



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

---



FACULTAD DE FARMACIA

**“Desarrollo farmacéutico de un polvo seco multiparticulado  
inhalable a base de NLC-vinorelbina como potencial tratamiento  
para cáncer pulmonar”**

**TESIS**

Que para obtener el título de Maestra en Farmacia

**PRESENTA**

QFB. Rebeca Salinas Cortés

**Director de Tesis:**

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

2022

# JURADO

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

**Nombre del alumno:** Rebeca Salinas Cortés

**Título de la tesis:** “Desarrollo farmacéutico de un polvo seco multiparticulado inhalable a base de NLC-vinorelbina como potencial tratamiento para cáncer pulmonar”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Dea Herrera Ruiz

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):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dra. Dea Herrera Ruiz  
Firma del miembro del jurado

18 de mayo, 2022  
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

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-05-18 16:51:58 | Firmante

qxY18lNd9l7ybTMfjQ85b7cicrx5VNmSs73QGruGF7J7oqcTwnBLcGD9j+wDLaviawqn12GEsJEeLMRN8Q/5NbCAfHsOzxuDSx8592m3lR/lqYjxOXVTu5RZgXva3mALGFscUabZND8iOu/51r63aAkpikHzM8fev7dOZ4aiPbLaKTg+oTbV+kbXqmbT3HSb7bqFI22Emu/VnNx50YVK0PcJ9AOaJtJrDfISW+9eC3SI3rBkBwlmxEQprBQults2TAdEIIrYKcVhijjK9eB MI5ZIWXgM8jEjexbF4Z4nQrP6F32D5jl0ar2MBsiQOOZisnYNAV3ZZZazvnWtvEMQ==

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



[KVgY7lQbE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/U3G8BJhjpJCLKEhXVH77sgW5mw9sLBz6>



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

**Nombre del alumno:** Rebeca Salinas Cortés

**Título de la tesis:** “Desarrollo farmacéutico de un polvo seco multiparticulado inhalable a base de NLC-vinorelbina como potencial tratamiento para cáncer pulmonar”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Angélica Meneses Acosta

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):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Dra. Angélica Meneses Acosta**  
\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

**24/06/2022**  
\_\_\_\_\_  
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

**ANGELICA MENESES ACOSTA | Fecha:2022-06-24 14:09:14 | Firmante**

N3STKfYasQuuHGBTb9n6GHnYT+Ljjan1nyC8/wbDtS0lJb7ew/5wUEkPu6GPXms+AwQ96Ep4azmpOfkSh3lcwHJdB4rwBn7eAHRlJCKSxwEeH1xWUJq/L9nErarqO5Rjpv4BHm8hC7wfGQCcyDEgWbjnCGzL25FPSjjoPEBgdghH+m1o6BdLn8mmrDgtv/K19Gmgq2SQXL0ABayRFTATfLrcc9AKTwxBUHW2AuGJwSgE23ZXKcia/9aJ5RYCmFoRzPQhc0nD UtVbgwpaP712ii9QTa0eXT9oXY6OLzJdav5HFbmt2jLjwmJLZ6alhdA8hD7wxVwWZbHihZLZ0NzHgg==

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



**Br4NJsP8o**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ladQ74z6zTiODyi4hKk6ItC5T7IFnV7X>



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

**Nombre del alumno:** Rebeca Salinas Cortés

**Título de la tesis:** “Desarrollo farmacéutico de un polvo seco multiparticulado inhalable a base de NLC-vinorelbina como potencial tratamiento para cáncer pulmonar”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** **Dra. María Josefa Bernad Bernad**

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

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
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

**MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD | Fecha:2022-05-30 14:41:42 | Firmante**

oHDY/rHqjT/Qi1G1tIANuLrkS9/dMOXrXCAM1bkiGo2WSKvIF3ExdlOBi4uEwD71AAyDGXaHYTFydfyvbByygBiQyAAppUXOD/uh25etlDsaMfm/OPhng4GcmtDPJR16IG2Tgmic5eZ2996jTRQ0gU8jmg9edZ/8PL7Z7Dus49pgvPxGIMh9CrLMV2NY6HNwWWW/Kmac6/Hlwg+gBXhwBqE0se4PYeQ1aFIA9wc/AXTlayuPlnSEUMYAbPbxYkF6IHtiDNKBKPkI4LAvWSGH9LVdUyh/nggniAqEZgazkZoJ4J5keRmnbOD7M8YfboXTUN568WiA4V+7iBHfEOEFy8Q==

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



[PyzhnuUE0](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/u7d0U1t3yDuPszJO5WALoYyYgZBBov1K>



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

**Nombre del alumno:** Rebeca Salinas Cortés

**Título de la tesis:** “Desarrollo farmacéutico de un polvo seco multiparticulado inhalable a base de NLC-vinorelbina como potencial tratamiento para cáncer pulmonar”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Gerardo Leyva Gómez

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

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
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

**GERARDO LEYVA GÓMEZ** | Fecha:2022-05-31 22:00:10 | Firmante

U1qJBCejudQkLbHd7qcOp6xATHtorKJmwkkLYFflwwTBMaDZkbz9409H1QM4poy4DPCI+sMsBQVYeC1eE455KRgEB3d4KP+K+UpagHTEifyPf5lpcmDWDm5b9VxWoRrN6hs2CY1PgIDT9hLrA4nw7w/nFFei8U1eXNsulJEmscs8cxQYQvjcRqttm+oM6opXRILEAI2Uzsq6+WTONLkqxn7jMYkiDhjHOBVUIHPi0xMiMr1xqlogm4feNC6fPlxJ6it2Fmp4g0EN8s0JJliX1XtxrZp3Ap8bfRsiM+VxtQPh1qUSzUwGpqN6qvRDgFZsPq2+vmE11rq6p3NTA2T5iA==

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



[XNO7oHmEQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RMTLNpBXvM1OIIAxeH6qZakzFKNOSTU5>



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

**Nombre del alumno:** Rebeca Salinas Cortés

**Título de la tesis:** “Desarrollo farmacéutico de un polvo seco multiparticulado inhalable a base de NLC-vinorelbina como potencial tratamiento para cáncer pulmonar”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Sergio Alcalá Alcalá

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

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
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

**SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2022-05-30 13:46:29 | Firmante**

bubsv9egCVg6zelDHZ6RGERmkojJ9Vwe50fYG1E8aXQc0pLG+bLMdj/3YgPbUq42hYL70PAIsCXPUUOHZw4A0BmO0yvEO/7X+7v50KPwmND0f7TQpUbWjgVDt/wVn2A+RTKtDjwjtjnxk16OkfZPpmqRJ8dToa0B2hHOXBrCQM08Dj5JcOYclYU8HnDi3XaXdbBli+h5ZhnWI/77cjnaWEXQ1zwWMW3xpONOHONQXkXyIScQJDxEoY2WY4TNjoXBUgJKn0BSUNM1Ap6TIQ8iLEbiHQiT5ZCyxt7saTUtlhBYbhU1WL4puwHOU5qtcs16tszuYMV+4wQSp3rMmaW1190A==

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



Mi6NVYLHD

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/OI5M1itzSXxDNNEp9mN9gi3JzEiOxYpd>



*No te rindas, aún estás a tiempo  
de alcanzar y comenzar de nuevo,  
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,  
liberar el lastre, retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo.*

*-Anónimo*

## **Lugar de trabajo**

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio 1 de investigación en Tecnología Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en Cuernavaca, Morelos México.

**DEDICATORIA**

A MIS PADRES

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (número 759598).

Agradezco al Dr. Sergio Alcalá Alcalá por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo el conocimiento que me deja y por dirigir siempre de la manera más atenta este proyecto. Gracias, porque a la academia le hace falta más asesores como usted.

Agradezco a mi comité tutor por sus comentarios y sugerencias que cada semestre fueron forjando esta investigación: Dra. María Josefa Bernad Bernad y Dr. Jesús Rivera Islas.

Agradezco a la Dra. Dea Herrera Ruiz y a sus alumnos por los estudios de Rayos X de polvos.

Agradezco a Helm de México por la donación de las lactosas para inhalación.

Además, quiero agradecer a Isabel Cruz, por haberme apoyado en el transcurso de la maestría y por pasar conmigo este periodo de pandemia en el laboratorio.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres, Víctor y Carolina, por su apoyo y por todo su amor incondicional. Porque me siguen enseñando con su ejemplo a ser valiente, a enfrentar la vida con todos sus problemas y dificultades confiando siempre en Dios. Gracias por tanto y espero ser algún día como ustedes.

Agradezco a mi hermano Víctor por ser mi cómplice, mi compañero y aún a veces (más de lo que quisiera admitir), mi maestro.

Agradezco a mis perros, Ciro, pero en especial a Bamsi, porque no hay día malo cuando están ellos.

*“Nos juzgan por el éxito de nuestros esfuerzos. Dios ve los esfuerzos en sí.”*

*-Charlotte Brontë*

## ÍNDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| INDICE DE FIGURAS.....   | 5  |
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | 7  |
| 1 RESUMEN.....   | 9  |
| 1.1 Abstract .....   | 10 |
| 2 INTRODUCCIÓN.....  | 11 |
| 3 MARCO TEÓRICO .....  | 12 |
| 3.1 El cáncer pulmonar.....                                      | 12 |
| 3.1.1 Tratamientos actuales: Retos y desventajas.....            | 14 |
| 3.2 Vinorelbina.....   | 15 |
| 3.3 Administración pulmonar de fármacos .....                    | 16 |
| 3.3.1 Anatomía de los pulmones .....                             | 16 |
| 3.3.2 Deposición de las partículas en la ruta pulmonar.....      | 18 |
| 3.3.3 Aclaramiento y excreción de las partículas inhaladas ..... | 20 |
| 3.4 Formulaciones y dispositivos para inhalación .....           | 20 |
| 3.5 Ingeniería de partículas .....                               | 23 |
| 3.6 Nanopartículas lipídicas.....                                | 24 |
| 3.6.1 Acarreadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC) .....       | 24 |
| 4 ANTECEDENTES.....  | 25 |
| 4.1 Tratamientos anticancerígenos por vía inhalatoria.....       | 25 |
| 4.2 NLC para administración pulmonar.....                        | 26 |
| 5 JUSTIFICACIÓN.....   | 27 |
| 6 HIPÓTESIS .....  | 28 |
| 7 OBJETIVOS .....  | 28 |
| 7.1 Objetivo general.....  | 28 |
| 7.2 Objetivos particulares .....                                 | 28 |
| 8 ESTRATEGIA METODOLÓGICA .....                                  | 29 |
| 8.1 Diagrama general de la metodología .....                     | 29 |
| 9 METODOLOGÍA .....  | 30 |
| 9.1 Materiales y equipos.....                                    | 30 |
| 9.1.1 Pruebas de solubilidad .....                               | 30 |
| 9.1.2 Preparación de los NLC.....                                | 31 |
| 9.1.3 Caracterización de los NLC .....                           | 33 |
| 9.1.4 Optimización de las NLC (Tamaño objetivo).....             | 33 |
| 9.1.5 Lavado de las partículas.....                              | 34 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 9.1.6   | Desarrollo y evaluación de un método analítico por UV para cuantificar vinorelbina ..... | 34 |
| 9.1.7   | Eficiencia de encapsulación.....   | 35 |
| 9.1.8   | Liofilización.....   | 36 |
| 9.1.9   | Rendimiento .....  | 36 |
| 9.1.10  | Capacidad de carga.....  | 36 |
| 9.1.11  | Recubrimiento con quitosán .....   | 37 |
| 9.1.12  | Caracterización física y del estado sólido de los NLC.....                               | 37 |
| 9.1.13  | Estudios de la formulación.....  | 38 |
| 9.1.14  | Estudios de eficacia <i>in vitro</i> .....   | 41 |
| 10      | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 43 |
| 10.1    | Pruebas de solubilidad.....  | 45 |
| 10.2    | Preparación de los NLC.....  | 46 |
| 10.3    | Caracterización de NLC.....  | 48 |
| 10.3.1  | Método de manufactura .....  | 48 |
| 10.4    | Desarrollo de un método analítico por UV para cuantificar vinorelbina .....              | 49 |
| 10.4.1  | Eficiencia de encapsulación.....   | 50 |
| 10.4.2  | Optimización de la formulación .....   | 51 |
| 10.4.3  | Optimización del proceso de obtención .....  | 53 |
| 10.5    | Recubrimiento mucoadhesivo.....  | 56 |
| 10.5.1  | Recubrimiento con quitosán .....   | 56 |
| 10.6    | Obtención de NLC como polvo seco.....  | 58 |
| 10.6.1  | Secado por liofilización .....   | 58 |
| 10.6.2  | Selección de crioprotectores.....  | 58 |
| 10.7    | Caracterización física.....  | 61 |
| 10.7.1  | Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....  | 61 |
| 10.7.2  | Rayos X de polvos.....   | 62 |
| 10.7.3  | Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....  | 64 |
| 10.7.4  | Estudios Espectroscópicos .....  | 65 |
| 10.8    | Rendimiento .....  | 67 |
| 10.9    | Capacidad de carga.....  | 68 |
| 10.10   | Estudios de eficacia <i>in vitro</i> .....   | 68 |
| 10.10.1 | Evaluación de la mucoadhesión.....   | 68 |
| 10.10.2 | Formulación de NLC como polvo seco para inhalación .....                                 | 70 |
| 11      | CONCLUSIONES .....   | 78 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 12    | ANEXOS .....   | 80  |
| 12.1  | Pruebas de solubilidad.....  | 80  |
| 12.2  | Modelo de ajuste del método de cuantificación espectrofotométrico.....           | 82  |
| 12.3  | Análisis de varianza: Tamaño de partícula.....                                   | 83  |
| 12.4  | Análisis de varianza: Eficiencia de encapsulación .....                          | 84  |
| 12.5  | Análisis de varianza: Índice de polidispersidad .....                            | 85  |
| 12.6  | Análisis de varianza: Potencial Z .....  | 86  |
| 12.7  | Verificación de tamaño de partículas optimizadas .....                           | 87  |
| 12.8  | Tamaño de partícula y potencial Z durante experimento de recubrimiento .....     | 87  |
| 12.9  | Diseño experimental del recubrimiento de partícula.....                          | 89  |
| 12.10 | Partículas recubiertas optimizadas.....  | 90  |
| 12.11 | Mediciones de tamaño de partícula SEM .....                                      | 91  |
| 12.12 | Rendimiento del proceso de obtención de los NLC-vinorelbina y capacidad de carga | 92  |
| 12.13 | Análisis por Kawakita .....  | 93  |
| 12.14 | Masa media aerodinámica y Desviación estándar geométrica .....                   | 95  |
| 13    | ABREVIATURAS .....   | 104 |
| 14    | BIBLIOGRAFÍA .....   | 105 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Representación de una tomografía computarizada de la localización de cáncer pulmonar asociado con enfermedad idiopática pulmonar (ILD).....  | 14 |
| Figura 2. A) Molécula de vinorelbina B) Molécula de tartrato de vinorelbina .....  | 15 |
| Figura 3. Anatomía de los pulmones.....  | 17 |
| Figura 4. Las partículas grandes se someten a la impactación en las vías áreas grandes, partículas más pequeñas se depositan por sedimentación gravitacional y las más pequeñas por difusión en los alveolos. .... | 18 |
| Figura 5. Deposición pulmonar de las partículas inhaladas de acuerdo al tamaño de partícula.....   | 19 |
| Figura 6. Tecnología DPI. ....   | 22 |
| Figura 7. Diferencia entre un SLN y un NLC. ....   | 25 |
| Figura 8: Aparato 1 USP: Impactador de cascada de Andersen .....   | 42 |
| Figura 9. Solubilidad de vinorelbina en lípidos y disolventes.....   | 46 |
| Figura 10. Solubilidad de vinorelbina y lípidos sólidos en disolventes. ....   | 47 |
| Figura 11. Barrido de vinorelbina de 200-600 nm .....  | 49 |
| Figura 12. Gráfica que representa el tamaño de partícula obtenido respecto a la concentración de quitosán y el tiempo de recubrimiento. ....   | 56 |
| Figura 13. Tamaño de partícula después de resuspender el liofilizado. ....   | 60 |
| Figura 14. Termogramas de excipientes y NLC. ....  | 62 |
| Figura 15. Difractograma de vinorelbina .....  | 62 |
| Figura 17. Difractograma de Mezcla física .....  | 63 |
| Figura 19. Difractograma de NLC-vinorelbina .....  | 63 |
| Figura 20. Imagen por microscopía electrónica de barrido de los NLC-vinorelbina. ....  | 64 |
| Figura 21. Imagen por microscopía electrónica de barrido de los NLC-vinorelbina en un campo amplio. ....   | 64 |
| Figura 22. Espectros infrarrojos de los NLC y excipientes .....  | 66 |
| Figura 23. Estructura del quitosán .....   | 67 |
| Figura 24. Estructura del ácido oleico .....   | 67 |
| Figura 25. Estructura del Compritol 888.....   | 67 |
| Figura 26. Efecto del cambio en el potencial Z de las partículas recubiertas con quitosán al 0.16%, 0.25% y 0.50%.....   | 69 |
| Figura 27. Perfiles de liberación de vinorelbina representado como porcentaje liberado acumulado vs tiempo. ....   | 75 |
| Figura 28. Gráfico del modelo lineal ajustado de la curva patrón vinorelbina (n=3).....  | 82 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 29. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (2:1) .....   | 93  |
| Figura 30. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (1:1) .....   | 93  |
| Figura 31. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (1:2) .....   | 94  |
| Figura 32. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (1:3) .....   | 94  |
| Figura 33. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1) ..... | 95  |
| Figura 34. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1).....                        | 96  |
| Figura 35. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:1) ..... | 97  |
| Figura 36. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1).....                        | 97  |
| Figura 37. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2) ..... | 98  |
| Figura 38. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2).....                        | 98  |
| Figura 39. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2) ..... | 99  |
| Figura 40. Gráfico log normal con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2).....                                       | 99  |
| Figura 41. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (2:1).....    | 100 |
| Figura 42. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (2:1).....                          | 100 |
| Figura 43. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:1).....    | 101 |
| Figura 44. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:1).....                          | 101 |
| Figura 45. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:2).....    | 102 |
| Figura 46. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:2).....                          | 102 |
| Figura 47. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:3).....    | 103 |
| Figura 48. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:3).....                          | 103 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Comparación de distintos dispositivos para inhalación.....   | 21 |
| Tabla 2. Diseño de experimentos para optimización de las partículas .....   | 33 |
| Tabla 3. Modelos matemáticos de liberación de fármaco.....  | 43 |
| Tabla 4. Excipientes utilizados en las pruebas de solubilidad .....   | 45 |
| Tabla 5: Resultados de miscibilidad entre lípidos líquidos y disolventes. ....  | 47 |
| Tabla 6: Caracterización por DLS de NLC-vinorelbina por tres métodos.....   | 48 |
| Tabla 6. Parámetros de evaluación del sistema analítico espectrofotométrico .....   | 50 |
| Tabla 7. Eficiencia de encapsulación (%) de vinorelbina en los NLC .....  | 50 |
| Tabla 8. Metas de las variables de respuesta .....  | 54 |
| Tabla 9. Combinación de niveles de factores que maximiza la deseabilidad del experimento.....   | 54 |
| Tabla 10. Características de las partículas optimizadas.....  | 55 |
| Tabla 11. Resultados de optimización para mantener una talla de 2000.0 con el recubrimiento.....  | 57 |
| Tabla 12. Evaluación cualitativa de resuspendabilidad .....   | 59 |
| Tabla 13. Resultados de la reología de polvos, las mezclas se encuentran en una proporción NLC-vinorelbina: lactosa en masa.....                  | 70 |
| Tabla 14. Análisis por Kawakita de las mezclas NLC-vinorelbina: lactosa. ....   | 72 |
| Tabla 15. Se muestran los resultados para la masa media aerodinámica (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD).....                           | 73 |
| Tabla 16. Parámetros del ajuste de los NLC-vinorelbina no recubiertos. ....   | 76 |
| Tabla 17. Parámetros del ajuste de los NLC-vinorelbina recubiertos .....  | 76 |
| Tabla 18: Resultados de solubilidad de vinorelbina en lípidos líquidos, lípidos sólidos y disolventes.....  | 80 |
| Tabla 19: Resultados de solubilidad de vinorelbina y lípidos sólidos en disolventes. ....   | 81 |
| Tabla 20. Análisis de varianza para tamaño de partícula .....   | 83 |
| Tabla 21. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación .....   | 84 |
| Tabla 22. Análisis de varianza para índice de polidispersidad (PDI) .....   | 85 |
| Tabla 23. Análisis de varianza para potencial Z.....  | 86 |
| Tabla 24. Desglose de las corridas de la verificación de las partículas optimizadas .....   | 87 |
| Tabla 25. Tamaño de partícula promedio a tres concentraciones de quitosán y tres tiempos de agitación.....  | 87 |
| Tabla 26. Valores de potencial Z para las partículas recubiertas con quitosán a diferentes concentraciones y tiempos.....                         | 88 |
| Tabla 27. Tabla de recopilación de los resultados de tamaño de partícula después del recubrimiento y potencial Z después de la mucoadhesión. .... | 89 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 28. Partículas recubiertas optimizadas.....   | 90  |
| Tabla 29. Partículas recubiertas optimizadas después de la mucoadhesión.....  | 90  |
| Tabla 30. Mediciones de tamaño de partícula SEM.....  | 91  |
| Tabla 31. Rendimiento del proceso de obtención de NLC-vinorelbina a partir del método de doble emulsión- evaporación de disolvente..... | 92  |
| Tabla 32. Resultados de la capacidad de carga de vinorelbina en el sistema NLC.....   | 92  |
| Tabla 33. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1).....                            | 95  |
| Tabla 34. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:1).....                            | 96  |
| Tabla 35. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:1).....                            | 98  |
| Tabla 36. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:3).....                            | 99  |
| Tabla 37. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (2:1).....                              | 100 |
| Tabla 38. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:1).....                              | 101 |
| Tabla 39. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:2).....                              | 102 |
| Tabla 40. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:3).....                              | 103 |

## 1 RESUMEN

El cáncer pulmonar es uno de los tipos de cáncer con mayor letalidad en el mundo. Tan sólo en México es la primera causa de muerte por cáncer. Uno de los fármacos más utilizados para la quimioterapia contra cáncer de pulmón de células pequeñas es la vinorelbina, la cual actualmente se administra de manera sistémica por vía intravenosa u oral. El desarrollo de sistemas de liberación de fármacos ha tenido un gran impacto en la creación de nuevas formulaciones por diferentes vías de administración. La vía por inhalación es una vía prometedora y novedosa para administrar quimioterapéuticos como la vinorelbina directo al pulmón para alcanzar un mayor efecto local y así disminuir los efectos adversos de las quimioterapias sistémicas. Los sistemas lipídicos nanoestructurados (NLC) tienen el potencial para ser formulados para esta vía de administración y ya han demostrado ser superiores a sus antecesores.

El objetivo de este proyecto fue obtener, caracterizar y evaluar un polvo seco para inhalación a base de un sistema multiparticulado de acarreador lipídico nanoestructurado cargado con vinorelbina. Los NLC fueron obtenidos con el método de doble emulsión-evaporación de disolvente, utilizando como lípido líquido al ácido oleico y como lípido sólido al compritol® 888. Se llevó a cabo un diseño de experimentos y se obtuvieron NLC-vinorelbina optimizados con una eficiencia de entrapamiento de  $27.09 \pm 4.96$  %, una capacidad de carga de  $15.24 \pm 1.82$ % con un rendimiento de  $63.49 \pm 0.66$ %. Adicionalmente, para otorgarle a los acarreadores propiedades mucoadhesivas, éstos fueron recubiertos con quitosán y se evaluó la mucoadhesividad.

Los NLC-vinorelbina recubiertos se obtuvieron como polvo seco por un proceso de liofilizado con trehalosa como crioprotector al 2.0% (m/v). Se caracterizaron físicamente por calorimetría diferencial de barrido, rayos X de polvos y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier.

El sistema se formuló con lactosas de grado para inhalación, Respitose® ML001 y Lactohale® LH200 y diversas formulaciones NLC-vinorelbina lactosa mostraron propiedades reológicas adecuadas para la aerolización y administración pulmonar.

Finalmente, se realizaron los estudios de liberación de fármaco *in vitro*, con el cual se obtuvo una liberación completa del fármaco a las 50 horas, ajustándose a un modelo matemático de Korsmeyer-Peppas.

## 1.1 Abstract

Lung cancer is one of the deadliest cancers in the world. Only in Mexico, it is attributed to be the first cause of death by cancer. One of the most used drugs in chemotherapy treatment for non-small cell lung cancer is vinorelbine, administered by intravenous or oral route. The development of drug delivery systems has greatly impacted the creation of new formulations for different routes of administration. Inhaled therapy is a promising and novel route for chemotherapeutics administration. This way, vinorelbine could be delivered straight to the lungs in order to achieve an enhanced local effect and therefore decrease adverse systemic chemotherapy effects. Nanostructured lipid carriers have the potential to be formulated for this route of administration and have long since been shown to have superior properties to their predecessors.

The objective of this work was to obtain, characterize and evaluate a dry powder for inhalation, based on a multiarticulate system, a nanostructured lipid carrier loaded with vinorelbine. The NLCs were obtained by a double-emulsion solvent evaporation method, using as liquid lipid oleic acid and as solid lipid Compritol® 888. An experimental design and analysis were carried out and NLC-vinorelbine loaded were obtained with an entrapment efficiency of  $27.09 \pm 4.96$  %, a loading capacity of  $15.24 \pm 1.82$ % with a process yield of  $63.49 \pm 0.66$ %. Additionally, these NLCs were coated with chitosan and their mucoadhesive properties were evaluated.

The coated NLC-vinorelbine were obtained as a dry powder by lyophilization using trehalose as cryoprotectant at 2.0% (w/v). They were later physically characterized by scanning differential calorimetry, powder X-ray, and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy.

The system was formulated with inhalation grade lactose, such as Respitose® ML001 and Lactohale® LH200. Several of these formulations NLC-vinorelbine: lactose showed suitable rheological properties for aerolization and its pulmonary delivery.

At last, in vitro drug delivery studies were carried out, with which a complete drug release at 50 hours, fitting a Korsmeyer-Peppas mathematical model of drug release was achieved.

## 2 INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo causando casi 10 millones de fallecimientos en el año 2020. En ese año, los más comunes fueron: de mama, pulmonar, colorrectal, de próstata, de piel y gástrico y los que causaron un mayor número de fallecimientos fueron los siguientes: pulmonar (1.8 millones), colorrectal (935 000), hepático (830 000), gástrico (769 000) y de mama (685 000).<sup>1</sup>

En México, el cáncer de pulmón se ubica por su frecuencia en el séptimo lugar, sin embargo, es el tipo de tumor más letal, por lo que se ubica como la primera causa de muerte por cáncer. Anualmente se registran nueve mil nuevos casos, de los cuales 85%, están relacionados con el consumo de tabaco.<sup>2</sup>

Por sus características clínicas y terapéuticas el cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos; cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), este último, constituye alrededor del 80% al 85% de los casos. El tratamiento a utilizar depende del cáncer detectado, siendo la cirugía, la quimioterapia y la quimiorradioterapia las opciones de tratamiento. En etapas avanzadas del cáncer la única opción de tratamiento es la combinación de radiación y quimioterapia.<sup>3</sup>

Los tratamientos farmacológicos actuales, causan efectos adversos como náusea, úlceras, aumento de riesgo en la cardiotoxicidad, riesgo de desarrollo de otro tipo de cáncer, citotoxicidad a células sanas, entre otros.<sup>3</sup> Lo anterior, debido a que su administración se realiza de manera sistémica, ya sea por formas farmacéuticas sólidas orales que sufren de baja biodisponibilidad y dosis altas frecuentes, o en gran medida por la administración de medicamentos parenterales por vía intramuscular e intravenosa, lo que representa en la mayoría de los casos una ruta invasiva y dolorosa para el paciente. Además, fármacos quimioterapéuticos indicados para este tipo de cáncer como el paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, cisplatino y la vinorelbina están asociados con efectos adversos como dolor, reacciones alérgicas en la piel y daño a los nervios.<sup>4</sup>

Para mitigar los problemas anteriores se han presentado al menos dos estrategias; el desarrollo de nuevos y novedosos sistemas de liberación de fármacos y el uso de vías de administración alternas a las convencionales. Tal es el caso de la vía pulmonar, la cual permite la administración tanto local y sistémica de fármacos a través del uso de sistemas de liberación inhalables, basados en tecnologías como los polvos secos para inhalación.

