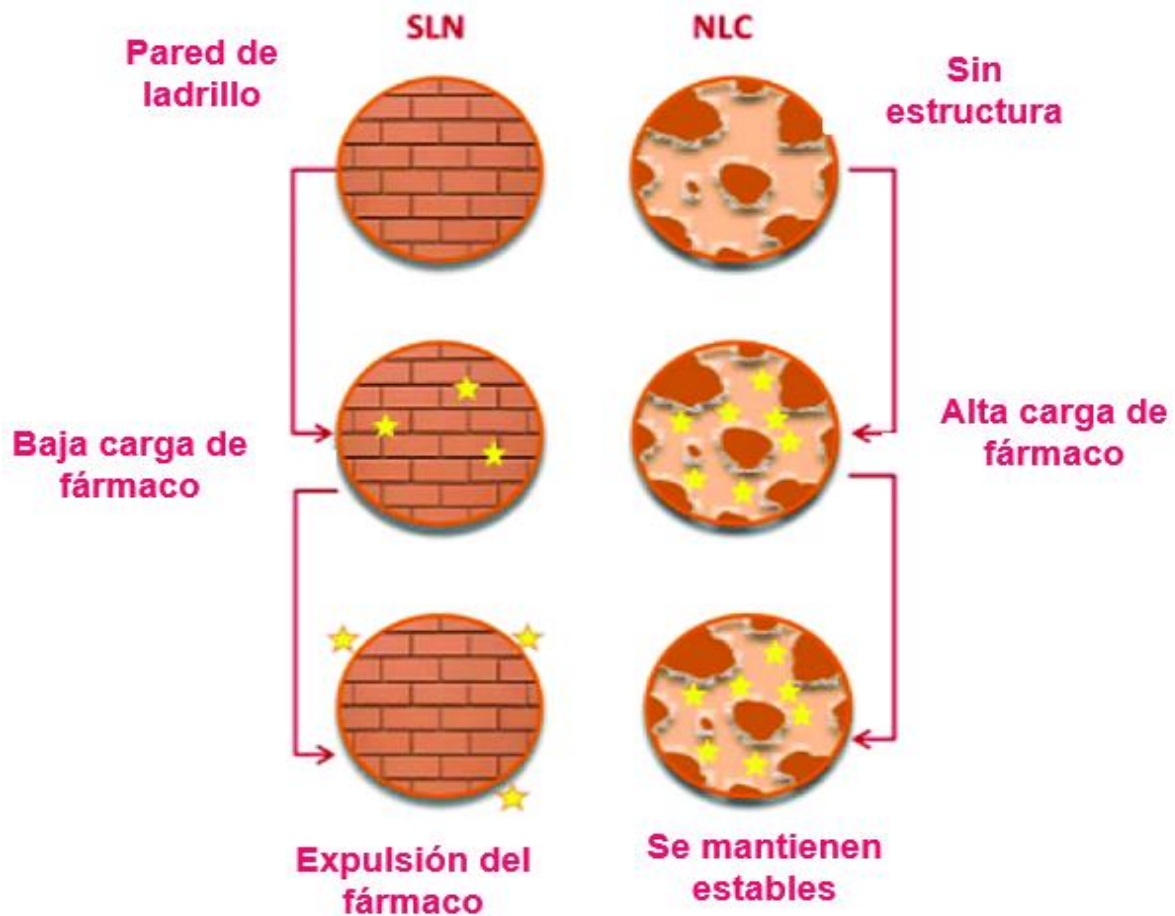


Figura 10. Comparación de una SLN y un NLC (Beloqui et al, 2016)

Los NLC se han propuesto para administrar fármacos por la vía pulmonar, donde requisitos como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, carga de fármaco suficiente, protección del fármaco, estabilidad y capacidad de aerolización son importantes. Publicaciones recientes indican que los NLC pueden cumplir los requisitos, para ser un sistema de administración adecuado para la aplicación pulmonar (Zhuang, 2010; Tronde et al, 2010; Naseri, 2015; Beloqui, 2016).

2.4.1 Usos de NLC en la administración pulmonar

Como se mencionó anteriormente, las enfermedades pulmonares son aquellas que afectan sus condiciones fisiológicas. En lo que respecta a la parte del tratamiento, se han hecho investigaciones de mercado y se ha observado el gran uso de los

dispositivos, como lo son los MDI, DPI y nebulizadores y gracias a estas investigaciones es probable que estos hechos impulsen el desarrollo de tratamientos innovadores para la vía pulmonar.

Los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) han llamado la atención dado a sus ventajas sobre otros nanoacarreadores existentes que han desarrollado para la vía pulmonar. Por ejemplo; se ha observado que mejora el potencial de focalización al unirse específicamente a los receptores de las células cancerosas, en donde, los NLC, los diseñaron con diferentes moléculas ligando de alta afinidad como el ácido hialurónico, transferrina y bombesina para el tratamiento de cáncer de pulmón **(Russell, 2017)**.

De igual manera, se han hecho estudios de tratamientos para asma alérgica, en donde se ha encapsulado hasta el 95% del Montelukast mediante la técnica de liofilización. Al igual que se han llevado a cabo aerosoles de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y NLC de beclometasona **(Da Silva, 2017)**.

Se ha demostrado que los nanoacarreadores nebulizados tienen un comportamiento aerodinámico adecuado necesario para la focalización pulmonar profunda.

3. JUSTIFICACIÓN

El asma es una enfermedad crónica que se presenta en personas de todas las edades sin distinguir sexo, se caracteriza por crisis recurrentes donde el paciente siente falta de aire y presenta distintas consecuencias como es la opresión en el pecho, sibilancias, fatiga, entre otros. Estos varían en cuanto a su severidad y frecuencia, pueden durar horas o incluso pueden presentarse solo algunos días del año.

En la actualidad, existe el tratamiento no farmacológico y farmacológico; en el tratamiento farmacológico existe una clasificación de ellos entre los más utilizados como son los agonistas β_2 adrenérgicos acción corta y prolongada, agonistas al receptor de leucotrienos, metilxantinas, esteroides inhalados y agonistas β_2 adrenérgicos y esteroides combinados, sin embargo, estos han presentado una variedad de desventajas encabezando la de los efectos adversos que estos conllevan, además de su seguida y alta dosificación y baja biodisponibilidad.

El desarrollo de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) ha adquirido gran auge en los últimos años, debido a la mejora de las nanopartículas lipídicas sólidas y propiedades fisicoquímicas de los fármacos como su estabilidad, solubilidad y liberación, los cuales son parámetros de suma importancia para que los fármacos lleven a cabo su efecto terapéutico.

La 6-hidroxi flavona es una molécula con potencial efecto antiasmático y broncodilatador. Dada su insolubilidad en agua tiene como consecuencia una baja biodisponibilidad al ser administrado por la vía oral. Es por ello que este trabajo se basa en la administración de la 6-HF por la vía pulmonar, la cual a lo largo del tiempo se ha descubierto que es una excelente vía para administrar fármacos con efectos sistémicos y locales.

Con base a lo anterior, en este proyecto se propone una forma farmacéutica de liberación prolongada con un fármaco experimental (6-HF), utilizando las ventajas que tiene la micro-nanotecnología y los NLC para desarrollar una formulación

dispuesta para ser administrada por la vía pulmonar con la finalidad de obtener un potencial efecto antiasmático y broncodilatador.

4. HIPÓTESIS

Es posible encapsular 6-HF en NLC bioadhesivos y formularlos como polvo seco para inhalación con propiedades tecnológicas y aerodinámicas apropiadas para la administración pulmonar, con una liberación adecuada para la vía y un mayor tiempo de permanencia, los cuales presentarán un efecto traqueorrelajante en un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener y caracterizar un polvo seco para inhalación formulado con NLC cargados con 6-HF, así como evaluar su eficacia *in vitro* y *ex vivo*.

5.2. Objetivos particulares

- Desarrollar y validar la metodología analítica para cuantificar la 6-HF en las diferentes etapas del proyecto.
- Obtener y optimizar NLC cargados con 6-HF, con un tamaño nanométrico objetivo >500 nm, mediante el uso de Diseño de Experimentos, para después ser recubiertos con un material polimérico mucoadhesivo.
- Llevar a cabo la caracterización física, del estado sólido y biofarmacéutica de los NLC mediante diferentes técnicas analíticas.
- Realizar estudios de eficacia *in vitro* a través de perfiles de liberación y pruebas de mucoadhesión.
- Formular los NLC optimizados como un polvo seco para inhalación (DPI) empleando diferentes excipientes para inhalación.
- Realizar la caracterización física de las formulaciones propuestas por medio de la reología de polvos, morfología, deposición de partículas y propiedades aerodinámicas.
- Evaluar el efecto relajante de la formulación optimizada en un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata.

6. REACTIVOS Y EQUIPOS

6.1 Reactivos

Fármaco experimental:

- 6-hidroxi flavona, marca SIGMA ALDRICH

Fármaco control:

- Teofilina, marca SIGMA ALDRICH

Inductor de contracción de tráquea:

- Carbacol, marca SIGMA ALDRICH

Estabilizante:

- Kolliphor P188, marca SIGMA ALDRICH

Lípidos:

- Lipocire, marca Gattefossé (glicéridos de almendra de palma hidrogenados)
- Miristato de isopropilo, marca Droguería Cosmopolita

Disolventes:

- Acetona, marca SIGMA ALDRICH
- Dimetilsulfóxido, marca SIGMA ALDRICH

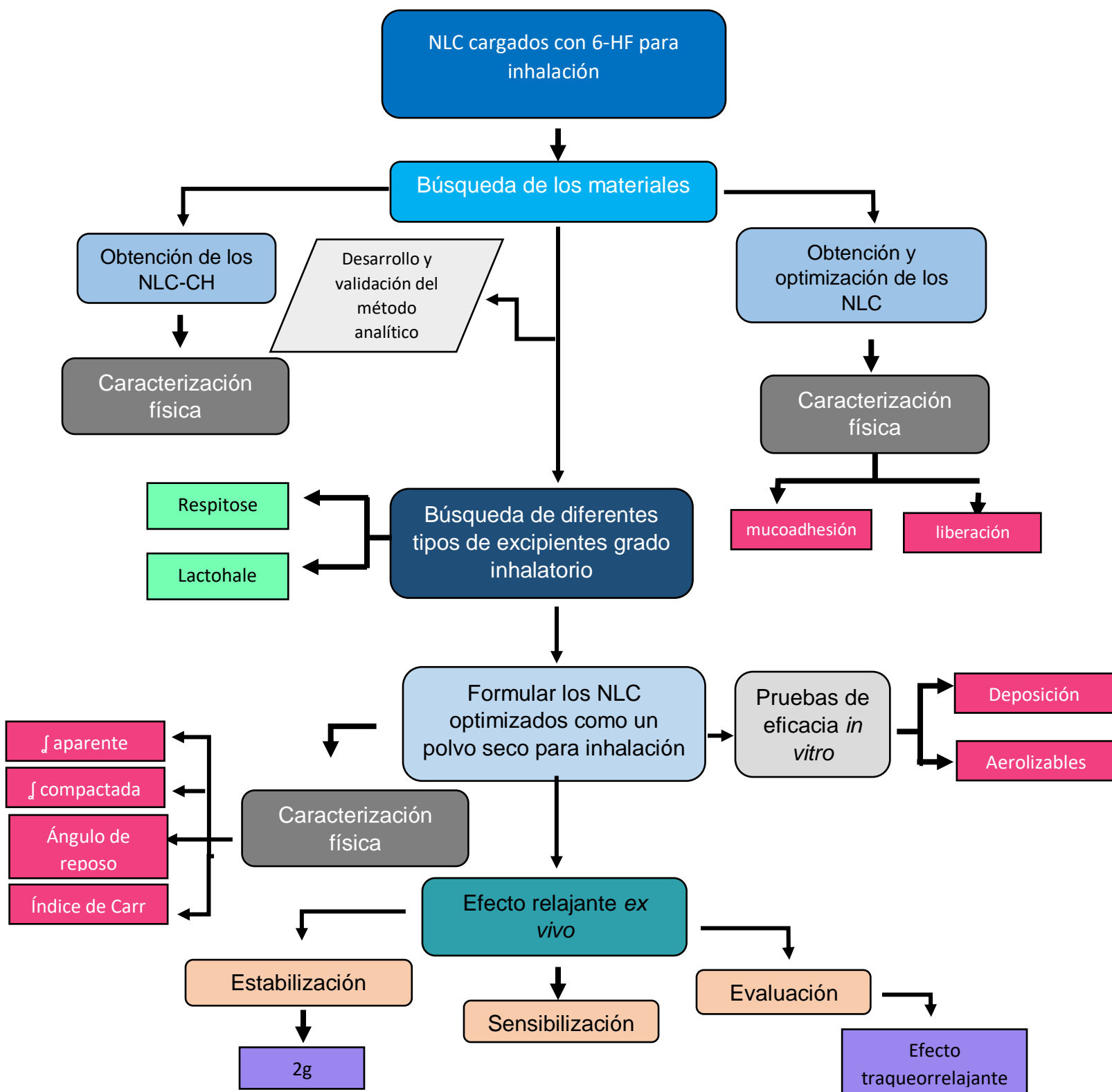
6.2 Equipos

- Balanza analítica, marca OHAUS
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, marca Agilent Technologies
- Zetasizer nano ZS9, marca Malvern
- Termocirculador Sous vide, marca PolyScience
- Ultra-turrax® T18 digital, marca IKA

- Potenciómetro SM-38W, marca Science MED
- Espectrómetro infrarrojo NICOLET 6700, marca Thermo scientific
- Liofilizador BenchTop Pro, marca SP SCIENTIFIC
- Microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM-76
- Calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo®/DSC 3 Start System)
- Difractómetro de rayos X de polvos (Bruker/D2 Phaser)
- Vortex (Science MED® MX-S)
- Rotaevaporador (IKA® RV 10/HB 10)
- Potenciómetro Science (MED® SM-3BW)

7. METODOLOGÍA

7.1 Metodología general



7.2 Selección de los materiales para el desarrollo de NLC mediante pruebas de solubilidad aparente

Se hizo una búsqueda bibliográfica de distintos materiales a emplear en la formulación de los acarreadores lipídicos nanoestructurados, así como, distintas metodologías para su obtención mediante pruebas de solubilidad (**Joshi, 2006; Prabhu et al, 2019**).

7.2.1 Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad se llevaron a cabo con la finalidad de tener como vehículo el disolvente más factible para la molécula y los lípidos. Se pesaron 10 mg de 6-HF y se colocaron en un tubo de ensaye, donde se fue agregando por separado distintos disolventes (etanol, metanol, acetona, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo) incrementando el volumen en 500 μL .

Por otro lado, se hizo esta misma prueba empleando lípidos líquidos (LL) y sólidos (LS). Se pesaron 10 mg de 6-HF y se colocaron en un tubo de ensaye, por separado se pesaban 20 mg de diferentes tipos de lípidos sólidos (lipocire, compritol, tefossé, suppocire, ácido esteárico, cera de abeja y fosfatidilcolina) y una vez vertidos en un tubo de ensaye se colocaron en un baño maria a 40°C. Una vez fundido el lípido se tomaron 200 μL y se vertieron en el tubo de ensaye donde se encontraba la 6-HF (incrementando el volumen hasta solubilizar por completo la 6-HF). Para las pruebas de solubilidad de los lípidos líquidos se utilizaron tubos de ensaye, donde se tenían 10 mg de 6-HF y se iban vertiendo 200 μL hasta tener una solución completamente traslúcida.

Finalmente, se hizo la prueba de solubilidad y miscibilidad de los LL y LS donde se pesaron 20 mg de los LS antes mencionados, se vertieron en tubos de ensaye y se les fue añadiendo 200 μL de los disolventes en los que la 6-HF era soluble (acetona, NaOH, diclorometano) y una vez disuelto el LS, se le añadieron 500 μL de LL, con la finalidad de observar la miscibilidad de estos dos. Esta última prueba de solubilidad se hizo con la finalidad de emplear un método de emulsión-evaporación de disolvente.

7.3 Desarrollo y validación de un método analítico por UV para cuantificar 6-HF

Una vez obtenidas las pruebas de solubilidad, se desarrolló un método analítico por espectrofotometría UV y posteriormente se validó considerando los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. Todos los parámetros se determinaron con base a la Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.

Primeramente, se realizó un barrido de 200 a 800 nm; del cual se observó la longitud de absorción máxima (265 nm) que se consideró para realizar una metodología por espectrofotometría UV. Las diluciones que se consideraron en la curva de calibración fueron de 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 $\mu\text{g/mL}$ y se realizaron a partir de una stock.

Se preparó un stock de 1 mg/mL de 6-HF; en donde, se pesaron 25 mg de 6-HF y se disolvieron en 25 mL de acetona. Posteriormente se realizó una segunda stock con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ a partir de la primera aforando con agua destilada.

- ✚ **Linealidad:** Este parámetro se llevó a cabo realizando una curva de calibración con 5 diluciones a diferentes concentraciones; las cuales se prepararon de la siguiente manera: se utilizaron 5 matraces volumétricos de 10 mL, se tomaron diferentes cantidades (dependiendo de la solución) de la segunda stock y se aforó con agua. Estas muestras obtenidas se midieron en un espectrómetro UV marca Agilent a 265 nm. Esto se llevó a cabo por triplicado.
- ✚ **Precisión por repetibilidad:** Para la precisión se prepararon 2 concentraciones conocidas (1 y 2 $\mu\text{g/mL}$) se leyeron a la longitud de onda establecida y se determinó el porcentaje del coeficiente de variación (%CV).
- ✚ **Exactitud:** Se prepararon 2 como en la precisión y se leyeron a 265 nm y con esas absorbancias y la ecuación de la recta, se calculó el porcentaje de recobro y los intervalos de confianza.

- ✚ **Límite de detección:** Se determinó empleando la ecuación en donde se emplea la desviación estándar, la pendiente de la recta de la ecuación obtenida en la regresión lineal.

$$LD = \frac{(3.3 * \sigma)}{b}$$

- ✚ **Límite de cuantificación:** De la misma manera que el límite de detección se empleó una ecuación utilizando desviación estándar y la pendiente de la recta.

$$LC = \frac{(10 * \sigma)}{b}$$

7.4 Obtención y optimización de NLC mediante emulsión- evaporación de disolvente

Se empleó un diseño experimental 2^3 con punto al centro. Se seleccionaron como factores: proporción de 6-HF: lípidos (X), proporción de LL/LS y la velocidad de agitación. Cada uno con dos niveles, superior e inferior (*tabla 5*). Como variables de respuesta se consideró el tamaño promedio (Y_1) y la eficiencia de encapsulación (Y_2). Esta respuesta se midió como indica el punto 7.5.4.

Tabla 5. Factores del diseño experimental a considerar en la formulación de NLC

Diseño experimental 2 ³		
Factores	Niveles	
	-	+
	-1	+1
F/L (X ₁)	1:1	2:1
LL/LS (mg) (X ₂)	5/50	5/500
Velocidad de agitación (rpm) (X ₃)	6000	12000

Los NLC se obtuvieron empleando el método de emulsión-evaporación de disolvente siguiendo las condiciones del diseño experimental. Se preparó la fase acuosa, en un vaso de precipitado pesando 10g de kolliphor P188 (poloxámero) y disolviendo en 1000 mL de agua destilada (*figura 11*).

Por otro lado, se preparó la fase oleosa en un tubo de ensaye con 5 mL de acetona y 10 mg de 6-HF utilizando diferentes cantidades de lípidos, correspondiendo a cada corrida del diseño experimental. Después la fase acuosa se colocó en el homogeneizador Ultra-turrax®, agitando a diferentes velocidades en un tiempo constante (10 minutos). Una vez ajustado lo anterior, se añadió la fase oleosa gota a gota. Considerando que el tiempo había transcurrido, se obtuvo una emulsión lechosa, la cual se llevó a un matraz bola para poder ser evaporado el disolvente. La evaporación del disolvente se llevó a cabo durante 30 minutos a 30°C en un rota-evaporador marca IKA®. Una vez eliminado el disolvente, se recuperó el resto de la emulsión y se midieron las variables Y₁ y Y₂. Para el tamaño promedio (Y₁) se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz empleando el equipo zetasizer. Se tomaron 300 µL de la emulsión y se resuspendieron por 5 minutos en 700 µL de H₂O

destilada. Una vez resuspendidas se vertieron en una celda de plástico y se midió en el equipo empleando 3 corridas. Cada muestra se midió por triplicado.

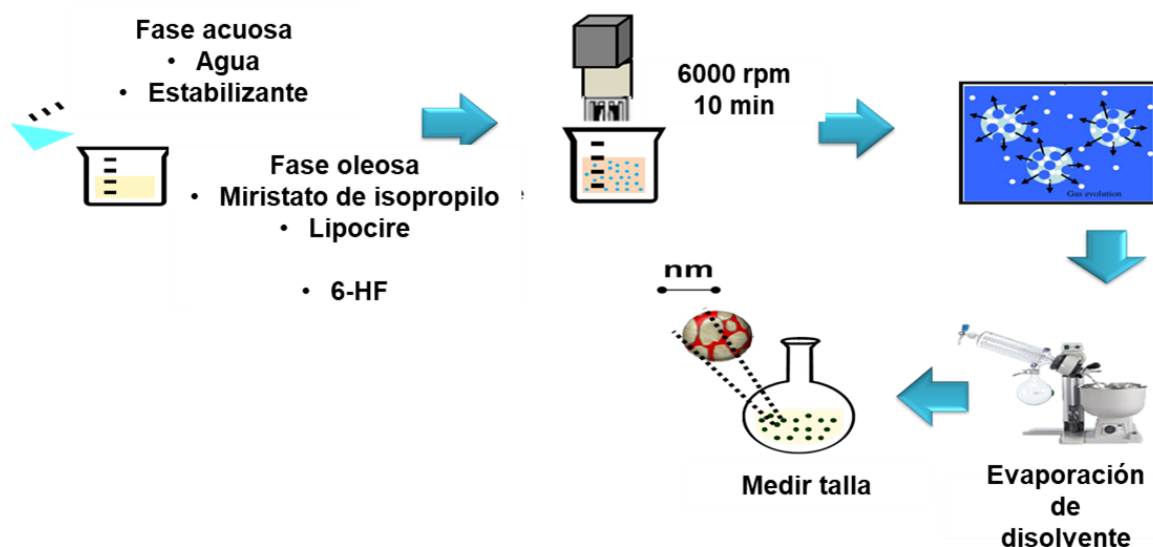


Figura 11. Esquema de la encapsulación de NLC por el método de emulsión simple-evaporación de disolvente

Posteriormente se midió la eficiencia de encapsulación (Y_2) por la técnica de difusión de membrana descrita en el apartado 7.5.4.

Una vez obtenida la eficiencia de encapsulación de cada lote, se llevó a cabo la optimización mediante la metodología de superficie de respuesta utilizando el software Statgraphic Centurion XVI, en el cual se predijeron los niveles adecuados de los factores para obtener un tamaño objetivo de 600 nm, con la finalidad de tener un sistema con el tamaño indicado para ser depositado en los bronquios y bronquiolos.

7.4.1 Recuperación y secado

Una vez eliminado el disolvente, se tomó la emulsión y se vertió en frascos ambar para liofilizar de 100 mL, se prepararon con manitol al 1%, para poder ser liofilizadas a una presión de 5 Pa y una temperatura de -80°C durante 24 horas. Transcurridas las horas, se tomaron los frascos y se recuperó la muestra con la ayuda de una espátula.

7.4.2 Recubrimiento con un polímero bioadhesivo

Se pesaron 10 mg de NLC liofilizados que se resuspendieron en 2 mL de agua destilada. Posteriormente se tomó 1 mL de las nanopartículas suspendidas y se vertieron en una celda de plástico de 1 cm de grosor, leyendo en un Zetasizer® nano ZS90, con 3 repeticiones a 25°C.

7.5 Caracterización de los NLC optimizados

7.5.1 Tamaño promedio

Se pesaron 10 mg de NLC liofilizados y se resuspendieron en 2 mL de agua destilada. Posteriormente se tomó 1 mL de las nanopartículas suspendidas y se vertieron en una celda de plástico de 1 cm de grosor y se leyeron por medio de un zetasizer® nano ZS90, con 3 repeticiones a 25°C.

7.5.2 Potencial zeta

De la suspensión de partículas anterior se tomó otro mL y se colocó con la ayuda de una micropipeta en una celda para la determinación del potencial zeta con las mismas condiciones que el punto anterior.

7.5.3 Morfología

Para el análisis del tamaño de partícula mediante SEM previamente se prepararon muestras donde, se pesaron 10 mg de NLC y NLC-CH (por separado) y se colocaron en un tubo de ensaye, posteriormente se añadieron 10 mL de agua destilada y se suspendieron por 5 min. Transcurrido el tiempo, se tomaron 300 μ L de las NLC resuspendidas y se colocaron en un cubreobjetos, de la misma manera se llevó a cabo el de NLC-CH y se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se cubrieron los cubreobjetos con oro con un espeso de 10 nm, en una máquina de pulverización catódica marca JEOL para así ser observados en el microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-7600F, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

7.5.4 Eficiencia de encapsulación

Es la cantidad porcentual de fármaco que queda atrapada en la nanopartícula y refleja la eficiencia de la formulación de los NLC. Para la cuantificación de la eficiencia de encapsulación se llevó a cabo la técnica de difusión por membrana de diálisis. Se vertieron 250 mL de H₂O destilada en un vaso de precipitado y se colocó en agitación magnética. Se tomó un lote de NLC (10 mL) y se colocó en una membrana de diálisis, sellándola con unas pinzas en cada esquina. La membrana se colocó dentro del vaso y se tomó lectura del medio después de 4 horas (**Chen et al, 2012**).