Para el cáncer pulmonar esta vía representa una mejor alternativa en su tratamiento. Por su parte, los sistemas de liberación de fármacos (SLF) son sistemas ampliamente investigados para mejorar y/o modificar la liberación y administración de fármacos, teniendo ventajas sobre los sistemas convencionales. Dentro de estos sistemas, se encuentran los multiparticulados, donde los micro y nanoestructurados destacan entre las más nuevas alternativas para formular como sistemas de administración por vía pulmonar, donde el tamaño y forma de las partículas inhaladas representan la mayor dependencia de la eficacia y un gran reto en su obtención y formulación.

En este sentido, los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) son la última generación de acarreadores lipídicos sólidos, que mejoran a sus antecesores en estabilidad y también se pueden utilizar para diversas vías de administración, incluida la pulmonar.

Es por ello que el desarrollo de un sistema de liberación modificada para vía pulmonar de vinorelbina supone una ventaja en el tratamiento de este tipo de cáncer, ya que podría alcanzarse el sitio de acción sin efecto sistémico y de forma más eficiente.

Así, en el presente trabajo, se desarrolló un acarreador lipídico nanoestructurado cargado con vinorelbina para después ser formulado y caracterizado como polvo seco para inhalación (DPI), y proveer una alternativa para tratar el cáncer de pulmón de tipo NSCLC.

### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 El cáncer pulmonar**

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de pulmón se encuentra entre los tipos de cáncer más mortales tanto para hombres como mujeres. Cerca de la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar fallecen durante el primer año a su diagnóstico, teniendo una probabilidad de supervivencia dentro de los siguientes cinco años del 17.8%.

El cáncer pulmonar ocurre cuando las células pulmonares mutan y proliferan. Existen varios factores que pueden provocar esta mutación. Generalmente ocurre cuando las células están expuestas a sustancias tóxicas por un tiempo prolongado. Fumar es la causa número uno para el desarrollo de cáncer pulmonar, ya que provoca cerca del 90% de los casos. <sup>5</sup>

La segunda causa es la exposición al radón, seguida de la exposición a asbesto, uranio, arsénico, cadmio, níquel y algunos derivados del petróleo. También, se ha evidenciado en

años recientes que la exposición a la contaminación ambiental ha aumentado el riesgo de padecer cáncer pulmonar. <sup>6</sup>

Por último, el factor genético es muy importante, ya que hay ciertos genes asociados a tener mayor riesgo de padecer cáncer. Los portadores con variaciones en la secuencia TP53 que también fuman, tienen hasta 3 veces más probabilidad de desarrollar cáncer pulmonar que los no fumadores y no portadores. <sup>7</sup>

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) comprende alrededor del 85% de todos los casos de cáncer pulmonar, mientras que el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) comprende el 15% de los casos restantes. El NSCLC se subclasifica a su vez en tres tipos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.<sup>7</sup>

Dentro de los subtipos de NSCLC, el adenocarcinoma es el más común, ya que comprende cerca del 40% de los diagnósticos. Surge del epitelio de las vías aéreas pequeñas de las células alveolares tipo II. Tiende a ocurrir en la periferia del pulmón y comparado a los otros subtipos de cáncer NSCLC tiene mayor probabilidad de ser diagnosticado antes de que se difunda por todo el pulmón.

En el caso de carcinoma de células grandes, comprende del 5% a 10% de los casos de cáncer y éste generalmente comienza en la parte central de los pulmones, algunas veces cerca de los nódulos linfáticos, dirigiéndose hacia el pecho. <sup>7</sup>

La aparición de cáncer de pulmón, está generalmente relacionada con otras enfermedades pulmonares como las enfermedades idiopáticas intersticiales (ILD), siendo una de las más comunes la fibrosis pulmonar. El 83.9% de los casos cáncer relacionados con las ILD se manifiestan como tumores periféricos, el 68.1% desarrollándose en las zonas fibróticas, el 58.7% manifestándose en los lóbulos inferiores.

En general, en pacientes con ILD, el cáncer pulmonar aparece un 64% en los lóbulos inferiores, un 53% en la interfase tejido sano-tejido enfermo con fibrosis y en un 31.8% en las áreas fibróticas (ver Figura 1). <sup>8</sup>

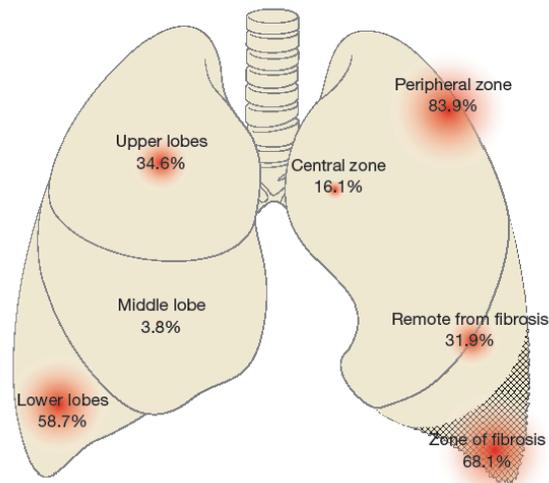


Figura 1. Representación de una tomografía computarizada de la localización de cáncer pulmonar asociado con enfermedad idiopática pulmonar (ILD). Obtenido de Naccache J. et al. <sup>8</sup>

### 3.1.1 Tratamientos actuales: Retos y desventajas

El tratamiento para el cáncer pulmonar depende de la localización y desarrollo del tumor. El tratamiento más consistente y exitoso para curar a pacientes de cáncer pulmonar es el quirúrgico, sin embargo, esta opción no siempre está disponible para todos los pacientes, ya que el tumor debe ser visto bajo los criterios médicos como operable. Normalmente se opera a los pacientes que tengan NSCLC en etapa I, II y IIIA para remover el tumor, no obstante, en la mayoría de los casos, se continúa con un tratamiento adicional, ya sea radioterapia o quimioterapia posterior a la cirugía.<sup>7 9</sup>

La quimioterapia es benéfica en pacientes con enfermedad avanzada e incluso en metástasis. Esta es la terapia más utilizada ya que cerca del 70% de los pacientes con cáncer de pulmón presentan la enfermedad en etapa avanzada al momento de su diagnóstico. Para la etapa más avanzada del cáncer, la etapa IV de NSCLC, se recomienda una quimioterapia en combinación.<sup>9</sup>

La radioterapia puede ser parte del tratamiento paliativo de pacientes que no respondieron a la cirugía y que no responden a la quimioterapia. También se puede usar para el NSCLC en etapas muy tempranas, donde el nódulo canceroso dentro del pulmón está localizado y definido, entonces se puede tratar con una radiación focalizada.<sup>9</sup>

Los alcaloides de la vinca son la segunda clase de fármacos anticancerígenos más utilizada. Estos fármacos son un subconjunto de fármacos obtenidos de la planta bigaro rosa (*Catharanthus roseus*). La actividad anticancerígena de estos alcaloides proviene de su mecanismo de acción: inhiben la proliferación celular a raíz de afectar la dinámica microtubular, interfiriendo con la polimerización de la tubulina, lo que provoca un bloqueo del proceso de la mitosis y llevando la célula a apoptosis.<sup>10</sup>

### 3.2 Vinorelbina

Uno de los alcaloides de la vinca más utilizados específicamente para el cáncer NSCLC es la vinorelbina y ha demostrado ser consistente y eficaz. La terapia con este fármaco consiste en la administración de 30 mg/m<sup>2</sup> en infusión intravenosa durante 6-10 minutos por semana.<sup>11</sup>

La vinorelbina base presenta baja solubilidad acuosa (SCB clase II), tiene un tiempo de vida media de entre 27.7 a 43.6 horas. Su solubilidad acuosa es de apenas 0.0122 mg/mL, tiene un peso molecular de 778.9 g/mol, un coeficiente de partición Log P de 4.39 y tiene un pKa1 de 8.66 y un pKa2 de 10.87 Su estructura química se puede apreciar en la Figura 2.<sup>12</sup>

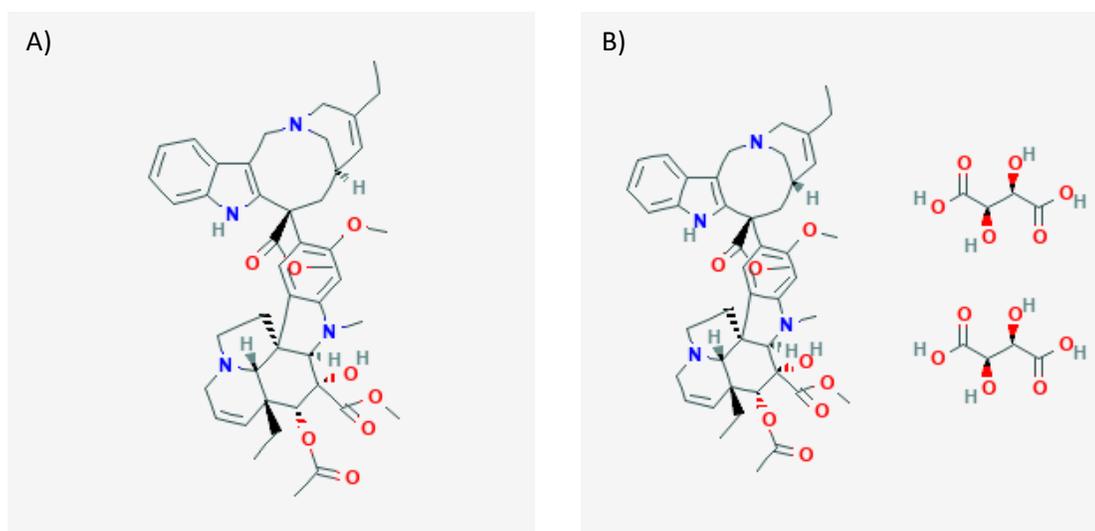


Figura 2. A) Molécula de vinorelbina B) Molécula de tartrato de vinorelbina. Obtenido de Pubchem.<sup>13</sup>

Este fármaco se encuentra en formulación oral como Navelbine en cápsulas blandas de 20 y 30 mg y principalmente solución inyectable para la vía intravenosa de 10 y 50 mg/mL, sin embargo, estas formas farmacéuticas presentan las desventajas previamente mencionadas, así que, actualmente no existe una forma farmacéutica comercial que explote toda su eficacia sin que se presenten fuertemente los efectos adversos. <sup>14</sup>

### **3.3 Administración pulmonar de fármacos**

La administración pulmonar de fármacos ha tomado gran interés en la medicina, debido a que los pulmones ofrecen muchas ventajas como vía de administración ya que son capaces de absorber fármacos tanto para tratamiento local como para el sistémico, debido a la alta permeabilidad y gran área superficial (aproximadamente entre 70 a 140 m<sup>2</sup> en adultos), además de que poseen una alta vascularidad. Otras ventajas adicionales son la relativamente baja actividad enzimática y su capacidad de evitar el metabolismo de primer paso. <sup>15</sup>

Por estas razones, esta vía de administración está reportada en el tratamiento de enfermedades respiratorias como el asma, la fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los fármacos generalmente aplicados por esta vía son corticoesteroides, beta-simpaticomiméticos, antagonistas muscarínicos y antibióticos. <sup>16</sup>

A través de esta vía de administración, se alcanzan concentraciones de fármaco más altas en los pulmones cuando se administran directamente hacia su objetivo. Como resultado, dosis considerablemente más bajas pueden ser terapéuticamente equivalentes o incluso superiores a dosis más altas administradas en la terapia sistémica; al mismo tiempo, se reduce el riesgo de efectos secundarios. Esto significa que, los efectos secundarios más altos están típicamente asociados con la administración de dosis por vía oral o intravenosa.

17

#### **3.3.1 Anatomía de los pulmones**

Los pulmones son un objetivo atractivo para la administración pulmonar de fármacos en la forma de diversos sistemas de liberación.

Los pulmones son el órgano encargado del intercambio gaseoso y de proveer el oxígeno a las células del cuerpo. Consisten de un total de 5 lóbulos, el pulmón derecho consiste de

tres y el izquierdo de dos. El interior está comprendido de bronquios y pasajes de aire más pequeños, alveolos, vasos sanguíneos y tejido linfático (ver Figura 3).

Los bronquios se subdividen a su vez en bronquios primarios, secundarios, bronquiolos y finalmente los alveolos. En total, los pulmones tienen más de 300 millones de alveolos que junto con los capilares forman una red de 280 billones de capilares, brindando un área superficial de casi 70 m<sup>2</sup> disponible para el intercambio gaseoso con la sangre.

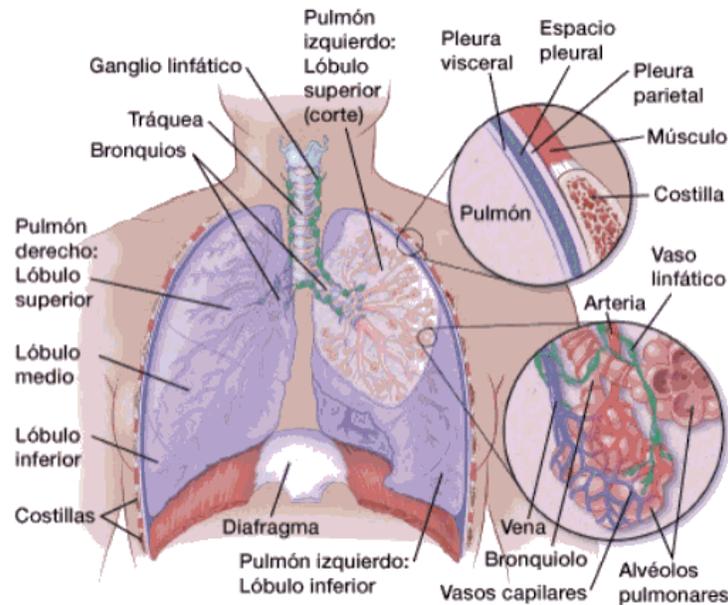


Figura 3. Anatomía de los pulmones. Obtenido de la American Cancer Society <sup>18</sup>

La superficie de las vías respiratorias intrapulmonares está controlada por tipos de células secretoras y ciliadas. Estas últimas producen mucus de diferentes composiciones y se subclasifican basadas en su apariencia microscópica, incluyendo células serosas, neuroendocrinas, mucina-calciformes y células CCSP-expresoras secretoras (Club cell secretory protein). El mucus de las vías respiratorias representa una secreción multicomponente que se puede describir como un hidrogel biológico compuesto de agua, glicoproteínas polimerizantes de mucina (MUC5B y MUC5A), un amplio rango de moléculas antimicrobianas (defensinas, lisozima), componentes celulares (incluyendo ácidos nucleicos y queratina) y factores TFF (trefoil factors). <sup>19</sup>

En las vías respiratorias sanas, la MUC5B es la mucina secretora dominante en las glándulas submucosas y en la superficie del epitelio, mientras que la MUC5AC se produce

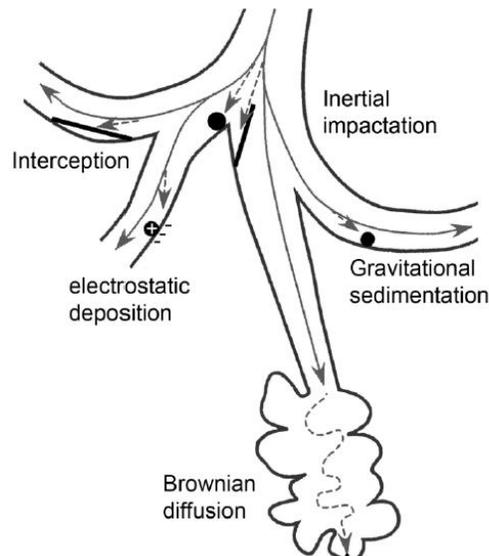
predominantemente en el recubrimiento del epitelio proximal de las vías aéreas; sin embargo, ninguna se expresa a nivel de los bronquiolos terminales, lo cual sugiere que el intercambio gaseoso requiere de una zona libre de mucinas, pero rica en tensoactivos para proteger los alveolos adyacentes. <sup>19</sup>

### 3.3.2 Deposición de las partículas en la ruta pulmonar

La efectividad de la medicación inhalada radica en la relación con la cantidad de fármaco que logre depositarse más allá de la región orofaríngea, con el lugar en que se produzca el depósito y con la distribución uniforme o no del mismo.

El tamaño y la forma de las partículas son los principales factores que van a condicionar el depósito de cualquier partícula en los pulmones. El tamaño se define mediante lo que se denomina diámetro de la masa media aerodinámica (MMAD). El MMAD divide a la distribución del aerosol en dos y se define como el diámetro al cual el 50% de las partículas de ese aerosol son mayores en masa y el otro 50% son menores. <sup>20</sup>

En función de su tamaño y forma, las partículas pueden depositarse mediante tres mecanismos: impactación, sedimentación y difusión (ver Figura 4). <sup>21</sup>



*Figura 4. Las partículas grandes se someten a la impactación en las vías aéreas grandes, partículas más pequeñas se depositan por sedimentación gravitacional y las más pequeñas por difusión en los alveolos. Obtenido de Fröhlich E. et al. <sup>22</sup>*

La impactación es el fenómeno físico por el que las partículas de un aerosol tienden a continuar con su trayectoria cuando transitan por la vía aérea. Las partículas se ven afectadas por el flujo de aire y de su dirección lo que hace que choquen contra la pared de la vía aérea.

La sedimentación es el fenómeno físico por el cual las partículas con una masa suficiente se depositan por acción de la gravedad cuando el tiempo de permanencia en la vía aérea es suficientemente largo. La difusión Browniana es el fenómeno por el cual las partículas de un aerosol se desplazan de forma errática de un sitio a otro de las vías aéreas cuando alcanzan los espacios alveolares en donde la velocidad del aire es prácticamente despreciable. Estas partículas por lo general no llegan a depositarse y son expulsadas nuevamente al exterior.<sup>22</sup>

En cuanto a la deposición de las partículas respecto a su tamaño, en humanos, las partículas inhaladas con un diámetro mayor a  $5 \mu\text{m}$  se depositan en la nariz y garganta, mientras que las partículas entre  $1 \mu\text{m}$  a  $5 \mu\text{m}$  se depositan en los bronquios primarios y secundarios vía impactación a causa de las fuerzas gravitacionales. Las partículas menores a  $1 \mu\text{m}$  alcanzan los bronquios terciarios y los bronquiolos vía sedimentación por la gravedad. Las partículas de tamaño menor a  $0.5 \mu\text{m}$  difunden y se depositan vía movimiento Browniano en los alveolos (ver Figura 5).<sup>23</sup>

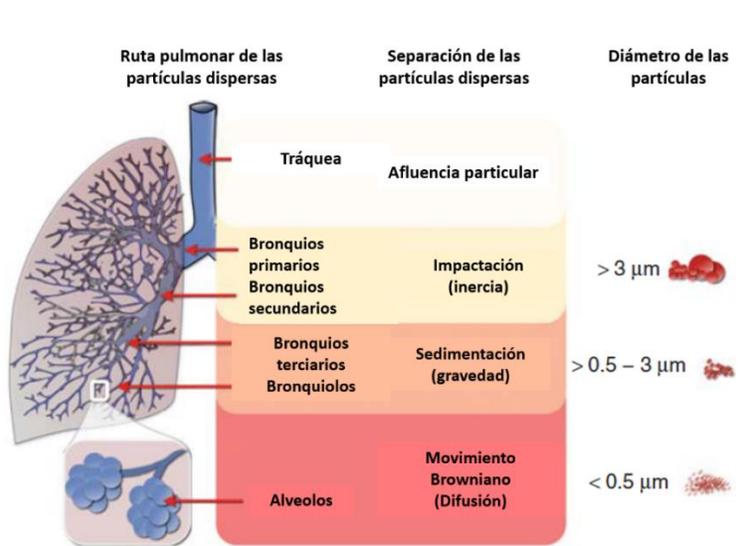


Figura 5. Deposición pulmonar de las partículas inhaladas de acuerdo al tamaño de partícula.

Modificado de Klinger et al.<sup>23</sup>

Para los sistemas de inhalación multiparticulados, la sedimentación es el método más atractivo para la deposición de partículas. Estos sistemas, al ser liberados del dispositivo para inhalación, forman agregados que poseen suficiente masa para sedimentarse y quedarse por un tiempo prolongado en la región bronquial.

Otros factores importantes en el mecanismo de deposición de las partículas son la frecuencia de respiración, la humedad, la velocidad de aire, el tamaño de partícula y su geometría junto con su morfología.<sup>23</sup>

### **3.3.3 Aclaramiento y excreción de las partículas inhaladas**

Las vías respiratorias superiores (desde la tráquea hasta los bronquios terciarios) están recubiertos de una gruesa película de mucus, que actúa como una protección para atrapar y eliminar partículas extrañas al medio. Los movimientos mucociliares eliminan las partículas ajenas inmediatamente antes de que puedan llegar a la parte baja de los pulmones.

En cambio, en la parte baja y profunda de los pulmones, es decir en la región alveolar, el mecanismo es más complejo. Junto con el recubrimiento alveolar, las uniones estrechas presentes en las células epiteliales sirven como una primera barrera para que ocurra el transporte. Las proteínas de transporte juegan un papel vital en el transporte de fármacos vía absorción o difusión pasiva que depende de la naturaleza del fármaco.

Otro aspecto importante de esta región, es el aclaramiento de moléculas por los macrófagos alveolares. Entonces, las moléculas que son capaces de cruzar la barrera son captadas por las células epiteliales o fagocitadas por los macrófagos alveolares.<sup>17</sup>

A pesar de los avances en el desarrollo de las formulaciones para administración pulmonar, aún falta información respecto al transporte, aclaramiento y captación celular en el epitelio alveolar, sobre todo de aquellos en estado de enfermedad.

## **3.4 Formulaciones y dispositivos para inhalación**

Se han desarrollado numerosos dispositivos de inhalación, como son: el inhalador en polvo seco (DPI), nebulizador, inhalador presurizado de dosis medida (pMDI) e inhaladores de

niebla fina. Los pDML y los nebulizadores son aerosoles de base líquida; los pDML requieren de propelente como los hidrofluoroalcanos y los nebulizadores no necesitan propelente, pero vienen en solución y suspensión para luego ser atomizados en pequeñas gotas. Un nebulizador ideal debe mantener la estabilidad del fármaco y no debe alterar su formulación. Los factores que afectan la eficiencia de la solución nebulizadora son el pH, la viscosidad, la tensión superficial, la concentración de fármaco y la osmolaridad. <sup>16</sup>

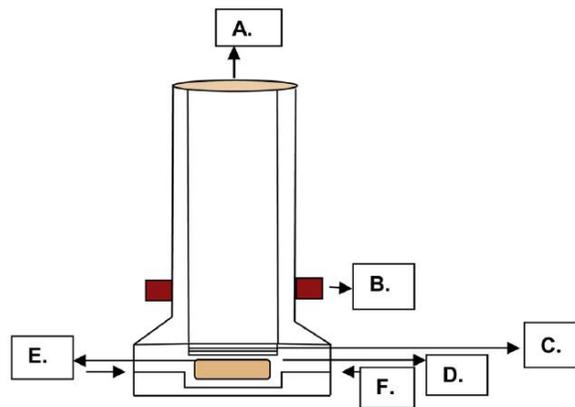
El desarrollo de los DPI se originó para sobreponerse a la actuación deficiente de coordinación-inhalación de los pacientes en los tratamientos como el asma y el EPOC. Las ventajas de los DPI incluyen alta estabilidad, no son invasivos, pueden mostrar un perfil de liberación sostenido, mecanismo de acción rápido (del dispositivo) y no necesita propelentes en la formulación. Los DPI son más convenientes de usar y no requieren de almacenamiento en frío ni que se reconstituyan antes de la administración. Normalmente el fármaco a administrar se mezcla con excipientes no respirables como la lactosa. <sup>16</sup>

Comparados a los nebulizadores, los DPI son capaces de liberar dosis de fármaco en un periodo corto de tiempo (menos de un minuto), además como los DPI solo se pueden activar con el flujo inspiratorio del paciente por algunos segundos, las concentraciones de fármaco en el aire sólo son consecuencia de la exhalación y son prácticamente despreciables, por lo tanto, no hay contaminación en el aire comparado a los nebulizadores.<sup>24</sup> Las características de los dispositivos para inhalación mencionados se encuentran resumidos en la Tabla 1.

| <b>Inhalador en polvo seco (DPI)</b>             | <b>Nebulizador</b>  | <b>Inhalador presurizado de dosis medida (pMDI)</b>                     |
|--|---|---|
| Polvo seco (alta estabilidad)                    | Aerosol de base líquida   | Aerosol de base líquida   |
| Fácil administración (coordinación-inhalación)   | No necesita propelente  | Presentación en solución o suspensión                                   |
| Mecanismo de acción rápida                       | Se necesita tener control sobre factores como el pH, viscosidad, tensión superficial, concentración del fármaco, osmolaridad. | Requiere propelente (hidrofluoroalcanos)                                |
| No necesita propelente                           | Sólo el 10% de la dosis inhalada llega a las vías respiratorias bajas.  | Se necesita una adecuada coordinación-inhalación por parte del paciente |
| No requiere almacenamiento en cadena de frío     |   |   |
| No necesitan reconstituirse                      |   |   |
| Deposición pulmonar profunda (partículas 1-5 µm) |   |   |
| Eficiencia de deposición (70%)                   |   |   |

*Tabla 1. Comparación de distintos dispositivos para inhalación*

En general, los DPI proveen de una mayor estabilidad fisicoquímica y una deposición pulmonar más profunda utilizando la respiración normal del paciente. Además, no requieren almacenamiento en cadena fría, ni su reconstitución para dosificarse. Los DPI generalmente se formulan como una sola fase, la cual consta de una mezcla de partículas. Reducen la tasa de degradación química o la posibilidad de alguna reacción con superficies de contacto comparado con las formulaciones en suspensión. Otras ventajas, de estos sistemas incluyen el potencial para liberar una pequeña o mayor masa de fármaco por inhalación. Los elementos que conforman un DPI se muestran en la Figura 6.<sup>25</sup>



*Figura 6. Tecnología DPI. A: Pieza donde se coloca la boca y ocurre la liberación del fármaco. B: Botón de acción del dispositivo. C: Filtro que cambia con la resistencia del flujo interno. D: Cámara donde va la cápsula con el polvo seco. F: Entrada de aire. Obtenido de Chandel *et al.*<sup>26</sup>*

En general, las formulaciones para inhalación se enfrentan a muchos retos que dificultan el diseño de un aerosol. Un reto muy importante es la producción eficiente de partículas que puedan ser usadas desde el dispositivo. Otro reto es que los pacientes tienen maneras de inhalar diferentes, lo cual somete a los aerosoles a variables de velocidad del aire y duración de la inhalación y, por último, la diferencia en la geometría entre diferentes individuos, así como las diferencias en el estadio de las enfermedades pulmonares que pueden modificar la anatomía y los patrones de respiración pulmonares que afectan finalmente a la distribución espacial de las partículas.<sup>27</sup>

### 3.5 Ingeniería de partículas

El objetivo de la ingeniería de partículas es el de diseñar partículas con atributos deseables para una liberación óptima a los pulmones, así como mostrar una biodisponibilidad máxima. Estos atributos incluyen: una distribución de tamaño estrecha, estabilidad, alta dispersabilidad y la capacidad de controlar la cinética de liberación de fármacos. En un nivel práctico, un proceso de ingeniería de partículas debe reducir la complejidad de manufactura, disminuir costos y minimizar el impacto ambiental.

El parámetro fundamental usado para caracterizar una partícula inhalable es el diámetro aerodinámico ( $d_a$ ). Este se define como el diámetro de una esfera de diámetro geométrico  $d_g$  y una densidad  $\rho$  que alcance la misma velocidad de sedimentación como una partícula no esférica.<sup>27</sup>

El progreso del campo de la administración pulmonar requiere de un continuo desarrollo en las tecnologías de ingeniería de partículas. Estas tecnologías abarcan desde técnicas de procesamiento tradicionales como el “spray drying” y molienda (milling) a técnicas más avanzadas como el encapsulamiento de fármacos con micropartículas diseñadas con geometrías controladas. Las formulaciones basadas en nanopartículas han emergido en este campo de manera importante.

El progreso en la ingeniería de partículas puede llevar a tener un mayor control sobre el tamaño aerodinámico de la partícula, que dirige a tener una dosificación y administración pulmonar más precisa.<sup>27</sup>

El “milling” o molienda es el proceso mecánico de reducir partículas grandes a un polvo micro o nanométrico. Esta molienda se puede lograr con “jet milling” o con molienda con molino de bolas vía seca o húmeda. Ambas técnicas producen partículas menores a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las propiedades físicas de los polvos pueden variar dependiendo en la técnica de molienda utilizada, lo cual a su vez tiene un impacto significativo en la aerolización.

El spray drying fue una tecnología innovadora desde 1940 como una alternativa prometedora para fabricar nano y micropartículas con características de dispersión y flujo para administración pulmonar y desde entonces se han derivado más técnicas de ésta. Sin embargo, además de las propiedades aerodinámicas de las partículas, es necesario considerar cómo la ingeniería de partículas afecta la tasa de liberación del fármaco administrado.

Las formulaciones basadas en sistemas nanoparticulados, han ganado interés en el área por mostrar una cinética de liberación mejorada. Las formulaciones de este tipo poseen propiedades físicas únicas debido a su tamaño, por ejemplo, la solubilidad de saturación de los fármacos formulados en nanopartículas puede ser mayor que la del fármaco sin estar nanoparticulado.<sup>27</sup>

### **3.6 Nanopartículas lipídicas**

Existe un gran número de sistemas particulados de suministro o acarreamiento de fármacos dentro de los que se encuentran las nanopartículas lipídicas. En las últimas décadas, los sistemas de liberación lipídicos nanoparticulados han ofrecido una favorable alternativa como sistemas acarreadores que favorecen los efectos de absorción de los fármacos encapsulados. Dentro de estos sistemas, se encuentran los liposomas, los niosomas, las nanoemulsiones, las partículas sólidas lipídicas (SLN) y los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC).<sup>28</sup>

La disponibilidad de excipientes lipídicos dentro de los estándares de seguridad y regulatorios, junto con su capacidad de mejorar la biodisponibilidad de fármacos han revolucionado los sistemas de liberación basados en lípidos.<sup>29</sup>

#### **3.6.1 Acarreadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC)**

Los NLC, son la última generación de acarreadores lipídicos que surgieron para mejorar la estabilidad y la capacidad de carga debido a la estructura de su composición. Están compuestos de dos lípidos, uno líquido y uno sólido que forman una matriz no cristalina, la cual previene los problemas de encapsulación de sus antecesores las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN).

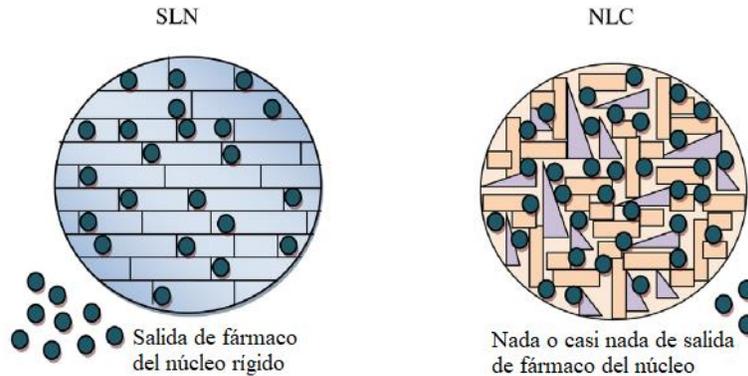


Figura 7. Diferencia entre un SLN y un NLC. Modificado de V. Salvi et al.<sup>30</sup>

Tanto las SLNs y las NLCs tienen una amplia gama de propiedades que las hacen útiles para la liberación de fármacos tanto por vía parenteral, dérmica, tópica y pulmonar. Estos acarreadores han sido desarrollados para reducir los efectos secundarios tóxicos de fármacos potentes y para incrementar la eficacia del tratamiento, sin embargo, los productos en el mercado de este tipo de acarreadores aún son limitados.<sup>31</sup> Estos sistemas presentan además la ventaja de ser obtenidos con materiales biocompatibles y biodegradables que los hacen candidatos a emplearse en el desarrollo de polvos para inhalación.

## 4 ANTECEDENTES

### 4.1 Tratamientos anticancerígenos por vía inhalatoria

La administración sistémica de fármacos anticancerígenos es la ruta más común para tratar cáncer pulmonar, aunque este método generalmente resulta en una concentración de fármaco por debajo de la óptima en las regiones donde se encuentra el tumor, pero en cambio termina dañando células y órganos sanos que no están implicados en la enfermedad. Es por esto, que la liberación de fármacos local, vía inhalación para cáncer pulmonar es una alternativa adecuada para administrar una concentración de fármaco mayor directamente al órgano afectado; al mismo tiempo reduce la toxicidad hacia los otros órganos y células sanas, se reduce la dosis, la frecuencia de administración y con ello los efectos no deseados que, terminan por beneficiar la calidad de vida del paciente.

La terapia contra el cáncer por vía inhalatoria facilita la liberación directamente del agente quimioterapéutico directamente a los pulmones.

Actualmente existen reportados sistemas acarreadores inhalables de fármacos quimioterapéuticos para el cáncer de pulmón como las nanopartículas poliméricas de PLGA del fármaco TAS-103, las micropartículas de PLGA para el fármaco doxorubicina, liposomas nanométricos de paclitaxel, liposomas multicomponente con docetaxel y nanopartículas de gelatina para cisplatino. No obstante, estas formulaciones aún no se encuentran disponibles en el mercado y siguen en estudio, mientras que los sistemas de liberación para vinorelbina se limitan a sistemas intencionados para la administración intravenosa.<sup>16</sup>

## 4.2 NLC para administración pulmonar

Existen reportados NLCs principalmente para enfermedades respiratorias. Patil-Gadhe *et al*, formularon y evaluaron un NLC cargado con montelukast para administrarlo como DPI para tratar el asma y demostraron eficacia farmacocinética y seguridad.<sup>32</sup>

El mismo Patil-Gadhe junto con Pokharkar, formularon y evaluaron un NLC con rosuvastatina para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Demostraron su eficacia *in vivo* y una buena evaluación farmacocinética.<sup>33</sup>

Para el caso del cáncer pulmonar, existen reportados algunos NLC cargados con agentes quimioterapéuticos, especialmente para el paclitaxel.

P. Kaur *et al*. Reportaron un NLC cargado con paclitaxel que demostró una alta eficiencia de encapsulación (85.6%) y una liberación máxima hasta las 72 horas. Este NLC lo formularon posteriormente como DPI con lo cual obtuvieron buenas propiedades de flujo y una buena deposición de la formulación en los pulmones en los ensayos *in vivo*.<sup>34</sup>

Por otro lado, Taratula y colaboradores reportaron la preparación de un NLC multifuncional para liberar dos tipos de fármacos anticancerígenos de manera simultánea tanto para doxorubicina y paclitaxel junto con SiRNA. Con este sistema, demostraron una supresión del tumor efectiva *in vitro*.<sup>35</sup>

Hasta el momento no se encuentran reportados en la literatura acarreadores NLC cargados con vinorelbina para ninguna vía de administración.

## 5 JUSTIFICACIÓN

La terapia localizada para el cáncer pulmonar ofrece ventajas sobre la terapia sistémica como la oral y la intravenosa, ya que reduce el daño sobre los otros tejidos y los efectos adversos causados por la citotoxicidad del fármaco. Otra ventaja de la terapia localizada, además de dirigirse directamente a las células cancerosas, es que permitiría la administración de dosis más bajas, reduciendo así los efectos adversos del fármaco.

La vinorelbina más comercializada es la Navelbine® (bitartrato de vinorelbina) para administración intravenosa y no tiene una formulación óptima, ya que causa irritación venosa y flebitis cuando se administra directamente por la vía intravenosa como solución acuosa. Este problema se debe probablemente al cambio de pH en el momento de la inyección y por lo tanto inmediata precipitación en el sitio. Además, su administración sistémica trae consigo efectos adversos como náuseas, neuropatía, fatiga, anemia, leucopenia entre otras.<sup>36 17</sup>

Una manera eficiente de administrar fármacos como los agentes quimioterapéuticos es a través de nanoacarreadores o sistemas multiparticulados como lo es los nanoacarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). Esto debido a su capacidad de alterar las propiedades fisicoquímicas de la formulación, lo cual puede resultar en una liberación del fármaco de forma más eficiente y disminución de toxicidad debido a la administración del fármaco.

Además, la formulación de los NLC como polvo seco para inhalación (DPI) trae consigo ventajas de una fácil y efectiva administración en la parte baja pulmonar para asegurar la correcta deposición de las partículas en el sitio de la enfermedad, por lo que, formular un sistema NLC en DPI para este fármaco resulta idóneo.

## 6 HIPÓTESIS

Es posible obtener una formulación en polvo seco para inhalación (DPI) para vinorelbina, a base de NLC, como partícula acarreadora, la cual presentará propiedades tecnológicas adecuadas para la administración pulmonar.

## 7 OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* una formulación inhalable para vinorelbina basada en un sistema seco multiparticulado de NLC para administración pulmonar.

### 7.2 Objetivos particulares

- Llevar a cabo pruebas de solubilidad aparente de los materiales a emplear en disolventes de diferente polaridad, incluido el fármaco para definir los materiales y el método de preparación para la obtención del NLC.
- Realizar estudios de preformulación para la caracterización física y fisicoquímica de la vinorelbina y los excipientes seleccionados, empleando diferentes técnicas analíticas para establecer las condiciones de los estudios de formulación.
- Obtener y optimizar los NLC cargados con vinorelbina mediante el uso de diseños experimentales para ser utilizados como materia prima en el desarrollo del DPI, obteniendo un polvo seco, caracterizando sus propiedades físicas y el estado sólido.
- Desarrollar la metodología analítica para cuantificar la vinorelbina en las diferentes etapas del proyecto.
- Realizar estudios de formulación de los NLC como DPI evaluando diferentes excipientes para inhalación, a través de mezclas físicas para darle propiedades tecnológicas aerolizables.
- Caracterizar el DPI obtenido en cuanto a su reología y propiedades aerodinámicas para determinar su eficacia tecnológica.
- Evaluar la eficacia *in vitro* de los sistemas obtenidos, a través de estudios de mucoadhesión, pruebas de liberación *in vitro*, estudios de mucoadhesión para determinar su eficacia tecnológica para la administración pulmonar.

## 8 ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 8.1 Diagrama general de la metodología



Fase 1: Preformulación

Fase 2: Obtención de NLC cargados con vinorelbina y su caracterización

Fase 3: Formulación de NLC en polvo seco para inhalación

Fase 4: Caracterización y evaluación de la eficacia del polvo seco *in vitro*

#### Diagrama general de la metodología

- (1) Definición de los materiales y método de preparación para la obtención del NLC por medio de pruebas de solubilidad aparente de la vinorelbina y los materiales. Las pruebas de solubilidad aparente por el método de adición de disolvente: a una cantidad fija y conocida de fármaco, se le añade un volumen fijo de disolvente hasta alcanzar la disolución.
- (2) Caracterización fisicoquímica: De la vinorelbina y de los excipientes empleando diferentes técnicas analíticas: difracción de rayos X (XRD), Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja (FTIR) para conocer el estado de cristalinidad, polimorfismo y pureza del fármaco.
- (3) Desarrollar y evaluar la metodología analítica para cuantificar la vinorelbina.

- (4) Elegir método de manufactura: En relación a los resultados de las pruebas de solubilidad, se elige un método de manufactura de las NLC adecuado, ya sea por el método de difusión y evaporación de disolvente, el método de microemulsión o de homogeneización en caliente.
- (5) Optimizar los NLC mediante el uso de diseños experimentales.
- (6) Caracterización y evaluación de las NLCs: determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z por dispersión de luz dinámica (DLS). Forma y morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM), interacción fármaco-lípido con espectroscopía infrarroja (FTIR), comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC), eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de carga (CC) y estudios de liberación *in vitro*.
- (7) Pruebas NLC-excipientes: Elegir el crioprotector adecuado de entre la lactosa, sucrosa, glucosa y manitol para realizar pruebas de liofilización.
- (8) Formulación: formulación del polvo seco para inhalación con diferentes tipos de lactosa de grado inhalatorio.
- (9) Caracterización del polvo seco: estudios de reología de polvos, es decir; densidad aparente, densidad compactada, índice de compresibilidad.
- (10) Caracterización y estudio *in vitro* del polvo seco para inhalación: morfología y tamaño de la partícula por microscopía electrónica de barrido (SEM), medición del diámetro medio aerodinámico (MMAD) y GSD (desviación estándar geométrica).

## 9 METODOLOGÍA

### 9.1 Materiales y equipos

#### 9.1.1 Pruebas de solubilidad

Para las pruebas de solubilidad aparente de vinorelbina (ditartrato de vinorelbina en polvo, donada por Laboratorios Cryopharma) se seleccionaron los siguientes lípidos. Lípidos líquidos: ácido oleico, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de linaza, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite de ricino, aceite de germen de trigo, triglicéridos ácidos cápricos/caprílico, aceite mineral y glicerina.

Lípidos sólidos: Suppocire®, palmitato de cetilo, compritol® 888 (tribehenato de glicerilo), monoestearato de glicerol, Lipocire®, cera de abeja y Tefose® HC.

Disolventes: Agua, metanol, etanol, Dimetil sulfóxido (DMSO), acetona, acetato de etilo, diclorometano y NaOH 0.1 N.

Las pruebas de solubilidad se llevaron a cabo pesando 10.0 mg de vinorelbina y añadiendo 100 µL del excipiente en volúmenes crecientes, y agitando en vórtex hasta observar disolución o hasta 14.0 mL de disolvente.

Posteriormente, se realizaron pruebas de solubilidad en acetona, acetato de etilo y diclorometano a los lípidos seleccionados: monoestearato de glicerol, ácido esteárico, compritol® 888, lecitina de soya y fosfatidilcolina (pura) bajo el mismo procedimiento.

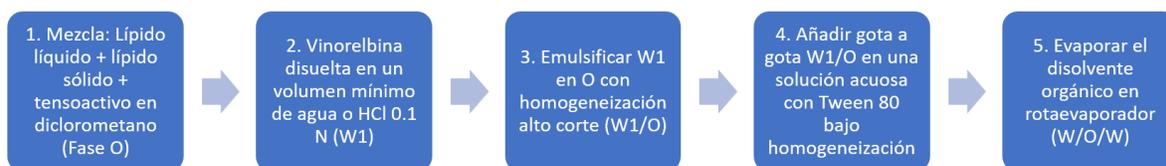
### 9.1.2 Preparación de los NLC

De acuerdo a los resultados de las pruebas de solubilidad se seleccionaron tres técnicas de preparación:

- **Técnica de doble-emulsión y evaporación de disolvente.** Para esta técnica se seleccionaron de forma preliminar los siguientes excipientes:

Diclorometano como fase orgánica, HCl 0.1 N como fase acuosa 1, lecitina de soya como tensoactivo de la fase acuosa 1 al 1% (m/v), ácido esteárico y compritol® 888 como lípidos sólidos, ácido oleico como lípido líquido, NaOH 0.1N como fase acuosa 2, tween 80 al 2.5% (m/v) como tensoactivo de la fase acuosa 2 y vinorelbina (10.0 mg). La relación lípido sólido: lípido líquido seleccionada fue 70:30.

A continuación, se presenta el esquema general de preparación de la técnica de doble-emulsión y evaporación de disolvente.



- **Técnica de emulsión simple y evaporación de disolvente.** Para esta técnica se seleccionaron de forma preliminar los siguientes excipientes:

Diclorometano como fase orgánica, ácido esteárico y compritol® 888 y lecitina de soya 1% (m/v) como lípidos sólidos, ácido oleico como lípido líquido, NaOH 0.1N como fase acuosa, tween 80 como tensoactivo al 2.5% (m/v) y vinorelbina (10.0 mg). La relación lípido sólido: lípido líquido seleccionada fue 70:30.

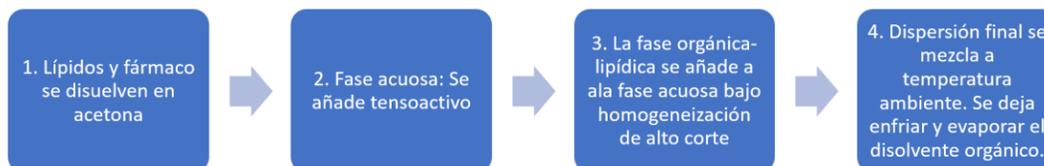
A continuación, se presenta el esquema general de preparación de la técnica de emulsión simple y evaporación de disolvente la cual fue adaptada de Patil-Gadhe *et al.*<sup>32</sup>



- **Técnica de difusión de disolvente.** Para esta técnica se seleccionaron de forma preliminar los siguientes excipientes:

Acetona como fase orgánica, ácido esteárico como lípido sólido, ácido oleico como lípido líquido, NaOH 0.1N como fase acuosa, tween 80 como tensoactivo al 2.5% (m/v) y vinorelbina (10.0 mg). La relación lípido sólido: lípido líquido seleccionada fue 70:30.

A continuación, se presenta el esquema general de preparación de la técnica de difusión de disolvente.



En todos los casos, la homogeneización de alto corte se realizó a 10000 rpm con un equipo de agitación de alto corte Ultraturrax® (IKA T18DS1) y la masa total de lípidos se mantuvo

constante en 500 mg. La masa de los lípidos y excipientes se pesó en una balanza analítica Ohaus® (Adventurer Pro AV2102).

### 9.1.3 Caracterización de los NLC

Los NLC fueron caracterizados por dispersión de luz dinámica (DLS) por diámetro hidrodinámico (tamaño de partícula), índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z en un equipo Zetasizer Zen 3690 (Malvern Panalytical).

### 9.1.4 Optimización de las NLC (Tamaño objetivo)

Debido a que se requiere un sistema para efecto local contra el cáncer pulmonar, el objetivo de talla se encuentra entre los 0.5-3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

Se planteó un diseño experimental tipo Plackett-Burman con punto al centro con los seis factores que pueden afectar el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación y para cada uno se seleccionaron dos niveles; uno alto y uno bajo. Se seleccionaron como lípido sólido al compritol® 888 y como lípido líquido al ácido oleico. Los factores y los niveles se presentan en la siguiente tabla.

| Factor  | Nivel       |              | Nivel utilizado en las pruebas preliminares |
|---|-------------|--------------|---|
|   | Bajo (-1)   | Alto (+1)    |   |
| A: %(m/m) lípido líquido (respecto a lípidos totales) | 20.0%       | 40.0%        | 30.0%                                       |
| B: Concentración lecitina %(m/v)                      | 1.0%        | 3.0%         | 1.0%  |
| C: Fármaco respecto a lípidos totales %(m/m)          | 50.0% (1:2) | 100.0% (1:1) | 2.0%  |
| D: Velocidad de homogeneización (rpm) 1ª emulsión     | 6000        | 10000        | 10000                                       |
| E: Concentración de tensoactivo %(m/v) en W2          | 0.5%        | 2.0%         | 2.5%  |
| F: Fase W1/O %(v/v)                                   | 20% (1:4)   | 100.0% (1:1) | 10.0%                                       |

Tabla 2. Diseño de experimentos para optimización de las partículas

### 9.1.5 Lavado de las partículas

Después de su preparación, los NLC se encuentran en suspensión acuosa en una solución de NaOH 0.1 N. Para eliminar el NaOH de la suspensión, es necesario un proceso de lavado. Para ello, se utilizaron membranas de diálisis de celulosa. Se introdujo el total de la suspensión coloidal en las membranas y éstas a su vez se introdujeron en 500.0 mL de agua destilada a temperatura ambiente en agitación constante. Se hace un recambio de medio cada 30 minutos hasta que el pH del medio sea de 7.0.

### 9.1.6 Desarrollo y evaluación de un método analítico por UV para cuantificar vinorelbina

Se desarrolló un método analítico por espectrofotometría UV y posteriormente se validó considerando los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, exactitud, repetibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. Todos los parámetros se determinaron con base en 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 600 nm (espectrofotómetro Agilent® Cary 60 UV-Vis), con el cual se observó el espectro característico de la vinorelbina, con el cual se seleccionó la longitud de onda de absorción de 270 nm para realizar la metodología. Para las curvas de calibración (n=3) se consideraron seis puntos que corresponden a las diluciones de vinorelbina en concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL a partir de una disolución stock.

Para la disolución stock y las diluciones posteriores se utilizó como medio acuoso metanol:agua en una proporción (1:5).

**Linealidad:** Se prepararon por triplicado 6 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia por dilución. Se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición y se reportó la relación de la concentración vs la respuesta analítica.

**Exactitud y repetibilidad del método:** Al conocer los componentes de la muestra se preparó el placebo analítico. A la cantidad de placebo analito equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, se adicionó la cantidad de analito correspondiente al 100% de

éste en la muestra. Se seleccionaron dos niveles, superior e inferior de la cantidad por sextuplicado, se adicionó la cantidad de analito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Se determinó la cantidad recuperada de analito. Se calculó el porcentaje de recobro de cada placebo analítico, teniendo que estar dentro del 97-103% con un CV no mayor al 3%.

**Límite de detección:** Se prepararon 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito) a valores menores de contenido de la prueba de impurezas por dilución. Se midieron las respuestas analíticas. Se determinó empleando la siguiente ecuación, en donde se utiliza la desviación estándar y la pendiente de la recta de la ecuación obtenida del ajuste de regresión lineal de la curva de calibración.

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

Límite de cuantificación: Se prepararon 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito) a valores menores de contenido de la prueba de impurezas por dilución. Se midió la respuesta analítica. Se empleó la siguiente ecuación en donde se utiliza la desviación estándar y la pendiente de la recta obtenida del ajuste de regresión lineal de la curva de calibración.

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

### 9.1.7 Eficiencia de encapsulación

Para cuantificar la eficiencia de encapsulación (%EE), se centrifugó 1.0 mL (n=3) de suspensión a 18659 g durante una hora (Centrífuga Hettich Zentrifugen D-78532). El sobrenadante se filtró por un filtro de nylon de 0.2 micras. Se tomó una alícuota del sobrenadante filtrado y se diluyó apropiadamente para cuantificar la cantidad de vinorelbina con el método analítico descrito y calculando con la siguiente ecuación.

$$EE\% = \frac{(\text{fármaco inicial} - \text{fármaco libre})}{\text{fármaco inicial}} * 100$$

*Ecuación 1: Cálculo de la eficiencia de encapsulación.*

### 9.1.8 Liofilización

Para poder llevar a polvo seco a los NLC, se necesita un proceso para remover el agua de la suspensión. Para esto, se seleccionó el proceso de liofilización. Debido a que el proceso de congelamiento puede dañar a los NLC, se requiere el uso de crioprotectores.

Se realizaron pruebas de liofilización (n=3) de los NLC-quitosán, utilizando cinco diferentes crioprotectores (D-manitol, isoleucina, Trehalosa, sorbitol y dextrosa) cada uno a seis diferentes concentraciones (m/v) (0.5%, 1.0%, 2.0%, 4.0%, 8.0%, 10.0%). Los NLC se congelaron previo a la liofilización por dos horas con dióxido de carbono. La liofilización se lleva a cabo a 200 mT de presión y -85.0 °C de temperatura por 24 horas. Con una liofilizadora BenchTop Pro with Omnitronics® VirTis SP Scientific.

Posteriormente, se resuspendieron los NLC en el volumen original de agua destilada y se evaluó la capacidad de resuspenderse, la apariencia física y la talla, el PDI y potencial Z por medio de dispersión de luz dinámica.

### 9.1.9 Rendimiento

Se colocó un triplicado de 1.0 mL de tres lotes diferentes previamente lavados, en tubos Eppendorf para su liofilización bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Posteriormente se pesó el contenido seco y se calculó el rendimiento en relación con la masa teórica de los excipientes empleados y la masa obtenida después de la liofilización.

$$\%Rendimiento = \frac{\text{masa teórica de los excipientes}}{\text{masa obtenida experimentalmente}} * 100$$

*Ecuación 2. Cálculo del rendimiento.*

### 9.1.10 Capacidad de carga

Para cuantificar la capacidad de carga de vinorelbina en el NLC, se colocó un triplicado de 1.0 mL de tres lotes diferentes previamente lavados, en tubos Eppendorf. Se liofilizaron con las condiciones anteriormente descritas. Se añadió 1.0 mL de metanol a cada tubo y se agitó por vórtex durante cinco minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a

18659 g durante media hora. Se cuantificó la vinorelbina del sobrenadante por espectroscopía UV-VIS con el método descrito y se calculó con la siguiente ecuación.

$$\text{Capacidad de carga \%} = \frac{(\text{Masa de vinorelbina en NLC})}{\text{Masa de NLC recuperada}} * 100$$

*Ecuación 3. Cálculo de la capacidad de carga.*

### 9.1.11 Recubrimiento con quitosán

#### Preparación de la disolución stock de quitosán

Para preparar la disolución stock de quitosán se utilizó quitosán de bajo peso molecular. Se preparó una disolución de ácido acético al 1.0% (v/v) en la cual se disolvió el quitosán. Se dejó en agitación constante toda la noche para asegurar su completa disolución.

Para el recubrimiento (n=3), se tomaron volúmenes fijos de los NLC lavados en suspensión y se añadieron gota a gota a volúmenes fijos de quitosán hasta obtener las concentraciones de 0.16%, 0.25% y 0.5% de quitosán (v/v) respectivamente bajo agitación constante a 300 rpm.

Después del tiempo fijado (1, 2 y 3 horas), la suspensión de NLC-quitosán se centrifugó a 18659 g por 30 minutos para separar el quitosán excedente. El botón de NLC-quitosán se resuspendió en volumen original de agua destilada y se midió la talla, PDI y potencial Z por medio de dispersión de luz dinámica.

### 9.1.12 Caracterización física y del estado sólido de los NLC

#### 9.1.12.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para caracterización física de los NLC como polvos secos se llevó un análisis térmico de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (TA Instruments DSC Q20) para ello se colocaron muestras de 5 a 10 mg en charolas de aluminio herméticas, las cuales fueron colocadas en calorímetro, el cual operó en un rango de temperatura de 15 a 300 °C con una tasa de calentamiento de 10°C/min con un flujo de nitrógeno de 50 mL/min.

#### **9.1.12.2 Estado cristalino por Rayos X de polvos**

Para determinar la naturaleza cristalina del fármaco en los NLC se realizaron estudios de rayos X de polvos con un difractómetro de rayos X Bruker D2 PHASER (Detector lynxeye 1D Mode, tubo de Cu=1.54184 Å)

#### **9.1.12.3 Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La visualización de la morfología y tamaño de los NLC-vinorelbina se realizó por microscopía electrónica de barrido con un microscopio de emisión de campo con haz de iones focalizado Crossbeam 550 (Zeiss). Las muestras se recubrieron en un Sputter Coater AGB7340 (Agar Scientific) recubriendo con blanco de oro durante 60 segundos en atmosfera de Argón.

En un segundo análisis, las muestras también se analizaron con el mismo procedimiento, pero con un microscopio MAIA3, TESCAN (Triglav®). Se recubrieron con oro bajo vacío a un voltaje de 6.5 kV. Las muestras se montaron en una superficie de aluminio fijada con cinta de carbono. La medición del tamaño a partir de las imágenes se realizó con el software ImageJ.

#### **9.1.12.4 Estudios espectroscópicos**

Se analizaron los NLC-vinorelbina tanto recubiertos como no recubiertos, además de sus materias primas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con un equipo Cary 630 (Agilent Technologies Diamond ATR) medidos a 150 escaneos por muestra.

#### **9.1.13 Estudios de la formulación**

Para poder administrar el sistema NLC-vinorelbina para inhalación, se seleccionaron dos lactosas de grado inhalable: Respitose® ML001 y Lactohale® LH200. Estas lactosas actúan como diluyente y transporte para la dosificación y administración de fármacos; en este caso del sistema NLC-vinorelbina. Se prepararon mezclas de NLC-vinorelbina: lactosa en diferentes proporciones, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3 manteniendo una dosis equivalente a 10 mg de vinorelbina. Con estas mezclas se realizó el estudio de reología de polvos con las pruebas descritas a continuación.