7.5.5 Eficiencia de carga

Se pesaron 10 mg de NLC liofilizadas y se disolvieron en 5 mL de acetona. Posteriormente se hizo una dilución tomando 1 mL de la solución anterior y se añadieron 2 mL de H₂O destilada, esta nueva solución se agitó con la ayuda de un vórtex por 2 minutos y posteriormente se midió en el UV. Se determinó la concentración de la 6-HF contenida en las partículas empleando la siguiente ecuación (**Chen et al, 2012**).

$$\%EC = \frac{(masa\ de\ NLC\ final)}{masa\ inicial\ de\ 6 - HF} \times 100$$

7.5.6 Rendimiento

Las nanopartículas liofilizadas obtenidas se pesaron (considerando un lote) y se empleó la siguiente fórmula para la determinación del rendimiento:

$$Rendimiento(\%) = \frac{(masa\ de\ los\ NLC\ liofilizados)}{masa\ de\ todas\ las\ materias\ primas} \times 100$$

Donde:

Masa de todas las materias primas es; el peso de los lípidos empleados (50 mg), la masa de la 6-HF (5 mg) y el manitol.

7.5.7 Interacción de los componentes por espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier FT-IR

Se tomaron alrededor de 5 mg de muestra de NLC con y libre de fármaco, NLC-CH con y libre de fármaco, mezclas físicas con y sin fármaco y de las materias primas. Para llevar a cabo el análisis, se tomaron los 5 mg de cada muestra y se analizaron por separado colocándolas en el cristal del espectrómetro de infrarrojo marca thermo scientific, modelo NICOLET 6700, del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), UAEM. Se utilizó un rango de muestreo de 500 a 4500 cm^{-1} .

7.5.8 Determinación del perfil de difracción de Rayos X de Polvos(DRXP)

Se prepararon 15 mg de muestra de NLC y NLC-CH (con fármaco), mezcla física de lipocire y 6-HF, chitósan y molécula sola. Cada muestra se colocó en el difractor de rayos X para polvos marca Bruker, modelo D2 PHASER, 5 a 45° (2θ) en el laboratorio 2 de la Facultad de Farmacia, UAEM.

7.5.9 Determinación de la interacción de los componentes por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Previamente se calibró el equipo empleando indio como referencia, posteriormente se colocaron de 5 a 7 mg de cada muestra en charolas herméticas de aluminio (chitosán, lipocire, miristato de isopropilo, 6-HF, manitol, kolliphor P 188, NLC, NLC-CH con fármaco), las charolas se traparon y cerraron con una prensa para su uso respectivo. Estas se colocaron en un calorímetro marca Mettler Toledo®. Las muestras se analizaron de 10 °C/min, con un rango de temperatura de 30 a 300°C. Este experimento se llevó a cabo en la Facultad de Química de la UAEMex.

7.6 Evaluación de la eficacia *in vitro* de los NLC

7.6.1 Perfiles de liberación

Se llevaron a cabo los estudios de liberación de la 6-HF durante 48 horas utilizando una cantidad de NLC y NLC-CH (recubiertos al 1%) equivalente a 1 mg de flavona. Los estudios se realizaron por triplicado.

Las muestras anteriores se colocaron en bolsas de diálisis 15X5 cm (PM: 14000 Da) para que la cuantificación fuera adecuada, y se sumergieron en frascos ámbar con 100 mL de buffer de fosfatos a un pH 5.5 y 7.4 con lauril sulfato de sodio al 0.1% (p/v) (con la finalidad de mejorar la solubilidad) cada uno. Los vasos se colocaron en un baño maria a 37°C, bajo agitación magnética a 100 rpm. Se tomaron 3 mL de muestra a los tiempos: 15, 30, 60, 120, 240, 480, 720 minutos y posterior a la última muestra se hicieron muestreos cada 24 horas hasta las 48 horas. Cada muestreo era sustituido con la misma cantidad de buffer 5.5 para mantener las condiciones “sink”.

Para evaluar la cinética de liberación de la 6-HF y el posible mecanismo de liberación se realizó un modelado matemático (tabla 6). Para conocer a qué modelo se ajusta, se determinó el coeficiente de determinación (r^2) y la constante de velocidad (k).

Tabla 6. Modelos matemáticos empleados en los perfiles de liberación de 6-HF

Modelo matemático	Ecuación
Cinética de orden cero	$A=A_0-kt$
Cinética de primer orden	$\log C=\log C_0-kt/(2.303)$
Modelo de Higuchi	$C_t/C_\infty=kt^{1/2}$
Modelo de Korsmeyer-Peppas	$C_t/C_\infty=kt^n$
Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{Q_0}-\sqrt[3]{Qt}=k_{HC}$

7.7 Pruebas de bioadhesión

7.7.1 Interacción con mucina

En este estudio se utilizó mucina de estómago cerdo tipo II al 1 y 2% p/v en solución. Se pesaron 20 mg de NLC y NLC-CH optimizados y se resuspendieron en 10 mL de solución de mucina. Las soluciones obtenidas se colocaron en un baño maria a 37°C con agitación magnética a 100 rpm. Las muestras anteriores se analizaron a

diferentes tiempos: 30, 60, 120, 240 min, determinando su tamaño de partícula y su potencial zeta utilizando el zetasizer® nano ZS90 con las mismas condiciones que en el punto 7.5.1 y 7.5.2. (Takeuchi et al, 2005).

7.8 Formulación de NLC como polvo seco para inhalación

Inicialmente, se eligieron tres proporciones distintas (1:1,2:1 y 1:2) para llevar a cabo mezclas de lactosa para inhalación con los NLC optimizados. Una vez elegidas las proporciones se consideraron cuatro tipos de lactosa monohidratada distintos:

Nombre comercial	Tipo de lactosa	D50 (μm)
ML001	Polvo	37-61
ML006	Polvo fino	17
LH200	Polvo grueso	50-100
LH201	Polvo grueso	50-100

Posteriormente, se llevó a cabo la mezcla durante 30 minutos empleando una bolsa de plástico translúcida, manteniendo las proporciones adecuadas, con una masa constante de 10 mg de 6-HF en los NLC. Este tipo de mezcla se llevó a cabo con la finalidad de obtener una mezcla homogénea de lactosa y nanopartículas.

7.8.1 Pruebas reológicas

7.8.1.1 Densidad aparente y densidad compactada

Se realizó la prueba de densidad aparente y compactada tomando las mezclas antes mencionadas y se colocaron en una probeta de 10 mL, se registró el volumen inicial (volumen aparente) y posterior a ello se llevó a cabo el golpeteo a una altura de 5 cm durante 100 veces sobre una superficie plana. El volumen que marcó después del golpeteo se registró como volumen final (Patton, 2004; Laila, 2012).

Densidad aparente

$$\rho_a = \frac{m}{V_i}$$

m= masa de la muestra (g)
Vi= Volumen inicial (mL)

Densidad compactada

$$\rho_c = \frac{m}{V_f}$$

m= masa de la muestra (g)
Vf= Volumen final (mL)

Índice de Carr

$$Carr = 100 (V_i - V_f) V_i$$

Vi=Volumen inicial (mL)
Vf= Volumen final (mL)

7.8.1.2 Angulo de reposo

Para medir el ángulo de reposo se empleó un embudo con un diámetro de 7 cm y un diámetro en orificio de 0.5 cm, se colocó a una altura de 10 cm, se agregaron los polvos en el embudo y se tomó el tiempo en que cayó. Finalmente, se midió el diámetro de la base y la altura del lecho del polvo (**Laila, 2012; Mullarney, 2011**).

Ángulo de reposo

$$AR = \tan^{-1}(2h)/D$$

h= altura (cm)
D= diámetro (cm))

Velocidad de flujo

$$VF = \frac{m}{T}$$

m= masa de la muestra (g)
T= tiempo (seg)

7.8.2 Aerolización y masa media aerodinámica

La evaluación de la aerolización se llevó con un impactador de cascada de Andersen. Este aparato utilizado estaba conformado de 8 estaciones, una boquilla donde la formulación es introducida, un conducto y un suministro de vacío (**United States Pharmacopeial Convention, 2012**) (figura 12).

Se pesaron 1.5 g de NLC, se colocaron en la boquilla del impactador y se empleó un vacío de aire de 28.3 l/min durante 15 min. Una vez terminado el tiempo, se retiró la boquilla y la tapa para poder cuantificar la cantidad depositada por platillo. Se tomó el primer platillo y se pesó con su respectiva tapa. Los ocho platillos se pesaron de la misma manera y posteriormente se restó el peso inicial de cada deposito.

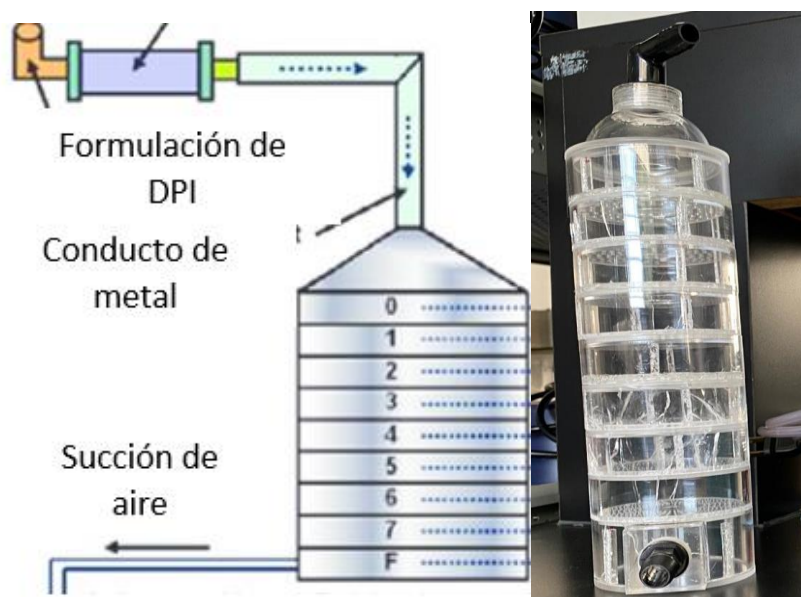


Figura 12. Impactador de cascada de Andersen

Se preparó una capsula en donde se añadió la formulación ya antes mencionada y posteriormente un DPI fue utilizado para introducir el medicamento y proceder a la liberación del contenido mediante la ruptura de la capsula. Después se colocó en la boquilla del impactador y con ayuda de vacío la formulación se aspiró a través del impactador. Este método se llevó a cabo para determinar el diámetro de masa media aerodinámica (MMAD) y la desviación estándar geométrica (GSD) utilizando los pesos obtenidos en cada platillo.

7.9 Evaluación del efecto de la 6-HF en el modelo ex vivo

Para esta evaluación se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 250 a 300 g, en condiciones de bioterio, con libre acceso a alimento Rodent Labs Chow® y agua limpia. De acuerdo a la Regulación Federal para el Manejo y experimentación de los animales emitida por la Secretaria de Agricultura y Recursos naturales se llevó a cabo la manipulación de los animales (NOM-062-ZOO-1999).

El primer paso fue sacrificar a los animales en una cámara con exceso de éter etílico, posteriormente, fue realizada la disección en la parte del cuello y el tórax para extraer la tráquea de la rata. Una vez extraída, fue limpiada de tejido adyacente, mucosidad y sangre.

Una vez que se obtuvo la tráquea completamente limpia, esta fue fraccionada en anillos de aproximadamente 3 a 5 mm, los cuales se mantuvieron en 10 mL de solución de Ringer Krebs en constante burbujeo con O₂/CO₂ (95:5) a 37° C a un pH de 7.4.

Cada fragmento fue colocado en un sistema isométrico vertical para tejido aislado. Los anillos de tejido de tráquea fueron sujetos en la parte inferior de la cámara de incubación y a un transductor de fuerza isométrico modelo Grass FT03, el cual transforma la información a un sistema BIOPAC®.

Una vez colocados los fragmentos, se prosiguió a estabilizar y sensibilizar a una tensión de 2g durante 30 minutos, lavando cada 20 minutos y ajustando al valor inicial. Cada tejido fue sensibilizado induciendo contracciones con carbacol 1 μM, una vez que se alcanzó la meseta, fue lavado con solución Ringer Krebs para regresar a su estado basal por 15 min, realizando esto por duplicado (*figura 11*).

7.9.1 Evaluación ex vivo del efecto relajante de los NLC sobre la contracción inducida por carbacol 1 μM; en anillos de tráquea aislada de rata

Los anillos fueron sometidos a una tensión basal de 2g de fuerza en tráquea y se dejó un periodo de estabilización aproximado de 20 min. Posteriormente, el tejido fue sometido a un proceso de sensibilización durante 15 min con carbacol [1 μM] por duplicado. Después, se añadieron las muestras respectivas en cada canal para llevar a cabo la evaluación de la relajación de tráquea. Al final, el tejido fue lavado con solución de Ringer-Krebs, para recuperar el nivel basal de la tensión (*figura 13*).

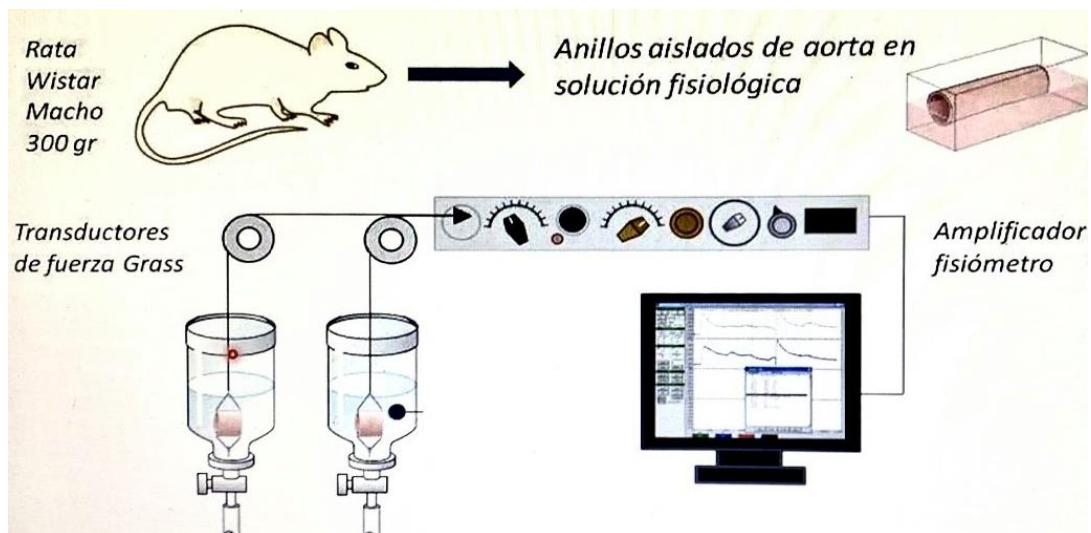


Figura 13. Esquema de la evaluación ex vivo (Imagen elaborada por Emmanuel Gaona)

Para determinar evaluar el efecto relajante, se añadieron las muestras (6-HF, NLC con y sin molécula, NLC-CH, NLC-CH formulada con ML001, carbacol, DMSO y teofilina), en donde, la 6-HF y las NLC cargadas se encontraban en su CE_{50} . La evaluación se llevó a cabo durante 7 horas, marcando cada hora de ensayo (*figura 14*).

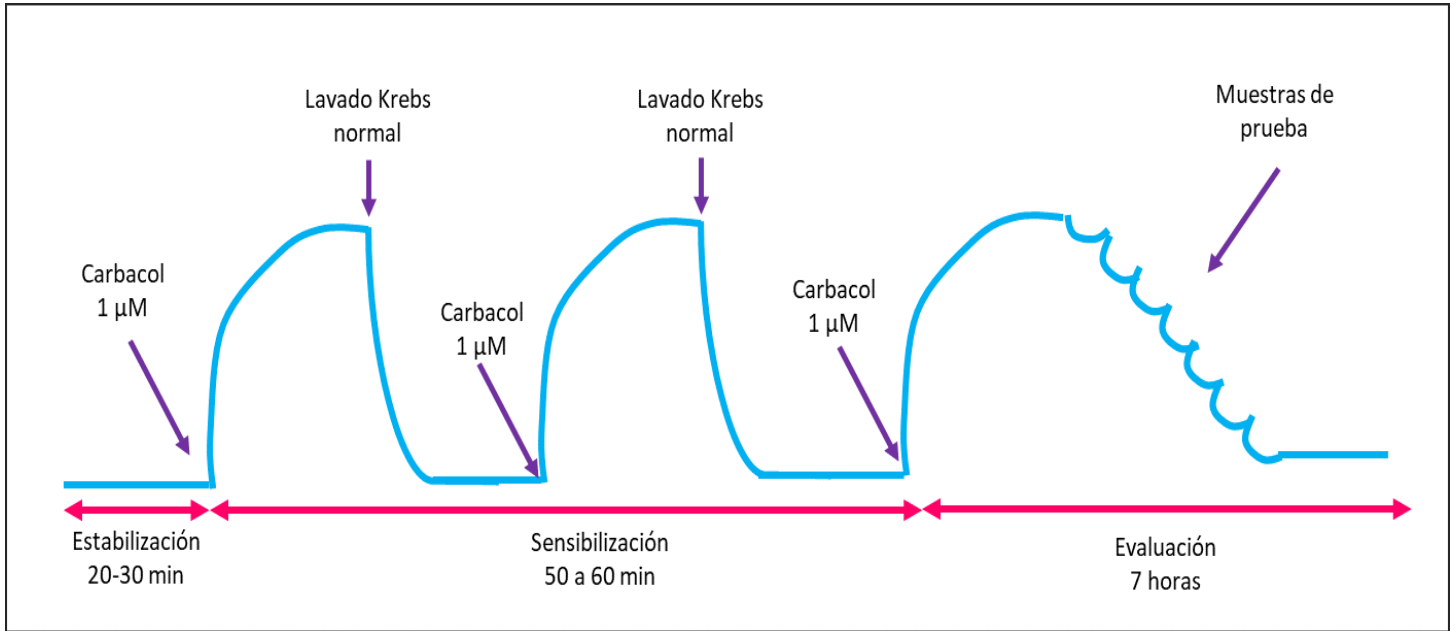


Figura 14. Evaluación del efecto traqueorrelajante de la 6-HF y los NLC

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Selección de los materiales

8.1.1 Pruebas de solubilidad

Se llevaron a cabo las pruebas de solubilidad de la 6-HF con base en la bibliografía. En el gráfico podemos observar que la 6-HF fue mayormente soluble en DMSO y acetona, sin embargo, se seleccionó como disolvente la acetona ya que los lípidos fueron insolubles en DMSO (*figura 15*).

Posteriormente, se realizaron las pruebas de solubilidad de lípidos sólidos, donde se eligió el lipocire dado a su solubilidad en la acetona. Finalmente se desarrolló la miscibilidad del lípido líquido donde se optó por usar el miristato de isopropilo, dado que presentaba las características; todo esto con la finalidad de desarrollar una metodología de emulsión simple-evaporación de disolvente.



Figura 15. Pruebas de solubilidad aparente empleado distintos tipos de lípidos y disolventes orgánicos

8.2 Desarrollo del método analítico

8.2.1 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción

La longitud de onda de máxima absorción se determinó preparando una solución stock de 6-HF en acetona en un rango de 800 a 200 nm, utilizando un espectrofotómetro UV marca AGILENT. En donde, se obtuvo una longitud máxima absorción de 265 nm para la 6-HF (*figura 16*).

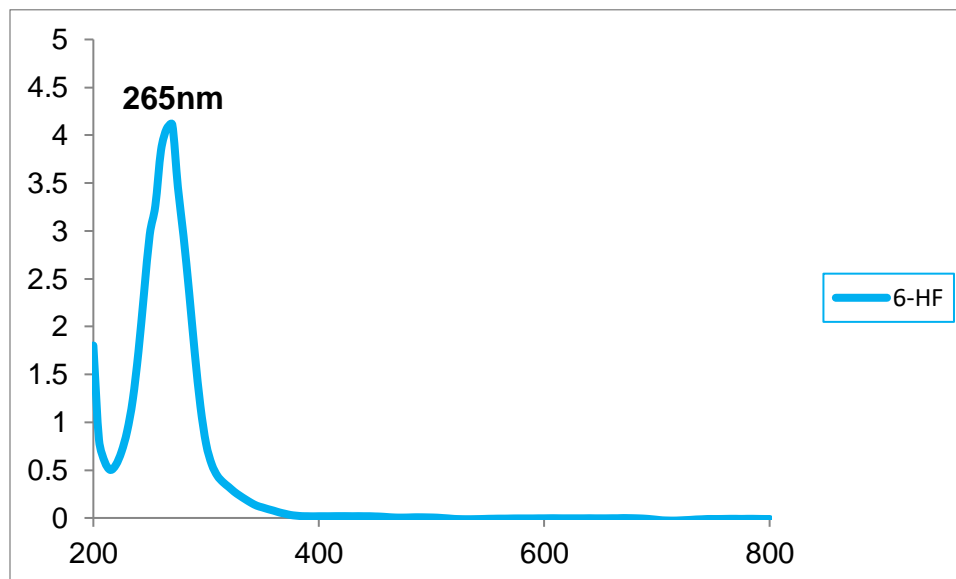


Figura 16. Espectro de absorción de la 6-HF en espectrofotómetro UV en un rango de 200 a 800 nm

8.3 Validación del método analítico para la cuantificación de 6-HF

Para la validación del método analítico se analizó una curva de calibración con cinco concentraciones distintas y se leyó a 265 nm para así obtener la ecuación de la recta y su respectiva r^2 .

En la *tabla 7* podemos observar los parámetros de desempeño que se tomaron en consideración al evaluar con sus respectivos resultados en la validación del método analítico de 6-HF.

Tabla 7. Parámetros de la validación del método analítico de la 6-HF (A.C Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, 2012)

Parámetro	Criterio	Resultado	Cumple
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$ IC _m = No debe incluir el cero IC _b = debe incluir el cero	$r^2 = 0.99$	Sí
Precisión (repetibilidad)	CV ≤ 3%	CV = 0.62	Sí
Exactitud	IC debe incluir el 100% CV ≤ 3%	IC= 99.80-101.71% CV= 0.90%	Sí
Especificidad	Sin interacción en la longitud de onda	No existe interacción en la longitud de onda (figura 10)	Sí
Límite de detección	-	0.0055 µg/mL	-
Límite de cuantificación	-	0.0166 µg/mL	-

Intervalo de confianza (IC)= 95%

En la *figura 17* se pueden observar los barridos de la 6-HF y los excipientes utilizados en la formulación, esto con la finalidad de evaluar la especificidad y determinar si existe una interacción entre ellos mediante las señales. Se observó

que no existe una interferencia de las materias primas por lo cual al cuantificar a una longitud de onda de 265nm solo se evaluará la 6-HF.

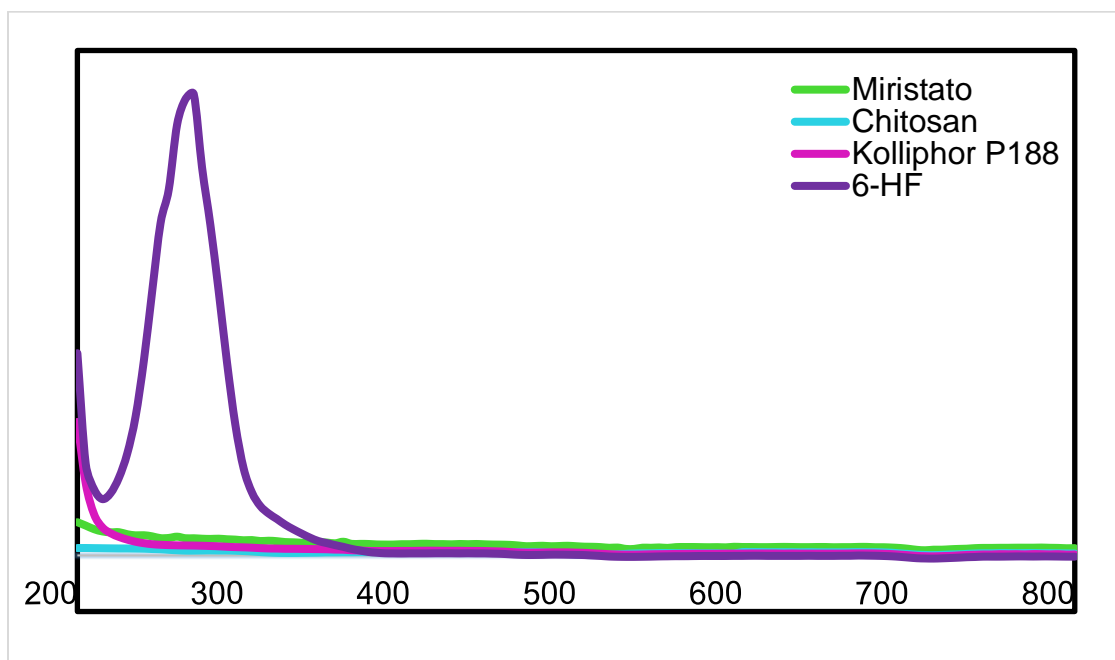


Figura 17. Espectros de absorción UV de los materiales en la formulación de los NLC y NLC-CH (200-800 nm)

8.4 Obtención y optimización de los NLC

Para la preparación de los NLC se empleó el método de emulsión-evaporación de disolvente (Naseri, 2015). Se realizó la preparación de estos utilizando como tensoactivo kolliphor P 188 (poloxámero 188) al 1% en la fase acuosa, mientras que la fase oleosa correspondió al miristato de isopropilo, lipocire y 6-HF disuelto en acetona. Las fases se homogenizaron a 6000 y 15000 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se midió el tamaño promedio mediante la técnica de dispersión dinámica de luz con un zetasizer® nano ZS90 y se cuantificó la eficiencia de encapsulación utilizando un espectrofotómetro UV (tabla 8).