### 9.1.13.1 Reología de polvos

### 9.1.13.2 Densidad aparente y compactada

La densidad y el flujo de los polvos secos para inhalación se presentan en términos de las densidades aparente y compactada (g/mL), Índice de Hausner, índice de Carr y ángulo de reposo.

La densidad aparente se determinó vertiendo polvo una cantidad conocida de mezcla NLC-vinorelbina: lactosa bajo la influencia de la gravedad en una probeta de 10.0 mL con 1 cm de diámetro. El volumen ocupado por el polvo se registró. La densidad compactada se llevó a cabo al registrar el volumen del polvo tras 200 asentamientos a 5 cm de altura. El número de asentamientos se fijó para todas las muestras al no observar un cambio en el volumen después del asentamiento número 150. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La densidad aparente, compactada, índice de Carr, Índice de Hausner, se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones <sup>37</sup>:

$$\rho \text{ aparente} = \frac{\text{masa de la muestra (g)}}{\text{volumen aparente (mL)}}$$

$$\rho \text{ compactada} = \frac{\text{masa de la muestra (g)}}{\text{Volumen compactado (mL)}}$$

*Ecuación 4: Cálculo de volumen aparente*

*Ecuación 5: Cálculo de volumen compactado*

$$\text{Índice de Carr (\%IC)} = \frac{\rho \text{ compactada} - \rho \text{ aparente}}{\rho \text{ compactada}} * 100$$

*Ecuación 6: Cálculo de índice de Carr*

$$\text{índice de Hausner (IH)} = \frac{\rho \text{ aparente}}{\rho \text{ compactada}}$$

*Ecuación 7: Cálculo de índice de Hausner*

### 9.1.13.3 Ángulo de reposo

El ángulo de reposo también es un indicativo del flujo de los polvos, la medición se llevó a cabo por triplicado para mezcla vertiendo una cantidad fija de la mezcla a través de un embudo, la mezcla se dejó caer por gravedad. El cuello del embudo se colocó a una altura

fija de 2 cm. Se midió la altura con un vernier y se trazó la circunferencia del cono generado, se registraron cuatro medidas de diámetro de la cual se obtuvo un diámetro promedio. Con los datos obtenidos, el ángulo de reposo se calculó con la ecuación 5 <sup>37</sup>

$$\text{Ángulo de reposo } (\theta) = \text{Tan}^{-1} \left( \frac{h}{\frac{D}{2}} \right)$$

*Ecuación 8: Cálculo de ángulo de reposo, donde h es la altura del cono y D es el diámetro de la circunferencia.*

#### **9.1.13.4 Compactibilidad y cohesividad: Análisis por Kawakita**

También se determinó la fluidez de las mezclas de polvos usando el análisis de Kawakita. Se ejecutó de la misma manera que la densidad aparente y compactada con la diferencia de que se registraron los volúmenes ( $V_N$ ) a diferente número de asentamientos (N) (N= 5,10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90,100,120,150,200). El comportamiento de las formulaciones en los asentamientos se comparó utilizando constantes numéricas obtenidas de las gráficas de Kawakita. La ecuación de Kawakita que se utiliza para evaluar las propiedades de flujo de los polvos está dada por:

$$\frac{N}{C} = \frac{N}{a} + \frac{1}{ab}$$

*Ecuación 9: Ecuación de Kawakita*

Donde  $a$  y  $b$  son constantes;  $a$  describe el grado de reducción de volumen en el límite del asentamiento y corresponde a la compactibilidad,  $1/b$  es la constante relacionada a la cohesión y por lo tanto corresponde a la cohesividad del polvo,  $C$  es el grado de la reducción de volumen y se calcula a partir del volumen inicial o aparente ( $V_0$ ) y del volumen en el asentamiento N ( $V_N$ ) como:

$$C = \frac{(V_0 - V_N)}{V}$$

*Ecuación 10: Cálculo del parámetro C de Kawakita*

Los valores numéricos para las constantes  $a$  y  $1/b$  se obtienen de graficar los datos experimentales de  $N/C$  versus el número de asentamientos N <sup>38</sup>.

## **9.1.14 Estudios de eficacia *in vitro***

### **9.1.14.1 Mucoadhesión**

Para comprobar el efecto de mucoadhesión, se utilizaron las tres concentraciones de recubrimiento con quitosán (0.16%, 0.25% y 0.5%). (n=3).

La mucina se disolvió bajo agitación constante toda la noche en una disolución amortiguadora de fosfatos a pH 6.8 para simular el ambiente fisiológico pulmonar con cáncer.

Se puso en contacto volúmenes fijos de NLC-quitosán con un volumen fijo de mucina para llegar a una concentración de mucina al 1.0% (v/v). Se dejó en agitación por 1,2,3 y 24 horas (n=3) bajo agitación constante y temperatura constante (100 rpm y  $37 \pm 0.5$  °C respectivamente). Después del tiempo fijado, se centrifugó a 18659 g por 30 minutos para separar la disolución excedente de mucina. El botón se resuspendió en el volumen original de agua destilada y se midió la talla, el PDI y el potencial Z por medio de dispersión de luz dinámica.

### **9.1.14.2 Masa media aerodinámica (MMAD) y Desviación estándar geométrica (GSD)**

La evaluación de la aerolización se llevó a cabo con la determinación de la masa media aerodinámica con un impactador de cascada de Andersen. Este aparato tiene las especificaciones del aparato 1 del método 601 de la USP. Está conformado por 8 estaciones en total, tomando en cuenta la base, una boquilla, donde se introduce la formulación, un conducto y suministro de vacío (Figura 8).

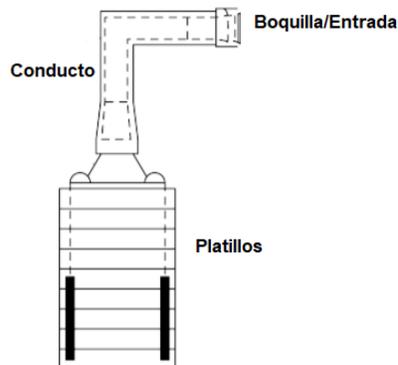


Figura 8: Aparato 1 USP: Impactador de cascada de Andersen

La determinación para cada mezcla NLC-vinorelbina: lactosa se realizó por triplicado pesando una cantidad fija de polvo correspondiente a una dosis de 10 mg de fármaco. El polvo se colocó en la entrada de la boquilla del impactador y se empleó un vacío de aire de 28.3 l/min durante 5 minutos. Una vez terminado este tiempo, se pesa cada etapa o platillo de manera individual y se obtiene la masa impactada en cada estadio/platillo del impactador por diferencia de pesos con el peso inicial de cada platillo antes del experimento.

La determinación de la masa media aerodinámica se lleva a cabo como se describe el análisis para el aparato 1 de la USP. Al obtener la masa de polvo retenida en cada platillo, se calcula el porcentaje de peso acumulado versus el diámetro de partícula que se retiene en cada platillo y se calculó la masa media aerodinámica como  $d_{50}$  obtenida de la ecuación de ajuste de la gráfica log normal. En ésta, se grafica el porcentaje de peso acumulado versus el logaritmo del diámetro de partícula retenido en cada platillo. De la misma ecuación de ajuste se calcula la desviación estándar geométrica (GSD) ya que, tomando en cuenta una distribución normal, la desviación estándar se calcula como  $\mu \pm \sigma$  ( $\mu \pm 34.13$ ).<sup>39</sup>

### 9.1.14.3 Estudios de liberación *in vitro*

Se llevaron a cabo los estudios de liberación *in vitro* de la vinorelbina de los NLC-vinorelbina tanto recubiertos con quitosán (0.16% m/v) como no recubiertos (n=3). Se utilizó una cantidad de NLC liofilizado equivalente a 10 mg de vinorelbina. Las muestras se colocaron directamente en 80.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.8 contenida en vasos ámbar. Los vasos se colocaron en un baño maría a 37°C, bajo agitación magnética constante a 100 rpm. Se tomaron alícuotas, filtrándose simultáneamente con un filtro de 0.2 micrómetros. Las alícuotas se tomaron a los tiempos 0.25, 0.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 12,

24, 50, horas y se realizaron muestreos hasta 24 horas después para asegurar que la liberación hubiese concluido a las 50 horas. A cada muestreo se volvió a añadir el volumen de medio sustraído.

Para evaluar la cinética de liberación de la vinorelbina de los NLC y el posible mecanismo, se realizó el ajuste a diferentes modelos matemáticos utilizando en programa DDSolver.

Los modelos seleccionados fueron los siguientes: orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell y Peppas Sahlin. Las ecuaciones que describen estos modelos se presentan a continuación:

| Modelo           | Ecuación                          | Parámetro     |
|------------------|-----------------------------------|---------------|
| Orden cero       | $F = k_0 * t$                     | $k_0$         |
| Primer orden     | $F = 100 * (1 - e^{-k_1 * t})$    | $k_1$         |
| Higuchi          | $F = kh * t^{0.5}$                | kh            |
| Korsmeyer-Peppas | $F = kkp * t^n$                   | kkp, n        |
| Hixson-Crowell   | $F = 100 * [1 - (1 - khc * t)^3]$ | khc           |
| Peppas-Sahlin    | $F = k_1 * t^m + k_2 * t^{2m}$    | $k_1, k_2, m$ |

Tabla 3. Modelos matemáticos de liberación de fármaco.

## 10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera actividad de la fase 1 de preformulación fue la definición del acarreador. Para esto se realizó una búsqueda y revisión bibliográfica exhaustiva de los actuales y diferentes sistemas de liberación para la administración pulmonar en aerosol. Con ésta, se encontró que existen cuatro principales sistemas, los cuales son: el inhalador en polvo seco (DPI), el nebulizador, el inhalador presurizado de dosis medida (pMDI) y los inhaladores de niebla fina.

Las desventajas de los pMDI es que necesitan de propelentes, los cuales contaminan al medio ambiente. Tanto los pMDI y los nebulizadores son aerosoles de base líquida, es decir vienen en suspensión y necesitan tomar más factores en cuenta para que la solución no altere la estabilidad del acarreador ni del fármaco. Los inhaladores de niebla fina, aunque no se presentan en suspensión, también son de base líquida e igualmente requieren de

muchos factores para mantener la integridad del fármaco. En cambio, los DPI, al no estar en solución, se consideran altamente estables, además de que liberan la dosis en un periodo corto de tiempo comparado a los nebulizadores. Adicionalmente, al no contener propelente, no contaminan al ambiente. Por último, los DPI son ideales para los pacientes que tienen problemas de coordinación-inhalación, por lo que presentan una opción de administración pulmonar fácil para el paciente.

Por estas razones, es idóneo formular un polvo seco que contenga al acarreador con vinorelbina para que sea administrado por la vía pulmonar a través de un inhalador para polvo seco.

Para definir el tipo de acarreador, se buscó todo tipo de referencia relacionada a la administración pulmonar de fármacos y se encontró que las más utilizadas son: las nanopartículas poliméricas, los liposomas, las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) con sus variantes y los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC).

Los acarreadores más reportados para administración pulmonar son los lipídicos, encabezados por los liposomas, seguido de las nanopartículas sólidas lipídicas, sin embargo, los liposomas presentan problemas de estabilidad y baja eficiencia de encapsulación. Las nanopartículas sólidas lipídicas, tienen una mayor estabilidad que los liposomas, pero debido a la estructura cristalina de la matriz, presentan salida de fármaco y por lo tanto una baja eficiencia de encapsulación.

Por estas razones, la nueva generación de partículas sólidas lipídicas, disminuye y previene la salida de fármaco dado que su matriz no es cristalina y por lo tanto está menos estructurada y es capaz de cargar más fármaco sin expulsarlo.

Del análisis de la literatura, se definió que el sistema apropiado para la vinorelbina para una administración pulmonar, son el uso de los acarreadores nanoestructurados formulados como polvo seco.

De la revisión bibliográfica, también se documentaron los diversos métodos de preparación de NLC. Dentro de los cuales, los más usados son: la homogeneización a alta presión en sus dos variantes, en frío y en caliente, el método de difusión de disolvente, el método de emulsificación y evaporación de disolvente y el método de microemulsión.

Los métodos más viables para trabajar a menor escala son el método de difusión y evaporación de disolvente, el método de microemulsión y la homogeneización en caliente.

Como ya se mencionó, el método sería elegido dependiendo de los resultados de las pruebas de solubilidad aparente y de los resultados preliminares de caracterización de tamaño, PDI y potencial Z de los NLC.

Adicionalmente a los métodos de preparación de los NLC, se obtuvo una lista de los excipientes más utilizados en la preparación de NLC para DPI para fármacos anticancerígenos. Los cuales por lo general son ácidos grasos, triglicéridos y diversos aceites.

Los tensoactivos también forman parte esencial de la preparación de NLC, ya que son los que brindan estabilidad para la formación de las partículas. Se encontró que los más utilizados son los Tween tanto 20 como 80 y sus mezclas. Por lo tanto, los excipientes que se usaron para las pruebas de solubilidad en el siguiente paso del curso de la investigación fueron los siguientes:

| <b>Lípido líquido</b>   | <b>Lípido Sólido</b>              | <b>Tensoactivos</b> |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Ácido oleico            | Ácido esteárico                   | Tween 20            |
| Compritol               | Palmitato de glicerol             | Tween 60            |
| Aceite de girasol       | Fosfatidilcolina                  | Tween 80            |
| Aceite de ricino        | Monoestearato de glicerol         | Poloxámero 188      |
| Palmitato de isopropilo | Triglicéridos C1018<br>(lipocire) | Gluconato de sodio  |
| Aceite de castor        | Palmitato de cetilo               | Fosfatilcolina      |
| Aceite de sésamo        |                                   |                     |
| Aceite de linaza        |                                   |                     |
| Aceite de papa          |                                   |                     |

*Tabla 4. Excipientes utilizados en las pruebas de solubilidad*

## 10.1 Pruebas de solubilidad

Se presentan en la Figura 9 los resultados de las pruebas de solubilidad de vinorelbina en diferentes lípidos, tanto líquidos como sólidos y en varios disolventes. El procedimiento se encuentra descrito en la metodología. Los resultados desglosados se encuentran en el anexo 12.1.

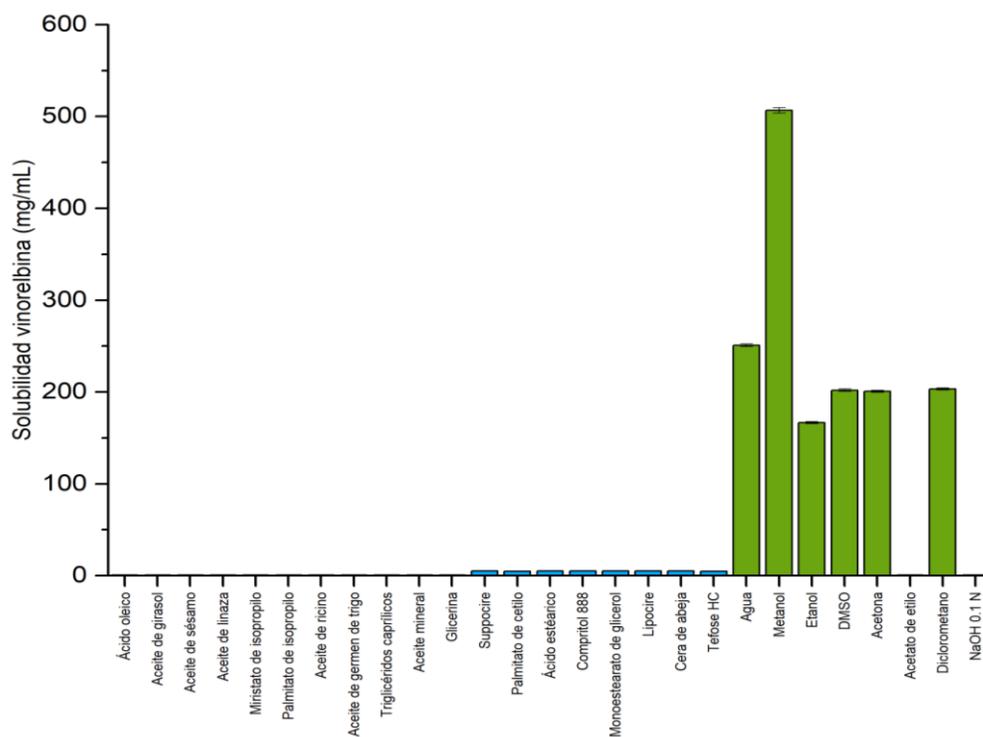


Figura 9. Solubilidad de vinorelbina en lípidos y disolventes

## 10.2 Preparación de los NLC

Los métodos más simples y comunes para preparar NLC son los métodos de homogeneización en caliente, para los cuales se requiere que el fármaco sea soluble o al menos suspendible en los lípidos.<sup>30</sup> Dado que no fue el caso para ningún lípido, se planteó la preparación de los NLC por otros métodos que requieren de disolventes orgánicos, por lo tanto, se realizaron pruebas de solubilidad en los disolventes en los que la vinorelbina resultó ser soluble. (Figura 10).

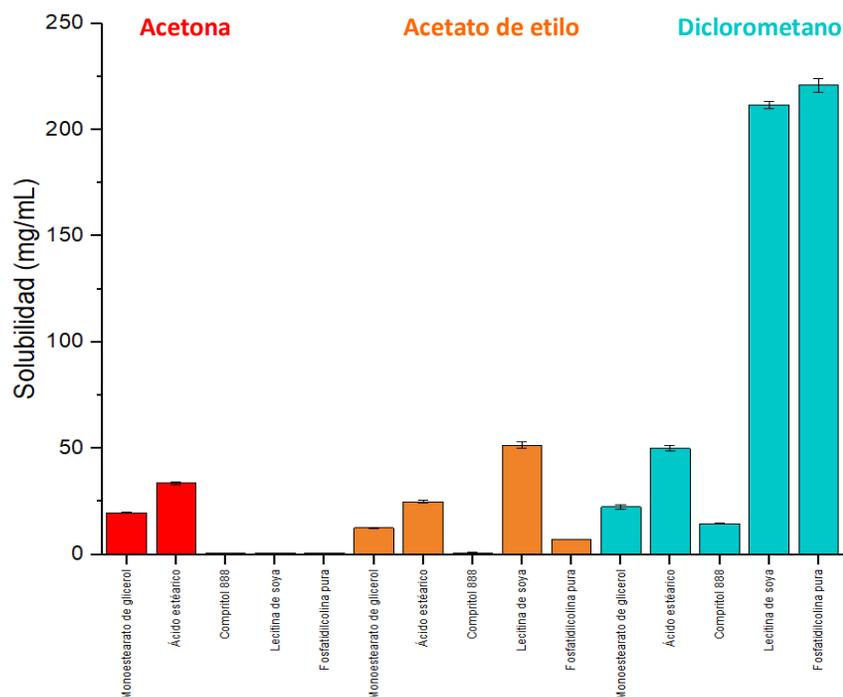


Figura 10. Solubilidad de vinorelbina y lípidos sólidos en disolventes.

Utilizando los mismos disolventes: acetona, acetato de etilo y diclorometano, se realizaron pruebas de miscibilidad entre diversos lípidos líquidos y los disolventes mencionados (Tabla 5).

| Lípido líquido          | Disolventes      |               |             |
|-------------------------|------------------|---------------|-------------|
|                         | Acetato de etilo | Diclorometano | Acetona     |
| Palmitato de isopropilo | Miscibles        | Miscibles     | Miscibles   |
| Miristato de isopropilo | Miscibles        | Miscibles     | Miscibles   |
| Ácido oleico            | Miscibles        | Miscibles     | Miscibles   |
| Acite de ricino         | Miscibles        | Miscibles     | Miscibles   |
| Glicerol                | Inmiscibles      | Inmiscibles   | Inmiscibles |
| Aceite mineral          | Miscibles        | Miscibles     | Inmiscibles |

Tabla 5: Resultados de miscibilidad entre lípidos líquidos y disolventes.

Con esta información, se propusieron tres métodos de preparación de NLC. El primer método fue el método de difusión de disolvente, en el cual se requiere un disolvente orgánico capaz de disolver tanto al fármaco como a los lípidos y que además sea miscible en agua. Se seleccionó como disolvente a la acetona y como lípidos líquido y sólido al ácido oleico y al ácido esteárico.

Este método no fue capaz de producir una suspensión coloidal, ya que el sistema fue inestable y condujo a la precipitación inmediata de los excipientes, por lo tanto, este método fue descartado.

Los otros métodos propuestos: emulsión simple y evaporación de disolvente y doble emulsión y evaporación de disolvente fueron capaces de producir una suspensión coloidal; para ello, se seleccionaron como lípido sólido, ácido esteárico y compritol según el caso y como lípido líquido al ácido oleico en ambos casos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

### 10.3 Caracterización de NLC

#### 10.3.1 Método de manufactura

A continuación, se presentan los resultados de tamaño de partícula, PDI y potencial Z para las partículas preparadas con diferentes métodos (n=2).

| Método                             | Tamaño (nm)   | PDI         | Potencial Z |
|------------------------------------|---------------|-------------|-------------|
| Emulsión simple<br>Ácido esteárico | *             | *           | *           |
| Emulsión simple<br>Compritol® 888  | 254.0±400     | 0.250±0.006 | -41.6±0.400 |
| Doble emulsión<br>Ácido esteárico  | 310.8±34.100  | 0.209±0.029 | -45.3±0.600 |
| Doble emulsión<br>Compritol® 888   | 318.9±104.800 | 0.275±0.029 | -37.7±0.300 |

Tabla 6: Caracterización por DLS de NLC-vinorelbina por tres métodos

*\*El método de emulsión simple empleando como lípido sólido al ácido esteárico dio como resultado una suspensión inestable que precipitó a los pocos minutos de su preparación por lo que se descartó.*

Como se muestra en la tabla 6, el método de emulsión simple empleando como sólido lípido al ácido esteárico falló en formar una suspensión coloidal. Sólo con compritol® 888, el método de emulsión simple logró formar una suspensión coloidal de partículas.

Como se observa en la tabla 6, los procedimientos restantes fueron capaces de formar las partículas en suspensión, en todos los casos su tamaño fue nanométrico, mostrando el menor tamaño de partícula con la emulsión simple con compritol® 888. Los PDI fueron menor a 0.3 lo que indica una excelente distribución unimodal de la población de tamaño de las partículas lo que se traduce en suspensiones monodispersas.<sup>40</sup>

En todos los casos, el valor de potencial Z fue mayor a 130.01 mV lo que es un indicio de una alta estabilidad en suspensión. El valor negativo de las partículas se atribuye a los iones carboxilatos presentes en la partícula, otorgados por el ácido oleico (lípidos líquidos) que se encuentra en todas las formulaciones. <sup>41</sup>

#### 10.4 Desarrollo de un método analítico por UV para cuantificar vinorelbina

Para calcular la eficiencia de encapsulación del fármaco, se estableció un método analítico espectrofotométrico UV-VIS. Se estableció una curva de cuantificación de vinorelbina en metanol: agua (1:5) la cual fue validada. Se registraron los valores de absorbancia a una longitud de onda  $\lambda=270.0$  nm de acuerdo al siguiente barrido.

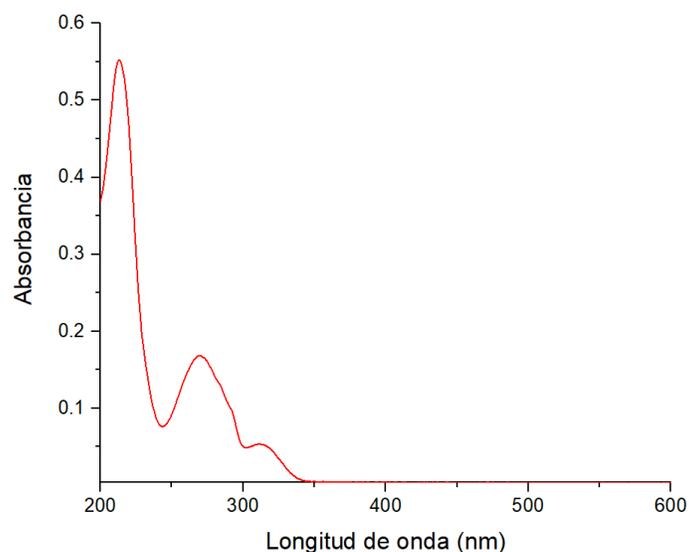


Figura 11. Barrido de vinorelbina de 200-600 nm

Como ya mencionado anteriormente, se evaluó la adecuabilidad del sistema con los parámetros presentados en la tabla 6 en un intervalo de 5-30  $\mu\text{g/mL}$ . La gráfica de linealidad se encuentra en el anexo 12.2.

| Parámetro  | Resultado      | Especificación |
|------------|----------------|----------------|
| Linealidad | $R^2 = 0.9998$ | $R^2 > 0.9800$ |
|            | CV = 0.2%      | CV < 3.0 %     |

|   |                                     |                                |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|
| Exactitud (% de recobro)<br>y Repetibilidad | 99.1 % a 100.0 %<br><br>CV = 0.74 % | 97% a 103 %<br><br>CV ≤ 3.00 % |
| Límite de detección                         | 0.0121 µg/mL                        | -                              |
| Límite de cuantificación                    | 0.0368 µg/mL                        | -                              |

Tabla 6. Parámetros de evaluación del sistema analítico espectrofotométrico

Con el método analítico definido y evaluado, se pudo cuantificar la eficiencia de encapsulación de acuerdo a lo descrito en la metodología.

#### 10.4.1 Eficiencia de encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulación para ambos métodos de evaporación de disolvente, recordando que para el método de emulsión simple sólo se determinó para el método que utiliza como lípido sólido al compritol® 888, ya que como se mencionó anteriormente, con ácido esteárico no se obtiene una suspensión coloidal.

| Método                            | Eficiencia de encapsulación (%) |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Emulsión simple<br>Compritol® 888 | 31.70±25.18                     |
| Doble emulsión<br>Ácido esteárico | IND*                            |
| Doble emulsión<br>Compritol® 888  | 61.74±0.47                      |

Tabla 7. Eficiencia de encapsulación (%) de vinorelbina en los NLC (n=2), IND\* indeterminación.

La indeterminación en el método de doble emulsión con el lípido sólido de ácido esteárico se debe a la interferencia de los excipientes con el método analítico, el cual no resultó específico en este caso porque posiblemente una pequeña fracción de ácido esteárico queda disuelta en el medio lo cual ocasiona que la curva de absorción a 270.0 nm se vea opacada por la absorción de otra especie en solución.

Las partículas que emplearon compritol® por ambos métodos fueron capaces de encapsular a la vinorelbina, sin embargo, el método de doble emulsión obtuvo una eficiencia de encapsulación mayor. Este hecho se debe a que la vinorelbina al ser un fármaco hidrofílico encuentra mayor estabilidad por una doble emulsión de tipo W/O/W debido a que

en la primera emulsión se encuentra en una fase acuosa que luego es dispersada en la fase orgánica, en cambio en el método de emulsión simple la vinorelbina se encuentra en la fase orgánica y durante la homogeneización es más probable que migre a la única fase acuosa disponible, factor que no promueve su permanencia dentro del sistema lipídico.

Además, el método de doble emulsión y evaporación de disolvente ha reportado ser eficaz en encapsular a fármacos hidrofílicos, incluso en forma de sal, en sistemas lipídicos como el del presente trabajo. <sup>42</sup>

Debido a que el mejor resultado de encapsulación se obtuvo con el método de doble emulsión y evaporación de disolvente utilizando compritol® 888 como lípido sólido, se decidió seleccionar este método como el método determinado para formular los NLC.

#### **10.4.2 Optimización de la formulación**

Debido a que se requiere un sistema para efecto local contra el cáncer pulmonar, el objetivo de talla se encuentra entre los 0.5-3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. El sistema requiere de un tamaño de partícula de por lo menos 500 nm, tamaño por arriba del obtenido con este método y las condiciones de proceso que se utilizaron.