Tabla 8. Matriz del Diseño experimental 2^3 con resultados

X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1:55	2:1	10500	808.10	74.39
1:10	2:1	15000	786.60	88.89
1:10	2:1	6000	967.60	95.60
1:100	1:1	6000	936.30	78.86
1:10	1:1	6000	523.50	83.98
1:100	2:1	6000	722.10	89.40
1:100	1:1	15000	1038.00	86.06
1:100	2:1	15000	960.80	78.95
1:10	1:1	15000	914.70	79.58

En el diseño experimental pudimos observar que se obtiene un amplio rango de tamaños de partículas, las cuales abarcan desde nano hasta microacarreadores, por lo cual se analizó el efecto de los factores mediante análisis estadístico.

El efecto de los factores y sus interacciones se puede observar con el gráfico de Pareto (*figura 18*), donde se aprecia que el factor velocidad de agitación, la proporción de F/L es directamente proporcional al tamaño. La línea azul es representativa a un límite de valor significativo; por lo cual se puede apreciar que para el tamaño promedio no existe un factor con valores significativos, sin embargo, podemos decir que existe una alteración. Las barras de color azul muestran el efecto en la disminución del tamaño, es decir, que el tamaño de partícula es inversamente proporcional a la interacción de los factores F/L y LL/LS (AB) y LL/LS y velocidad de agitación (BC).

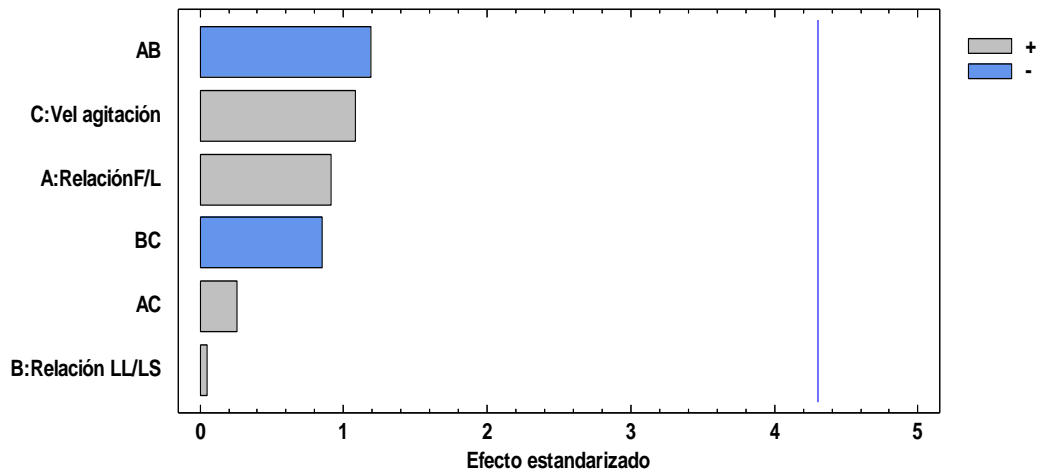


Figura 18. Gráfico de Pareto estandarizado para el tamaño promedio

Donde se obtuvo la siguiente ecuación de ajuste para la optimización de los factores:

$$Y_1 = -2.75 + 5.50889 * X_1 + 445.611 * X_2 + 0.0471407 * X_3 - 3.37444 * X_1 * X_2 + 0.0000803704 * X_1 * X_3 - 0.0241778 * X_2 * X_3$$

Se optimizó la variable de respuesta mediante metodología de superficie de respuesta. Los parámetros a considerar en la optimización se enfocaron principalmente en el tamaño de partícula, donde se planteó como objetivo una talla >500 nm para garantizar que la partícula se deposite en la superficie de la mucosa y tenga un efecto local según la ingeniería de partículas y la deposición de las mismas (figura 19).

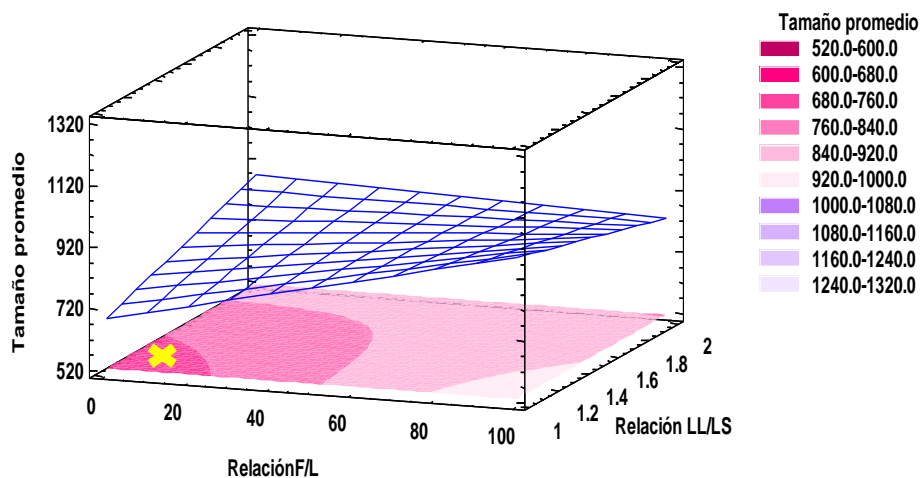


Figura 19. Superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio con contornos

Se llevó a cabo la reproducción de los lotes optimizados por triplicado (tabla 9) y se verificó su tamaño promedio (Y_1) y eficiencia de encapsulación (Y_2). En el cual podemos observar que, para el tamaño, este difiere por 14.33 nm con base en lo predicho y obtenido según la técnica de dispersión dinámica de luz. Sin embargo, el tamaño sigue siendo favorable para la vía de administración pulmonar. Así mismo se observa que para la eficiencia de encapsulación se mostró una variabilidad de aproximadamente 15 % del valor encontrado con respecto al valor predicho. Este se considera aceptable.

Tabla 9. Niveles óptimos predichos y valores encontrados en la optimización de NLC

X_1	X_2	X_3	Y_1		Y_2	
Niveles de optimización			Predicho	Encontrado	Predicho	Encontrado
1:10	20 mg/30 mg	6000 rpm	606.80 nm	621.13 ± 10.91 nm	96.32%	82.88 ± 1.69%

8.5 Caracterización de los NLC optimizadas

8.5.1 Tamaño promedio y potencial Z

Se llevó a cabo un triplicado del lote para verificar las predicciones sobre el tamaño promedio y eficiencia de encapsulación. En la *tabla 9* se muestran los valores predichos y encontrados de cada factor, así como, el tamaño obtenido por la técnica de dispersión dinámica de luz. Como se observa, el promedio obtenido fue de 621 ± 3.49 nm para dicho análisis (*figura 20*).

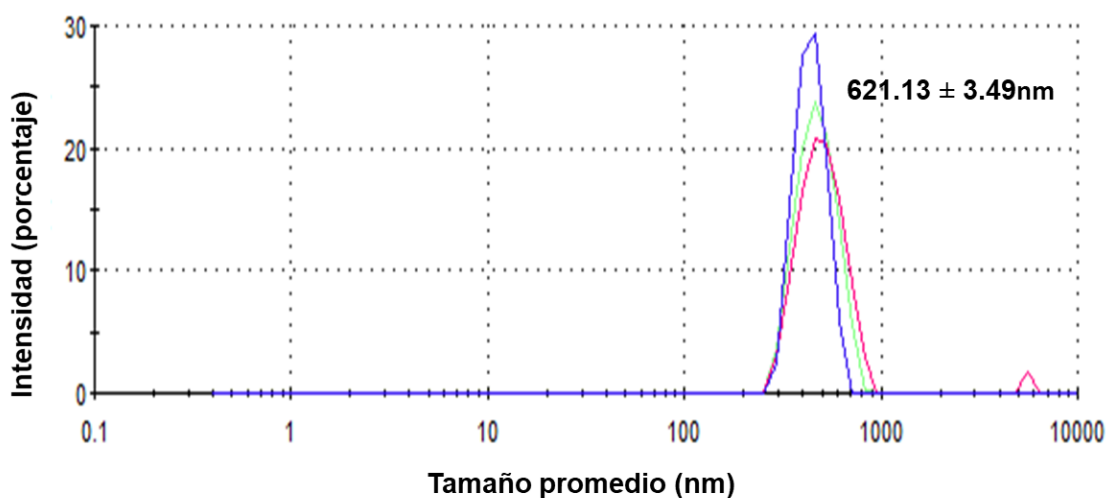


Figura 20. Tamaño promedio de los NLC cargados con 5 mg de 6-HF PDI: 0.221

8.5.2 Eficiencia de encapsulación

Después de haber validado el método analítico se cuantificó la eficiencia de encapsulación de los NLC cargados con 6-HF.

Según los factores estudiados mencionados anteriormente, se obtuvo una eficiencia de encapsulación en un rango de 82 al 90%, lo que indica que la molécula se encuentra dentro de la matriz propuesta. Estos valores se consideran viables para continuar con la optimización de dicha variable respuesta.

Una vez optimizada la formulación se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 82.88 ± 1.69 %.

8.5.3 Eficiencia de carga

Para determinar la eficiencia de carga de los acarreadores optimizados, se llevó a cabo la metodología 7.5.5, en donde se obtuvo un porcentaje en promedio del $83.98\% \pm 3.56$ como se observa en la *figura 21*.

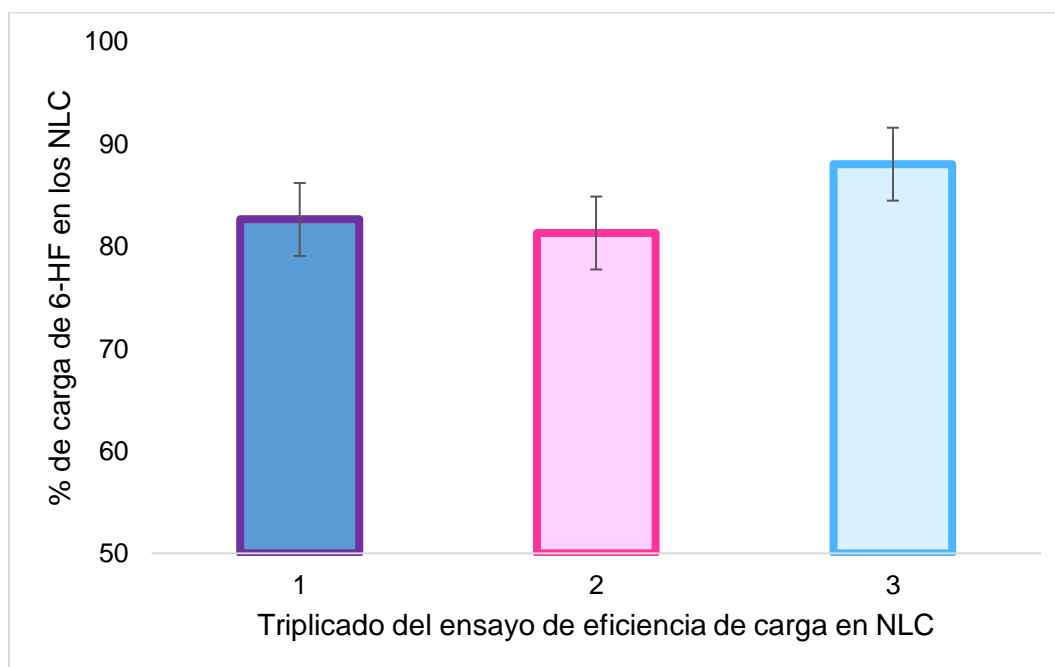


Figura 21. Eficiencia de carga en los NLC optimizados

8.5.4 Rendimiento de proceso

Para calcular el rendimiento se empleó la metodología 7.5.6. Los lotes obtenidos se pesaron y con base en el desarrollo de la ecuación del apartado antes mencionado se obtuvo un rendimiento del 82.02 ± 9.09 , dicho análisis se realizó por triplicado. Tales valores indican un buen rendimiento durante la manufactura.

8.5.5 Morfología

Para la determinación de la morfología se empleó la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido, SEM (por sus siglas en inglés). Dicha técnica tiene como fundamento utilizar un haz de electrones para formar una imagen, tiene una gran

profundidad de campo y esto permite que enfoque una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación.

En la *figura 22* podemos observar las diferentes formulaciones desarrolladas en dicho proyecto donde A representa a una partícula de 700 nm y en B se puede observar otra población de NLC con un tamaño de 500 a 700 nm, lo cual podemos comparar con los tamaños obtenidos por dispersión dinámica de luz ($621.13 \text{ nm} \pm 3.49$). Mediante esta técnica se puede observar que los NLC presentan una morfología esférica y homogénea.

En la figura C y D tenemos las NLC-CH en la formulación final del polvo seco (mezcla de NLC-CH con lactosa ML001). En donde se logran observar las NLC-CH con cristales de lactosa incrustados en la muestra, lo cual provoca que el tamaño de partícula aumente y la morfología sea amorfa. De igual manera existe una mayor aglomeración provocada por el polímero de recubrimiento (chitosán). Sin embargo, a pesar de dicho incremento, no afecta en la deposición particular dado el tamaño que es mantenido dentro del rango especificado previamente.

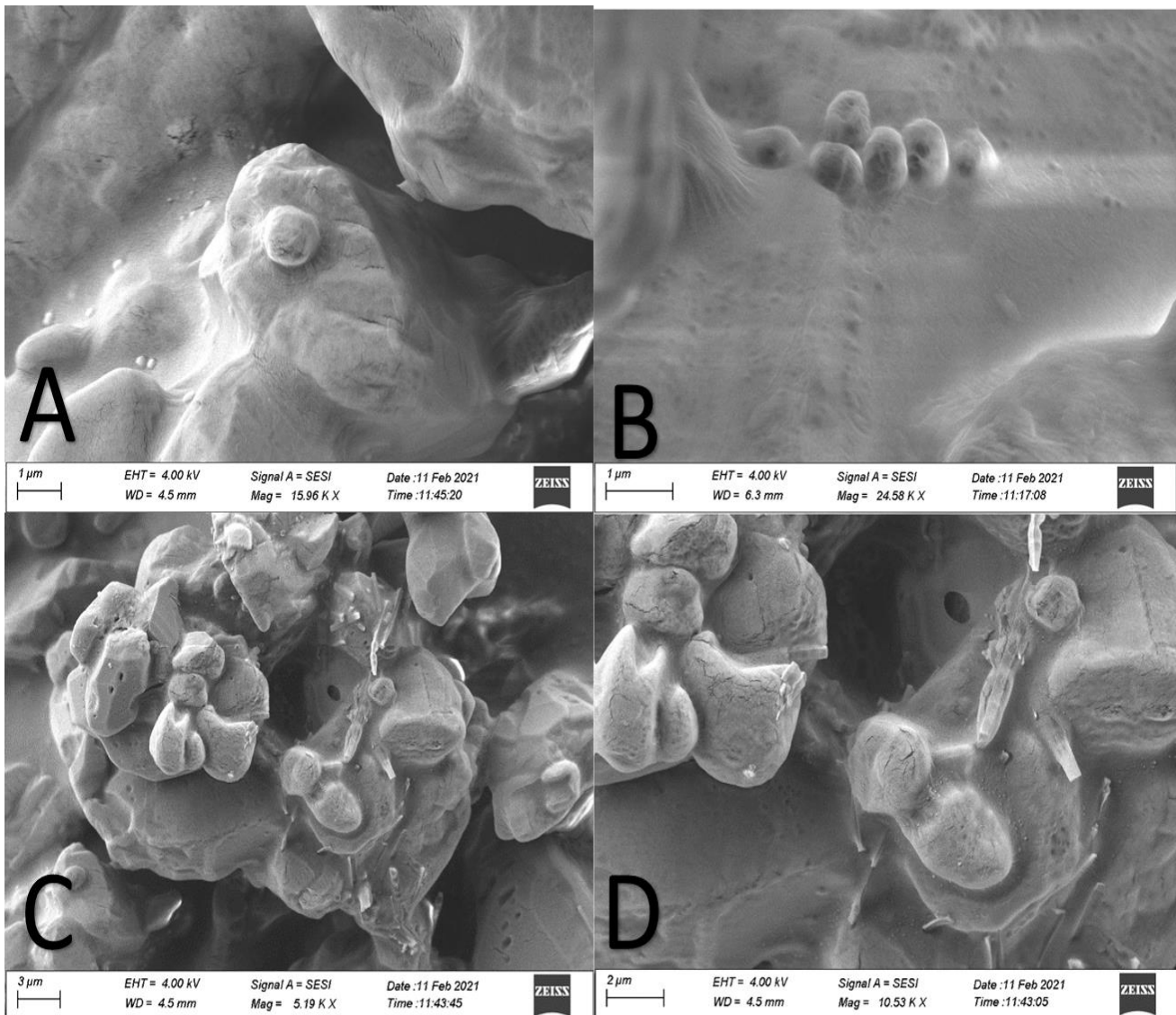


Figura 22. Micrográficas por microscopía electrónica de barrido donde A y B son NLC, C y D son NLC-CH en mezcla con lactosa ML001.

En la *figura 23*, podemos observar las micrografías de las NLC y NLC-CH donde, podemos decir que existe una mayor aglomeración en los NLC-CH y no presentan una forma esférica. En la figura B podemos observar una capa gruesa alrededor de la partícula que evidencia el recubrimiento con CHI.

Con base en lo antes mencionado, podemos inferir que las partículas se encuentran cubiertas por el polímero CHI, pero se requiere de un mayor porcentaje de crioprotector para disminuir la aglomeración de estas (92) (93).

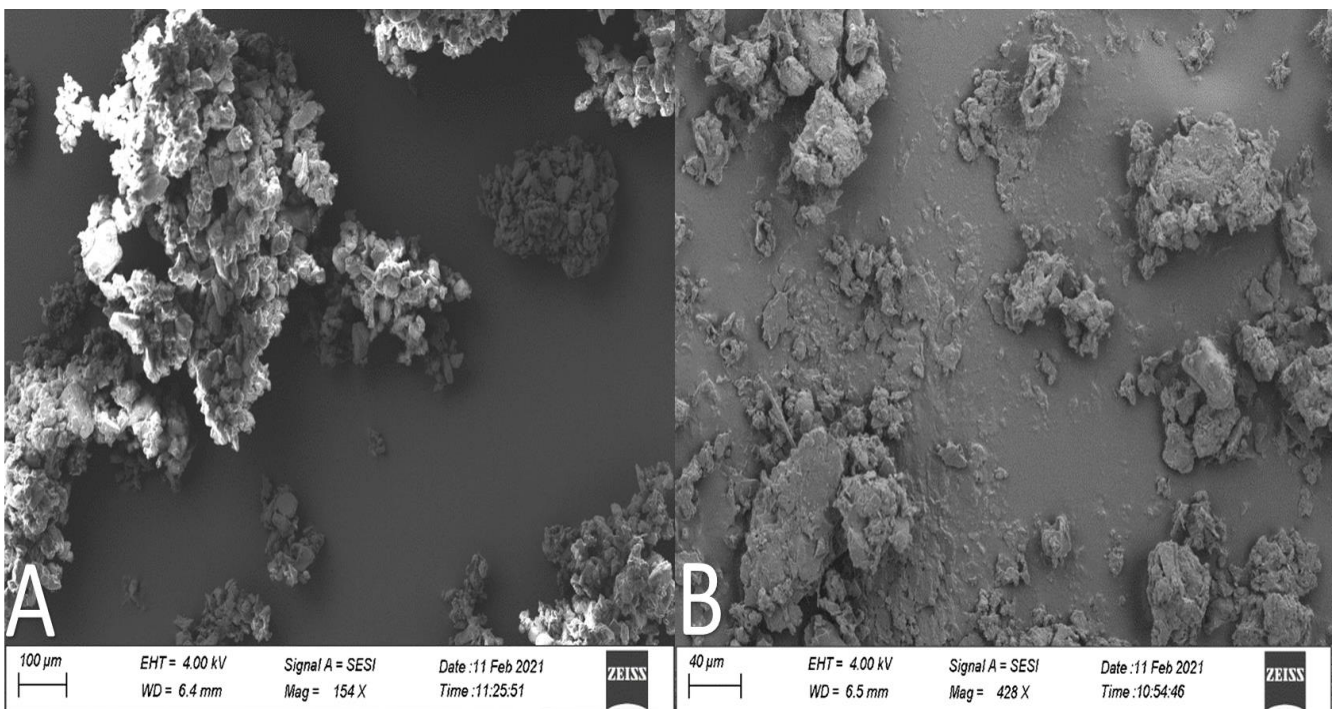


Figura 23. Micrografías por SEM donde A se observa una masa de NLC aglomerados y en B se observa los NLC-CH.

8.5.6 Presencia e interacción de los componentes por FT-IR

Durante la caracterización estructural y presencia de componentes mediante espectrometría infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) se prepararon mezclas físicas, NLC, NLC-CH y 6-HF.

En la *figura 24* se pueden observar los espectros FT-IR de la 6-HF, los NLC y los NLC-CH.

Con respecto al espectro de la 6-HF se pueden observar bandas características correspondiente al grupo carbonilo presente a los 1600 cm^{-1} aproximadamente, a los 1540 cm^{-1} debido a estiramientos de doble enlace carbono- carbono de los anillos del benceno, así como unos ligeros sobretonos característicos de un anillo aromático. Además de observar estiramientos con respecto al grupo éter a los 1180 cm^{-1} como grupo funcional característico presente en la molécula.

En las bandas del espectro de NLC y NLC-CH se observa un desplazamiento del grupo carbonilo de la 6-HF. Considerando también que los lípidos presentan grupos carbonilos característicos de los grupos ésteres, por lo que se observan sobrepuestos.

En el espectro de NLC-CH se observa claramente a 3200 cm^{-1} la banda característica de los grupos alcohol (OH) que se encuentran presentes en el polímero de recubrimiento CHI, así como algunos éteres presentes característicos de dicho polímero, que además como se mencionó anteriormente la molécula 6-HF tiene presente en su estructura química.

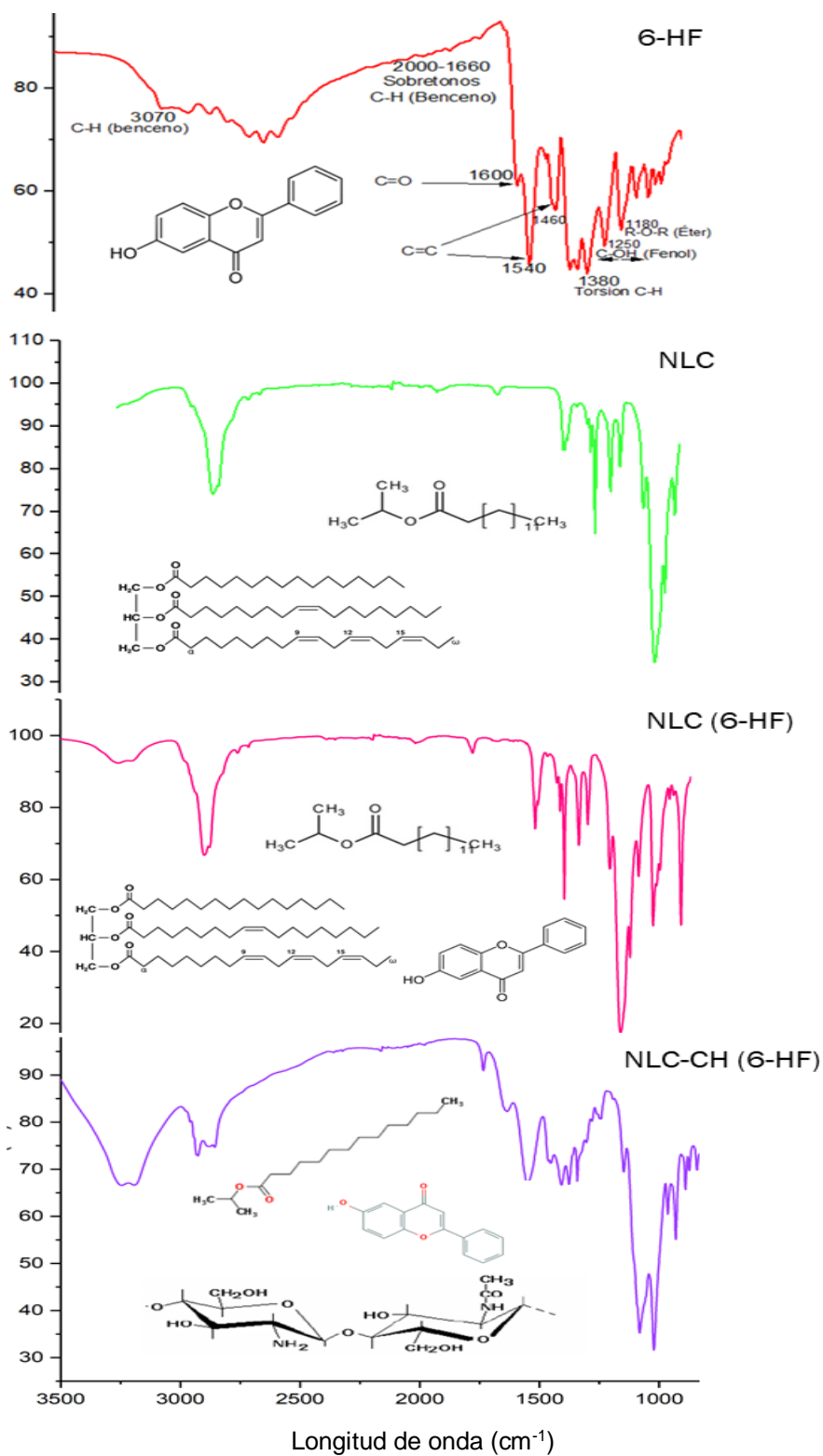


Figura 24. Espectros IR de la 6-HF, NLC libres y con 6-HF y NLC-CH

8.5.7 Determinación del perfil de difracción mediante difracción de Rayos X (DRX)

Para investigar los cambios de la estructura cristalina de los NLC y NLC-CH, se realizaron los ensayos empleando la técnica de difracción de rayos x de polvos.

Los patrones de difracción de rayos x de NLC, NLC-CH, 6-HF, lipocire y lactosa, se pueden observar en la *figura 25*. El difractograma de 6-HF muestra un pico intenso en 2θ igual a 13° y un difractograma definido, lo cual es característico de estructuras altamente cristalinas. Por otro lado, en las NLC se observa menos intenso y en las NCL-CH desaparece, lo que indica el amorfismo de la 6-HF en las nanopartículas.

Las intensidades de las NLC y NLC-CH son más definidas, lo que sugiere que el grado de cristalinidad es mayor en las nanopartículas que en las materias primas. Además, los difractogramas de las nanopartículas muestran cambios graduales con el aumento del contenido de lipocire en la matriz lipídica. Mientras que en la mezcla física no muestra picos definidos, en los NLC se observa un pico agudo en 2θ igual a 18° y 23° . En el polímero mucoadhesivo se observa que el CHI corresponde a una sustancia amorfa.

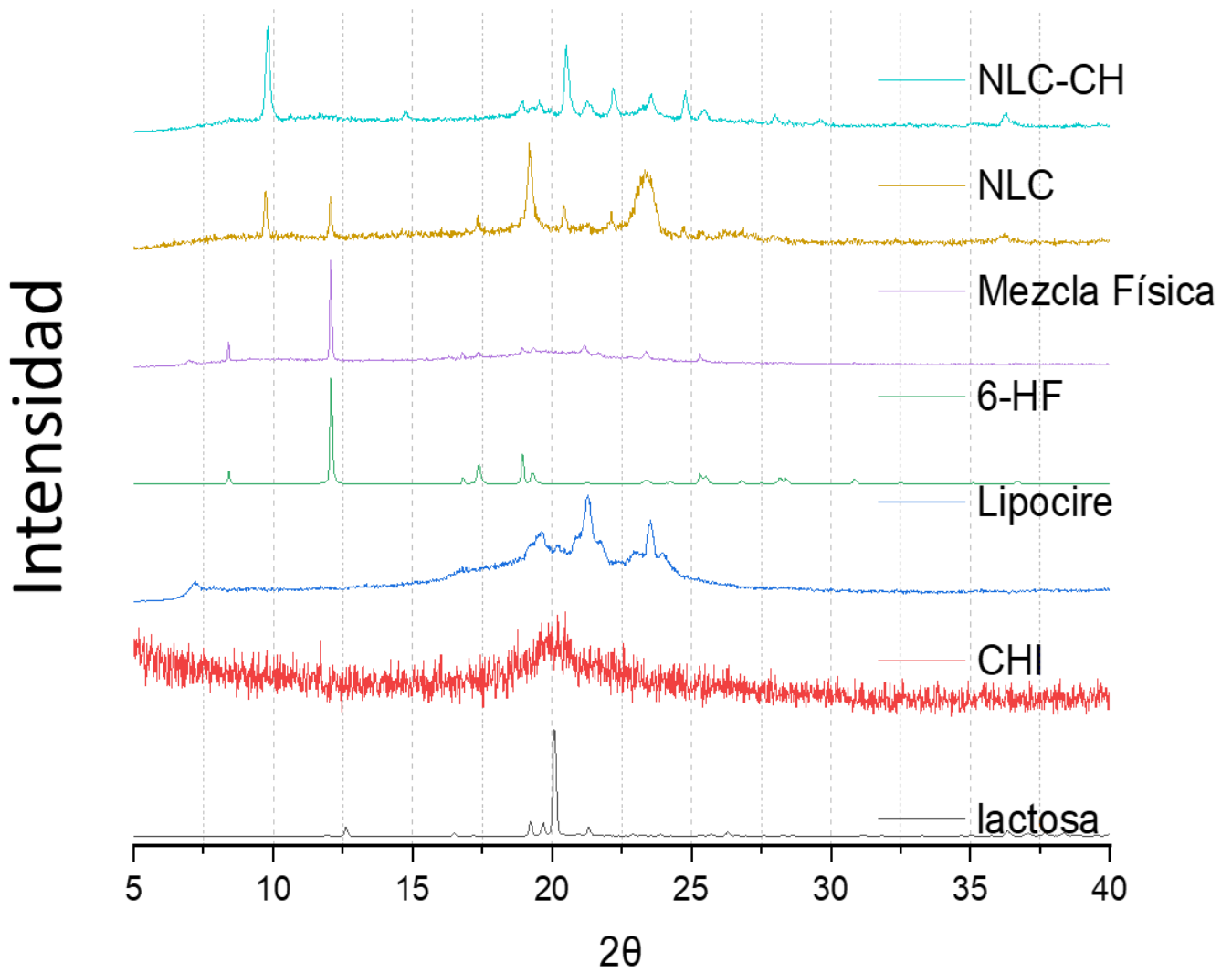


Figura 25. Patrones de difracción de rayos X de polvos de los materiales y de las formulaciones (NLC y NLC-CH)

8.5.8 Interacción de los componentes por DSC

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica altamente sensible para estudiar las propiedades termotrópicas de muchas macromoléculas y extractos biológicos diferentes. Esta técnica se ha aplicado al campo farmacéutico con estudios de excipientes y medicamentos de ADN. En los últimos tiempos, se ha prestado más atención a los sistemas de administración de fármacos basados en lípidos y a las interacciones farmacológicas con membranas biomiméticas. Se han utilizado transiciones de fase altamente reproducibles para determinar valores, tales como el tipo de interacción de unión, pureza, estabilidad y liberación de un mecanismo de administración de fármacos **(Chiu & Prenner, 2011)**. También se puede utilizar para analizar la incorporación de medicamentos en las nanopartículas mediante el examen del cambio de entalpía. El DSC es una de las principales herramientas utilizadas para la caracterización del estado de la matriz, con polimorfismo e incorporación de fármacos en las dispersiones de lípidos. Las nanopartículas tienden a tener una temperatura de fusión disminuida en comparación con las materias primas que no tienen el tamaño nanométrico.

En la *figura 26* se observan los termogramas de la mezcla física, de los NLC, NLC-CH con y sin fármaco y de la 6-HF. En la 6-HF podemos observar un evento endotérmico a los 240°C característico del punto de fusión de la molécula, lo cual, nos permite afirmar la pureza de ella. Los termogramas de NLC no mostraron una banda intensa como en la mezcla física, lo cual puede ser indicativo de la disminución de la cristalinidad. Los estudios de DSC revelan el efecto polimérico, es decir, el efecto de encapsulación de los lípidos en un fármaco basado en los cambios en los valores máximos del punto de fusión, es decir, para el fármaco puro muestra un pico endotérmico a 240° C y para el fármaco unido muestra no muestra un pico ya que, disminuye con el aumento del lipocire y el chitosán.

El inicio del pico endotérmico debe estar relacionado con la acumulación de presión debido a la evaporación del agua dentro de las charolas. Los polisacáridos suelen tener una fuerte afinidad por el agua y, en estado sólido, estas macromoléculas

pueden tener estructuras desordenadas que pueden hidratarse fácilmente (Netsomboon & Bernkop, 2016).

En las NLC-CH se puede observar un evento exotérmico a 220 °C aproximadamente, el cual puede deberse al reordenamiento de las moléculas del chitosán.

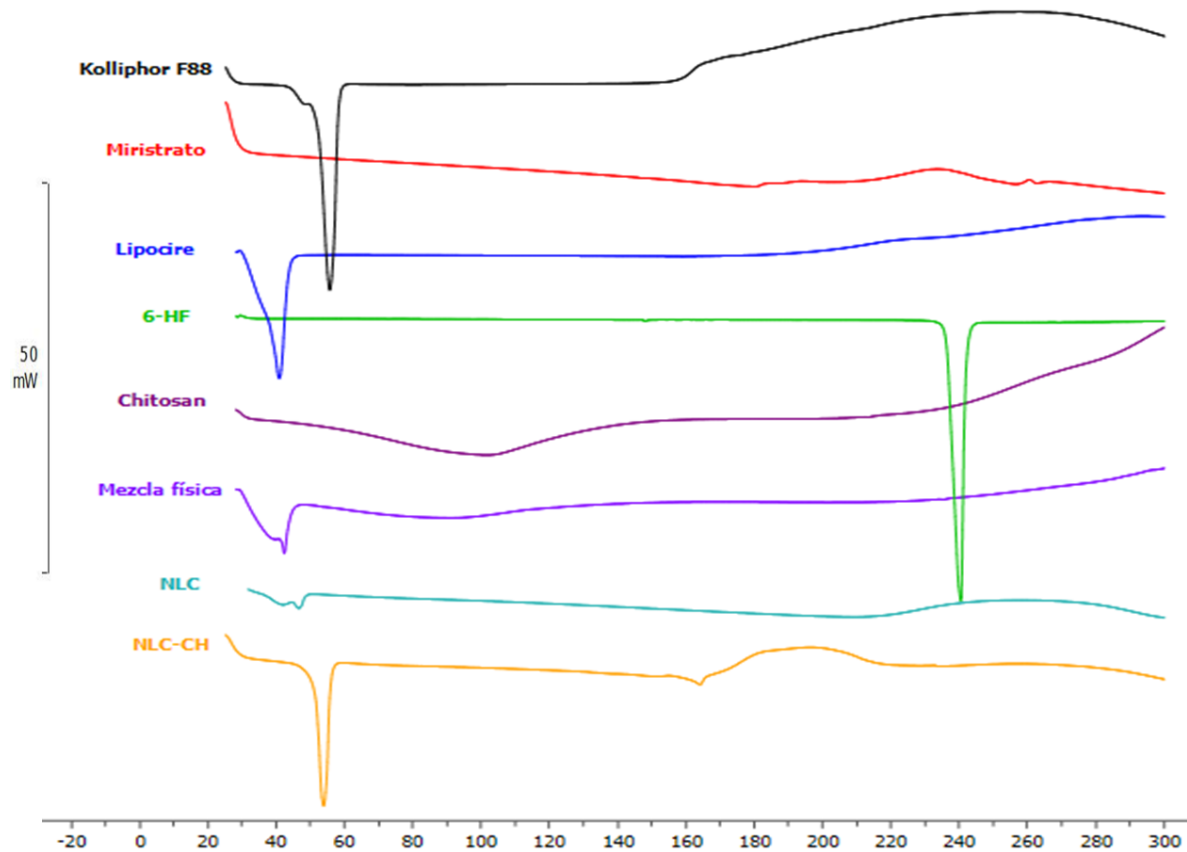


Figura 26. Termogramas de la mezcla física, NLC y NLC-CH con fármaco y de la 6-HF

8.5.9 Recubrimiento con chitosán

Los NLC se recubrieron con CHI a diferentes concentraciones y por medio de un ANOVA se eligió la concentración más adecuada para la experimentación.

Dado que el valor P (0.016) del tamaño promedio fue menor que el alfa (0.05) en la comparación de las 3 concentraciones de CHI (tabla 10), se observó que, si existe una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, en la carga de potencial zeta no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos.

Se decidió utilizar la concentración de CHI al 1% ya que se conoce que, con respecto al uso del polímero CHI en altas concentraciones de éste en sistemas particulados, tienden a formar aglomeraciones entre ellas, además de que se obtuvo un tamaño adecuado para ser formulado para la vía pulmonar (**United States Pharmacopeial Convention, 2012**).

Tabla 10. Tamaño promedio y potencial zeta de los NLC a diferentes concentraciones de CHI.

Recubrimiento con CHI (%)	Tamaño promedio nm	Potencial Zeta mV
1	832.35 ± 5.62	30.13 ± 1.79
2	1354.10 ± 4.62	28.23 ± 1.53
3	1895.00 ± 31.43	30.23 ± 1.58

8.5.10 Pruebas de mucoadhesión

8.5.10.1 Incubación por mucinas

En el estudio se empleó mucina de estómago de cerdo tipo II al 1 y 2% p/v. Se pesaron 50 mg de NLC recubiertos, los cuales se resuspendieron en 3 mL de buffer pH 5.5. Por otro lado, se pesaron 60 mg de mucinas y fueron disueltos en 3 mL de buffer pH 5.5.

En los NLC no se observa un cambio brusco en el tamaño dado que podemos observar que las tallas oscilaban entre 600 a 700 nm (*ver tabla 11*) durante todo el ensayo, sin embargo, podemos decir que incrementó ligeramente la talla por una posible aglomeración de las partículas. Para el análisis del potencial zeta, mediante un ANOVA se encontró que el valor-P (0.3121) es mayor que 0.05, por lo que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar,

con un nivel del 95.0% de confianza en el análisis del potencial zeta para los NLC cargados con 6-HF (*anexo*).

En la *figura 27* se puede observar un incremento en la talla de las NLC-CH, en la segunda hora surge un incremento de hasta 500 nm, mientras que en la tercera y cuarta hora la talla se mantiene constante en 2000 nm. En el análisis de varianza (ANOVA) del tamaño promedio en función de las NLC-CH cargados con 6-HF se observa una diferencia estadísticamente significativa puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0.05. De la misma manera, se puede observar un cambio significativo en el potencial zeta, donde conforme transcurre el tiempo, la interacción de mucina-partículas provoca un cambio en la carga. Esto surge dado que existe una interacción electrostática entre la mucina y el CHI. Las interacciones entre el CHI y las mucinas dependen de varios factores intrínsecos como puede ser el peso molecular del polímero, pero también dependen en gran medida de los factores externos o ambientales en los que tiene lugar la interacción, por ejemplo, el pH del medio, concentración de mucinas e incluso la temperatura. El CHI tiene, en general, un pKa alrededor de 6.1, por lo tanto, a un pH más bajo que el pKa, el grupo amina en las unidades de N-acetil-glucosamina será protonado, lo que conducirá a fuerzas de repulsión electrostática entre ellos y, por lo tanto, favorecerá una conformación más extendida de la molécula (**Celli, 2007; Lu, 2013**).

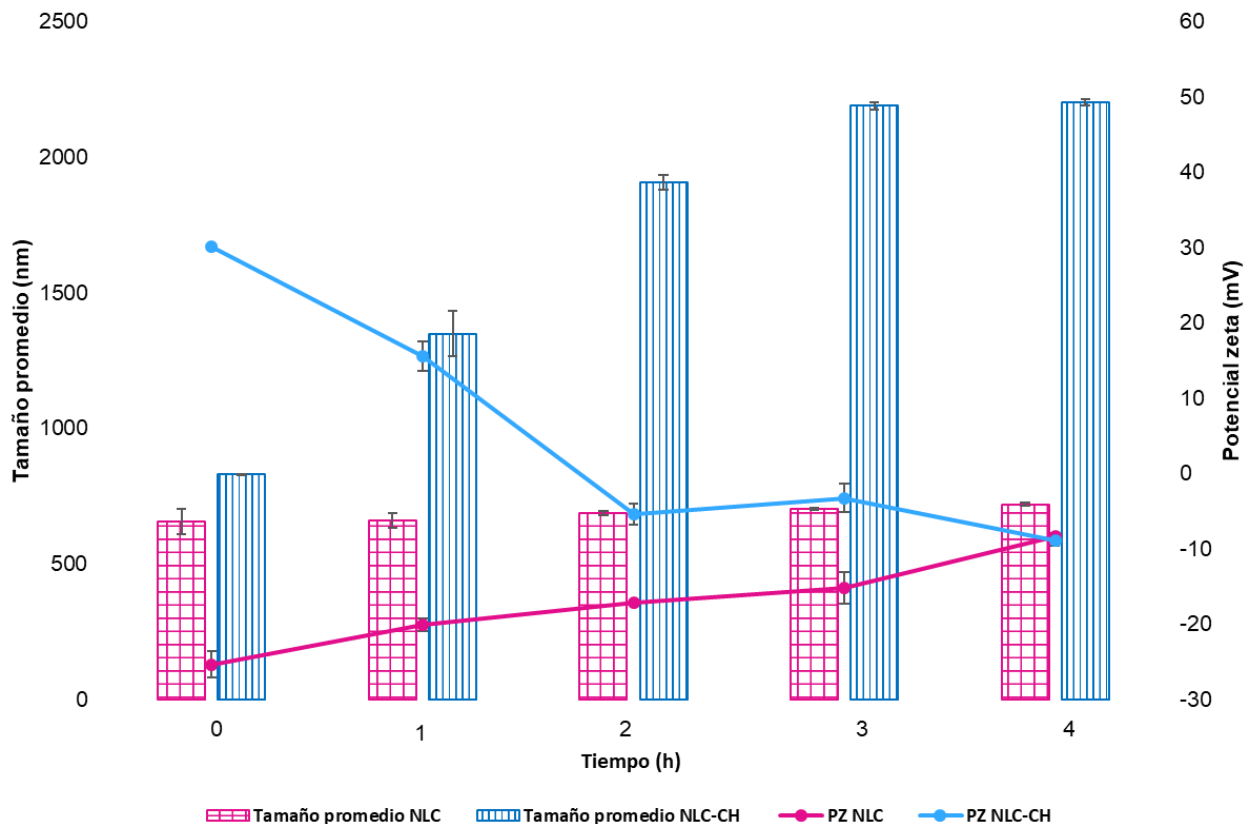


Figura 27. Tamaño promedio y potencial Z de las NLC y NLC-CH al interactuar con mucinas

8.5.11 Evaluación de la eficacia de los NLC *in vitro*

8.5.11.1 Perfiles de liberación

Se realizaron estudios de liberación de los NLC optimizados y recubiertos a condiciones “sink” usando el aparato II según la FEUM, se colocaron los vasos a 37°C con 100 rpm. Se tomaron muestra del medio a diferentes tiempos y se midió por medio del espectrofotómetro UV reemplazando con medio fresco.

Se evaluó el perfil de liberación de los NLC optimizados y recubiertos (con 1 mg respecto a 6-HF). Como control se evaluó la liberación del polvo de 6-HF sin ser formulado. En la *figura 28* se observan los perfiles correspondientes a pH 5.5 de las partículas recubiertas y sin recubrir. Se observa que no existe una diferencia

significativa entre de los perfiles de las NLC y NLC-CH, sin embargo, en comparación con el polvo de 6-HF se observa un aumento en la disolución empleando las nanopartículas **(Jia et al, 2009)**.

Después de obtener los perfiles de liberación, los resultados se ajustaron a diferentes modelos matemáticos con la finalidad de dilucidar el mecanismo de liberación. En la *tabla 11* se observan las r^2 y constantes de cada modelo; observando un mejor ajuste en el modelo de Higuchi, lo cual nos puede decir que la molécula es liberada por difusión. El modelo de Higuchi se basa en los siguientes supuestos: la difusión del fármaco solo ocurre en una sola dimensión, hinchazón y disolución de la matriz, moléculas de fármaco mucho más pequeñas que el espesor del sistema, difusividad constante del fármaco, el entorno de liberación actúa como un sumidero perfecto y una solubilidad del fármaco mucho mayor que la concentración inicial del fármaco en la matriz **(Dash, 2010)**.

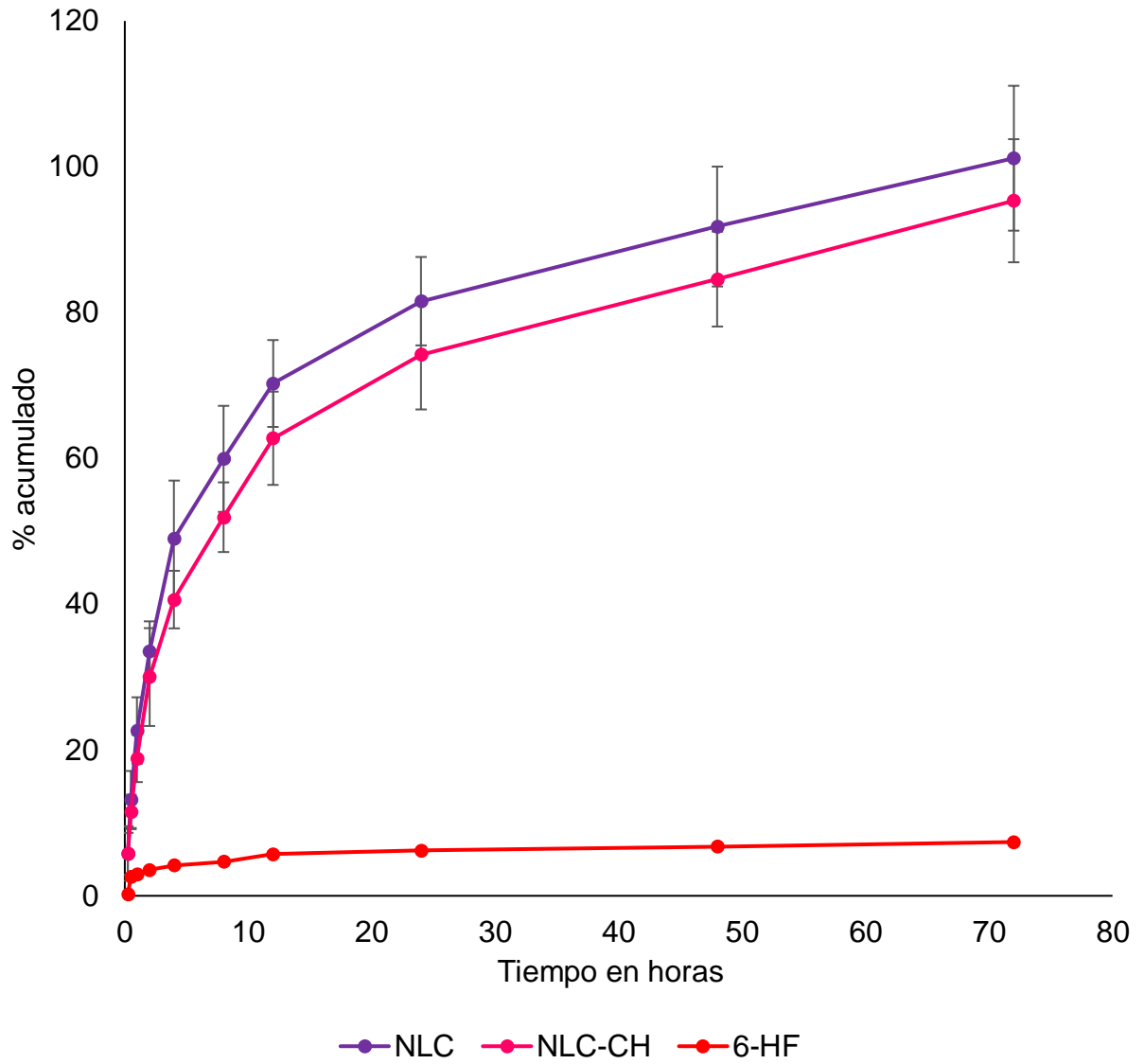


Figura 28. Perfiles de liberación a pH 5.5 de 6-HF a partir de los NLC y NLC-CH en comparación con la disolución del polvo de fármaco

Tabla 11. Modelos matemáticos ajustados al perfil de liberación

Modelo	r^2	Constante (k)
Higuchi	0.985	19.337 h ^{-1/2}
Orden cero	0.8706	5.0428 h ⁻¹
Primer orden	0.4765	0.1098 h ⁻¹
Hixon-crowell	0.5217	-0.233 h ^{-1/3}
Korsemyer-peppas	0.34	n= 0.3694

8.6 Formulación y evaluación de las propiedades aerolizables de los NLC.

8.6.1 Formulación y evaluación de las propiedades aerolizables de las NLC-CH.

En la elaboración de DPI se requiere de la incorporación de excipientes con partículas con un diámetro mayor a las NLC para mejor la dispersión del flujo y en la actualidad, el más utilizado es la lactosa monohidratada **(Da Silva et al, 2017)**.