Se planteó un diseño experimental con los seis factores que pueden afectar el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación y para cada uno se seleccionaron dos niveles; uno alto y uno bajo. <sup>34 43 32 44</sup>

Los factores y los niveles se presentan en la tabla 7. Además, se fijaron los siguientes factores en el diseño experimental: tiempo de emulsificación, cantidad de lípidos totales (300.0 mg), volumen de la segunda fase acuosa (W2) manteniendo el volumen de W1/O del 20% respecto a W2.

| Factor   | Nivel      |              | Nivel utilizado en las pruebas |
|--|------------|--------------|--------------------------------|
|  | Bajo (-1)  | Alto (+1)    |                                |
| A: % (m/m) lípido líquido (respecto a lípidos totales) | 20%        | 40%          | 30%                            |
| B: Concentración lecitina                              | 1.0%       | 3.0%         | 1.0%                           |
| E: Concentración tensoactivo (%m/v) en W2              | 0.5%       | 2.0%         | 2.5%                           |
| C: Fármaco respecto al lípido total (%m/m)             | 50% (1:2)  | 100% (1:1)   | 2.0%                           |
| D: Velocidad de homogeneización (rpm) 1ª emulsión      | 6000       | 10000        | 10000                          |
| F: Fase W1/O (%v/v)                                    | 20.% (1:4) | 100.0% (1:1) | 10.0%                          |

*Tabla 7. Factores y niveles utilizados en la optimización de la formulación*

#### 10.4.2.1 Tamaño de partícula

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), se determinó que la proporción de fármaco respecto a los lípidos totales y la concentración de tensoactivo Tween 80, tienen un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre el tamaño de partícula. La relación de fármaco respecto a los lípidos tiene un efecto negativo sobre el tamaño de partícula y la concentración de Tween 80 tiene un efecto positivo sobre el tamaño. El análisis de varianza correspondiente se encuentra en el anexo 12.3.

#### 10.4.2.2 Eficiencia de encapsulación

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) ningún factor tiene un efecto significativo ( $P > 0.05$ ) sobre la eficiencia de encapsulación, sin embargo, un aumento en la concentración de lecitina de soya (tensoactiva fase W1) tiene un efecto negativo en eficiencia de encapsulación del fármaco en el sistema. El análisis de varianza correspondiente se encuentra en el anexo 12.4.

#### 10.4.2.3 Índice de polidispersidad

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), ningún factor tiene un efecto significativo ( $P > 0.05$ ) sobre el índice de polidispersidad, sin embargo, un aumento en la concentración de lecitina de soya y del radio W1/O tiene un efecto positivo en el PDI, por lo que es

deseable mantenerlos en un nivel bajo. El análisis de varianza correspondiente se encuentra en el anexo 12.5.

#### **10.4.2.4 Potencial Z**

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), el factor de lípido líquido respecto a lípidos totales y la concentración de Tween 80 tienen un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre el potencial Z de la partícula. A mayor proporción de ácido oleico se obtiene un valor menor de potencial Z y a mayor concentración de tensoactivo el valor de potencial Z aumenta. El análisis de varianza correspondiente se encuentra en el anexo 12.6.

### **10.4.3 Optimización del proceso de obtención**

#### **10.4.3.1 Objetivos de optimización**

Debido a que se requiere un sistema para efecto local contra el cáncer pulmonar, el objetivo de talla se encuentra entre los 0.5-3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Se realizó una matriz experimental tal como se documenta en la tabla 7.

#### **10.4.3.2 Optimización de múltiples respuestas**

Tomando en cuenta los diversos factores que tienen un efecto significativo o no, sobre el tamaño de partícula, PDI, potencial Z y eficiencia de encapsulación, se realizó la optimización de múltiples respuestas realizando las siguientes consideraciones:

- Se excluye como respuesta deseable la variable de potencial Z debido a que en todos los casos se obtiene un valor alrededor de -30.0 mV, un valor adecuado que está relacionado con la estabilidad en suspensión. En todos los casos, el valor negativo está dado por la composición de lípidos, en especial el ácido oleico como explicado anteriormente. Además, este sistema está intencionado para formularse como polvo seco por lo que su estabilidad en suspensión cobra menos importancia que las otras variables de respuesta.

- Se disminuyó el valor óptimo de cantidad de fármaco para reducir el uso de recursos y de pérdida del fármaco no encapsulado.

Las metas de las respuestas se establecieron de la siguiente manera:

| Variable                        | Respuesta a optimizar |
|---------------------------------|-----------------------|
| Tamaño promedio (nm)            | 1000.0                |
| PDI                             | Minimizar             |
| Eficiencia de encapsulación (%) | Maximizar             |

*Tabla 8. Metas de las variables de respuesta*

En la Tabla 9 se muestran los factores y el nivel de los factores para alcanzar la respuesta óptima.

### **Optimizar deseabilidad**

Valor óptimo=0.845933

| Factor                 | Bajo   | Alto    | Óptimo  | Óptimo redondeado* |
|------------------------|--------|---------|---------|--------------------|
| Lípido líquido         | 20.0   | 40.0    | 37.5795 | 37.5               |
| Concentración Lecitina | 1.0    | 3.0     | 1.00073 | 1.0                |
| Fármaco                | 50.0   | 75.0    | 75.0    | 75.0               |
| Homogeneización        | 6000.0 | 10000.0 | 9079.95 | 9000               |
| Concentración Tween 80 | 0.5    | 2.0     | 1.03038 | 1.0                |
| Radio W1/O             | 20.0   | 100.0   | 20.0    | 20.0               |

*Tabla 9. Combinación de niveles de factores que maximiza la deseabilidad del experimento. \*El factor homogeneización se tuvo que redondear en mayor proporción que los demás factores debido a que el homogeneizador de alto corte sólo permite velocidades en múltiplos de 100.*

#### **10.4.3.3 Verificación del modelado (NLC optimizados)**

En la tabla 10, se resume las características de las partículas optimizada. Los datos completos se encuentran en el anexo 12.7.

|                  |                |
|------------------|----------------|
| Tamaño (nm)      | 929.00 ± 10.93 |
| PDI              | 0.48 ± 0.08    |
| Potencial Z (mV) | -33.07 ± 1.62  |
| %EE              | 27.09 ± 4.96   |

Tabla 10. Características de las partículas optimizadas

La prioridad de optimizar el método de obtención de los NLC era para obtener un tamaño de partícula adecuado para la administración a nivel de bronquios y bronquiolos, ya que, con un tamaño menor a 500 nm, las partículas se pueden depositar a nivel alveolar lo que ocasionaría que la liberación de vinorelbina fuera más sistémica que local con lo que se perdería el objetivo del presente proyecto.

El tamaño obtenido con las nuevas condiciones fue de 929.00 ± 10.93 nm, el cual es un tamaño adecuado, que incluso puede aumentar sin problema alguno por un recubrimiento mucoadhesivo para mejorar sus propiedades tecnológicas.

Como ya se mencionó anteriormente, no hay ningún factor que afecte significativamente la eficiencia de encapsulación ni el PDI. El valor de PDI obtenido, es aún menor a 0.5, valor que todavía es considerado aceptable en una población de partículas en suspensión.

Cabe mencionar que se utilizó menor cantidad de fármaco en la preparación de las partículas optimizadas, lo que pudo afectar la eficiencia de encapsulación, sin embargo, se tomó esta decisión basándose en el hecho de que, si bien al aumentar la cantidad de fármaco, aumenta la eficiencia de encapsulación, el fármaco que queda libre también es una cantidad alta que se tiene que desechar como residuos tóxicos durante el proceso de manufactura.

Aun tomando en cuenta la eficiencia de encapsulación presentada (27.09%), cada lote preparado de NLC equivaldría a tener encapsulada una dosis de 60.95 mg de vinorelbina. Esta dosis es suficiente para el esquema de dosificación en la quimioterapia con vinorelbina ya que las cápsulas de gelatina blanda para el tratamiento oral, se comercializan en dosis de 20, 30 y 80 mg y en el caso de la presentación inyectable, se comercializa en dosis de 10 mg/mL en presentación de 1.0 mL. <sup>12</sup>

## 10.5 Recubrimiento mucoadhesivo

El proceso de recubrimiento es necesario para otorgarle al sistema de liberación propiedades mucoadhesivas, para prolongar el tiempo de residencia del sistema en la cavidad pulmonar y de esta manera asegurar una liberación de vinorelbina más efectiva en el sitio tumoral.<sup>45</sup>

Es relevante mencionar, que las NLC optimizadas presentan las siguientes características de talla, PDI y potencial Z:  $1073 \pm 12.77$  nm,  $PDI 0.441 \pm 0.133$ ,  $-18.3 \pm 1.56$  mV.

### 10.5.1 Recubrimiento con quitosán

A continuación, se presenta el tamaño, PDI y potencial Z de los NLC recubiertos por porcentaje de quitosán utilizado y tiempo de recubrimiento (1 a 3 horas). Los datos desglosados se encuentran en el anexo 12.8.

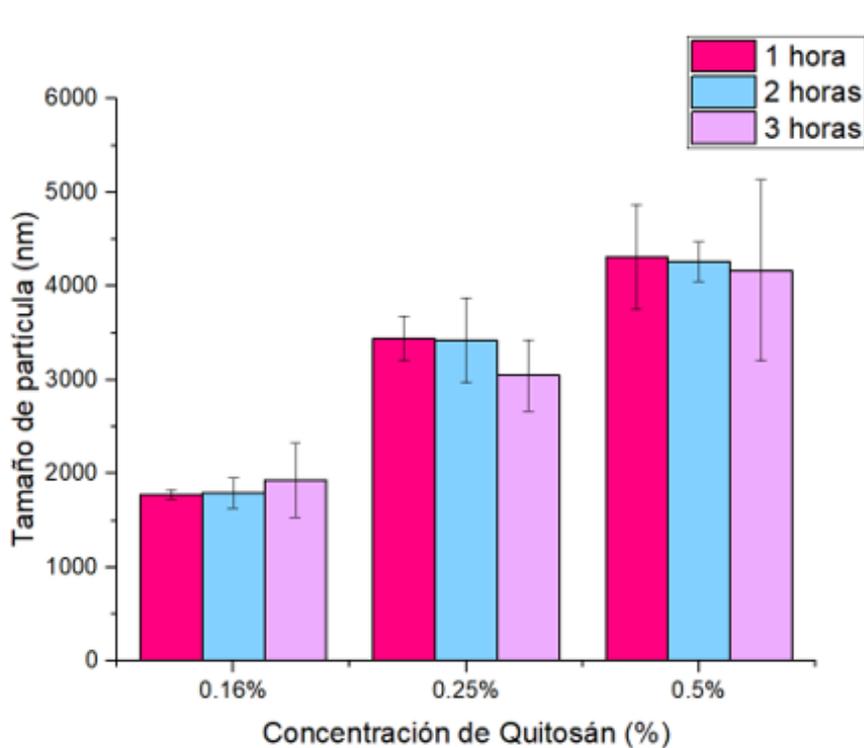


Figura 12. Gráfica que representa el tamaño de partícula obtenido respecto a la concentración de quitosán y el tiempo de recubrimiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Se obtuvo una R-cuadrada de 84.29%, lo que indica este estadístico es que el modelo explica el 84.29% de la variabilidad en el tamaño de partícula. El valor P del ANOVA del tiempo, de la concentración de quitosán y de la combinación del tiempo con la concentración de quitosán, resultó ( $P < 0.5$ ), por lo tanto, las variables tienen un efecto significativo sobre el tamaño de partícula. Se evidencia que a mayor tiempo de recubrimiento y a mayor concentración de quitosán, mayor será el tamaño final de la partícula.

Cabe destacar que el valor de potencial Z de las partículas recubiertas para el mismo experimento en todos los casos fue positivo y superior a 30.0 mV.

Estos valores positivos de potencial Z son deseables para otorgar la propiedad de mucoadhesividad a los NLC debido a que, con esta carga, las partículas pueden ser capaces de interactuar con la mucina de las mucosas. La mucina al estar cargada negativamente, puede entonces interactuar electrostáticamente con la carga positiva de los NLC y propiciar la adhesividad a las mucosas.

La talla objetivo para las NLC es de 2000 nm debido a que, a partir de 500 nm a 5000 nm, es un tamaño de partícula adecuado para la zona de bronquiolos y bronquios terciarios, lugar donde aparece principalmente el cáncer pulmonar de células no pequeñas.<sup>15</sup>

Es por esto que se realizó la optimización con los datos obtenidos fijando la talla objetivo en 2000 nm. Los datos desglosados se encuentran en el anexo 12.9 y 12.10.

Valor óptimo = 2000.0 nm

| <i>Factor</i>              | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Óptimo</i> |
|----------------------------|-------------|-------------|---------------|
| Concentración Quitosán (%) | 0.16        | 0.5         | 0.160891      |
| Tiempo (h)                 | 0.5         | 3.0         | 0.96451       |

*Tabla 11. Resultados de optimización para mantener una talla de 2000.0 con el recubrimiento.*

Con esta información, se obtuvo que, para alcanzar una talla de 2000 nm se debe usar para recubrir una concentración de 0.16% de quitosán y que el tiempo de recubrimiento sea de prácticamente una hora.

## 10.6 Obtención de NLC como polvo seco

### 10.6.1 Secado por liofilización

Para poder obtener los NLC como polvo seco, se seleccionó a la liofilización como proceso de secado. Este proceso puede desestabilizar una suspensión, especialmente durante la etapa de congelación, ya que durante el congelamiento ocurre la cristalización del agua, lo que produce cargas mecánicas sobre la solución crioconcentrada. Esta solución concentrada puede inducir la agregación y en algunos casos una fusión irreversible de partículas. Para dar protección frente a las tensiones generadas durante el congelamiento, se utilizan los crioprotectores. Estos pueden disminuir la interacción entre cadenas de carbono para evitar la desestabilización del sistema una vez que se produce un intercalamiento en las cadenas lipídicas, disminuyendo las fuerzas de atracción de Van der Waals, reduciendo la temperatura de transición de fase y la aglomeración de las partículas.<sup>46</sup>

### 10.6.2 Selección de crioprotectores

Por las razones expresadas anteriormente, para proteger a los NLC en el proceso de congelamiento, se estudiaron cinco crioprotectores diferentes en seis concentraciones cada uno. En la figura 13, se enlistan los resultados de tamaño de partícula, para evidenciar el grado o no de aglomeración de las partículas.

A continuación, se muestra en la tabla 12. La evaluación cualitativa de los liofilizados (n=3).

| Crioprotector | Concentración (%m/v) | Resuspende |
|---------------|----------------------|------------|
| Manitol       | 0.5                  | NO         |
|               | 1                    | NO         |
|               | 2                    | NO         |
|               | 4                    | POCO       |
|               | 8                    | MEDIO      |
|               | 10                   | MEDIO      |
| Isoleucina    | 0.5                  | POCO       |
|               | 1                    | POCO       |
|               | 2                    | POCO       |
|               | 4                    | MEDIO      |
|               | 8                    | MEDIO      |

|           |     |       |
|-----------|-----|-------|
|           | 10  | MEDIO |
| Sorbitol  | 0.5 | NO    |
|           | 1   | NO    |
|           | 2   | NO    |
|           | 4   | NO    |
|           | 8   | NO    |
|           | 10  | NO    |
| Trehalosa | 0.5 | NO    |
|           | 1   | POCO  |
|           | 2   | SI    |
|           | 4   | SI    |
|           | 8   | SI    |
|           | 10  | SI    |
| Dextrosa  | 0.5 | SI*   |
|           | 1   | SI*   |
|           | 2   | NO    |
|           | 4   | NO    |
|           | 8   | NO    |
|           | 10  | NO    |

*Tabla 12. Evaluación cualitativa de resuspendibilidad*

Un sistema en polvo seco liofilizado, debería ser capaz de resuspendirse nuevamente en agua y regresar a su estado original. Para esto, se evaluó la capacidad de resuspendirse nuevamente en agua. Como se aprecia en la tabla 12, en los únicos casos en los cuales las partículas se vuelven a resuspender completamente es con el crioprotector de trehalosa en las concentraciones del 2-10%. En el caso de la dextrosa, en concentraciones de 0.5% y 1.0%, el sistema se puede volver a resuspender, pero el liofilizado obtenido no tiene la característica de un polvo seco.

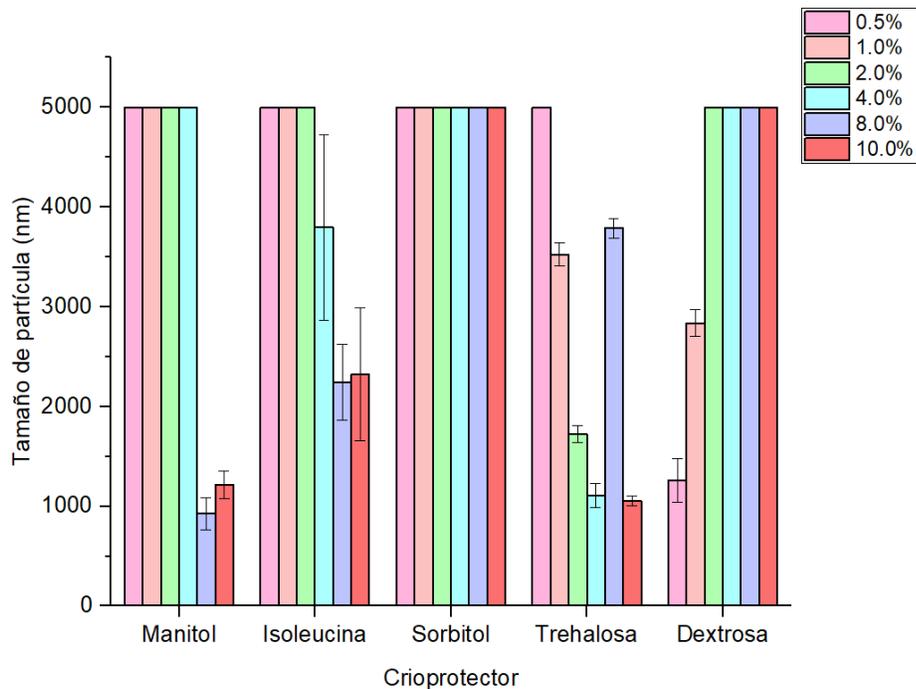


Figura 13. Tamaño de partícula después de resuspender el liofilizado.

En la Figura 13, las barras que graficadas alcanzan un tamaño de 5000 nm, en realidad representan un tamaño de partícula mayor a 5000 nm ya que es el límite de detección del equipo de dispersión de luz dinámica. Comparando la Tabla 12 con la Figura 13, se puede apreciar que este es el caso para los liofilizados que no se pudieron resuspender en su totalidad.

En cuanto a características físicas, los liofilizados con trehalosa son los que demuestran mejor capacidad para resuspenderse a partir de 2.0% de concentración hasta 10.0%.

Con trehalosa al 2.0% se obtiene una talla de  $1726.0 \pm 84.9$  nm, un PDI de  $0.478 \pm 0.066$  y potencial Z de  $35.8 \pm 2.25$  mV. Al mismo tiempo, con una concentración de 4.0% se obtiene una talla de  $1109 \pm 121.7$  nm, un PDI de  $0.529 \pm 0.058$  y potencial Z de  $31.4 \pm 1.66$  mV.

La trehalosa demostró ser el crioprotector adecuado para utilizar en el proceso de liofilizado de los NLC y ambas concentraciones de 2.0% y 4.0% pueden servir para dicho propósito, sin embargo, también es deseable utilizar la menor cantidad de crioprotector por lo que se selecciona la trehalosa al 2.0% como crioprotector para liofilizar el sistema de ahora en adelante.

## 10.7 Caracterización física

### 10.7.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Todos los excipientes que componen a los NLC se analizaron por calorimetría diferencial de barrido, así mismo los NLC (NLC con y sin fármaco y NLC recubiertos con quitosán). Los resultados del análisis se muestran en la figura 14.

El resultado del DSC para ácido oleico confirma que es un aceite libre de agua. Para el compritol, la endoterma a 73.47 °C equivale a su punto de fusión y demuestra el carácter cristalino de este excipiente.<sup>47</sup>

Lo más relevante de esta caracterización física radica en notar la diferencia entre los termogramas de la mezcla física, los termogramas de los excipientes por separado y finalmente los termogramas de las NLC, ya sean sin fármaco, con fármaco y recubiertas.

Se observa que los eventos endotérmicos y exotérmicos de la mezcla física no coinciden con los eventos de los NLC.

En los NLC-VIN, la ausencia de las endotermas de la vinorelbina, da un indicio de la encapsulación del fármaco dentro del sistema.

La ausencia de las endotermas implica la ausencia de un punto de fusión evidente, lo cual es un indicio de que el sistema (NLC) no es cristalino y podría ser nanoestructurado.<sup>48</sup>

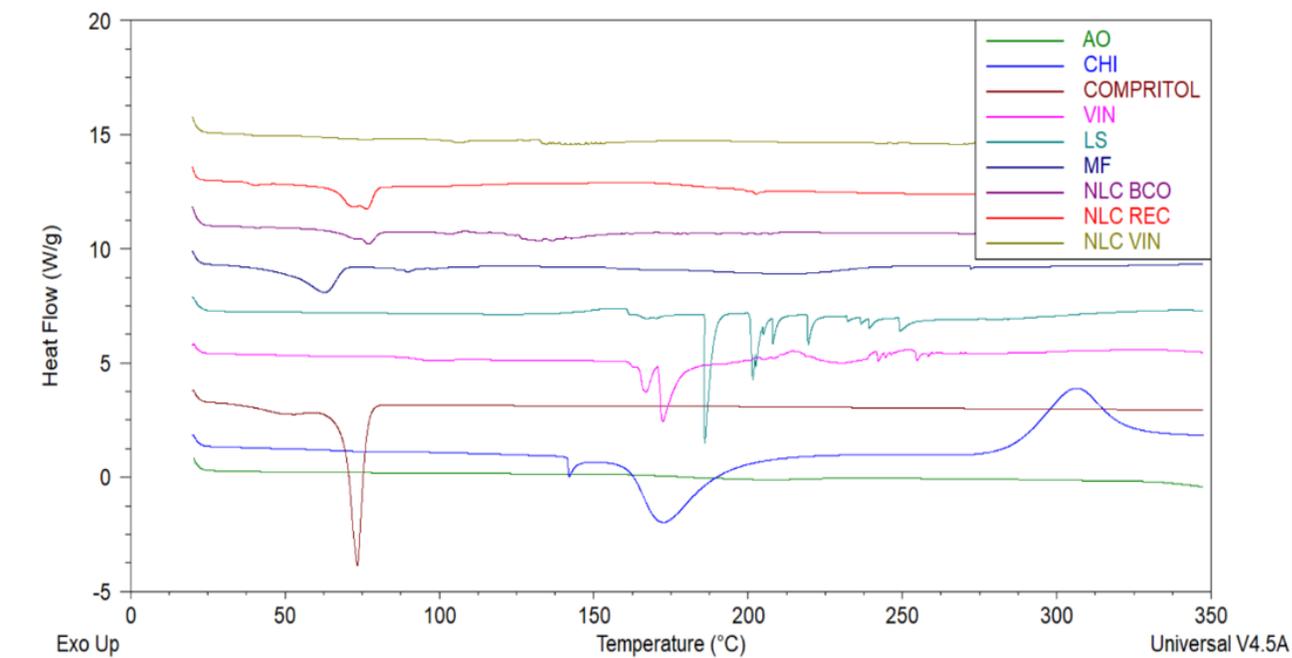


Figura 14. Termogramas de excipientes y NLC.

### 10.7.2 Rayos X de polvos

A continuación, se presentan los difractogramas de los NLC y vinorelbina por separado para su mejor visualización.

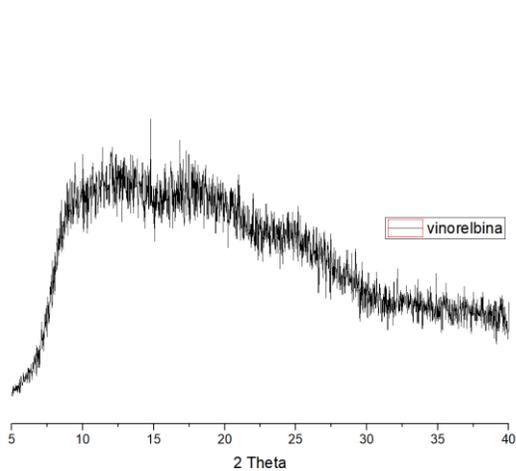


Figura 15. Difractograma de vinorelbina

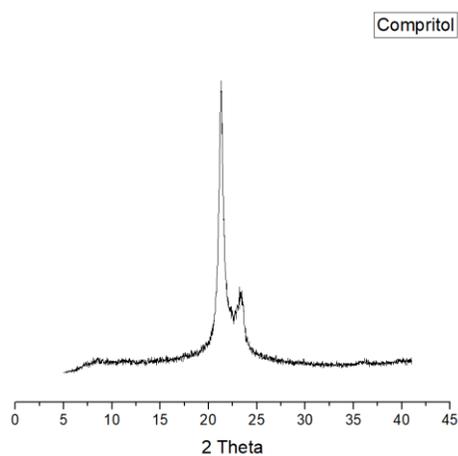


Figura 16. Difractograma de compritol

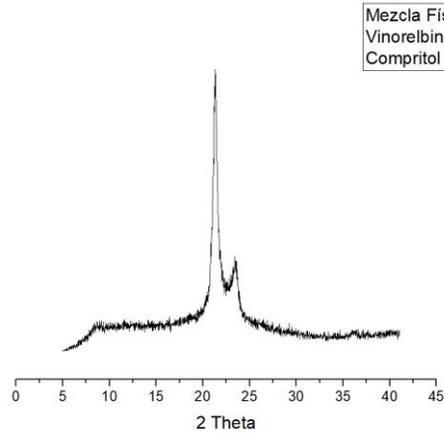


Figura 17. Diffractograma de Mezcla física

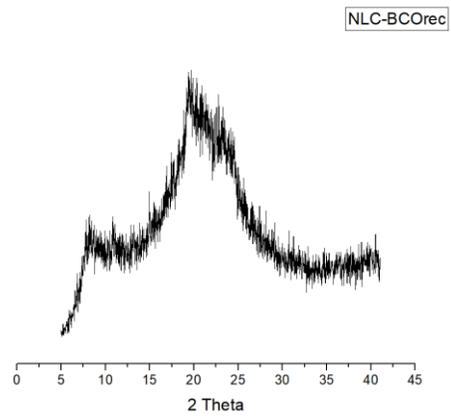


Figura 18. Diffractograma de NLC blanco

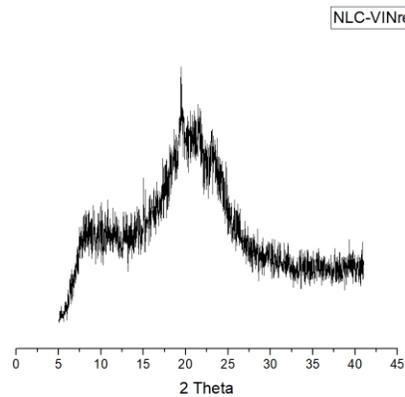


Figura 19. Diffractograma de NLC-vinorelbina

El diffractograma de vinorelbina muestra el patrón característico de un sólido amorfo, correspondiente a la sal amorfa de ditartrato de vinorelbina, en cambio el del compritol muestra un diffractograma típico de un sólido cristalino. En la mezcla física de vinorelbina con el compritol, el diffractograma prácticamente corresponde al mismo del compritol de nuevo demostrando su carácter cristalino.

Comparando los diffractogramas de los NLC blanco (sin fármaco) y los NLC-vinorelbina, se puede observar que prácticamente son iguales y se pueden superponer uno sobre otro, lo que indica que no existe una conversión de amorfo a cristalino del fármaco durante el

proceso y que el NLC es de carácter amorfo y no cristalino, hecho que da un indicio de que se obtiene un acarreador lipídico nanoestructurado y no un acarreador SLP (partícula sólida lipídica).

### 10.7.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

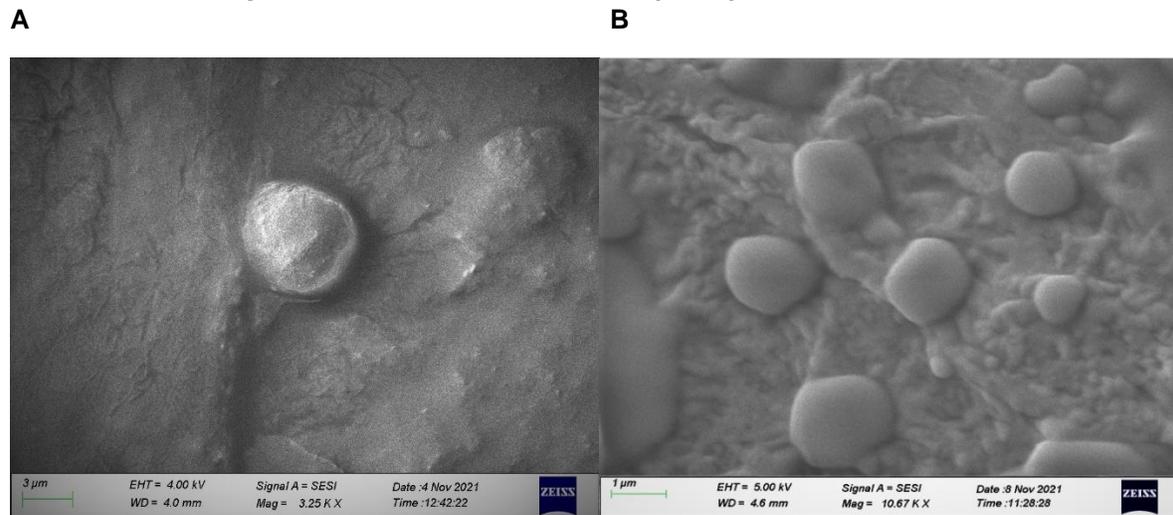


Figura 20. Imagen por microscopía electrónica de barrido de los NLC-vinorelbina. La Figura 20A corresponde a los NLC-vinorelbina sin recubrir y la figura 20B corresponde a los NLC-vinorelbina recubiertos con quitosán.

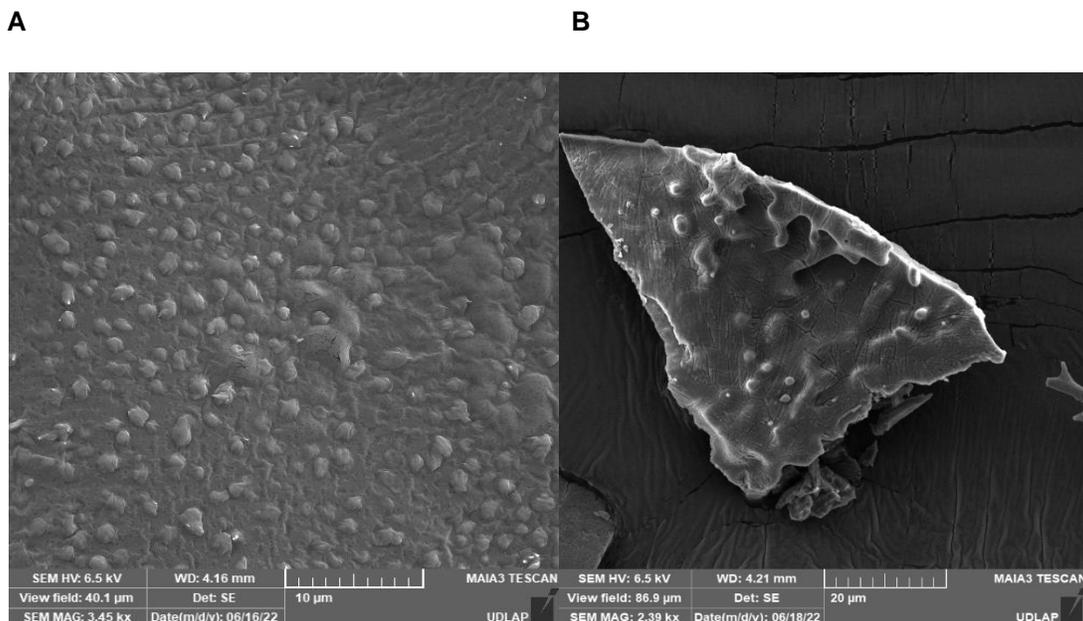


Figura 21. Imagen por microscopía electrónica de barrido de los NLC-vinorelbina en un campo amplio. La Figura 21A corresponde a los NLC- vinorelbina sin recubrir y la Figura 21B corresponde a los NLC-vinorelbina recubiertos. En ésta, los NLC se encuentran sobre un cristal de crioprotector.

Como se puede apreciar en la Figura 20, las partículas son de forma esférica. Las partículas recubiertas son de superficie lisa. De acuerdo a la escala presentada, el tamaño de partícula se encuentra alrededor de 2  $\mu\text{m}$ , tamaño objetivo que se había planteado desde la preformulación del sistema. En la Figura B, se aprecian partículas de menor tamaño, esto concuerda con el hecho de, el valor de PDI, de las NLC-vinorelbina recubiertas, que refiere al ancho de distribución del tamaño de partícula es de  $0.495 \pm 0.204$ , es decir, la distribución no es idealmente monodispersa y por lo tanto existen diversas poblaciones de tamaño de partícula.

En la Figura 21, se muestran dos imágenes de campo más amplio. La Figura 21A muestra los NLC-vinorelbina sin recubrir y la Figura 21B muestra a los NLC-vinorelbina recubiertos. Las partículas se midieron con el software ImageJ y se obtuvo que el tamaño de partícula de los NLC-vinorelbina no recubiertos fue de  $1.024 \pm 0.193 \mu\text{m}$  y el tamaño de partícula de los NLC-vinorelbina recubiertos fue de  $2.055 \pm 0.466 \mu\text{m}$ , con lo cual se vuelve a confirmar el tamaño de partícula antes y después del recubrimiento. Los datos desglosados de las mediciones se encuentran en el anexo 12.11.

#### **10.7.4 Estudios Espectroscópicos**

Para estudiar la interacción entre el fármaco y los excipientes que forman al NLC, se llevó a cabo el análisis por espectroscopía infrarroja. A continuación, se presentan los espectros infrarrojos de los NLC y de los excipientes.

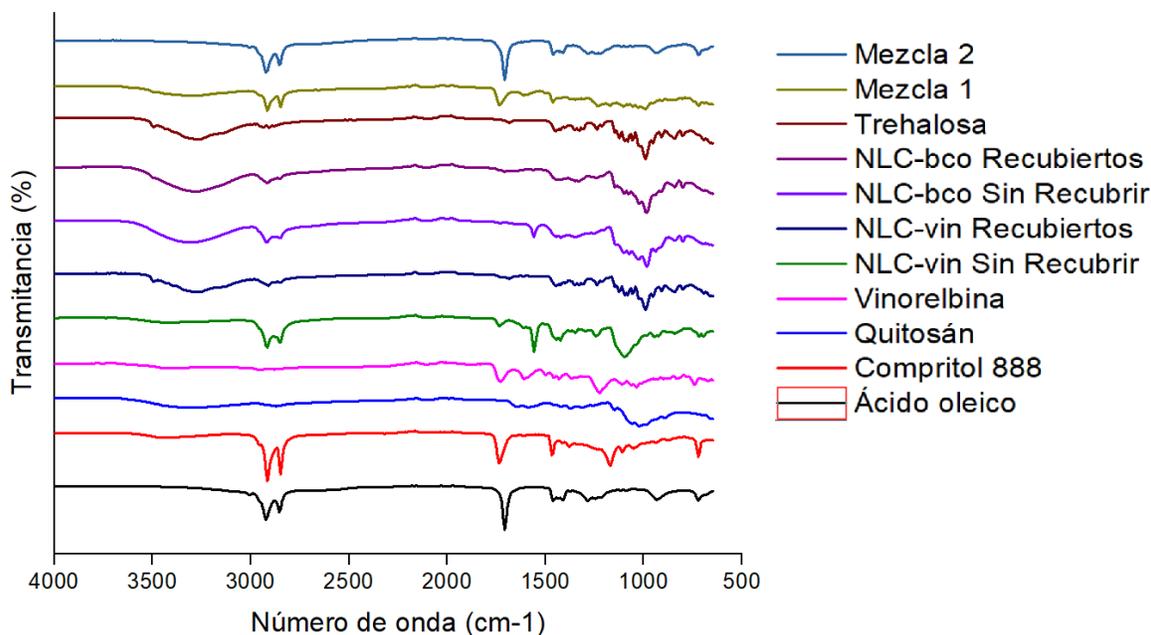


Figura 22. Espectros infrarrojos de los NLC y excipientes. La Mezcla 1 es una mezcla física que contiene todos los excipientes sólidos, incluida la vinorelbina. La Mezcla 2 contiene todos los excipientes sólidos, incluida la vinorelbina y además contiene al excipiente líquido (ácido oleico).

En color rosa, se muestra el espectro infrarrojo de la vinorelbina que confirma su identidad comparada al espectro infrarrojo reportado por Yong Li et al. (2012) para la sal de ditartrato. Se observa el pico de absorción a  $1732\text{ cm}^{-1}$  debido a los grupos carboxilo (COOH) provenientes de la sal de ditartrato (ver Figura 2). Las abundantes bandas entre  $1100$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los diferentes enlaces C-C, C-N presentes en la molécula de vinorelbina.<sup>49</sup>

El quitosán por su parte, presenta su señal más característica en  $1028\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a su huella dactilar de los enlaces C-C (ver Figura 23).

Como se puede observar, las señales de los lípidos, tanto líquido como sólido son similares al ser de la misma naturaleza lipídica, con picos característicos de los enlaces C-H (ver Figura 24 y 25). En los NLC-recubiertos, desaparece de la misma manera, la señal de  $1558\text{ cm}^{-1}$  que corresponde en el compritol® debido al recubrimiento con el quitosán.

Comparando los espectros infrarrojo del fármaco libre, de las mezclas físicas y de los NLC en cualquier modalidad, sólo en el espectro de la vinorelbina libre y en los de las mezclas físicas se presentó la señal remarcable a baja transmisión ( $1732\text{ cm}^{-1}$ ) debido al enlace

carboxilo, no así en los espectros de los NLC debido a que la vinorelbina se encuentra dentro de las partículas.

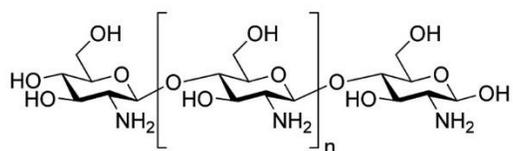


Figura 23. Estructura del quitosán

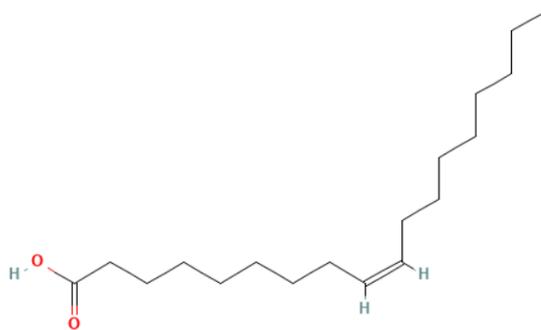


Figura 24. Estructura del ácido oleico

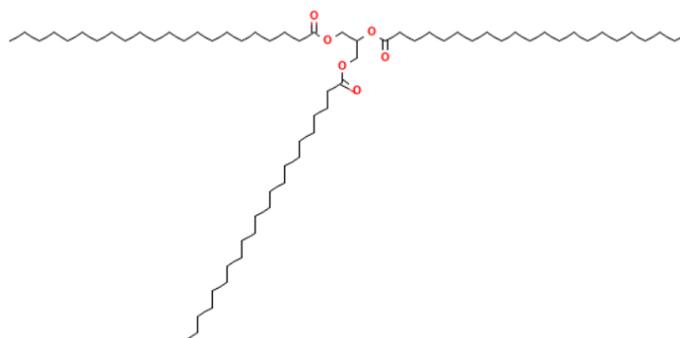


Figura 25. Estructura del Compritol 888

## 10.8 Rendimiento

Se obtuvo un rendimiento del  $63.49 \pm 0.66$  %, es decir que, durante el proceso de obtención de los NLC-vinorelbina existe una pérdida de masa de los excipientes y fármaco, sin embargo, cabe destacar que, a pesar de estas pérdidas, se obtiene un rendimiento mayor al 50% y con una desviación estándar de 0.66%, lo que significa que el método de obtención

de los NLC-vinorelbina es consistente. Los datos desglosados se encuentran en el anexo 12.12.

## **10.9 Capacidad de carga**

A partir de tres lotes, se tomó un triplicado de 1.0 mL de suspensión NLC-vinorelbina, se liofilizó y a partir de éste se determinó la cantidad de vinorelbina presente. Los resultados se calculan a partir de la ecuación 1 de la metodología.

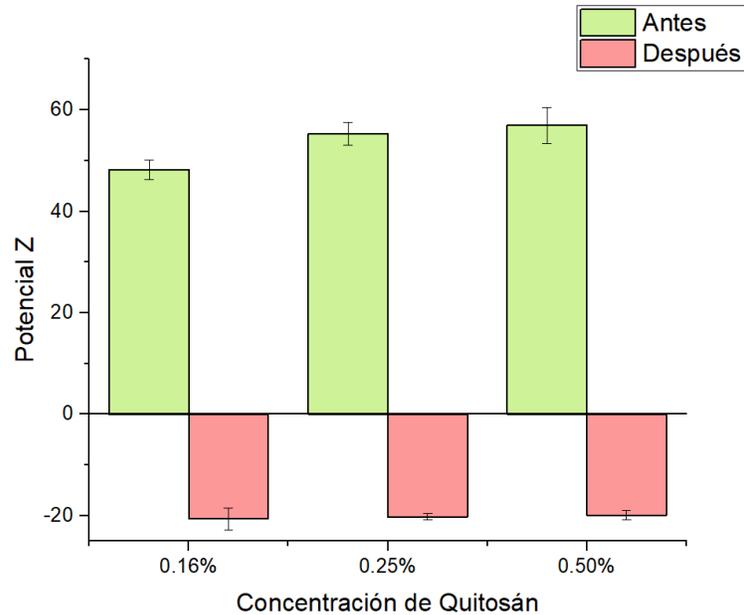
De los resultados se obtiene que la capacidad de carga de vinorelbina en el sistema es de  $15.24 \pm 1.82$  %. En otras palabras, la vinorelbina representará alrededor de un 15% de la masa total del sistema y para administrar una dosis de 10 mg de vinorelbina, se requiere administrar en total 65.62 mg de NLC-vinorelbina. Los datos desglosados se encuentran en el anexo 12.12.

## **10.10 Estudios de eficacia *in vitro***

### **10.10.1 Evaluación de la mucoadhesión**

Se realizó el experimento de mucoadhesividad con el mismo planteamiento del experimento de la tabla 1. El efecto de la mucoadhesividad se ve reflejado en el cambio en el potencial Z.

Para todas las partículas recubiertas con 0.16%, 0.25% y 0.50% se observó un cambio en el potencial Z de positivo (debido a la carga de quitosán) a un potencial Z negativo. Este fenómeno es un indicio de que el quitosán interactúa con las mucinas y se adhieren a éste, otorgándole la carga negativa a la partícula.



*Figura 26. Efecto del cambio en el potencial Z de las partículas recubiertas con quitosán al 0.16%, 0.25% y 0.50% respectivamente tras 24 horas de contacto.*

Se realizó un ANOVA y se obtuvo un valor P para las variables de tiempo y concentración de quitosán, y se observó que ni el tiempo de recubrimiento ni la concentración de quitosán tienen un efecto significativo ( $P > 0.5$ ) sobre la mucoadhesión, que en este caso es medido a través del potencial Z. Los datos completos del diseño experimental se encuentran en el anexo.

Debido a que no existe un cambio significativo en la mucoadhesión al utilizar diferentes partículas recubiertas con diferentes concentraciones de quitosán ni el tiempo de recubrimiento, entonces estos datos sólo comprueban que ocurre la adhesión de la mucina a los NLC. Se puede apreciar este fenómeno al cambiar el potencial Z de positivo (partículas recubiertas con quitosán) a un potencial Z negativo (experimento de mucoadhesión).

Se realizó un experimento de comprobación de las partículas recubiertas ( $n=3$ ). Las cuales obtuvieron un tamaño de partícula de  $1744.0 \pm 33.1$  nm con un PDI de  $0.495 \pm 0.207$  y un potencial Z de  $48.2 \pm 1.9$  mV.

Se realizó el experimento de mucoadhesividad a las mismas partículas de la comprobación ( $n=3$ ). Las cuales obtuvieron un tamaño de partícula de  $1720.7 \text{ nm} \pm 42.0$  con un PDI de  $0.336 \pm 0.053$  y un potencial Z de  $-20.6 \pm 2.2$  mV (los datos completos se encuentran en el

anexo 12.10). Con estos datos se puede comprobar que en efecto existe una adhesión de la mucina hacia las NLC recubiertas, debido a que originalmente, el potencial Z otorgado por el quitosán es positivo y después de entrar en contacto con la mucina, se vuelve negativo.

## 10.10.2 Formulación de NLC como polvo seco para inhalación

### 10.10.2.1 Selección de excipientes para inhalar

A partir de estudios previos de formulaciones similares del laboratorio de sistemas de liberación de la Facultad de Farmacia, se seleccionaron dos tipos de lactosa y se consideraron las siguientes proporciones NLC-vinorelbina:lactosa, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3.

### 10.10.2.2 Mezclado

En todos los casos, se obtuvo una mezcla de polvo homogénea con el mezclado que se llevó a cabo en bolsas de plástico herméticas. La fácil homogeneización de la mezcla es deseable dentro del proceso de manufactura para asegurar la uniformidad de contenido de cada lote.

### 10.10.2.3 Reología de Polvos

Como se menciona en la metodología, el flujo de las mezclas NLC-vinorelbina: lactosa se evaluó mediante la densidad aparente y compactada, índice de Carr, Índice de Hausner y ángulo de reposo. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (n=3).

| Mezcla                | Proporción (NLC-vinorelbina:lactosa) | Densidad aparente (g/mL) | Densidad compactada (g/mL) | Índice de Carr | Índice de Hausner | Ángulo de reposo (°) |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------|-------------------|----------------------|
| NLC: Respitose® ML001 |                                      |                          |                            |                |                   |                      |
| 1                     | 2:1                                  | 0.33±0.00                | 0.41±0.00                  | 20.00±0.00     | 1.25±0.00         | 47.72±1.20           |
| 2                     | 1:1                                  | 0.33±0.03                | 0.45±0.04                  | 26.67±0.00     | 1.36±0.00         | 39.07±2.33           |
| 3                     | 1:2                                  | 0.45±0.00                | 0.55±0.00                  | 17.24±0.00     | 1.21±0.00         | 28.69±3.84           |
| 4                     | 1:3                                  | 0.51±0.00                | 0.62±0.00                  | 18.52±0.00     | 1.23±0.00         | 31.27±1.69           |
| NLC: Lactohale® 200   |                                      |                          |                            |                |                   |                      |
| 5                     | 2:1                                  | 0.31±0.01                | 0.41±0.02                  | 26.21±2.23     | 1.36±0.04         | 46.25±0.03           |
| 6                     | 1:1                                  | 0.33±0.01                | 0.49±0.00                  | 32.60±2.33     | 1.48±0.05         | 36.19±0.68           |
| 7                     | 1:2                                  | 0.42±0.04                | 0.54±0.07                  | 21.57±3.40     | 1.28±0.05         | 36.19±0.68           |
| 8                     | 1:3                                  | 0.57±0.00                | 0.66±0.00                  | 14.29±0.00     | 1.17±0.00         | 30.79±1.03           |

Tabla 13. Resultados de la reología de polvos, las mezclas se encuentran en una proporción NLC-vinorelbina: lactosa en masa. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar.

Dentro de los excipientes acarreadores para inhalación, se encuentran la lactosa, el manitol y la trehalosa, pero estudios han demostrado un mejor desempeño en la aerolización al utilizar lactosa. Una menor densidad del polvo está asociada a una mayor fracción respirable. Una densidad compactada menor a 0.3 g/mL está asociada a una exitosa aerolización con una alta fracción respirable.<sup>50</sup>

Aunque ninguna mezcla exhiba una densidad compactada menor a 0.3 g/mL, al menos tres mezclas tienen valores de densidad relativamente bajos (mezcla 1, 2 y 5) y cabe destacar que la densidad no es el único parámetro que predice la capacidad de aerolización.

El índice de Carr ha sido propuesto como una evaluación indirecta del flujo de los polvos porque se ve afectado directamente por variaciones en la densidad aparente, el tamaño, la forma, el área superficial, el contenido de humedad y cohesividad de los materiales. El índice de Carr y el Índice de Hausner que están estrechamente relacionados, se calculan a partir de las densidades aparente y compactada. Se considera un flujo pobre cuando el Índice de Carr > 20.0% o el Índice de Hausner > 1.25 y está relacionado con la compresibilidad; entre más compresible sea un polvo, más poroso y cohesivo será.<sup>51</sup>

Como se aprecia en la tabla 13, las mezclas 2, 5, 6 y 7 tienen un Índice de Carr mayor a 20% y un Índice de Hausner mayor a 1.25 indicando un flujo pobre para esas mezclas de polvos. De manera general el Índice de Carr y de Hausner parecen disminuir, es decir, mejora el flujo al aumentar la proporción de lactosa, sin embargo, al mismo tiempo y en el mismo sentido aumenta la densidad compactada, disminuyendo la expectativa de aerolización.

El ángulo de reposo estático, se refiere al ángulo relativo a la base del cono piramidal que resulta de la caída libre del polvo a través del embudo y está relacionado a la fricción interparticular o, dicho de otro modo, a la resistencia al flujo de las partículas. Generalmente un ángulo de reposo menor a 40° indica propiedades adecuadas de flujo en polvos para inhalación y uno mayor a 50° indica un flujo pobre.<sup>51</sup> Las mezclas 2,3,4,6,7,8 presentan un ángulo de reposo menor a 40° y sólo en las que predomina la proporción de NLC-vinorelbina se presenta un flujo muy pobre.

Tanto el ángulo de reposo, el índice de Carr y el de Hausner, son propiedades de los polvos no intrínsecas y por lo tanto dependen en gran medida de la metodología utilizada para su cálculo. Aunque el Índice de Carr esté relacionado con propiedades cohesivas y de

compactación, el análisis de Kawakita es más detallado y completo para analizar esta propiedad.

#### 10.10.2.4 Compactibilidad y cohesividad

Los resultados del análisis por Kawakita se presentan en la siguiente tabla (n=3). Las gráficas obtenidas de cada mezcla se desglosan en el anexo 12.13.

| Mezcla                | Proporción<br>(NLC-<br>vinorelbina:<br>lactosa) | Compactibilidad (a) | Cohesividad (1/b) | Coefficiente de<br>determinación (r <sup>2</sup> ) |
|-----------------------|---|---------------------|-------------------|--|
| NLC: Respitose® ML001 |   |                     |                   |  |
| 1                     | 2:1   | 0.2320 ± 0.0027     | 20.7738 ± 1.7087  | 0.9770   |
| 2                     | 1:1   | 0.2989 ± 0.0030     | 16.8964 ± 2.2419  | 0.9831   |
| 3                     | 1:2   | 0.1838 ± 0.0093     | 8.5941 ± 7.0468   | 0.9885   |
| 4                     | 1:3   | 0.1904 ± 0.0018     | 3.3644 ± 1.2251   | 0.9985   |
| NLC: Lactohale® 200   |   |                     |                   |  |
| 5                     | 2:1   | 0.2353 ± 0.0188     | 12.9244 ± 7.8781  | 0.9480   |
| 6                     | 1:1   | 0.3456 ± 0.0216     | 7.7270 ± 1.8612   | 0.9969   |
| 7                     | 1:2   | 0.2274 ± 0.0351     | 6.8263 ± 2.6986   | 0.9971   |
| 8                     | 1:3   | 0.1497 ± 0.0046     | 5.6610 ± 4.0186   | 0.9956   |

*Tabla 14. Análisis por Kawakita de las mezclas NLC-vinorelbina: lactosa. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar.*

Las gráficas de Kawakita (N/C versus N) de las mezclas de NLC-vinorelbina: lactosa en sus diferentes proporciones resultaron en una relación lineal ( $r^2 > 0.9$ ). Las constantes de Kawakita indican el comportamiento de los polvos desde el estado de densidad aparente hasta el estado de densidad compactada. Entre menor es el valor de “a” se revela un flujo mejor, esta constante que describe el grado de reducción de volumen en el límite de los asentamientos refleja la compactibilidad del polvo. “1/b”, es considerada una constante de la cohesividad que mientras menor sea, demuestra una menor cohesividad.<sup>38</sup>

De acuerdo a los resultados de la tabla 14. Las mezclas más cohesivas son aquellas en las que la proporción de lactosa es menor y es congruente con la compactibilidad del polvo, ya que igualmente a menor valor de “a” demuestra un mejor flujo. Estos resultados son

congruentes con la tendencia que se observaba en la tabla 14. A mayor proporción de lactosa, mejora el flujo del polvo.

### 10.10.2.5 Propiedades aerodinámicas

La masa media aerodinámica (MMAD) divide a la distribución en dos, ya que es el diámetro con el cual el 50% de las partículas son mayores en masa y 50% son menores. Como descrito en la metodología, el cálculo se llevó a cabo como lo indica la USP en el método 601. Las gráficas del análisis completas se encuentran en el anexo 12.14. La tabla 15 resume los resultados.

| Mezcla                | Proporción (NLC-vinorelbina: lactosa) | MMAD ( $\mu\text{m}$ ) | GSD             |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------|
| NLC: Respitose® ML001 |                                       |                        |                 |
| 1                     | 2:1                                   | 3.28 $\pm$ 0.11        | 3.10 $\pm$ 0.03 |
| 2                     | 1:1                                   | 2.06 $\pm$ 0.56        | 2.83 $\pm$ 0.29 |
| 3                     | 1:2                                   | 3.38 $\pm$ 0.41        | 3.14 $\pm$ 0.04 |
| 4                     | 1:3                                   | 2.45 $\pm$ 0.23        | 2.86 $\pm$ 0.05 |
| NLC: Lactohale® 200   |                                       |                        |                 |
| 5                     | 2:1                                   | 3.15 $\pm$ 0.38        | 2.94 $\pm$ 0.13 |
| 6                     | 1:1                                   | 5.88 $\pm$ 0.44        | 3.87 $\pm$ 0.13 |
| 7                     | 1:2                                   | 2.50 $\pm$ 0.22        | 2.61 $\pm$ 0.05 |
| 8                     | 1:3                                   | 2.88 $\pm$ 0.37        | 2.89 $\pm$ 0.05 |

Tabla 15. Se muestran los resultados para la masa media aerodinámica (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD) como  $\mu \pm \sigma$ .

La desviación estándar geométrica (GSD) se define como la desviación del logaritmo del diámetro de la partícula, pero su valor se entiende dentro de una distribución log-normal: el 68% de la masa del polvo aerolizado contiene diámetros de partículas entre los valores de  $\text{MMAD} \cdot \text{GSD}$  y  $\text{MMAD}/\text{GSD}$ . Esto implica que el 84% de la masa del polvo o aerosol está contenido en partículas con diámetros menores a  $d_{84} = \text{MMAD} \cdot \text{GSD}$ , mientras que el 16% está contenido en partículas de diámetro menor a  $d_{16} = \text{MMAD}/\text{GSD}$  y por lo tanto se calcula a partir de la gráfica log normal como<sup>52</sup>:

$$GSD = \sqrt{\frac{d_{84}}{d_{16}}}$$

Ecuación 10. Cálculo de GSD a partir de la gráfica log-normal.