El epitelio alveolar del pulmón puede ser dirigido de manera efectiva al administrar los fármacos en una formulación de un DPI, con un MMAD menor a 5 μm . El desarrollo de formulaciones de polvo seco para inhalación es una propuesta atractiva porque mejora los problemas de estabilidad y solubilidad de los fármacos. Además, un aerosol de polvo seco ofrece la capacidad de proporcionar una amplia gama de dosis únicas por inhalación. Otras ventajas son la baja susceptibilidad al crecimiento microbiano y la idoneidad para fármacos tanto solubles en agua como insolubles **(Healy et al, 2013)**.

En este proyecto se utilizaron dos marcas comerciales distintas de lactosa (respitose y lactohale); de las cuales se utilizaron dos modelos distintos de cada una (ML001, ML006, LH200 y LH201). Una vez obtenida las mezclas se evaluaron las propiedades de flujo de los polvos mediante sus pruebas reológicas *(figura 29)*.

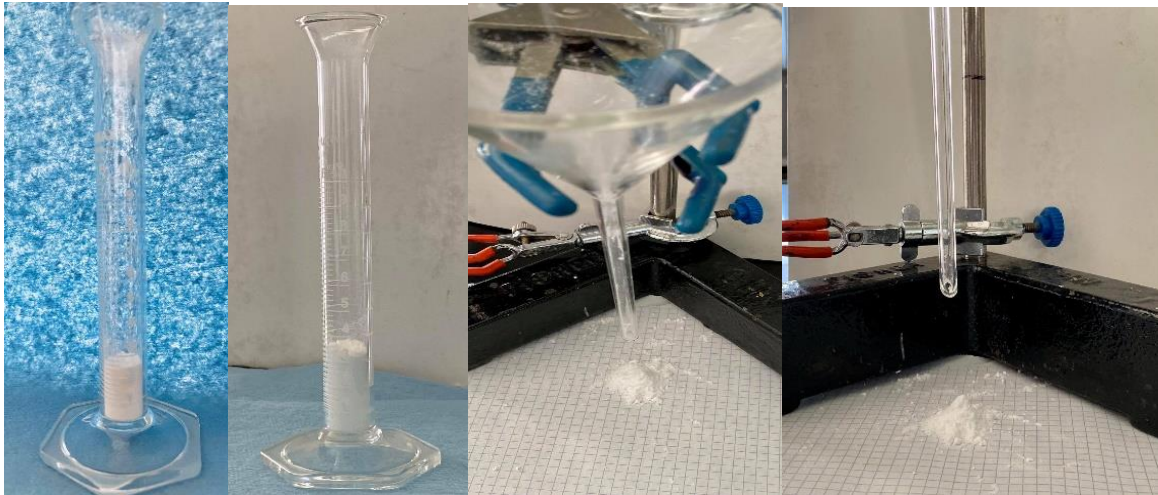


Figura 29. Evaluación de las pruebas reológicas de las mezclas de lactosa-NLC

Con base en los resultados se puede observar que, al aumentar la proporción de lactosa, la fluidez del polvo se vuelve pobre (*anexos*). Es por ello que se consideró la proporción 1:2 de lactosa-NLC adecuada para esta formulación. Una vez elegida la mejor proporción, se analizaron los distintos tipos de lactosa con base en sus propiedades reológicas.

En la tabla 12 podemos observar que las propiedades reológicas van incrementando conforme al tamaño de partícula de la lactosa. Según la FEUM, un valor de 5-15% en el índice de Carr, es característico de un tipo de flujo excelente, como sucede en la ML001. Sin embargo, las otras mezclas cuentan con un tipo de flujo regular (18-25%). Al igual que, estos valores coinciden con el índice de Hausner, el cual nos explica la fluidez de los polvos, considerando de 1.09-1.10 una excelente fluidez.

Con base en lo ya mencionado, se consideró como mejor proporción la 1:2, ya que presentó las mejores propiedades reológicas.

Tabla 12. Determinación de las propiedades reológicas de las mezclas en una proporción 1:2 lactosa-NLC

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	Índice de Carr (%)	Índice de Hausner	Ángulo de reposo(°)
ML001	0.17± 0.00	0.18± 0.00	9.44± 1.70	1.10± 0.02	14.38± 1.83
ML006	0.17± 0.00	0.21± 0.01	20.56± 2.74	1.26± 0.05	17.63± 0.53
LH200	0.17± 0.00	0.22 ± 0.00	23.33± 2.55	1.30± 0.04	10.46± 5.73
LH201	0.17± 0.00	0.22 ± 0.00	25.00± 0.0	1.33± 0.00	15.70± 3.43

Representando el promedio ± DE; densidad aparente, densidad compactada, índice de Carr, índice de Hausner y ángulo de reposo con una n=3.

Posteriormente, se evaluó la deposición de partículas utilizando el método de cascada de Andersen. En donde, se calculó el diámetro de masa media aerodinámica (MMAD), empleando la fórmula: $MMAD = d \left(\frac{p}{p_0 X} \right)^{1/2}$, donde d es el diámetro de la partícula previamente calculado, p es la densidad compactada y p_0 es la densidad aparente y X es el factor de superficie, que por ser esférica el valor es igual a 1 (tabla 13). Se observó que la fluidez de los polvos se ve afectados por el tamaño de partícula, es por ello, que se debe considerar la deposición de partículas, ya que, en los bronquios y bronquiolos el diámetro oscila entre 1-5 μm . Es por ello, que la lactosa ML001 es más conveniente para la formulación de nuestro polvo seco para inhalación. La lactosa LH201 es un polvo fino que de igual manera presentó una MMAD conveniente para la vía de administración, sin embargo, se conoce que entre más pequeña sea la partícula esta será exhalada o eliminada por el organismo.

Tabla 13. Determinación de las propiedades reológicas de las mezclas en una proporción 1:2 lactosa-NLC

Tipo de lactosa	MMAD (μm)	GSD
ML001	2.12 ± 0.95	0.32
ML006	8.69 ± 2.27	0.93
LH200	8.04 ± 1.38	0.90
LH201	0.76 ± 0.14	-0.11

Una vez eligiendo la ML001 como excipiente adecuado para la formulación, se evaluó el MMAD mediante 3 distintas formas; la primera fue la mencionada anteriormente, en la segunda ese fue calculando el logaritmo del diámetro vs el porcentaje acumulado y finalmente mediante el peso retenido de cada membrana.

En la tabla 14 se observan el MMAD calculado en las tres maneras de la mezcla ML001-NLC en una proporción 1:2. Se puede observar que se obtuvo un MMAD menor a $3\mu\text{m}$, lo cual es apto, ya que la deposición de partículas esperada se lleva a cabo mediante sedimentación en los bronquios y bronquiolos.

Por otro lado, los valores de la GSD son menores a 2, lo cual es ideal ya que, las partículas deben estar lo más cerca posible de la monodispersidad para aumentar la deposición en el sitio de acción deseado y aumentar la eficacia del tratamiento **(Zanen et al, 1998)**. Esto nos indica que el tamaño de partícula de los polvos obtenidos es adecuado para la administración pulmonar.

Tabla 14. MMAD y GSD de la formulación del polvo seco 1:2 ML001-NLC

Método	MMAD (μm)	GSD
Diámetro en peso	2.02 ± 0.38	1.4 ± 0.21
Log del diámetro	1.93 ± 0.75	1.71 ± 0.38
Con densidades	2.12 ± 0.95	0.3 ± 0.18

Empleando un microscopio, se observó a 40X la formulación de acarreadores formulados con lactosa, así como la forma cristalina de la ML001. Debido a la escala de este equipo no se observan a ver los NLC dado a su tamaño, sin embargo, alrededor de los cristales se puede observar una aglomeración de partículas, las cuales podemos decir que son los NLC (*figura 30*). La recolección de esta muestra fue adquirida del ensayo de impactador en cascada de Andersen de la etapa 3.

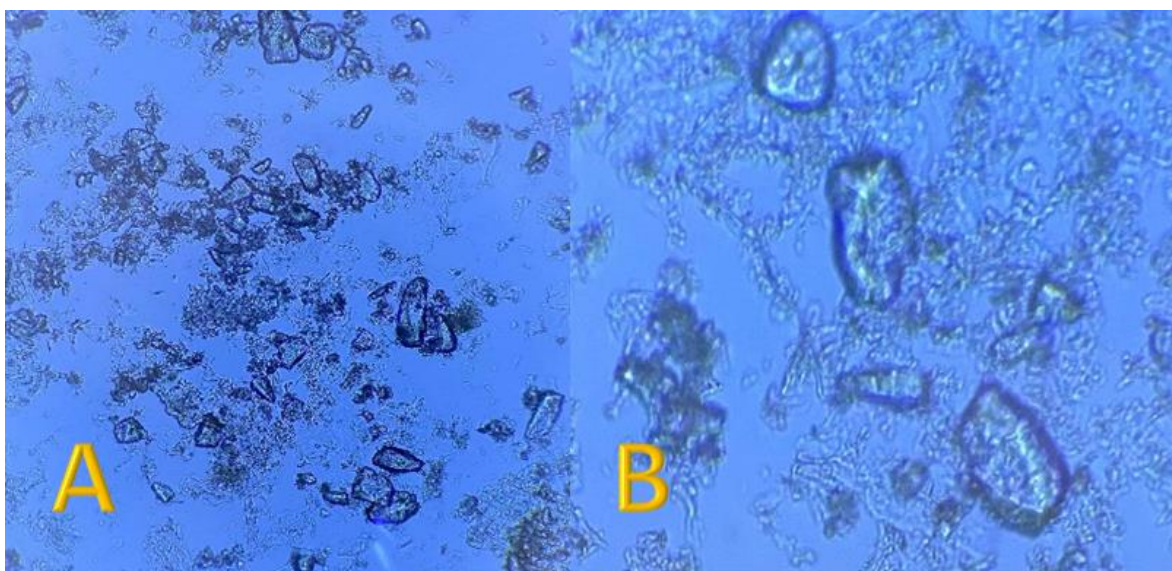


Figura 30. A) Cristales de lactosa ML001 con NLC-CH B) Cristales de lactosa ML001 sin NLC-CH

8.7 Determinación del efecto traqueorrelajante utilizando la concentración efectiva media (CE₅₀)

Se determinó el efecto traqueorrelajante en anillos de tráquea aislada de rata de las mezclas de los polvos (ML001-NLC-CH, NLC cargados con 6-HF y sin molécula, NLC-CH cargados con 6-HF y de la molécula experimental 6-HF), estos fueron cargados a la CE₅₀ de la 6-HF con una concentración de 84.14µM (**Flores-Flores A et al, 2018**).

En la figura 31 podemos observar una barra azul, la cual representa a la 6-HF previamente disuelta en DMSO, esto fue debido a que la solubilidad de esta es nula en medios acuosos. Así mismo, se utilizó la teofilina como control ya que, se conoce que es un fármaco utilizado para el tratamiento del asma.

Del estudio de las nanopartículas podemos observar que los NLC-CH y NLC cargados con 6-HF presentan una relajación de aproximadamente el 30% en los primeros 30 minutos, esto se relaciona con el mecanismo de liberación de los acarreadores, lo cual confirma que su liberación es controlada. Esto nos puede indicar que la formulación puede funcionar como medicamento de rescate y además como de tratamiento, ya que en las siguientes horas se puede observar que la relajación se mantiene entre el 80 y 100% durante las siguientes 7 horas (*figura 31*).

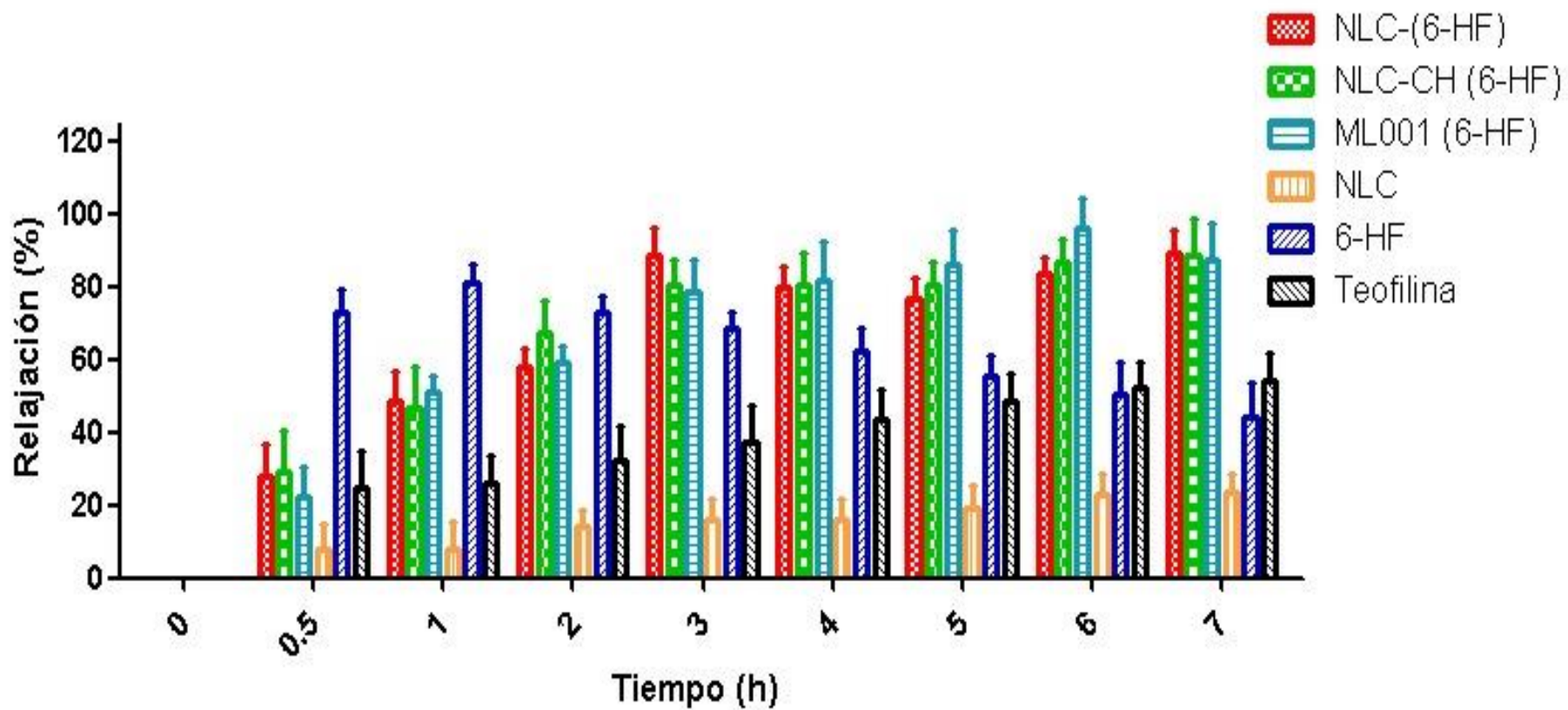


Figura 31.- Efecto traqueorrelajante de los NLC, NLC-CH, de la mezcla de lactosa-NLC y de la 6-HF

9. CONCLUSIÓN GENERAL

En este proyecto se lograron obtener acarreadores lipídicos nanoestructurados recubiertos con un polímero mucoadhesivo (CHI) cargados con 6-hidroxi flavona con un tamaño adecuado y propiedades tecnológicas aerolizables para poder ser administrados por la vía pulmonar, generando un efecto traqueorrelajante constante durante al menos 7 horas.

9.1 CONCLUSIONES PARTICULARES

- El método analítico se desarrolló y validó para cuantificar la 6-hidroxi flavona empleando una longitud de onda de 265 nm.
- Se obtuvieron acarreadores lipídicos nanoestructurados por el método de emulsión simple- evaporación de disolvente bajo condiciones óptimas.
- Los acarreadores fueron caracterizados, encontrando tallas promedio entre 523 a 1038 nm con PDI menor a 0.3, con potencial negativo de -15 a -23 mV y una eficiencia de encapsulación de 74.39% a 95.6%.
- Los acarreadores fueron optimizados con un tamaño promedio de 621.13 nm y una eficiencia de encapsulación del 82.88%.
- Los acarreadores recubiertos con chitosán obtuvieron un tamaño promedio de 832.35 ± 5.62 nm y un potencial zeta de 30.13 ± 1.79 mV.

- Los NLC-CH presentaron una mucoadhesión mediante interacción con mucinas.
- Los NLC y NLC-CH liberan alrededor del 80% dentro de las primeras 24 horas en un ambiente ácido característico de pacientes asmáticos (pH 5.5).
- La mezcla de lactosa-NLC presentó buenas propiedades de flujo mediante sus propiedades reológicas.
- Se obtuvo un MMAD adecuado para que las partículas sean depositadas en bronquios y bronquiolos.
- Los NLC, NLC-CH y la mezcla de ML001-NLC producen un efecto relajante de la musculatura lisa de las vías aéreas relacionado a un bloqueo de influjo de Ca^{2+} , lo cual nos indica que la 6-hidroxi flavona se encuentra encapsulada dentro del acarreador y conforme pasa el tiempo la va liberando.

10.PERSPECTIVAS

- Desarrollar formulaciones probando al menos 3 dosis distintas y evaluar sus efectos.
- Evaluar el efecto antiasmático de los acarreadores en un modelo *in vivo* de cobayo.
- Llevar a cabo pruebas de estabilidad de las diferentes formulaciones.

11. REFERENCIAS

- A.C Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. (2002) Guía de Validación de Métodos Analíticos.
- Ahedo-Arenas Maria Fernanda (2019). Desarrollo de un sistema microparticulado bioadhesivo cargado con 6-hidroxi flavona para el tratamiento del asma. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Farmacia.UAEM. México.
- Ajay M., Gilani AH., Mustafa MR. (2003) Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 74:603–612.
- Akah PA., Ezike AC., Nwafor SV., Okoli CO., Enwerem NM. (2003) Evaluation of the anti-asthmatic property of *Asystasia gangetica* leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 89:25–36.
- Alcalá-Alcalá S., David Quintanar-Guerrero D. (2014) La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. México : mundonano, 12, Vol. 7.
- Almadhoun K., Sharma S. (2020) Bronchodilators. *StatPearls*. 5(26):1-149. doi: 10.3310/hta5260.
- Álvarez-Santos M., Ramos-Ramírez P., Gutiérrez-Aguilar F., Sánchez-Hernández S., Lascurain R., Olmos-Zuñiga R., Jasso-Victoria R., A Bobadilla N. (2015) Antigen-induced airway hyperresponsiveness and obstruction is related to caveolin-1 expression in airway smooth muscle in a guinea pig asthma model. *Clinical and Translational Allergy*. Mar 26;5:14. doi: 10.1186/s13601-015-0058-7.
- Amaral-Machado L., Oliveira N., Moreira-Oliveira S., Pereira D. (2020) Use of Natural Products in Asthma Treatment. ID 1021258, 35 páginas. Hindawi.
- Amos S., Gamaniel K., Akah P., Wambebe C. (1998) Anti-inflammatory and muscle relaxant effect of aqueous extract of *Pavetta crassipes* leaves. *Fitoterapia* 69:425–429. Owoyele VB., Oloriegbe YY., Balogun EA., Soladoye AO. (2005) Analgesic and antiinflammatory properties of *Nelsonia canescens* leaf extract. *J Ethnopharmacol* 99:153–156.

- Andrews G.P., Laverty T.P., Jones DS. (2009) Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71. 505–518.
- Ann Mullen, RN, CNS, AE-C, CDE, TTS (2018). Devices for Inhaled Medications (Asthma Inhalers, COPD Inhalers). National Jewish Health.
- Avila-Villareal G., González-Trujano M. E., Carballo-Villalobos, A. I., Aguilar Guadarrama, B., García-Jiménez, S., Giles-Rivas, D, Estrada- Soto, S. (2016). Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 90–98.
- Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Préat, V. (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), 143–161. doi:10.1016/j.nano.2015.09.004.
- Boonyo W, Junginger HE, Waranuch N, et al. (2007) Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration. *J Control Release.* 121:168–175.
- Brennan D. (2019). WebMD. Bronchodilators (Rescue Inhalers): Short-Acting and Long-Acting Types.
- Brinkman JE, Sharma S. StatPearls [Internet] (2019). StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Mar 16. Physiology, Respiratory Drive.
- Cebollero P., Echegoyen E., Santolaria M.A. (2005) Occupational asthma. *Scielo* vol. 28. Suplemento 1.
- Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Ewoldt RH, McKinley GH, Bansil R, Erramilli S. (2007) Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules*. May; 8(5):1580-6.
- Chen, Y., Zhou, L., Yuan, L., Zhang, Z., & Wu, Q. (2012). Formulation, Characterization and Evaluation of the in Vitro Skin Permeation of Nanostructured Lipid Carriers Encapsulated Tripterine. 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. doi:10.1109/icbeb.2012.227.

- Chien-Hung L., Yu-Wei W., Sauh-Der Y., Yu-Hsaing L., Yu-Hui T. (2014) Effects of 6-Hydroxyflavone on Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells. Taiwan.
- Chiu M., y Prenner E. (2011) Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* Páginas: 39-59.
- Colegio Mexicano de Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica (COMAAIPE). (2017). Asma Infantil. Guía para su diagnóstico y tratamiento.
- Cook S., P.Bull S., Methven L., K.ParkerJ., V.Khutoryanskiy V.(2017). Mucoadhesion: A food perspective. Pages 281-296.
- da Silva, A.L., Cruz, F.F., Rocco, P.R.M., Morales, M.M., (2017). New perspectives in nanotherapeutics for chronic respiratory diseases. *Biophys. Rev.* 9, 793–803.
- Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica.* 67(3):217–223.
- Doan, Q., Shefrin, A., & Johnson, D. (2011). Cost-effectiveness of Metered-Dose Inhalers for Asthma Exacerbations in the Pediatric Emergency Department. *PEDIATRICS*, 127(5), e1105–e1111. doi:10.1542/peds.2010-2963.
- Evans CM, Koo JAS. (2009) Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol Therapeut.* 121:332–48.
- Flores-Flores A. (2019) Determinación del efecto antialérgico; toxicológico y farmacocinético de 6-hidroxiflavona para su potencial desarrollo como fármaco antiastmático. Tesis de Doctorado de la Facultad de Farmacia. UAEM. México.
- Flores-Flores A., Estrada-Soto S., Millán-Pacheco C., Bazán-Perkins B., Villalobos-Molina R., Moreno-Fierros L., Hernández-Pando R., García-Jiménez S., Rivera-Leyva J. (2018) Functional mechanism of tracheal relaxation, antiasthmatic, and toxicological studies of 6-hydroxyflavone.

- Flores-Flores A., Hidalgo-Figueroa S., Villalobos-Molina R., Ibarra-Barajas M., Bazán-Perkins B., Navarrete-Vázquez G., Estrada-Soto S. (2018) Relaxant effect of structurally related flavonoids on isolated tracheal rat rings: a SAR study. *Medicinal chemistry research* 27:122–127.
- Fundación para la formación e investigación sanitarias de la región de Murcia. Inhalador de niebla fina. (2012) página web: www.ffis.es/Inhaladores/4_inhalador_de_niebla_fina_respimat_soft_mist.html
- GEMA. (2019) Guía Española para el manejo del asma. Recuperado de: <https://www.gemasma.com/control-gravedad-del-asma-adulto/>
- Giner J., Roura P., Hernández C., Torrejón M., Peiró M., Fernández J., López de Santamaría E., Gimeno A., MAcian V., Tarragona E., (2015) Knowledge and attitudes of nurses in Spain about inhaled therapy. Results of a National Survey. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery.*;28:1-8.
- Global Initiative for asthma. (2019) Guía de bolsillo para el manejo y la prevención del asma.
- Hanisch FG, Muller S. (2000) MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*; 10:439–49
- Healy, A. M., Amaro, M. I., Paluch, K. J., & Tajber, L. (2014). Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 75, 32.
- Hogan BL, et al. (2014). Repair and regeneration of the respiratory System: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*. (2014); 15:123–138.
- I.M. van der Lubben, G. Kersten, M.M. Fretz, C. Beuvery, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, (2003) Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice, *Vaccine* 21. 1400–1408.
- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (2017) Neumología y cirugía de Tórax. México. vol. 76. suplemento 1.
- Iringtinger, M., Camuglia, V., Damm, M., Goede, J., & Frijlink, H. (2004). Pulmonary delivery of therapeutic peptides via dry powder inhalation: effects

of micronisation and manufacturing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(1), 7–14.