Para las mezclas NLC-vinorelbina: lactosa, se obtuvieron valores de GSD de 2.61 a 3.87. El uso del GSD para describir la distribución de tamaño de partícula sólo toma valor cuando la distribución se ajusta a la distribución log-normal. Un aerosol considerado como “ideal” es aquel con un  $GSD=1$  pero aerosoles con un  $GSD < 1.22$  ya son considerados homogéneos; los aerosoles con un  $GSD \geq 1.22$  son considerados polidispersos o heterogéneos; sin embargo, comúnmente, la mayoría de los aerosoles terapéuticos son polidispersos y tienen un GSD en el intervalo de 2-3. Sólo las mezclas 1,3,5 y 6 rebasarían ligeramente el valor convencional de GSD. <sup>53</sup>

En cuanto a la MMAD, en todos los casos, salvo en la mezcla 6, se obtienen valores entre 2-5  $\mu\text{m}$ . Debido a que con esta formulación se pretende tener un efecto local de la vinorelbina sobre el sitio tumoral, estos valores de MMAD son adecuados para que la formulación se deposite por sedimentación (por acción de la gravedad) en la zona de bronquios terciarios y bronquiolos, ya que partículas de MMAD menor a 0.5 difunden y se depositan en los alveolos, objetivo ideal si se pretende tener un efecto sistémico. La mezcla 6, es la única que se impactaría un poco más arriba en el tracto respiratorio, debido al MMAD que presenta.<sup>23</sup>

De manera general, ambas lactosas demuestran ser acarreadores potenciales para la formulación de NLC-vinorelbina. La diferencia entre ellas es que la lactosa para inhalación Respitose® ML001 es una lactosa de grado inhalable que contiene partículas de forma irregular y una gran cantidad de partículas finas que la hacen una lactosa cohesiva. La distribución de tamaño de partícula es ancha y tiene un tamaño de partícula medio ( $d_{50}$ ) de 37 a 61  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, la lactosa para inhalación Lactohale® 200 permite un  $d_{50}$  más estrechamente controlado, presenta un  $d_{50}$  de 50-100  $\mu\text{m}$  y también tiene cierto grado de cohesividad. <sup>54</sup>

#### **10.10.2.6 Pruebas de liberación *in vitro***

La liberación de fármaco a partir de sistemas multiparticulados es controlada por diferentes mecanismos dependiendo del tipo de sistema, estos incluyen la difusión del fármaco, la disolución del polímero y/o del fármaco a partir de éste y en algunos casos debido a procesos de hinchamiento polimérico y de erosión, entre muchos otros. Como

consecuencia, el modelamiento matemático de los perfiles de liberación de estos sistemas es un asunto complejo.<sup>55</sup>

A continuación, se presentan los perfiles de liberación de la vinorelbina tanto de los NLC recubiertos como los no recubiertos.

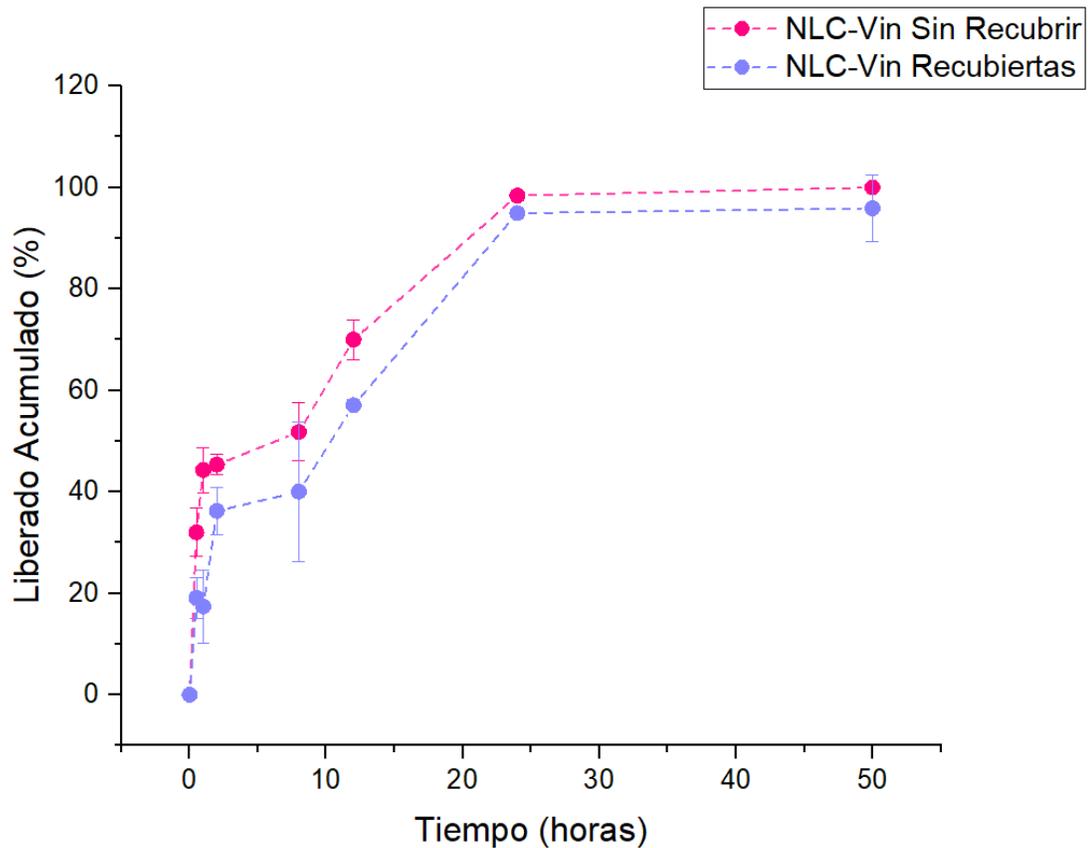


Figura 27. Perfiles de liberación de vinorelbina representado como porcentaje liberado acumulado vs tiempo.

Como se mencionó en la metodología, se realizó el ajuste de los perfiles a seis modelos matemáticos diferentes. Se obtuvieron los parámetros (en los casos correspondientes), el coeficiente de determinación  $R^2$ , el criterio de selección de Akaike (AIC) y la constante de liberación ( $k$ ).

| Modelo           | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> -adj | MSC     | AIC     | Constante (k)  | Parámetro           |
|------------------|----------------|---------------------|---------|---------|--|---------------------|
| Orden Cero       | -0.1323        | -0.1323             | -0.8622 | 74.7946 | 2.666 ±<br>0.020 h <sup>-1</sup>   | -                   |
| Primer Orden     | 0.6935         | 0.6935              | 0.4445  | 64.3415 | 0.150 ±<br>0.023 h <sup>-1</sup>   | -                   |
| Higuchi          | 0.7029         | 0.7029              | 0.4759  | 64.0902 | 17.533 ±<br>0.240 h <sup>-1/2</sup>  | -                   |
| Korsmeyer-Peppas | 0.9518         | 0.9437              | 2.0439  | 51.5459 | 38.107 ±<br>2.686 h <sup>-1</sup>  | n= 0.256 ±<br>0.019 |
| Hixson-Crowell   | 0.6216         | 0.6216              | 0.2340  | 66.0255 | 0.029 ±<br>0.001 h <sup>-1/3</sup>   |                     |
| Peppas-Sahlin    | 0.9153         | 0.8730              | 1.6118  | 47.4682 | K1: 26.704 ±<br>1.866 h <sup>-1</sup><br>K2: 11.699 ±<br>1.291 h <sup>-1</sup> | m= 0.184 ±<br>0.014 |

Tabla 16. Parámetros del ajuste de los NLC-vinorelbina no recubiertos.

| Modelo           | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> -adj | MSC    | AIC     | Constante (k)  | Parámetro           |
|------------------|----------------|---------------------|--------|---------|--|---------------------|
| Orden Cero       | 0.4627         | 0.4627              | 0.1080 | 69.6782 | 2.486 ±<br>0.135 h <sup>-1</sup>   | -                   |
| Primer Orden     | 0.8933         | 0.8933              | 1.7243 | 56.7475 | 0.088 ±<br>0.018 h <sup>-1</sup>   | -                   |
| Higuchi          | 0.9039         | 0.9039              | 1.8291 | 55.9091 | 15.757 ±<br>0.959 h <sup>-1/2</sup>  | -                   |
| Korsmeyer-Peppas | 0.9379         | 0.9275              | 2.0152 | 54.4204 | 23.051 ±<br>0.386 h <sup>-1</sup>  | n=0.386 ±<br>0.051  |
| Hixson-Crowell   | 0.8881         | 0.8881              | 1.6769 | 57.1266 | 0.024 ±<br>0.003 h <sup>-1/3</sup>   | -                   |
| Peppas-Sahlin    | 0.9232         | 0.8848              | 1.7095 | 49.4503 | K1: 19.836 ±<br>6.551 h <sup>-1</sup><br>K2: -0.950 ±<br>0.458 h <sup>-1</sup> | m= 0.562 ±<br>0.130 |

Tabla 17. Parámetros del ajuste de los NLC-vinorelbina recubiertos

El criterio de selección para un modelo adecuado que se ajuste a los datos del perfil de liberación se basa en criterios de parámetros estadísticos. Para evaluar la bondad del ajuste a un modelo los parámetros que se toman en cuenta son: el coeficiente de correlación ( $R_{\text{obs-pre}}$ ), el coeficiente de determinación ( $R_{\text{sqr}}$  o  $R^2$ ), el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2\text{-adj}$ ), el error cuadrático medio (MSE), la desviación estándar de los residuales ( $\text{MSE\_root}$ ), el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de selección del modelo (MSC). Dentro de estos criterios, los más usados son el  $R^2\text{-adj}$ , el AIC y el MSC. Para modelos con el mismo número de parámetros, se puede usar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para discriminar y elegir el mejor modelo. De cualquier manera, el modelo adecuado será aquel con el valor más elevado de  $R^2\text{-adj}$ .<sup>56</sup>

A pesar de tener estos criterios establecidos, se debe mencionar que cuando se evalúan modelos mecanísticos, la selección del modelo no sólo se debe basar en la bondad del ajuste, pero también en la plausibilidad mecanística del modelo.

De acuerdo a los parámetros mostrados en las tablas anteriores, tanto para los NLC-vinorelbina no recubiertos como recubiertos, el modelo que mejor se ajustan bajo el criterio de  $R^2\text{-adj}$ , es el de Korsmeyer-Peppas con un valor de 0.9437 y 0.9275 respectivamente.

Por otro lado, el criterio de Akaike ha sido muy usado por décadas por su aplicabilidad y simplicidad en general, lo cual lo hace un criterio muy popular para diferentes propósitos incluido el análisis de liberación de fármacos. Cuando se compara a dos modelos con diferente número de parámetros, el modelo con el menor valor de AIC se puede considerar como el mejor modelo.<sup>56</sup>

Para este parámetro y de nuevo en ambos tipos de partículas, el menor valor de AIC se obtiene con el modelo de Peppas-Sahlin pero las cifras oscilan en la misma magnitud en todos los casos.

El criterio de selección del modelo, también tiene mucha relevancia para elegir el modelo. En cierta manera, el MSC es una forma modificada pero recíproca del AIC, pero que ha sido normalizada para que sea independiente de la escala de los puntos experimentales. Para comparar diferentes modelos, el modelo más apropiado será aquel con el mayor valor de MSC. Generalmente un valor de  $\text{MSC} > 2$  indica un buen ajuste.<sup>56</sup>

Bajo este criterio, el único modelo que presenta un  $\text{MSC} > 2$  es el de Korsmeyer-Peppas, tanto para la liberación de vinorelbina de los NLC-vinorelbina no recubiertos como

recubiertos. Así mismo, es con el que se obtiene el valor de  $R^2$ -adj mayor, por lo que se puede concluir que es el modelo de mejor ajuste.

Este modelo, también llamado ley de potencia es una forma de describir la liberación de fármaco de manera semi-empírica. Principalmente se usa para estudiar la liberación de fármaco de sistemas poliméricos, pero también para sistemas en donde el mecanismo no es conocido o donde están relacionados varios fenómenos. A partir del modelo se obtiene el parámetro  $n$ , que en el caso de los NLC-vinorelbina no recubiertos es igual a  $0.256 \pm 0.019$  y para los NLC-vinorelbina recubiertos de  $n=0.386 \pm 0.051$

Cuando el parámetro  $n$  es igual a 0.5, significa que la liberación de fármaco es el resultado de una difusión fickiana, si  $n$  es igual a 1.0, se presenta un caso de transporte no fickiano también llamado transporte caso II y si  $n$  supera el valor de 1.0 entonces se habla de la presencia de un supercaso de transporte tipo II.

Los valores de  $n$  obtenidos son menores a 0.5, y por lo tanto, significa que la liberación del fármaco está asociada a la presencia de poros en la matriz del NLC y una subsecuente difusión simultánea del fármaco por la matriz a través de los poros formados que se llenan de medio de disolución.<sup>57</sup>

## 11 CONCLUSIONES

- Se desarrolló, caracterizó y avaluó de manera in vitro una formulación inhalable para vinorelbina en un sistema multiparticulado de NLC.
- Se obtuvieron NLC-vinorelbina optimizados por el método de doble emulsión-evaporación de disolvente con una EE de  $27.09 \pm 4.96$  %, una CC de  $15.24 \pm 1.82$  % con un rendimiento de  $63.49 \pm 0.66$  %.
- Se obtuvieron NLC-vinorelbina recubiertos con propiedades mucoadhesivas ( $1726.0 \pm 84.9$  nm)
- Se obtuvieron los NLC-vinorelbina recubiertos como polvo seco utilizando trehalosa como crioprotector al 2.0% (m/v).
- Se caracterizaron físicamente los NLC por calorimetría diferencial de barrido, rayos X de polvos y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier.
- Se corroboró la morfología y tamaño de los NLC-vinorelbina por microscopía electrónica de barrido.

- El mecanismo de liberación de vinorelbina de los NLC se lleva a cabo de manera controlada por 50 horas, ajustándose un perfil de liberación Korsmeyer-Peppas, que en este caso explica un tipo de liberación asociada a la difusión de fármaco a través de la matriz.
- Diversas formulaciones de NLC-vinorelbina: lactosa mostraron un MMAD y GSD adecuados para la administración pulmonar del sistema y demostraron propiedades reológicas adecuadas para su aerolización.
- Se desarrolló, caracterizó y evaluó *in vitro*, una formulación inhalable para vinorelbina basada en un sistema de polvo seco multiparticulado de NLC para administración pulmonar como potencial tratamiento para cáncer pulmonar.

## 12 ANEXOS

### 12.1 Pruebas de solubilidad

Se presentan en la siguiente tabla los resultados de las pruebas de solubilidad de vinorelbina.

|                         | <b>Excipiente/Disolvente</b>      | <b>Solubilidad de vinorelbina (mg/mL) o (mg/g)</b> |
|-------------------------|-----------------------------------|--|
| <b>Lípidos líquidos</b> | Ácido oleico                      | 0.7262 ± 0.0109                                    |
|                         | Aceite de girasol                 | 0.7262 ± 0.0041                                    |
|                         | Aceite de sésamo                  | 0.7238 ± 0.0041                                    |
|                         | Aceite de linaza                  | 0.7238 ± 0.0082                                    |
|                         | Miristato de isopropilo           | 0.7238 ± 0.0041                                    |
|                         | Palmitato de isopropilo           | 0.7238 ± 0.0082                                    |
|                         | Aceite de ricino                  | 0.7214 ± 0.0071                                    |
|                         | Aceite de germen de trigo         | 0.7119 ± 0.0041                                    |
|                         | Triglicéricos cápricos/caprílicos | 0.7119 ± 0.0041                                    |
|                         | Aceite mineral                    | 0.7238 ± 0.0041                                    |
|                         | Glicerina                         | 0.7262 ± 0.0041                                    |
| <b>Lípidos sólidos</b>  | Suppocire                         | 5.0064 ± 0.0332                                    |
|                         | Palmitato de cetilo               | 4.9793 ± 0.0293                                    |
|                         | Ácido estéarico                   | 5.0284 ± 0.0287                                    |
|                         | Compritol 888                     | 5.0303 ± 0.0297                                    |
|                         | Monoestearato de glicerol         | 5.0401 ± 0.0110                                    |
|                         | Lipocire                          | 5.0086 ± 0.0331                                    |
|                         | Cera de abeja                     | 5.0093 ± 0.0311                                    |
|                         | Tefose HC                         | 4.9619 ± 0.0263                                    |
| <b>Disolventes</b>      | Agua                              | 250.83 ± 1.44                                      |
|                         | Metanol                           | 506.66 ± 2.89                                      |
|                         | Etanol                            | 166.66 ± 0   |
|                         | DMSO                              | 202.00 ± 0   |
|                         | Acetona                           | 200.66 ± 1.15                                      |
|                         | Acetato de etilo                  | 0.7119 ± 0.0041                                    |
|                         | NaOH 0.1N                         | 0.7143 ± 0   |
|                         | Diclorometano                     | 203.33 ± 1.15                                      |

Tabla 18: Resultados de solubilidad de vinorelbina en lípidos líquidos, lípidos sólidos y disolventes

| <b>Disolvente</b>       | <b>Lípido</b>             | <b>Solubilidad del lípido (mg/mL)</b> |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <b>Acetona</b>          | Monoestearato de glicerol | 19.60 ± 0.20                          |
|                         | Ácido estéarico           | 33.66 ± 0.66                          |
|                         | Compritol 888             | 0.8309 ± 0.0041                       |
|                         | Lecitina de soya          | 0.6833 ± 0.0041                       |
|                         | Fosfatidilcolina          | 0.6857 ± 0.0071                       |
| <b>Acetato de etilo</b> | Monoestearato de glicerol | 12.500 ± 0.2165                       |
|                         | Ácido estéarico           | 24.7500 ± 0.6614                      |
|                         | Compritol 888             | 0.7595 ± 0.0041                       |
|                         | Lecitina de soya          | 51.5000 ± 1.5000                      |
|                         | Fosfatidilcolina          | 7.1777 ± 0.1018                       |
| <b>Diclorometano</b>    | Monoestearato de glicerol | 22.3889 ± 1.1523                      |
|                         | Ácido estéarico           | 50.0000 ± 1.3229                      |
|                         | Compritol 888             | 14.5714 ± 0.1428                      |
|                         | Lecitina de soya          | 211.5873 ± 1.6723                     |
|                         | Fosfatidilcolina          | 220.8333 ± 3.1458                     |
| <b>Glicerol</b>         | Monoestearato de glicerol | 0.7881 ± 0.0179                       |
|                         | Ácido estéarico           | 0.8000 ± 0.0143                       |
|                         | Compritol 888             | 0.7428 ± 0.0143                       |
| <b>Aceite mineral</b>   | Monoestearato de glicerol | 0.7690 ± 0.0179                       |
|                         | Ácido estéarico           | 101.3333 ± 1.5275                     |
|                         | Compritol 888             | 105.0000 ± 2.0000                     |

*Tabla 19: Resultados de solubilidad de vinorelbina y lípidos sólidos en disolventes.*

## 12.2 Modelo de ajuste del método de cuantificación espectrofotométrico

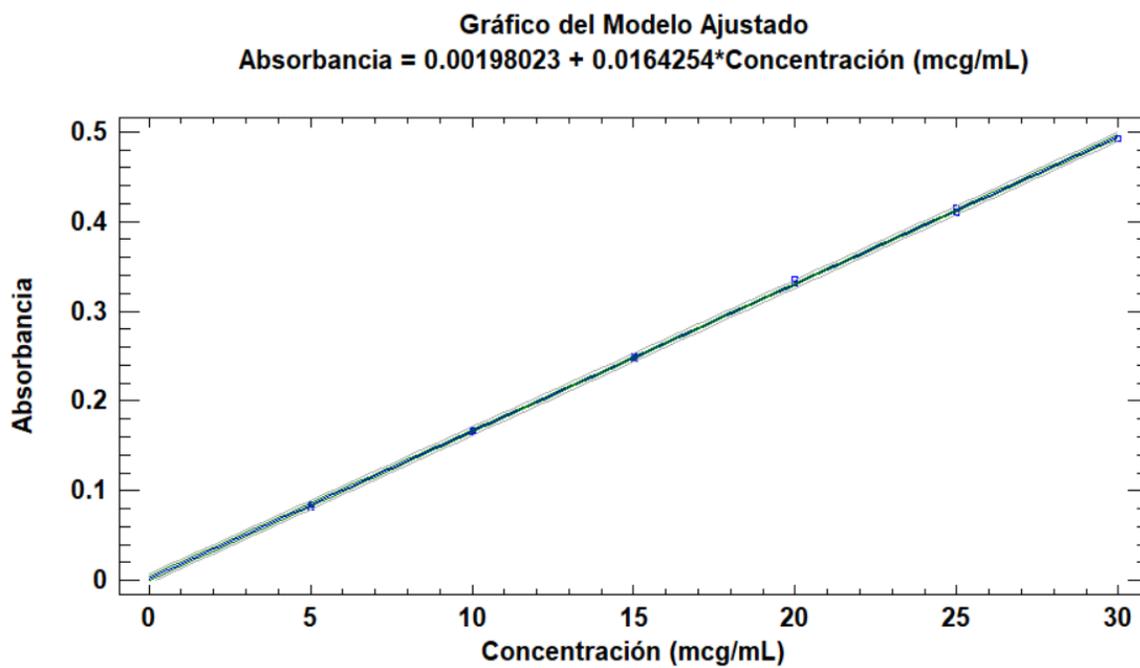


Figura 28. Gráfico del modelo lineal ajustado de la curva patrón vinorelbina (n=3)

### 12.3 Análisis de varianza: Tamaño de partícula

| <i>Fuente</i>    | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Lípido líquido | 150461.                  | 1         | 150461.               | 1.57           | 0.2453         |
| B:Conc Lecitina  | 254363.                  | 1         | 254363.               | 2.66           | 0.1417         |
| C:Fármaco        | 619574.                  | 1         | 619574.               | 6.47           | 0.0345         |
| E:Conc Tween 80  | 566675.                  | 1         | 566675.               | 5.92           | 0.0410         |
| Error total      | 765742.                  | 8         | 95717.8               |                |                |
| Total (corr.)    | 2.35682E6                | 12        |                       |                |                |

Tabla 20. Análisis de varianza para tamaño de partícula

R-cuadrada = 67.5095 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 51.2642 porciento

Error estándar del est. = 309.383

Error absoluto medio = 196.01

Estadístico Durbin-Watson = 1.24315 (P=0.0725)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.324973

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Tamaño promedio en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen una valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 67.5095% de la variabilidad en Tamaño promedio. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 51.2642%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 309.383. El error medio absoluto (MAE) de 196.01 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

## 12.4 Análisis de varianza: Eficiencia de encapsulación

| <i>Fuente</i>   | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-----------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| B:Conc Lecitina | 688.624                  | 1         | 688.624               | 1.85           | 0.2106         |
| C:Fármaco       | 95.1694                  | 1         | 95.1694               | 0.26           | 0.6265         |
| E:Conc Tween 80 | 139.687                  | 1         | 139.687               | 0.38           | 0.5569         |
| F:Radio W1/O    | 289.811                  | 1         | 289.811               | 0.78           | 0.4030         |
| Error total     | 2973.48                  | 8         | 371.685               |                |                |
| Total (corr.)   | 4186.77                  | 12        |                       |                |                |

Tabla 21. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación

R-cuadrada = 28.9792 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.0 por ciento

Error estándar del est. = 19.2791

Error absoluto medio = 11.6046

Estadístico Durbin-Watson = 2.66865 (P=0.8939)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.364126

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de EE en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen una valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 28.9792% de la variabilidad en EE. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0.0%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 19.2791. El error medio absoluto (MAE) de 11.6046 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

## 12.5 Análisis de varianza: Índice de polidispersidad

| <i>Fuente</i>    | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Lípido líquido | 0.0141453                | 1         | 0.0141453             | 1.22           | 0.3006         |
| B:Conc Lecitina  | 0.033075                 | 1         | 0.033075              | 2.86           | 0.1291         |
| C:Fármaco        | 0.00832133               | 1         | 0.00832133            | 0.72           | 0.4207         |
| E:Conc Tween 80  | 0.0110413                | 1         | 0.0110413             | 0.96           | 0.3569         |
| Error total      | 0.0924121                | 8         | 0.0115515             |                |                |
| Total (corr.)    | 0.158995                 | 12        |                       |                |                |

*Tabla 22. Análisis de varianza para índice de polidispersidad (PDI)*

R-cuadrada = 41.8774 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 12.8161 por ciento

Error estándar del est. = 0.107478

Error absoluto medio = 0.0695168

Estadístico Durbin-Watson = 2.38311 (P=0.7260)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.222879

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de PDI en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 41.8774% de la variabilidad en PDI. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 12.8161%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.107478. El error medio absoluto (MAE) de 0.0695168 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

## 12.6 Análisis de varianza: Potencial Z

| <i>Fuente</i>     | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Lípido líquido  | 85.3333                  | 1         | 85.3333               | 7.18           | 0.0366         |
| B:Conc Lecitina   | 3.0                      | 1         | 3.0                   | 0.25           | 0.6334         |
| C:Fármaco         | 1.76333                  | 1         | 1.76333               | 0.15           | 0.7135         |
| D:Homogeneización | 12.0                     | 1         | 12.0                  | 1.01           | 0.3539         |
| E:Conc Tween 80   | 52.92                    | 1         | 52.92                 | 4.45           | 0.0794         |
| F:Radio W1/O      | 14.9633                  | 1         | 14.9633               | 1.26           | 0.3048         |
| Error total       | 71.3477                  | 6         | 11.8913               |                |                |
| Total (corr.)     | 241.328                  | 12        |                       |                |                |

Tabla 23. Análisis de varianza para potencial Z

R-cuadrada = 70.4353 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 40.8707 por ciento

Error estándar del est. = 3.44837

Error absoluto medio = 1.82327

Estadístico Durbin-Watson = 1.5528 (P=0.1495)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.181087

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Potencial Z en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efectos tienen una valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 70.4353% de la variabilidad en Potencial Z. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 40.8707%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 3.44837. El error medio absoluto (MAE) de 1.82327 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

## 12.7 Verificación de tamaño de partículas optimizadas

Los resultados de las partículas optimizadas para cada réplica (n=3) son los siguientes:

|   | Tamaño (nm)  | PDI       | Potencial Z (mV) | %EE  |
|---|--------------|-----------|------------------|------|
| 1 | 925.3 ± 14.2 | 0.5 ± 0.1 | -31.2 ± 0.6      | 31.1 |
| 2 | 941.3 ± 89.9 | 0.4 ± 0.2 | -34.1 ± 1.9      | 21.6 |
| 3 | 920.4 ± 7.9  | 0.6 ± 0.0 | -33.9 ± 1.9      | 28.6 |

Tabla 24. Desglose de las corridas de la verificación de las partículas optimizadas

## 12.8 Tamaño de partícula y potencial Z durante experimento de recubrimiento

| Quitosán % | Tiempo de agitación (h) |        |        |        |
|------------|-------------------------|--------|--------|--------|
|            | 0                       | 1      | 2      | 3      |
| 0.16       | 1008.0                  | 1719.6 | 1667.6 | 1487.3 |
|            | 999.6                   | 1791.3 | 1971.6 | 2040.0 |
|            | 1034.0                  | 1812.6 | 1737.0 | 2252.6 |
| 0.25       | 1008                    | 3226.3 | 3809.0 | 3025.0 |
|            | 999.6                   | 3697.3 | 2921.6 | 3442.3 |
|            | 1034.0                  | 3390.3 | 3530.3 | 2683.0 |
| 0.5        | 1008.0                  | 3871.3 | 4046.6 | 3718.3 |
|            | 999.6                   | 4118.3 | 4274.6 | 3514.6 |
|            | 1034.0                  | 4948.6 | 4469.3 | 5274.3 |

Tabla 25. Tamaño de partícula promedio a tres concentraciones de quitosán y tres tiempos de agitación (n=3).

| Quitosán<br>% | Tiempo de agitación (h) |      |      |      |
|---------------|-------------------------|------|------|------|
|               | 0                       | 1    | 2    | 3    |
| 0.16          | -20.1                   | 44.2 | 59.4 | 59.9 |
|               | -22.6                   | 57.5 | 61.9 | 54.0 |
|               | -23.4                   | 56.6 | 60.3 | 66.7 |
| 0.25          | -20.1                   | 54.8 | 51.2 | 58.5 |
|               | -22.6                   | 56.1 | 56.5 | 57.5 |
|               | -23.4                   | 57.4 | 58.1 | 61.5 |
| 0.5           | -20.1                   | 48.9 | 51.0 | 51.7 |
|               | -22.6                   | 48.5 | 51.5 | 51.5 |
|               | -23.4                   | 47.4 | 51.6 | 50.7 |

*Tabla 26. Valores de potencial Z para las partículas recubiertas con quitosán a diferentes concentraciones y tiempos.*

## 12.9 Diseño experimental del recubrimiento de partícula

| Diseño Exp | Quitósán (%) | Tiempo (h) | Tamaño (nm) | Potencial Z (mV) |
|------------|--------------|------------|-------------|------------------|
| 1          | 0.25         | 3          | 3025        | -20.1            |
| 1          | 0.16         | 3          | 1487.333    | -22.6            |
| 1          | 0.25         | 1          | 3226.333    | -23.4            |
| 1          | 0.16         | 0          | 1008        | -20.1            |
| 1          | 0.5          | 2          | 4046.667    | -22.6            |
| 1          | 0.5          | 3          | 3718.333    | -23.4            |
| 1          | 0.16         | 1          | 1719.667    | -20.1            |
| 1          | 0.16         | 2          | 1667.667    | -22.6            |
| 1          | 0.25         | 0          | 1008        | -23.4            |
| 1          | 0.5          | 1          | 3871.333    | -19.1            |
| 1          | 0.5          | 0          | 1008        | -19.6            |
| 1          | 0.25         | 2          | 3809        | -20.8            |
| 2          | 0.16         | 3          | 2040        | -22.4            |
| 2          | 0.5          | 2          | 4274.667    | -20.9            |
| 2          | 0.25         | 0          | 999.6       | -20.3            |
| 2          | 0.16         | 1          | 1791.333    | -22.4            |
| 2          | 0.25         | 2          | 2921.667    | -20.8            |
| 2          | 0.25         | 3          | 3442.333    | -20.3            |
| 2          | 0.5          | 0          | 999.6       | -19.1            |
| 2          | 0.16         | 2          | 1971.667    | -21.3            |
| 2          | 0.25         | 1          | 3697.333    | -19.6            |
| 2          | 0.16         | 0          | 999.6       | -18.2            |
| 2          | 0.5          | 3          | 3514.667    | -20.9            |
| 2          | 0.5          | 1          | 4118.333    | -23.7            |
| 3          | 0.5          | 2          | 4469.333    | -20.7            |
| 3          | 0.16         | 3          | 2252.667    | -21.2            |
| 3          | 0.25         | 1          | 3390.333    | -22.2            |
| 3          | 0.25         | 0          | 1034        | -20.8            |
| 3          | 0.16         | 0          | 1034        | -22.1            |
| 3          | 0.25         | 2          | 3530.333    | -22.2            |
| 3          | 0.5          | 1          | 4948.667    | -20.4            |
| 3          | 0.5          | 0          | 1034        | -20.9            |
| 3          | 0.5          | 3          | 5274.333    | -24.6            |
| 3          | 0.16         | 2          | 1737        | -25.2            |
| 3          | 0.16         | 1          | 1812.667    | -23.5            |
| 3          | 0.25         | 3          | 2683        | -19.9            |

Tabla 27. Tabla de recopilación de los resultados de tamaño de partícula después del recubrimiento y potencial Z después de la mucoadhesión.