- Isaac, Jimenez C., Yne E., Martínez eE., Fonseca C., J.G. (2009) Artemisa Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 52, 73-75
- Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., Nakayam, T. (2010) Narigenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergol. Int.*59, 67-73
- J. Weiss, E.A. Decker, D.J. McClements, K. Kristbergsson, T. Helgason, T. Awad. 2. (2008) s.l. : Food Biophysics. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components.Vol. 3.
- Jia, L.-J., Zhang, D.-R., Li, Z.-Y., Feng, F.-F., Wang, Y.-C., Dai, W.-T., ... Zhang, Q. (2009). Preparation and characterization of silybin-loaded nanostructured lipid carriers. *Drug Delivery*, 17(1), 11–18.
- Joshi M., Patravale V. (2006) Formulation and evaluation of nanostructured lipid carrier (NLC)-based gel of valdecoxib. *Dru Dev Ind Pharm* 32(8):911–918
- Joshi, M. D., Prabhu, R. H., & Patravale, V. B. (2019). Fabrication of Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gels from Microemulsion Template for Delivery Through Skin. *Methods in Molecular Biology*, 279–292. doi:10.1007/978-1-4939-9516-5_19 -.
- Kittur, F. S., Harish Prashanth, K. V., Udaya Sankar, K., & Tharanathan, R. N. (2002). Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 185–193.
- Kreda, S. M., Davis, C. W., & Rose, M. C. (2012). CFTR, Mucins, and Mucus Obstruction in Cystic Fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9), a009589–a009589. doi:10.1101/cshperspect.a009589
- Kumar K, Dhawan N, Sharma H, Vaidya S, Vaidya B. (2014) Bioadhesive polymers: Novel tool for drug delivery. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 42 (4): 274-283.

- Laila J., Ghoroi C., Gurumurthy L., Patel U. (2012) Improvement of flow and bulk density of pharmaceutical powders using surface modification. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 213–225. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.012.
- Lu Y., Park K. (2013) Drug Delivery Systems: H, mucosal drug delivery. IN: *Biomaterials Science*. Third Edit. Elsevier: 1510-1518. Doi: 10.1016/B978-08-08778-8.00156-X.
- Mahapatro A, Singh DK. (2011) Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnol*. 9:55.
- Mainardi T., Kapoor S., Bielory L. (2009) Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123(2):283–294.
- Mali RG., Dhake AS. (2011) A review on herbal antiasthmatics. *Orient Pharm Exp Med* 11:77–90.
- Mancilla-Hernández E. Medina-Ávalos M., Barnica-Alvarado R., Soto-Candia D., Guerrero-Venegas R., Zecua-Nájera Y. (2015) Prevalencia de asma y determinación de los síntomas como indicadores de riesgo. México : *Revista alergia México*.
- Mansuri S., Kesharwani P., Jain K., Rakesh K. Tekade D., Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers* 100 (2016) 151–172.
- Meister, A., Bernhardt, G., Christoffel, V., & Buschauer, A. (1999). Antispasmodic Activity of *Thymus vulgaris* Extract on the Isolated Guinea-Pig Trachea: Discrimination Between Drug and Ethanol Effects. *Planta Medica*, 65(6), 512–516. doi:10.1055/s-1999-14006.
- Moeller EH, Jorgensen L. (2008) Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. *Drug Discov Today Technol*;5: e89–94.
- Mullarney, M. P., Beach, L. E., Davé, R. N., Langdon, B. A., Polizzi, M., & Blackwood, D. O. (2011). Applying dry powder coatings to pharmaceutical

powders using a comil for improving powder flow and bulk density. *Powder Technology*, 212(3), 397–402. doi:10.1016/j.powtec.2011.06.008

- Muller RH, Keck CM *J Biotechnol*. 2004. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Sep 30*; 113(1-3):151-70.
- Muñoz Cernada A. (2006). *Inhaladores de polvo seco para el tratamiento de las enfermedades respiratorias. Parte II. versión impresa ISSN 0034-7515 versión On-line ISSN 1561-2988.*
- Naseri N., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. (2015) Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *5(3)*: 305–313.
- Netsomboon, K., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, 76–89. doi:10.1016/j.ejpb.2015.11.003.
- Nikolić, V., Ilić-Stojanović, S., Petrović, S., Tačić, A., & Nikolić, L. (2019). Administration Routes for Nano Drugs and Characterization of Nano Drug Loading. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, 587–625.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Patil, T. S., & Deshpande, A. S. (2018). Nanostructured lipid carriers-based drug delivery for treating various lung diseases: A State-of-the-Art Review. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1-2).
- Patton JS. (1996) Mechanisms of macromolecular absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev*.19:3–36.
- Patton, J. S. (2004). *The Lungs as a Portal*. Research Department, Nektar Therapeutics, San Carlos, California.
- Perez-Padilla R, Menezes AMB. (2019) Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Latin America. *Ann Glob Health*. 22;85.

- Peris JB., Stübing G., Vanaclocha B.(1995) Fitoterapia aplicada. Valencia: COF de Valencia.
- Prabha, G., & Raj, V. (2016). Preparation and characterization of chitosan-Polyethylene glycol-polyvinylpyrrolidone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(4), 808–816. doi:10.1002/jbm.b.33637.
- PubChem base de datos, 6-Hydroxiflavone. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Hydroxyflavone>.
- R.J. Soane, M. Frier, N.S. A.C., Jones, S.S. Davis, L. Illum, (2000) Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans, *Int. J. Pharm.* 178. 55–65.
- Rabelo, R. S., Oliveira, I. F., da Silva, V. M., Prata, A. S., & Hubinger, M. D. (2018). Chitosan coated nanostructured lipid carriers (NLCs) for loading Vitamin D: A physical stability study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 902–912. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.174.
- Richardson M. (2003) The main function of the respiratory system is to draw air into the lungs to allow the exchange of gases with blood circulating to the lungs.p. 63. vol. 99.
- Russell, V., (2017). Four challenges for pulmonary drug delivery. *Pharm. Technol.* 4, s16–s18.
- Sarasija, S., & Patil, J. (2012). Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. *Lung India*, 29(1), 44. doi:10.4103/0970-2113.92361
- Savithamma N., Sulochana Ch., Rao KN. Ethnobotanical survey of plants used to treat asthma in Andhra Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology* 113 (2007) 54–61.
- Schäfer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. (2017) Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *s.l. : Adv Drug Deliv Rev.* Vol. 59. 427–443.
- Secretaria de salud. (2019). Boletín epidemiológico. México. n° 5, vol. 36.

- Song X, Lin Q, Guo L, Fu Y, Han J, Ke H, Sun X, Gong T, Zhang Z Pharm Res. (2015). Rifampicin loaded mannosylated cationic nanostructured lipid carriers for alveolar macrophage-specific delivery. May; 32(5):1741-51.
- Soren-Pedersen, Helen-Reddel, Boulet Louis Phillippe (2018). Global Initiative for asthma.
- Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y. (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. Adv. Drug Del. Rev. 57, 1583–1594.
- Temelkovski J., H. S. Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. (2008) An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. Thorax 53:8.
- Trapani A., Di Gioia S., Ditaranto N, et al. (2013) Systemic heparin delivery by the pulmonary route using chitosán and glycol chitosán nanoparticles. Int J Pharm. 447 (1-2).
- Tronde A, Nordén B, Marchner H, Wendel AK, Lennernäs H, Bengtsson UH. (2003) Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. J Pharm Sci. 92(6):1216-33.
- Tronde A., Nordén H., Wendel A.-K., Lennernäs H., Bengtsson U.H. (2003) Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure–absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. s.l. : J. Pharm. Sci., 2003, Vol. 92, págs. 1216-1233.
- United States Pharmacopeial Convention. Chapter 601: Aerosols, Nasal Sprays, Metered-Dose Inhalers and Dry Powder Inhalers. Rockville, MD, USA, 2012; USP 35-NF 30.
- Ventola C. L. (2010) Current issues regarding complementary and alternative medicine (CAM) in the United States: part 1: the widespread use of CAM and the need for better-informed health care professionals to provide patient counseling. Pharmacology & Therapeutics. 35(8):461–468.

- W. Stein S., Sheth P., Hodson D., Myrdal P. (2014) Advances in Metered Dose Inhaler Technology: Hardware Development.
- Wang, C. (2011) A Brief History of Respiratory Deposition Modeling; RTI International: Research Triangle Park, NC, USA.
- World Health Organization. World Health Organization. <https://www.who.int/news->
- Zanen P, Go LT, Lammers JW. (1998) The efficacy of a low-dose, monodisperse parasympatholytic aerosol compared with a standard aerosol from a metered-dose inhaler. *Eur J Clin Pharmacol.* 54(1):27–30.
- Zhuang CY, Li N, Wang M, Zhang XN, Pan WS, Peng JJ. *Int J Pharm.* (2010) Preparation and characterization of Vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. Vol. 394, págs. 179–185.
- Zosky, G. R. and Sly, P. D. (2007) *Clin. Exp. Allergy*, 37(7), 973- 988.

12. ANEXOS

12.1 Curva de calibración del método analítico

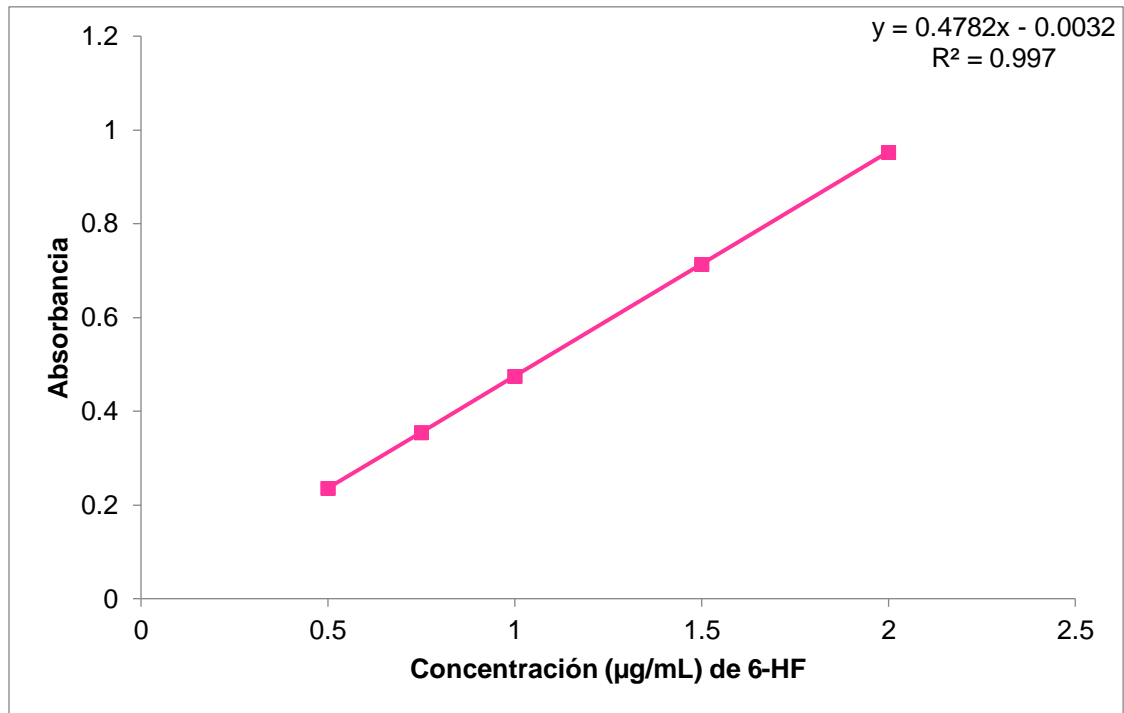


Figura 32. Curva de calibración de 6-HF

concentración	Abs.	Abs./Concentración
0	0.087	0.000
0	0.084	0.000
0	0.085	0.000
0.5	0.237	0.475
0.5	0.243	0.487
0.5	0.238	0.476
0.75	0.348	0.464
0.75	0.346	0.462
0.75	0.336	0.449
1	0.464	0.465
1	0.485	0.486
1	0.498	0.498
1.5	0.703	0.469
1.5	0.723	0.482
1.5	0.719	0.480
2	0.936	0.468
2	0.976	0.488
2	0.941	0.471
	Promedio	0.475
	DE	0.013
	CV	2.647

[experimental]	% recobro
1.01	101.258
1.00	100.212
1.02	101.614
2.02	101.027
2.03	101.267
1.98	99.166
PROMEDIO	100.757
DE	0.911
CV	0.904
INTERVALO DE CONFIANZA	0.956

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	
	0.998738232
Coeficiente de determinación R ²	
	0.997478057
	R ² ajustado
	0.997284061
	Error típico
	0.013908916
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.99471338	0.99471338	5141.75534	2.8079E-18
Residuos	13	0.00251495	0.00019346		
Total	14	0.99722834			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-0.003210057	0.00846834	-0.37906553	0.71075834	-0.0215048	0.01508469	0.021504803	0.015084688
Variable X 1	0.478194253	0.00666881	71.7060342	2.8079E-18	0.46378715	0.49260135	0.463787155	0.492601351

12.2 Análisis de varianza de la incubación con mucinas comparando tamaño promedio y potencial zeta

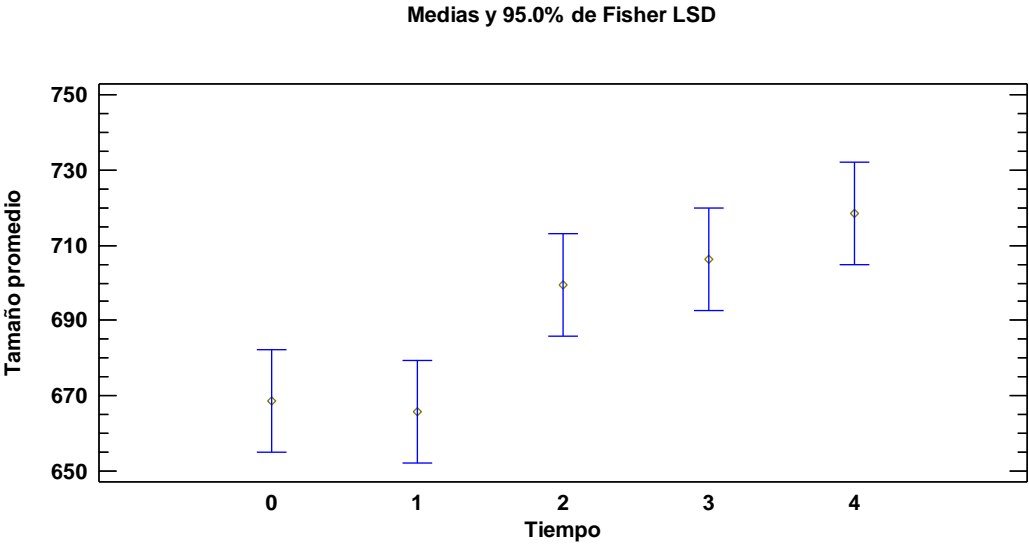


Figura 33. Gráfico de tamaño promedio de NLC cargados en diferentes tiempos de incubación con solución de mucinas al 1% ($n=3$)

Medias y 95.0% de Fisher LSD

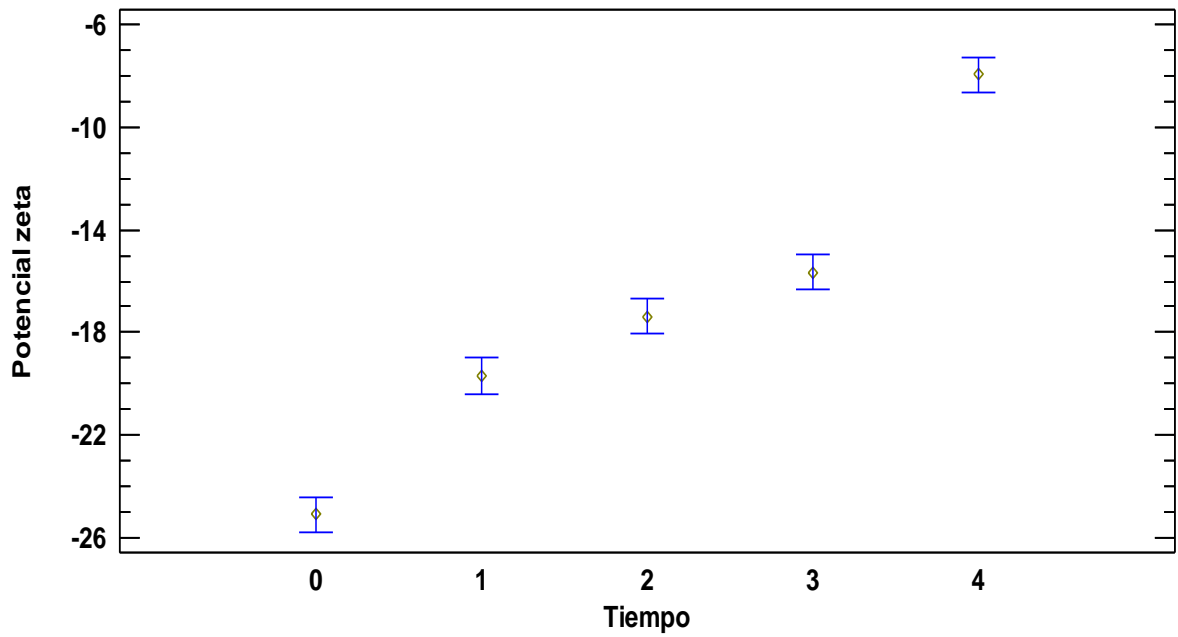


Figura 34. Gráfico de potencial zeta de NLC cargados en diferentes tiempos de incubación con solución de mucinas al 1% (n=3)

Medias y 95.0% de Fisher LSD

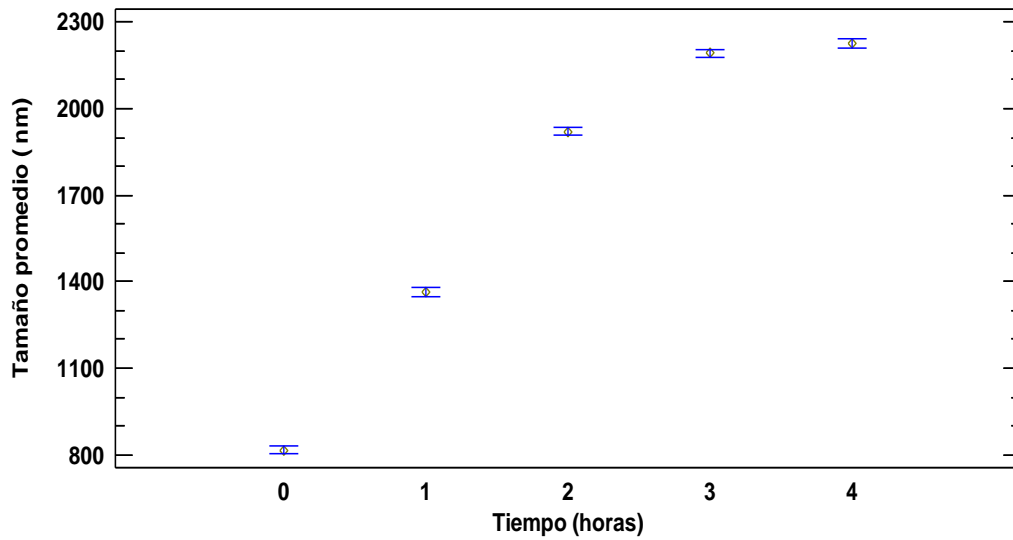


Figura 35. Prueba pos-hoc para el tamaño promedio de NLC-CH cargados con 6-HF en diferentes tiempos de incubación con solución de mucinas al 1% (n=3)

Medias y 95.0% de Fisher LSD

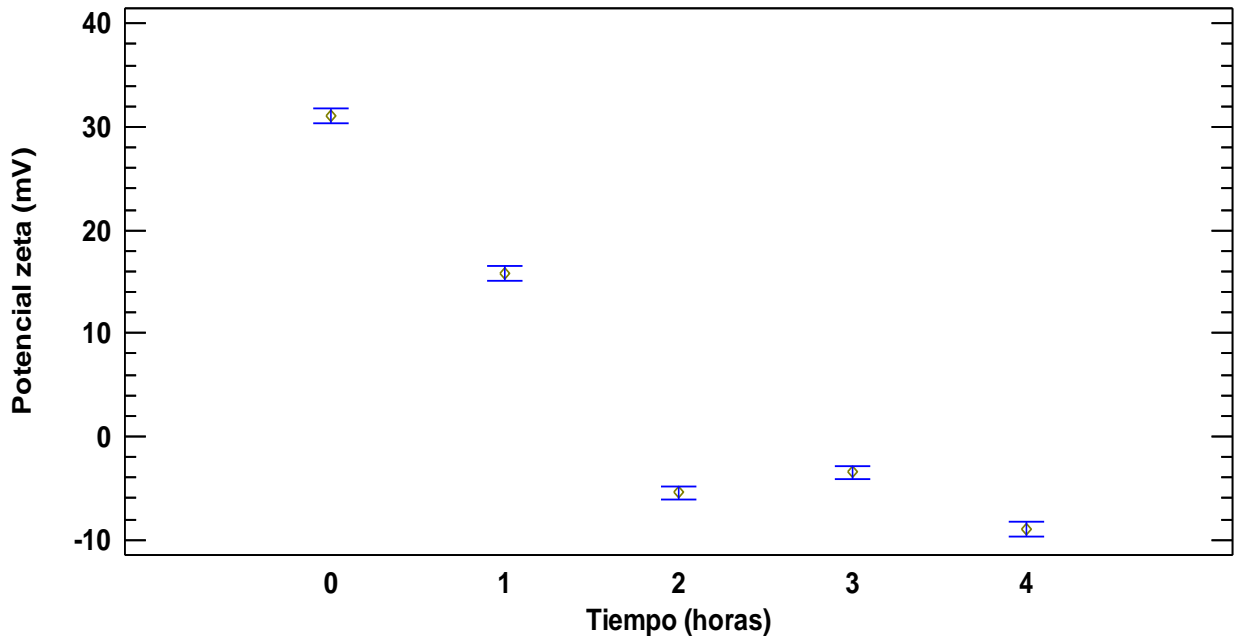


Figura 36. Prueba pos-hoc para el potencial zeta de los NLC-CH cargados con 6-HF en diferentes tiempos de incubación con solución de mucinas al 1% (n=3)

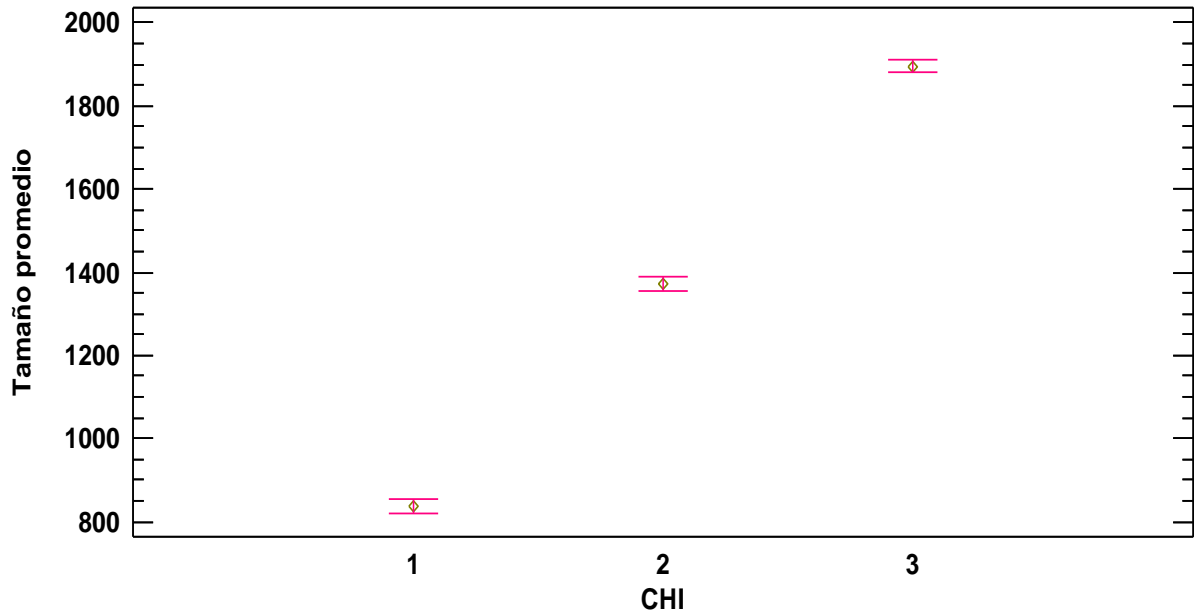


Figura 37. Prueba pos-hoc para el tamaño promedio a diferentes concentraciones de CHI

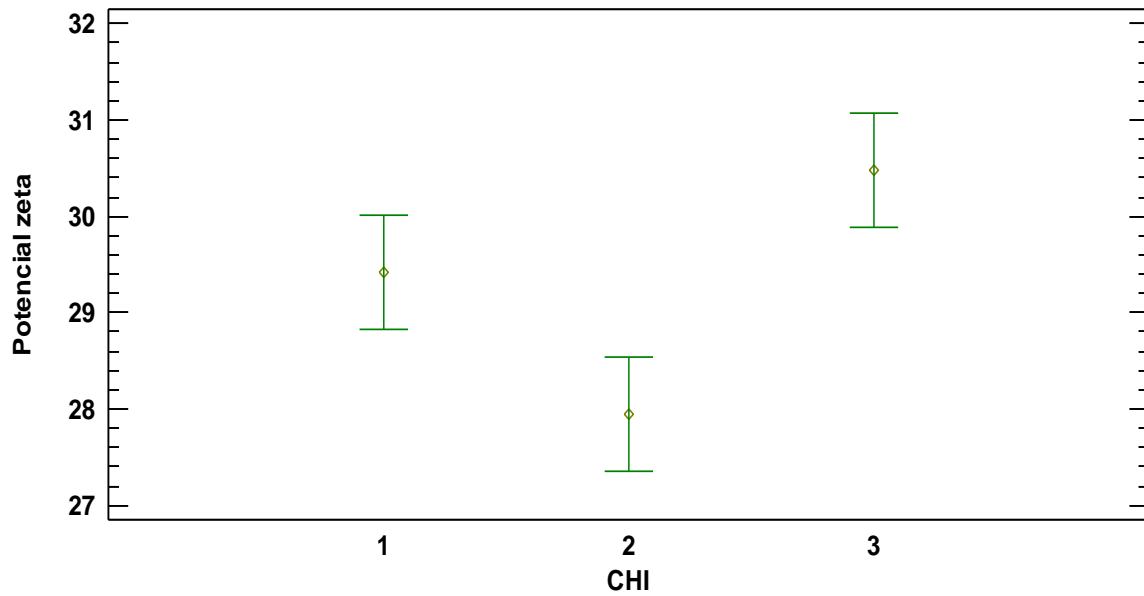


Figura 38. Prueba pos-hoc para el potencial zeta a diferentes concentraciones de CH

12.3 Perfil de liberación a un pH 7.4.

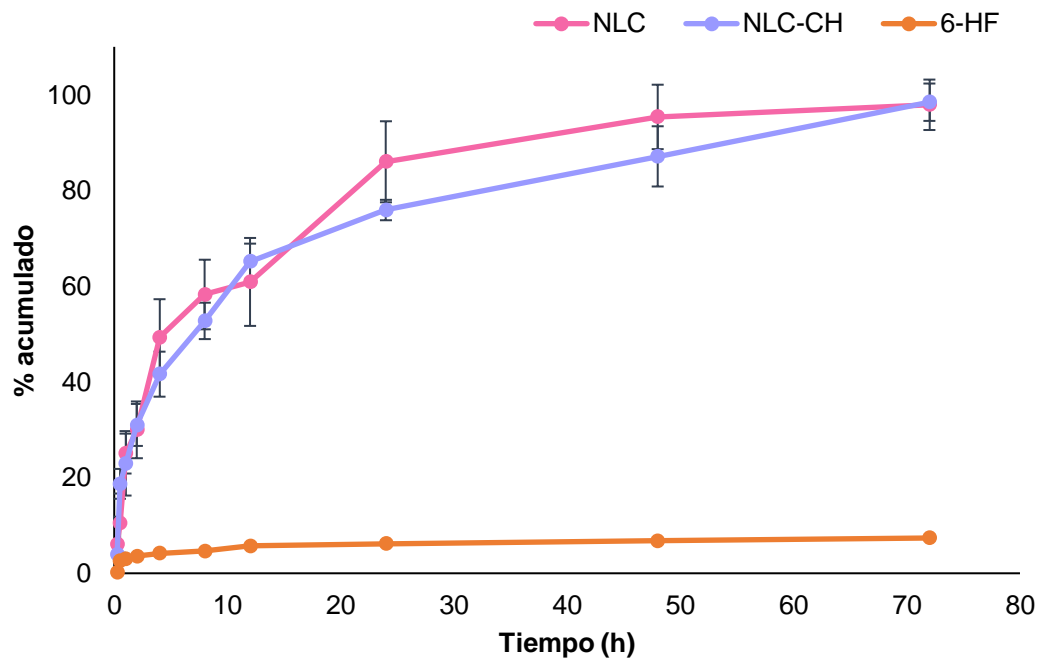


Figura 39. Perfiles de liberación a pH 7.4 de 6-HF a partir de los NLC y NLC-CH en comparación con la disolución del polvo de fármaco

12.4 Recubrimiento mucoadhesivo empleando chitosán

Tabla 15. Tamaño promedio y potencial zeta de los NLC y NLC-CH al 1% de mucinas

Tiempo/ concentración de mucina	Tamaño promedio (nm)		Potencial zeta (mV)	
	NLC	NLC-CH	NLC	NLC-CH
0	657.3 ± 45.96	830 ± 1.27	-25.3 ± 1.77	30.2 ± 0.28
1	660 ± 26.16	1350 ± 82.73	-20.1 ± 0.85	15.6 ± 1.96
2	687.5 ± 7.78	1908 ± 26.16	-17.1 ± 0.28	-5.43 ± 1.40
3	703.5 ± 5.23	2190 ± 12.73	-15.19 ± 2.12	-3.25 ± 1.90
4	720.1 ± 5.66	2202 ± 11.31	-8.3 ± 0.37	-8.89 ± 0.72

*Tiempo en horas

12.5 Gráficos de modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación.

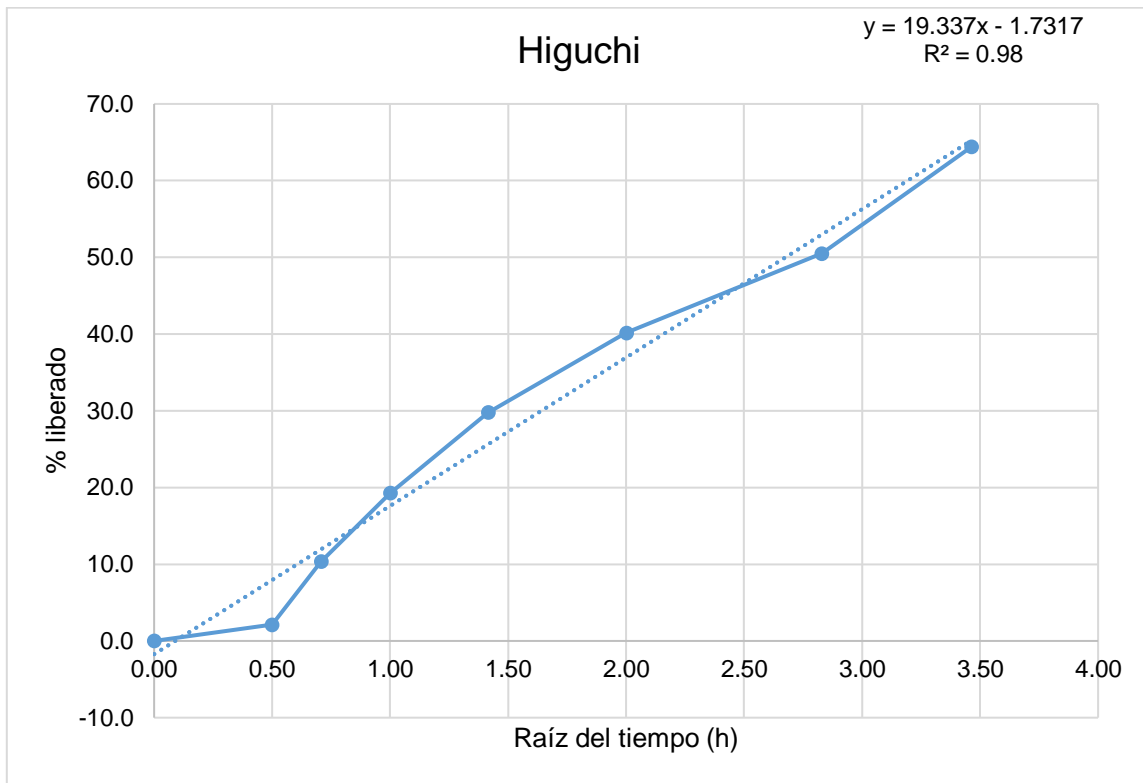


Figura 40. Gráfico de modelo de Higuchi

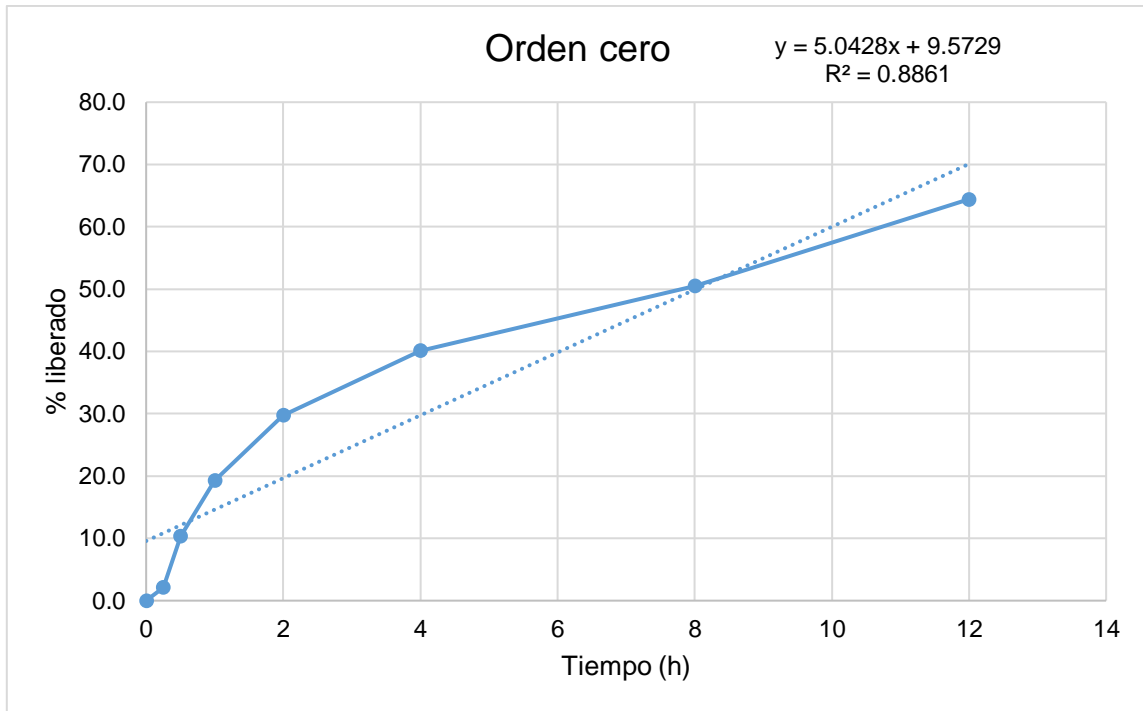


Figura 41. Gráfico de modelo de Orden Cero

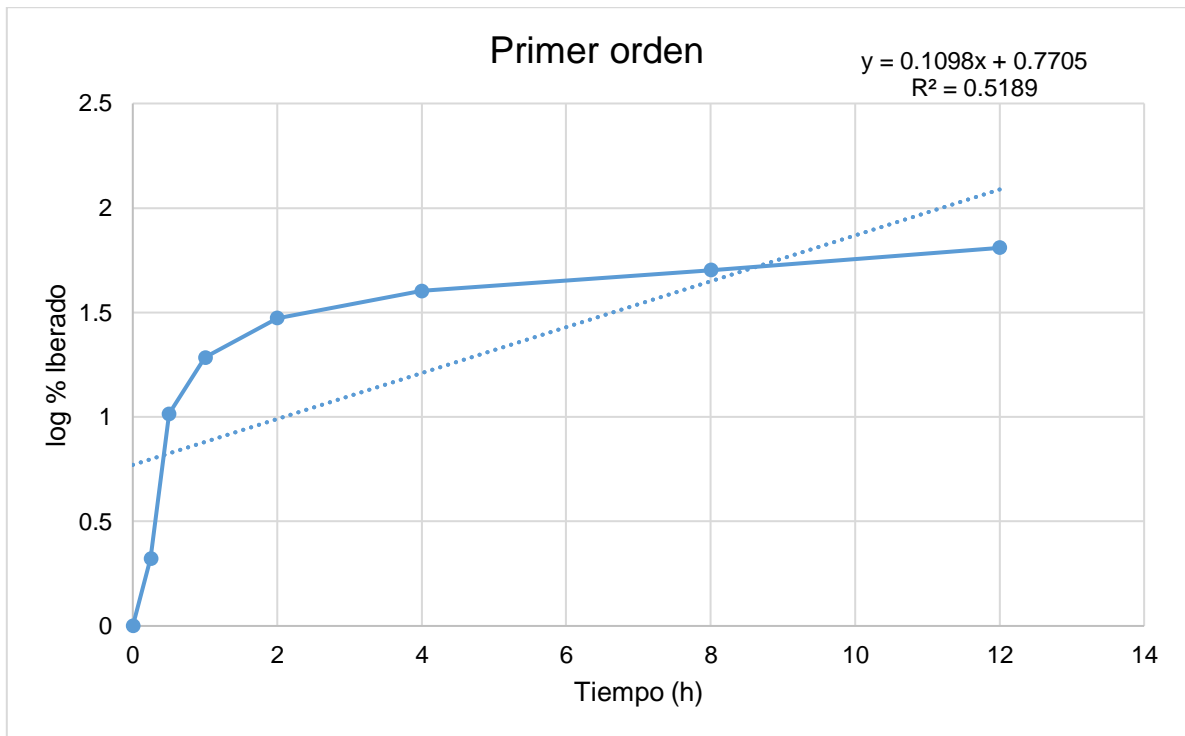


Figura 42. Gráfico de modelo de Primer orden

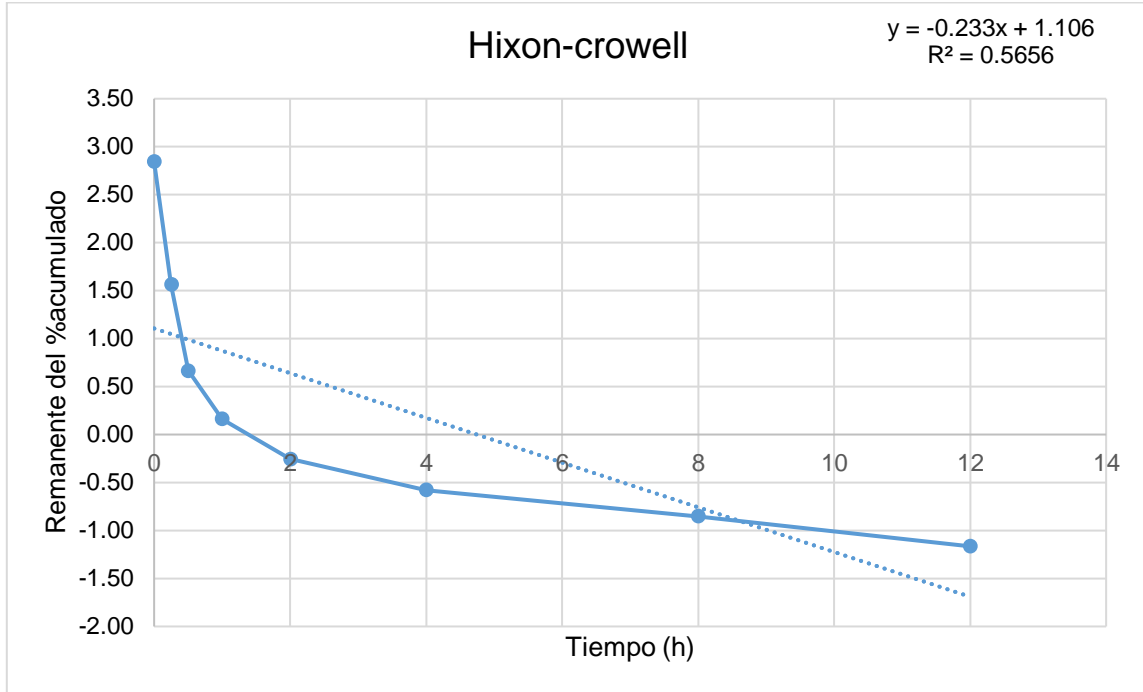


Figura 43. Gráfico de modelo de Hixon-Crowell

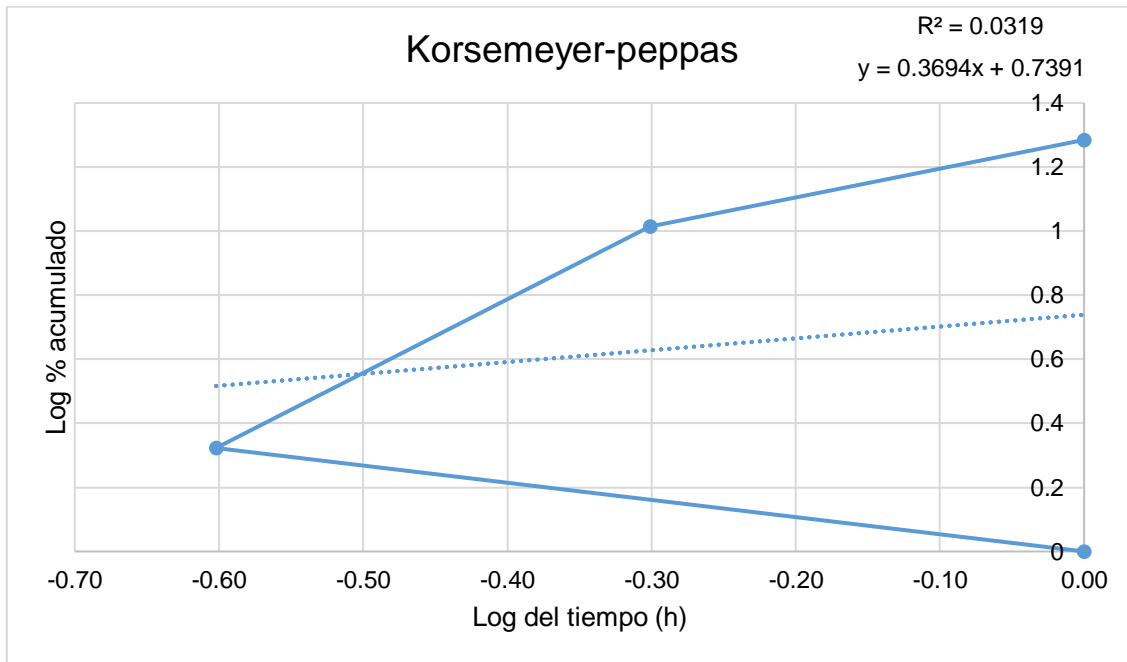


Figura 44. Gráfico de modelo de Korsmeyer-Peppas

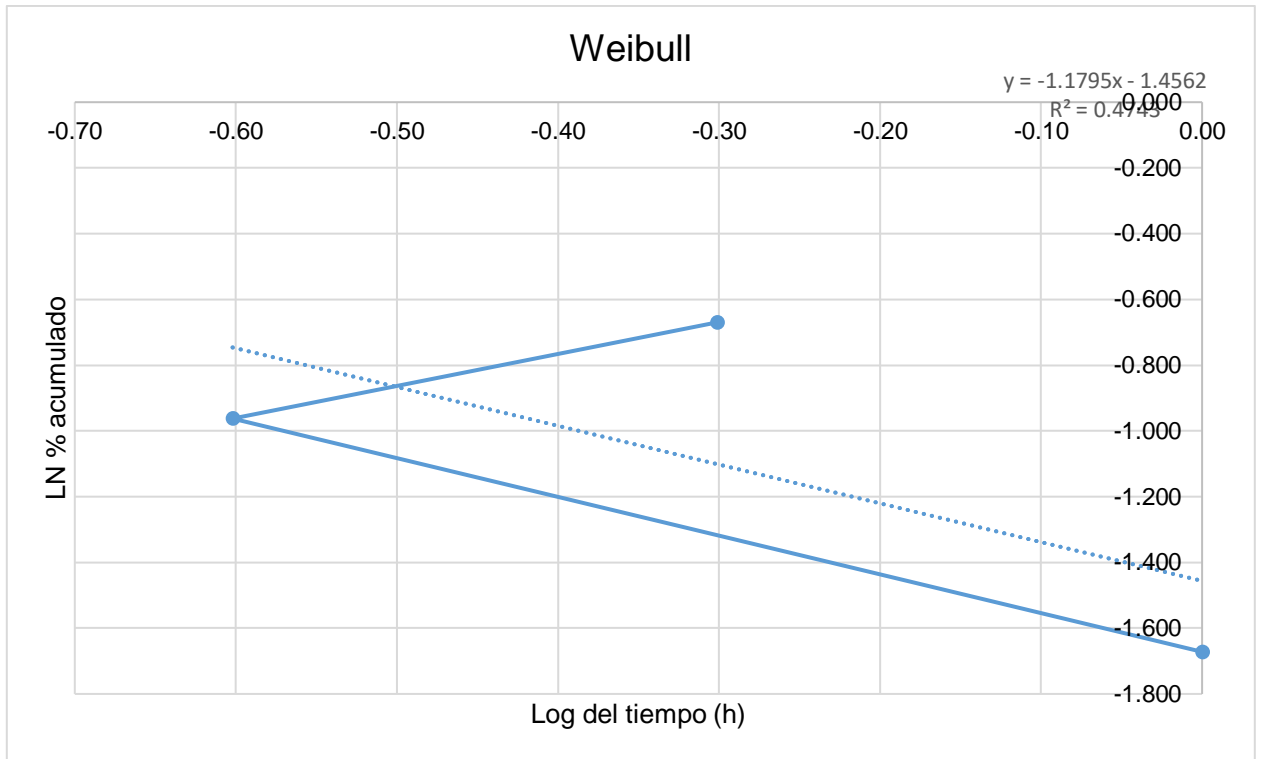


Figura 45. Gráfico de modelo de Weibull

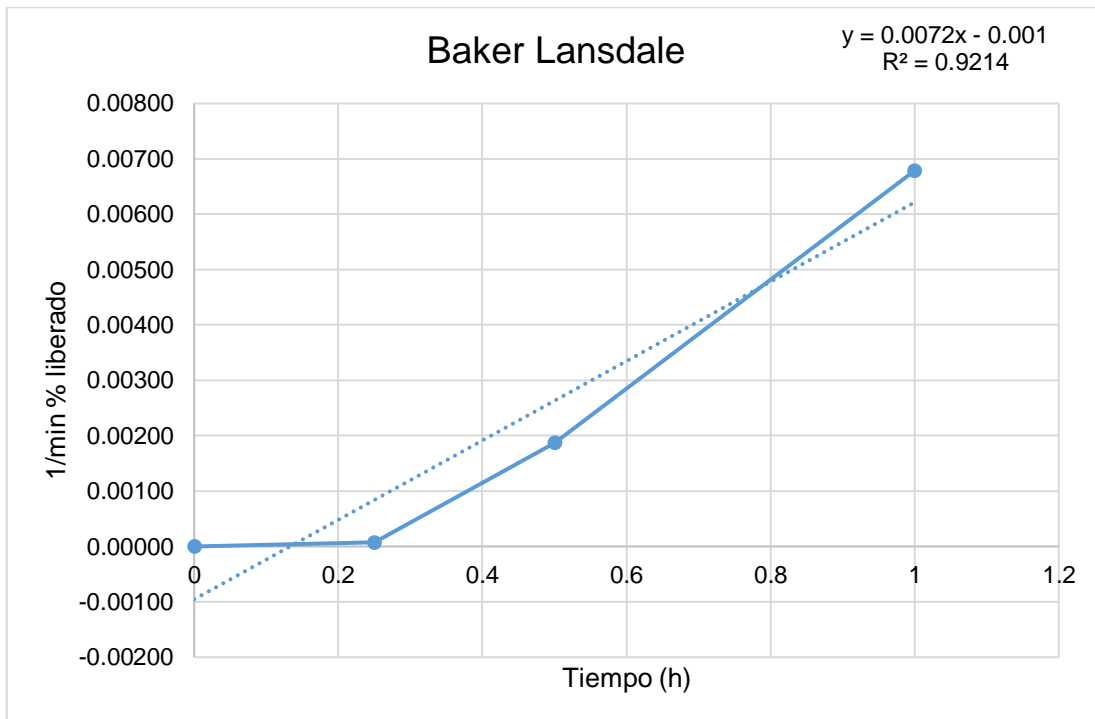


Figura 46. Gráfico de modelo de Baker Lansdale

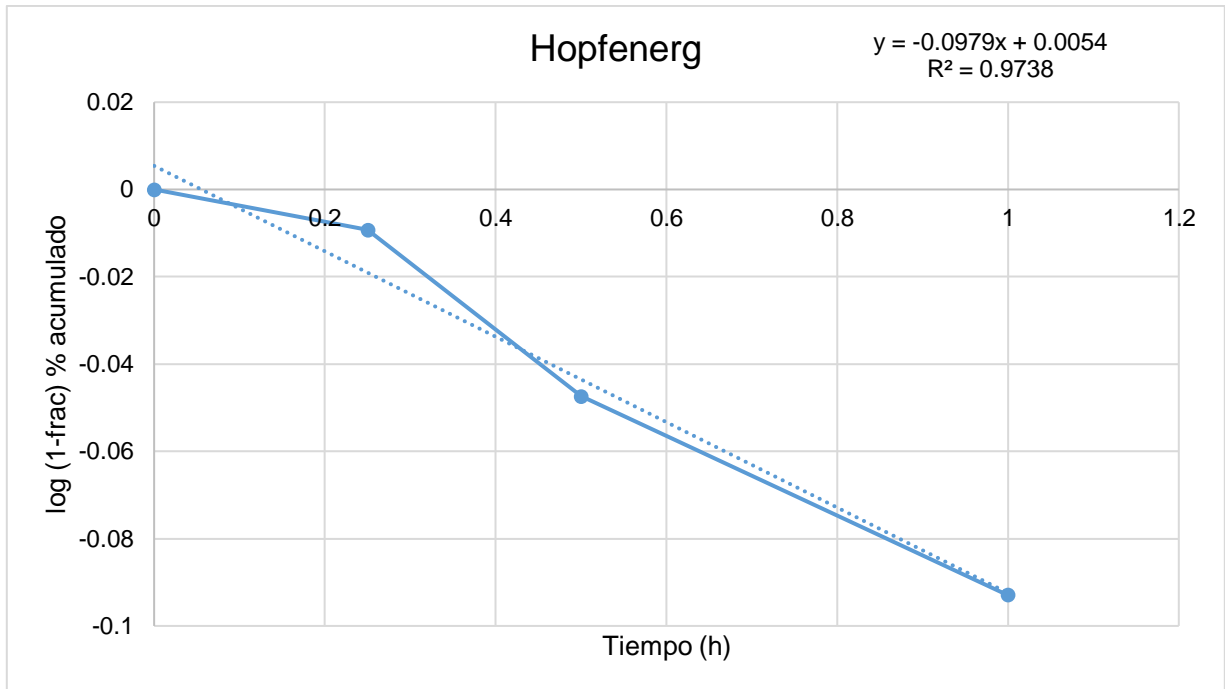


Figura 47. Gráfico de modelo de Hopfenberg

12.6 Pruebas reológicas en distintas proporciones.

12.6.1 Pruebas reológicas en una mezcla de lactosa-NLC con una proporción 1:1.

Tabla 16. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:1.

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.25	0.29	12.50	1.14	15.27
ML006	0.29	0.33	14.29	1.17	16.73
LH 200	0.25	0.33	25.00	1.33	11.90
LH201	0.20	0.29	30.00	1.43	17.40

Tabla 17. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:1 (réplica 2).

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.08	0.09	12.50	1.14	15.30
ML006	0.08	0.10	25.00	1.33	17.30
LH 200	0.08	0.11	30.00	1.43	8.90
LH201	0.08	0.10	25.00	1.33	16.30

Tabla 18. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:1 (réplica 3).

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.08	0.09	12.5	1.14	17.70
ML006	0.08	0.11	30.00	1.43	16.60
LH 200	0.08	0.12	37.50	1.60	9.50
LH201	0.08	0.11	30.00	1.43	17.50

12.6.2 Pruebas reológicas en una mezcla de lactosa-NLC con una proporción 2:1.

Tabla 19. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 2:1.

Tipo de lactosa	μ aparente (g/mL)	μ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.29	0.50	42.86	1.75	19.03
ML006	0.25	0.40	37.50	1.60	16.43
LH 200	0.22	0.33	33.33	1.50	17.23
LH201	0.29	0.36	20.00	1.25	22.19

Tabla 19. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:1 (réplica 2).

Tipo de lactosa	μ aparente (g/mL)	μ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.25	0.29	12.50	1.14	19.16
ML006	0.22	0.33	33.33	1.50	19.37
LH 200	0.22	0.33	33.33	1.50	25.15
LH201	0.25	0.40	37.50	1.60	22.70

Tabla 20. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 2:1 (réplica 3).

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.25	0.30	17.5	1.21	17.70
ML006	0.25	0.33	25.00	1.33	18.18
LH 200	0.20	0.29	30.00	1.43	21.56
LH201	0.25	0.33	25.00	1.33	21.04

12.6.3 Pruebas reológicas en una mezcla de lactosa-NLC con una proporción 1:2.

Tabla 21. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:2

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.17	0.18	8.33	1.09	14.83
ML006	0.17	0.20	16.67	1.20	17.64
LH 200	0.17	0.22	25.00	1.33	17.22
LH201	0.17	0.22	25.00	1.33	22.18

Tabla 22. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:2 (réplica 2).

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.17	0.18	8.33	1.09	14.70
ML006	0.17	0.21	20.00	1.25	17.30
LH 200	0.17	0.22	25.00	1.33	19.87
LH201	0.17	0.22	25.00	1.33	22.34

Tabla 23. Pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:2 (réplica 3).

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	índice de Carr (%)	índice de Hausner (%)	Ángulo de reposo (°)
ML001	0.17	0.19	11.7	1.13	17.70
ML006	0.17	0.22	25.00	1.33	16.60
LH 200	0.17	0.21	20.00	1.25	9.50
LH201	0.17	0.22	25.00	1.33	17.50

Tabla 24. Promedio de las pruebas reológicas de las diferentes lactosas con una proporción 1:2

Tipo de lactosa	ρ aparente (g/mL)	ρ compactada (g/mL)	Índice de Carr (%)	Índice de Hausner	Ángulo de reposo(°)
ML001	0.17	0.18	9.44	1.10	14.38
ML006	0.17	0.21	20.56	1.26	17.63
LH 200	0.17	0.22	23.33	1.30	10.46
LH201	0.17	0.22	25.00	1.33	15.70

12.7 Gráficos y cálculos de la masa media aerodinámica en una proporción 1:2 de ML001-NLC-CH.

Tabla 25. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de lactosa ML001.

1 ML001	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)	Peso (g) (ni)	%peso	NiXi	% peso acumulado
	0	96.00	9.00	0.10	6.67	0.90	6.67
	1	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	6.67
	2	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	6.67
	3	400.00	3.30	0.30	20.00	0.99	26.67
	4	400.00	2.10	0.12	8.00	0.25	34.67
	5	400.00	1.10	0.26	17.19	0.28	51.85
	6	400.00	0.70	0.08	5.33	0.06	57.19
	7	201.00	0.34	0.29	19.19	0.10	76.38
	Base	0.00	0.00	0.14	9.12	0.00	85.50
	Suma				1.28	85.50	2.58

Tabla 26. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de ML001 (réplica 2).

2 ML001	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)mm	Peso (g) (ni)	%peso	NiXi	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.14	9.33	1.26	9.33
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	9.33
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	9.33
	3.00	400.00	3.30	0.15	10.00	0.50	19.33
	4.00	400.00	2.10	0.18	12.00	0.38	31.33
	5.00	400.00	1.10	0.30	20.00	0.33	51.33
	6.00	400.00	0.70	0.18	12.00	0.13	63.33
	7.00	201.00	0.34	0.13	8.67	0.04	72.00
	Base	0.00	0.00	0.15	9.85	0.00	81.85
Suma				1.23	81.85	2.63	81.85

Tabla 27. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de ML001 (réplica 3).

3 ML001	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)mm	Peso (g) (ni)	%peso	NiXi	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.18	0.35	1.62	0.35
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	0.35
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	0.35
	3.00	400.00	3.30	0.26	17.33	0.86	17.68
	4.00	400.00	2.10	0.15	10.00	0.32	27.68
	5.00	400.00	1.10	0.18	11.89	0.20	39.58
	6.00	400.00	0.70	0.16	10.40	0.19	49.98
	7.00	201.00	0.34	0.20	13.33	0.07	63.31
	Base	0.00	0.00	0.16	10.58	0.00	73.89
Suma			1.28	73.89	3.25	73.89	

Tabla 28. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de ML006.

1 ML006	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)mm	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.15	1.34	9.91	9.91
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	9.91
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	9.91
	3.00	400.00	3.30	0.20	0.66	13.25	23.16
	4.00	400.00	2.10	0.15	0.32	10.00	33.16
	5.00	400.00	1.10	0.18	0.20	11.97	45.13
	6.00	400.00	0.70	0.34	0.24	22.67	67.79
	7.00	201.00	0.34	0.28	0.09	18.59	86.39
	Base	0.00	0.00	0.14	0.00	9.12	95.51
	Suma			1.43	2.84	95.51	95.51

Tabla 29. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de ML006 (réplica 2).

2 ML006	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.11	1.00	7.42	7.42
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	7.42
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	7.42
	3.00	400.00	3.30	0.24	0.80	16.07	23.49
	4.00	400.00	2.10	0.22	0.47	14.87	38.36
	5.00	400.00	1.10	0.19	0.21	12.63	50.99
	6.00	400.00	0.70	0.20	0.14	13.19	64.18
	7.00	201.00	0.34	0.29	0.10	19.20	83.38
	Base	0.00	0.00	0.03	0.00	2.00	85.38
	Suma				1.28	2.71	85.38

Tabla 30. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de ML006 (réplica 3).

3 ML006	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.25	2.25	16.67	16.67
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	16.67
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	16.67
	3.00	400.00	3.30	0.38	1.25	25.33	42.00
	4.00	400.00	2.10	0.23	0.49	15.65	57.65
	5.00	400.00	1.10	0.17	0.19	11.63	69.29
	6.00	400.00	0.70	0.05	0.04	3.33	72.62
	7.00	201.00	0.34	0.30	0.10	19.82	92.44
	Base	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	92.44
	Suma				1.39	4.33	92.44

Tabla 31. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de LH200.

1 LH200	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)mm	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0	96.00	9.00	0.24	2.16	16.00	16.00
	1	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	16.00
	2	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	16.00
	3	400.00	3.30	0.18	0.13	12.00	28.00
	4	400.00	2.10	0.24	0.50	16.00	44.00
	5	400.00	1.10	0.00	0.00	0.00	44.00
	6	400.00	0.70	0.25	0.17	16.37	60.37
	7	201.00	0.34	0.20	0.07	13.33	73.71
	Base	0.00	0.00	0.36	0.00	24.00	97.71
	Suma				1.47	3.03	97.71

Tabla 32. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de LH200 (réplica 2).

2 LH200	Numero	Cantidad de orificios	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0	96.00	0.30	2.70	20.00	20.00
	1	96.00	0.00	0.00	0.00	20.00
	2	400.00	0.00	0.00	0.00	20.00
	3	400.00	0.15	0.50	10.00	30.00
	4	400.00	0.18	0.38	12.00	42.00
	5	400.00	0.13	0.14	8.67	50.67
	6	400.00	0.40	0.28	26.67	77.33
	7	201.00	0.32	0.11	21.33	98.67
	Base	0.00	0.00	0.00	0.00	98.67
	Suma		1.48	4.10	98.67	98.67

Tabla 33. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de LH200 (réplica 3).

3 LH200	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)mm	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0	96.00	9.00	0.35	3.15	23.33	23.33
	1	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	23.33
	2	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	23.33
	3	400.00	3.30	0.18	0.59	12.00	35.33
	4	400.00	2.10	0.25	0.53	16.67	52.00
	5	400.00	1.10	0.10	0.11	6.67	58.67
	6	400.00	0.70	0.18	0.13	12.00	70.67
	7	201.00	0.34	0.16	0.05	10.65	81.31
	Base	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	81.31
Suma				1.22	4.56	81.31	81.31

Tabla 34. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de LH201.

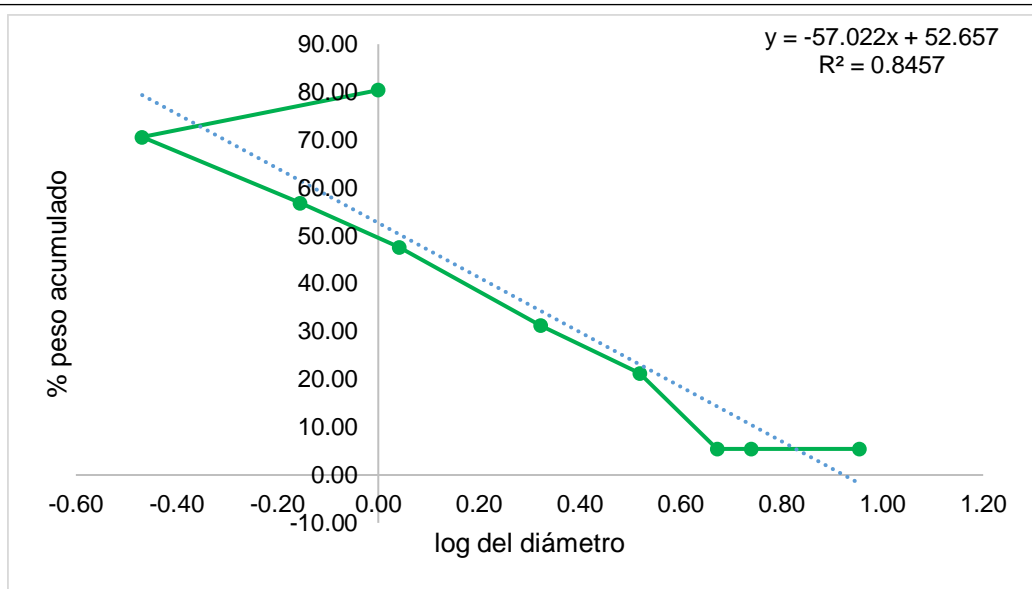
1 LH201	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.10	0.90	6.67	6.67
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	6.67
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	6.67
	3.00	400.00	3.30	0.28	0.92	18.67	25.33
	4.00	400.00	2.10	0.32	0.67	21.33	46.67
	5.00	400.00	1.10	0.20	0.22	13.33	59.99
	6.00	400.00	0.70	0.30	0.21	19.91	79.91
	7.00	201.00	0.34	0.20	0.07	13.33	93.24
	Base	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	93.24
Suma				1.40	2.99	93.24	93.24

Tabla 35. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de LH201 (réplica 2).

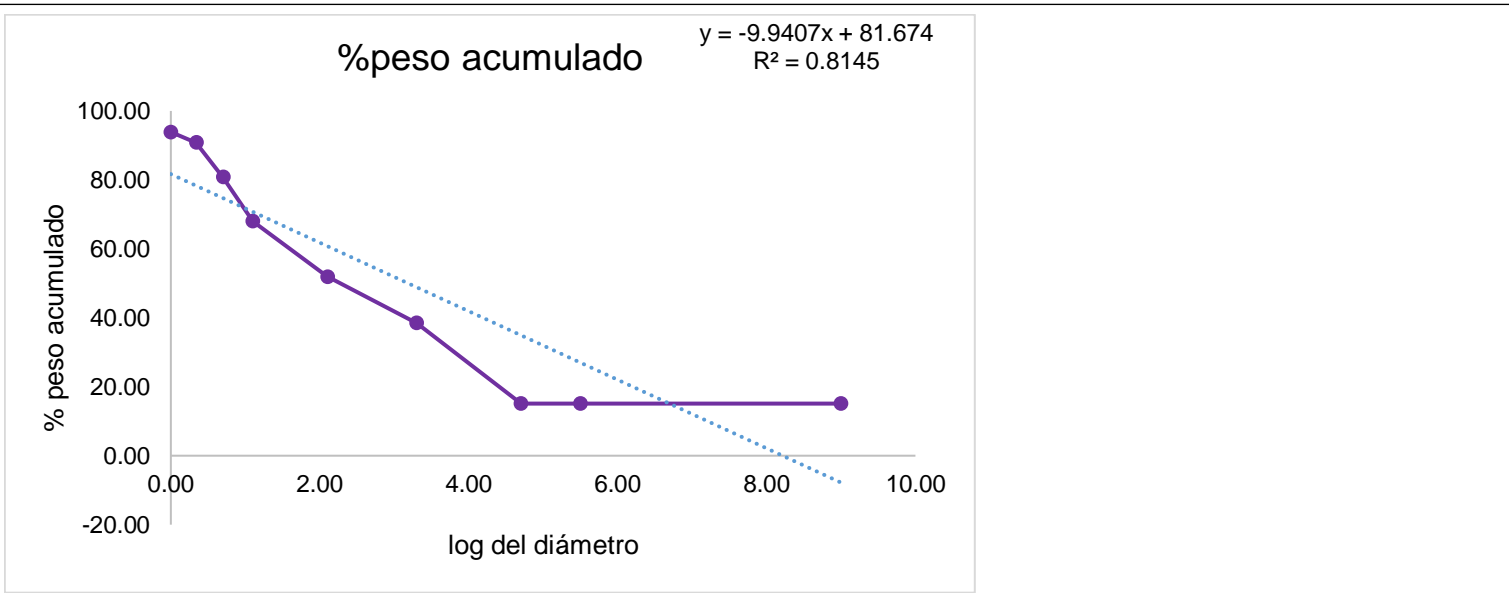
2 LH201	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.20	1.80	13.33	13.33
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	13.33
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	13.33
	3.00	400.00	3.30	0.18	0.58	11.79	25.12
	4.00	400.00	2.10	0.21	0.45	14.31	39.43
	5.00	400.00	1.10	0.18	0.20	12.00	51.43
	6.00	400.00	0.70	0.32	0.23	21.65	73.08
	7.00	201.00	0.34	0.28	0.09	18.59	91.67
	Base	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	91.67
Suma				1.38	3.35	91.67	91.67

Tabla 36. MMAD y GSD calculados por % peso acumulado de LH201 (réplica 3).

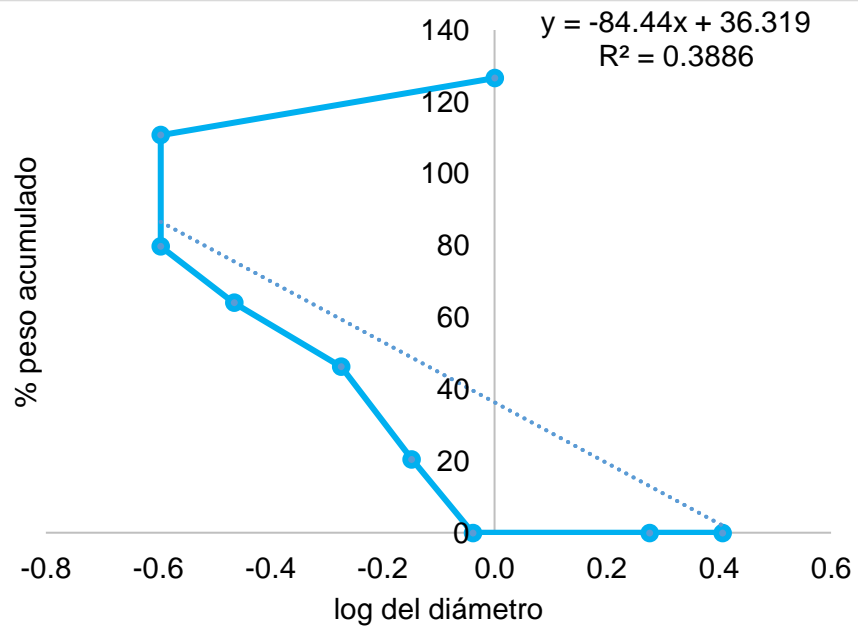
3 LH201	Numero	Cantidad de orificios	Diámetro (Xi)	Peso (g) (ni)	NiXi	%peso	% peso acumulado
	0.00	96.00	9.00	0.15	1.35	10.00	10.00
	1.00	96.00	5.50	0.00	0.00	0.00	10.00
	2.00	400.00	4.70	0.00	0.00	0.00	10.00
	3.00	400.00	3.30	0.20	0.66	13.33	23.33
	4.00	400.00	2.10	0.20	0.41	13.01	36.35
	5.00	400.00	1.10	0.13	0.15	8.83	45.17
	6.00	400.00	0.70	0.35	0.25	23.33	68.51
	7.00	201.00	0.34	0.20	0.07	13.21	81.72
	Base	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	81.72
	Suma			1.23	2.88	81.72	81.72



Despeje de fórmula	MMAD	X	Y	GSD	
Y	50%	84%	16%		
Y-52.66	-2.66	31.34	-36.66	X/Y	Raíz
Y-52.66/-57.02	0.05	-0.55	0.64	84%/16%	
Antilog	1.12	0.28	4.37	0.06	0.25



Despeje de fórmula	MMAD	X	Y	GSD	
Y	50%	84%	16%		
Y-73.41	-23.41	10.59	-57.41	X/Y	Raíz
Y-73.41/-9.43	2.48	-1.12	6.09	84%/16%	
Antilog	13.18	0.08	1230269	0.00	0.00



Despeje de fórmula	MMAD	X	Y	GSD	
Y	50%	84%	16%		
$Y - 36.319$	13.681	47.681	-20.319	X/Y	Raíz
$Y - 36.319 / 84.44$	0.162	0.565	0.24	84%/16%	$\sqrt{84/16}$
Antilog	1.452	3.67	1.74	2.109	1.45

12.8 Inducción de la contracción con carbacol 1 μ M

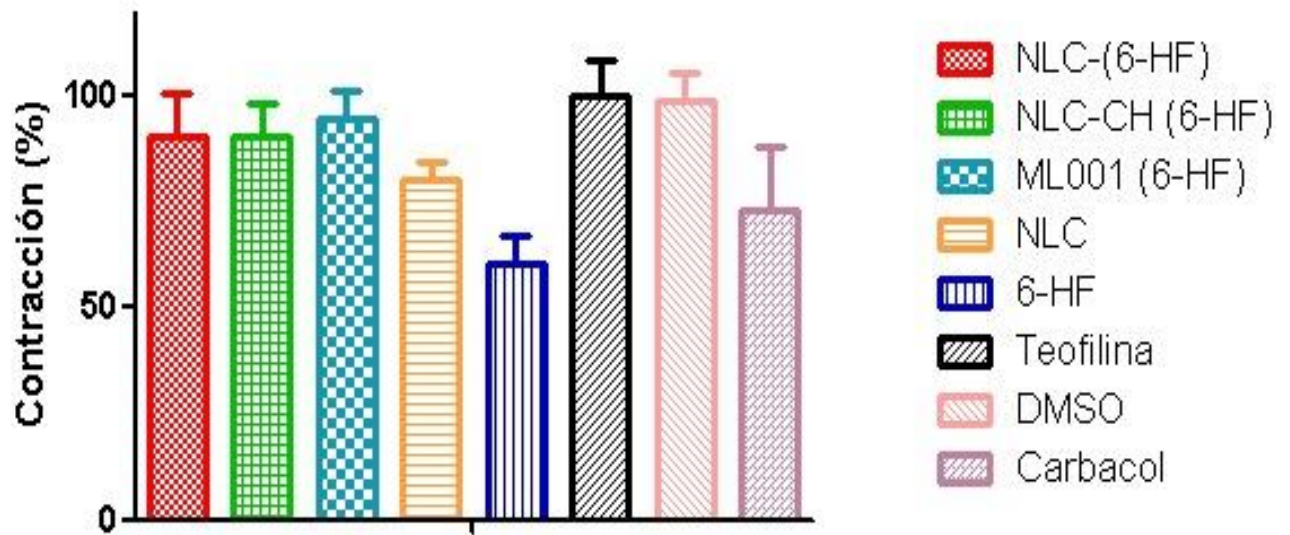


Figura 48. Contracción con carbacol 1 μ M después del ensayo

12.9 Constancias de participación

ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA



*A: Maria Fernanda Ahedo Arenas, Samuel Enoch Estrada Soto, Sergio Alberto Bernal Chávez,
Angélica Flores Flores, Sergio Alcalá Alcalá*

Por la presentación del Trabajo Libre:

Desarrollo de NLC para inhalación con MFA-6 con potencial uso antiasmático

**En el PRIMER CONGRESO VIRTUAL, LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL
DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

“Profesionales farmacéuticos unidos a distancia”

Celebrado del 9 al 11 de noviembre de 2020.

Dra Elizabeth Sánchez González

Presidenta



MASS Cynthia Espinosa Contreras

Directora de Ciencia y Tecnología

La Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán
otorga la presente

CONSTANCIA

A: María Fernanda Ahedo Arenas, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Por la presentación del poster "Encapsulación de 6-hidroxiflavona en acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)" en el marco del 1er. Foro Nacional de Ciencias Farmacéuticas realizado del 2 al 6 de septiembre en las instalaciones de esta Facultad.

Mérida Yucatán México, a 02 de septiembre de 2019



Dra. Zulema Osiris Cantillo Ciaú
Directora



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



A través de la Facultad de Farmacia

Otorga la presente:

CONSTANCIA

a:

L. F. Maria Fernanda Ahedo Arenas, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. Angélica Flores Flores, Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez, Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Por su participación en la presentación del cartel titulado "Obtaining of mucoadhesive nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 6-hydroxyflavone (6-HF)" 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 Faculta





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

A través de la Facultad de Farmacia

Otorga la presente:

CONSTANCIA

a:

L. F. María Fernanda Ahedo Arenas, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. Angélica Flores Flores, Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez, Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Por haber obtenido el 2do. Lugar a nivel maestría con el cartel titulado "Obtaining of mucoadhesive nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 6-hydroxyflavone (6-HF)" 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