## 12.10 Partículas recubiertas optimizadas

|          | Tamaño (nm) | PDI   | Potencial Z (mV) |
|----------|-------------|-------|------------------|
| 0.16     | 1754        | 0.257 | 46.4             |
|          | 1771        | 0.634 | 50.3             |
|          | 1707        | 0.594 | 47.9             |
| Promedio | 1744.0      | 0.495 | 48.2             |
| DE       | 33.1        | 0.207 | 1.9              |

*Tabla 28. Partículas recubiertas optimizadas*

|          | Tamaño | PDI   | Potencial Z |
|----------|--------|-------|-------------|
| 0.16     | 1769   | 0.387 | -22.4       |
|          | 1693   | 0.281 | -21.3       |
|          | 1700   | 0.339 | -18.2       |
| Promedio | 1720.7 | 0.336 | -20.6       |
| DE       | 42.0   | 0.053 | 2.2         |

*Tabla 29. Partículas recubiertas optimizadas después de la mucoadhesión*

## 12.11 Mediciones de tamaño de partícula SEM

Mediciones realizadas con el software ImageJ.

| Medición | Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) NLC-<br>vinorelbina |             |
|----------|--|-------------|
|          | Sin recubrir                                 | Recubiertas |
| 1        | 1.433  | 1.359       |
| 2        | 0.956  | 1.701       |
| 3        | 1.167  | 2.464       |
| 4        | 1.036  | 1.750       |
| 5        | 1.212  | 2.061       |
| 6        | 0.871  | 1.801       |
| 7        | 0.872  | 2.706       |
| 8        | 0.870  | 2.543       |
| 9        | 0.996  | 1.658       |
| 10       | 0.829  | 2.503       |
| Promedio | 1.024  | 2.055       |
| DE       | 0.193  | 0.466       |

*Tabla 30. Mediciones de tamaño de partícula SEM*

## 12.12 Rendimiento del proceso de obtención de los NLC-vinorelbina y capacidad de carga

En la siguiente tabla se presentan las masas de tres lotes de NLC-vinorelbina, la masa teórica y el rendimiento.

| n        | Masa total NLC-vinorelbina liofilizada (mg) | Masa teórica NLC-vinorelbina (mg) | Rendimiento (%) |
|----------|---|-----------------------------------|-----------------|
| 1        | 799.50                                      | 1244.50                           | 64.24           |
| 2        | 784.33                                      |                                   | 63.02           |
| 3        | 786.50                                      |                                   | 63.20           |
| Promedio |   |                                   | 63.49           |
| DE       |   |                                   | 0.66            |

Tabla 31. Rendimiento del proceso de obtención de NLC-vinorelbina a partir del método de doble emulsión-evaporación de disolvente.

| Lote     | n | Capacidad de carga (%) |
|----------|---|------------------------|
| A        | 1 | 18.06                  |
|          | 2 | 16.15                  |
|          | 3 | 13.77                  |
| B        | 4 | 15.30                  |
|          | 5 | 14.65                  |
|          | 6 | 13.83                  |
| C        | 7 | 14.16                  |
|          | 8 | 18.05                  |
|          | 9 | 13.23                  |
| Promedio |   | 15.24                  |
| DE       |   | 1.82                   |

Tabla 32. Resultados de la capacidad de carga de vinorelbina en el sistema NLC

### 12.13 Análisis por Kawakita

A continuación, se presentan las gráficas del análisis por Kawakita como la gráfica promedio del triplicado.

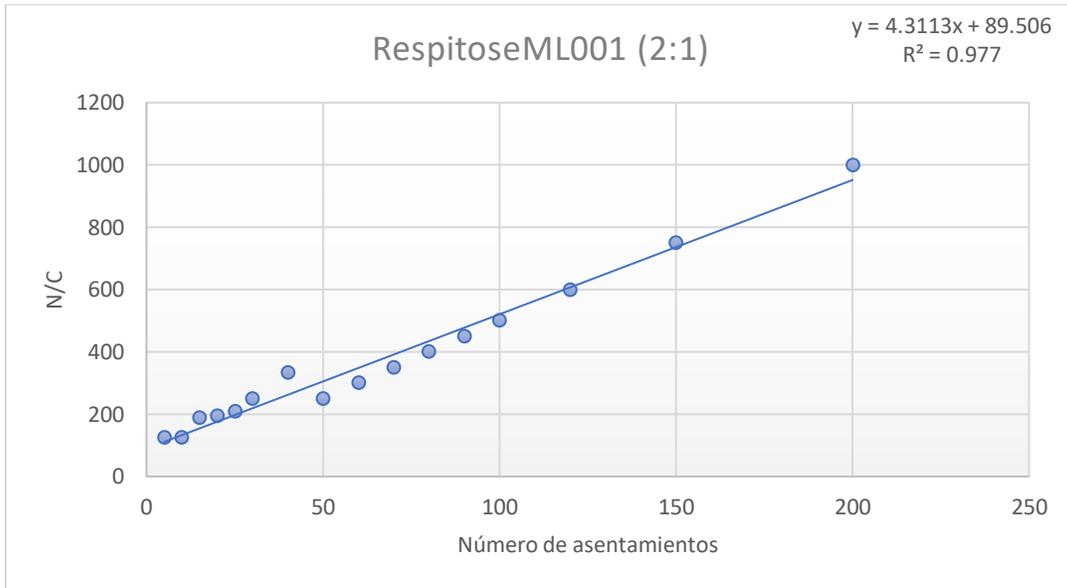


Figura 29. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (2:1)

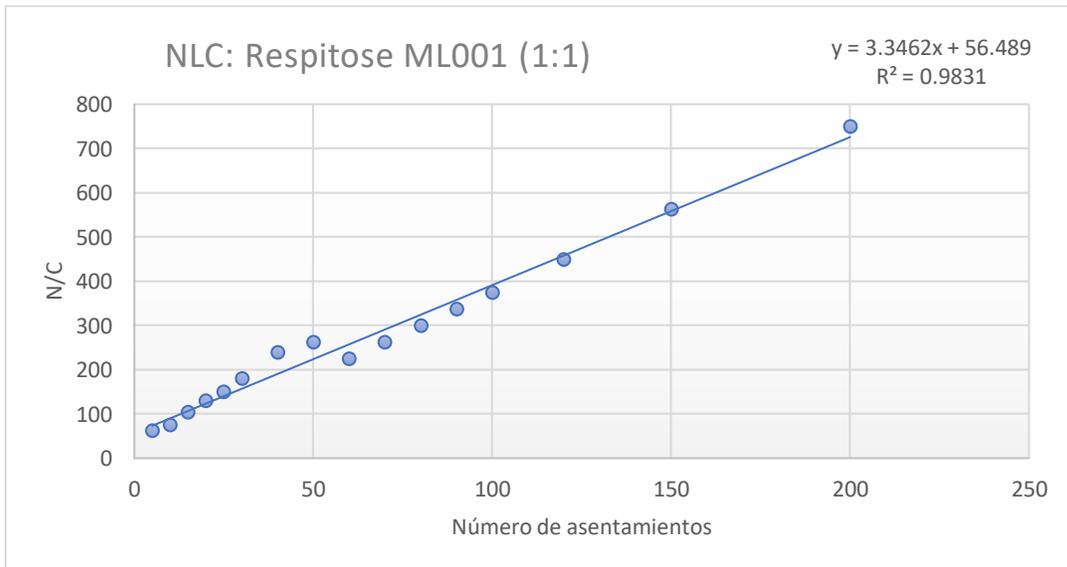


Figura 30. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (1:1)

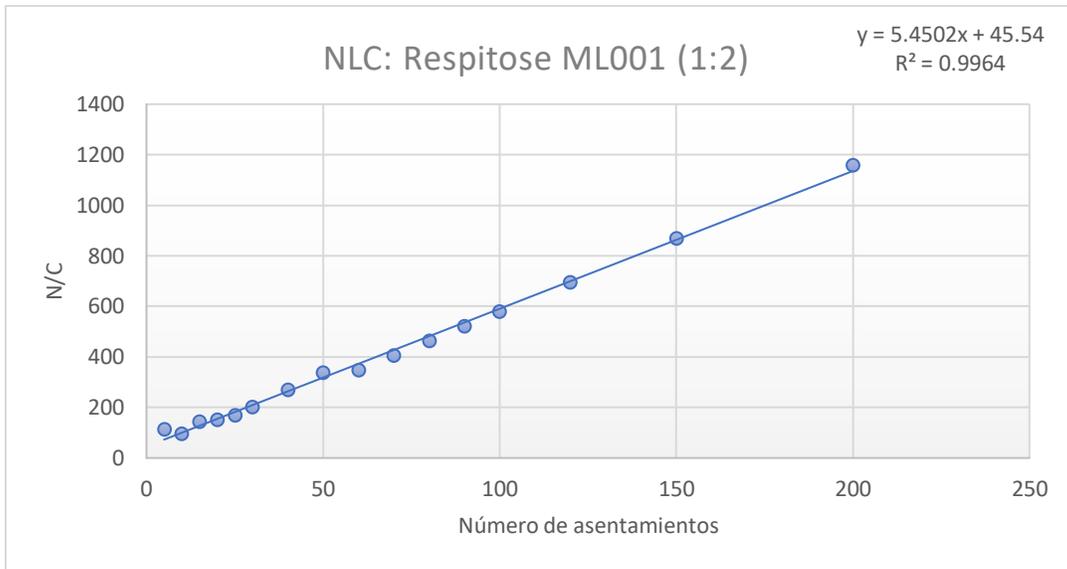


Figura 31. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (1:2)

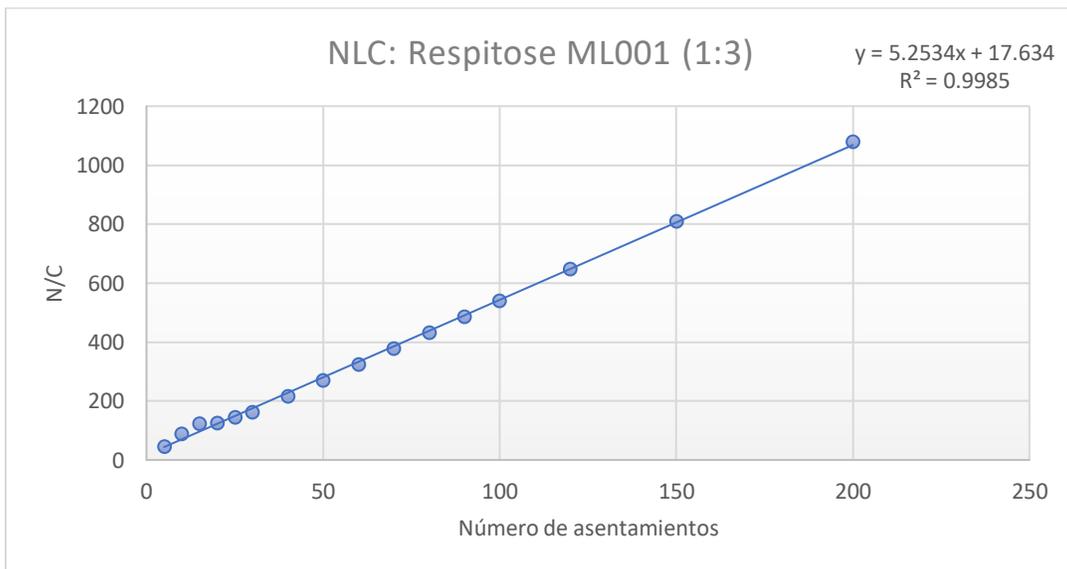


Figura 32. Gráfico de Kawakita Respitose ML001 (1:3)

## 12.14 Masa media aerodinámica y Desviación estándar geométrica

### NLC-vinorelbina: Respitose® ML001 (2:1)

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ ( $X_i$ ) | log diámetro | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|----------------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
| 7      | 0.34                             | -0.468521083 | 0.142653352 | 0.096200096 | 0.288046  | 0.175633 | 0.100085 |
| 6      | 0.7                              | -0.15490196  | 0.285306705 | 1.106301106 | 1.296207  | 0.895938 | 0.53728  |
| 5      | 1.1                              | 0.041392685  | 15.12125535 | 10.87061087 | 10.22564  | 12.0725  | 2.65992  |
| 4      | 2.1                              | 0.322219295  | 18.06942463 | 14.91101491 | 14.25828  | 15.74624 | 2.038236 |
| 3      | 3.3                              | 0.51851394   | 37.85068949 | 39.39393939 | 35.71771  | 37.65411 | 1.845979 |
| 2      | 4.7                              | 0.672097858  | 53.25725155 | 50.64935065 | 50.07201  | 51.3262  | 1.697067 |
| 1      | 5.8                              | 0.763427994  | 80.83689967 | 79.89417989 | 79.16467  | 79.96525 | 0.838379 |
| 0      | 9                                | 0.954242509  | 100         | 100         | 99.51992  | 99.83997 | 0.277172 |

Tabla 33. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1)

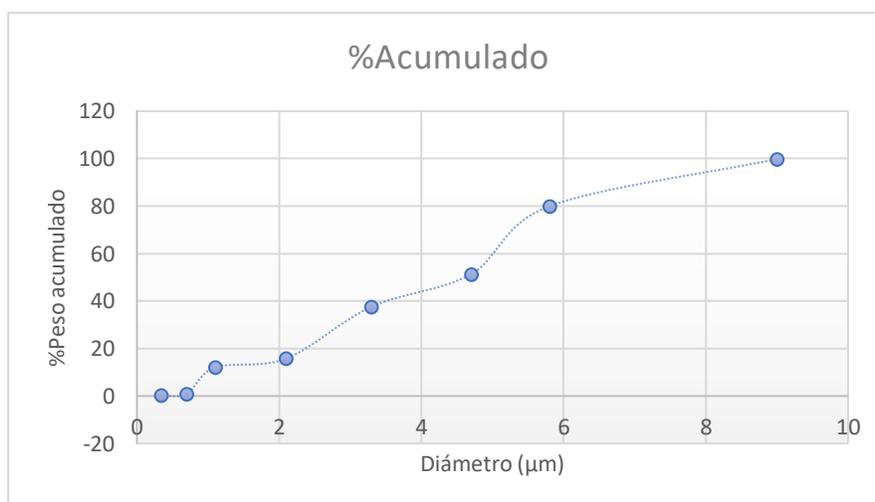


Figura 33. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1)

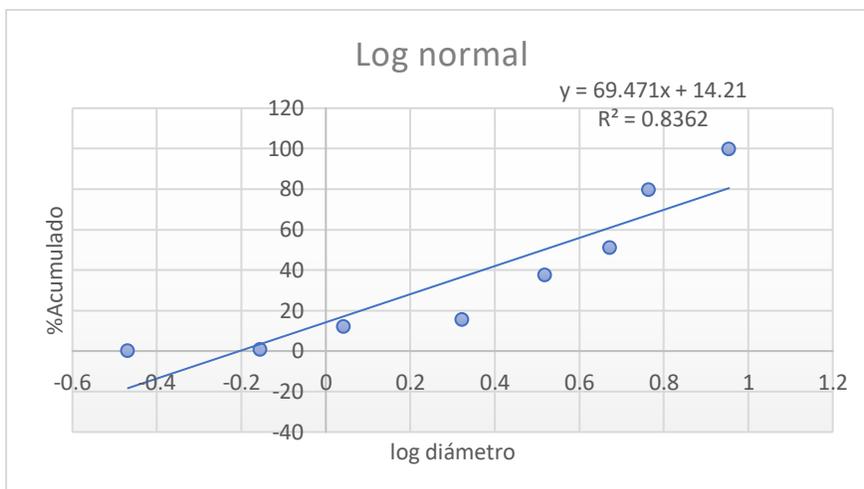


Figura 34. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1)

**NLC-vinorelbina: Respitose® ML001 (1:1)**

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ ( $X_i$ ) | log diámetro | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|----------------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
|        |                                  |              | %Acumulado  |             |           |          |          |
| 7      | 0.34                             | -0.468521083 | 0.868055556 | 3.087719298 | 2.291961  | 2.082578 | 1.124548 |
| 6      | 0.7                              | -0.15490196  | 5.520833333 | 3.929824561 | 17.5952   | 9.015287 | 7.472888 |
| 5      | 1.1                              | 0.041392685  | 22.5        | 18.10526316 | 27.32722  | 22.64416 | 4.612669 |
| 4      | 2.1                              | 0.322219295  | 48.47222222 | 25.33333333 | 61.49506  | 45.10021 | 18.31517 |
| 3      | 3.3                              | 0.51851394   | 81.31944444 | 53.64912281 | 75.88152  | 70.28336 | 14.66002 |
| 2      | 4.7                              | 0.672097858  | 98.02083333 | 68.66666667 | 79.5134   | 82.06697 | 14.84275 |
| 1      | 5.8                              | 0.763427994  | 98.64583333 | 72.49122807 | 98.69535  | 89.94414 | 15.11468 |
| 0      | 9                                | 0.954242509  | 99.09722222 | 99.0877193  | 98.83639  | 99.00711 | 0.147925 |

Tabla 34. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:1)

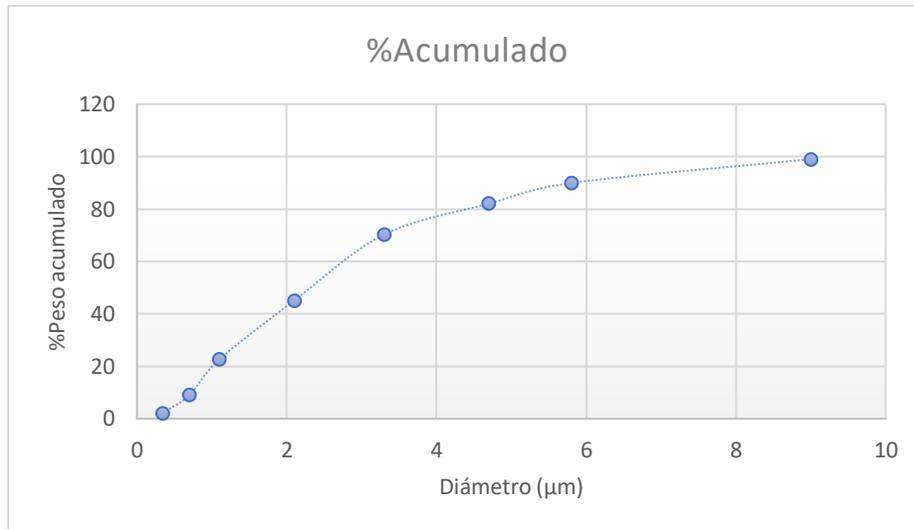


Figura 35. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:1)

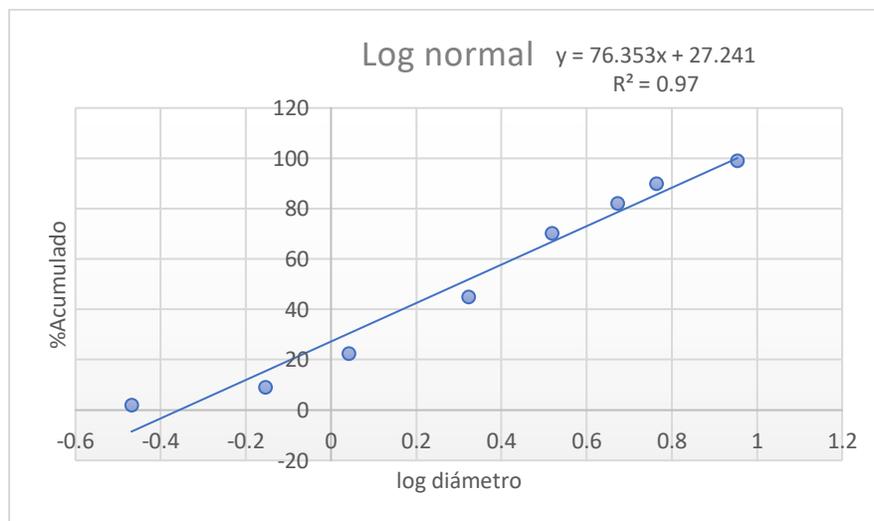


Figura 36. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (2:1)

**NLC-vinorelbina: Respitose® ML001 (1:2)**

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ (Xi) | log diámetro | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|-----------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
|        |                             |              | %Acumulado  |             |           |          |          |
| 7      | 0.34                        | -0.468521083 | 0.228623685 | 0.178200178 | 0.584624  | 0.330483 | 0.221532 |
| 6      | 0.7                         | -0.15490196  | 1.348879744 | 0.267300267 | 0.672318  | 0.762833 | 0.546441 |
| 5      | 1.1                         | 0.041392685  | 17.8783722  | 1.514701515 | 1.636948  | 7.010007 | 9.412479 |
| 4      | 2.1                         | 0.322219295  | 22.79378144 | 11.58301158 | 11.0494   | 15.14206 | 6.63195  |
| 3      | 3.3                         | 0.51851394   | 51.98902606 | 45.94594595 | 46.03917  | 47.99138 | 3.462376 |
| 2      | 4.7                         | 0.672097858  | 61.3397348  | 53.54915355 | 53.4639   | 56.1176  | 4.522706 |
| 1      | 5.8                         | 0.763427994  | 70.7133059  | 63.29076329 | 64.13329  | 66.04579 | 4.064081 |
| 0      | 9                           | 0.954242509  | 99.83996342 | 99.22779923 | 99.03537  | 99.36771 | 0.420148 |

Tabla 35. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:1)

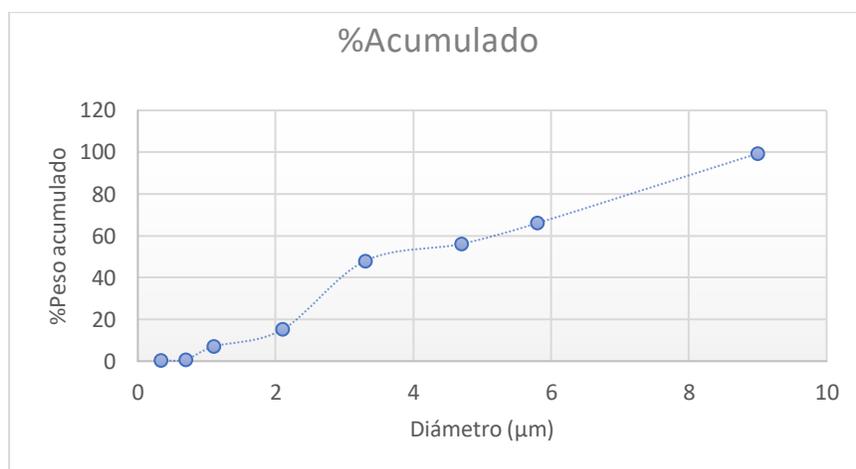


Figura 37. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2)

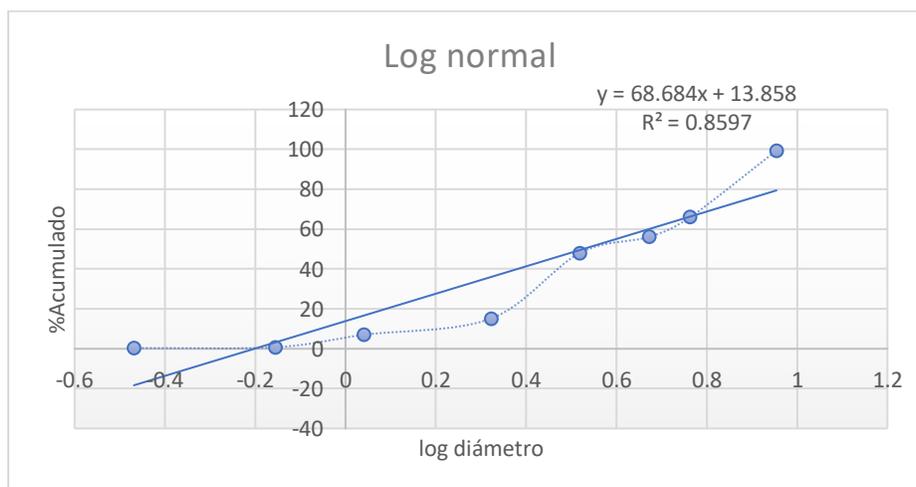


Figura 38. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2)

**NLC-vinorelbina: Respitose® ML001 (1:3)**

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ (Xi) | log diámetro | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|-----------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
|        |                             |              | %Acumulado  |             |           |          |          |
| 7      | 0.34                        | -0.468521083 | 0.839160839 | 2.318116976 | 1.606805  | 1.588028 | 0.739657 |
| 6      | 0.7                         | -0.15490196  | 5.472027972 | 12.39300999 | 8.922495  | 8.929178 | 3.460496 |
| 5      | 1.1                         | 0.041392685  | 8.951048951 | 18.99072753 | 14.89603  | 14.27927 | 5.048176 |
| 4      | 2.1                         | 0.322219295  | 17.81468531 | 30.11768902 | 26.2949   | 24.74242 | 6.296714 |
| 3      | 3.3                         | 0.51851394   | 41.01398601 | 55.95577746 | 55.84121  | 50.93699 | 8.593765 |
| 2      | 4.7                         | 0.672097858  | 71.13636364 | 77.19329529 | 71.55009  | 73.29325 | 3.383866 |
| 1      | 5.8                         | 0.763427994  | 93.63636364 | 92.63552068 | 94.65028  | 93.64072 | 1.007389 |
| 0      | 9                           | 0.954242509  | 99.37062937 | 96.23751783 | 98.63894  | 98.08236 | 1.639034 |

Tabla 36. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:3)

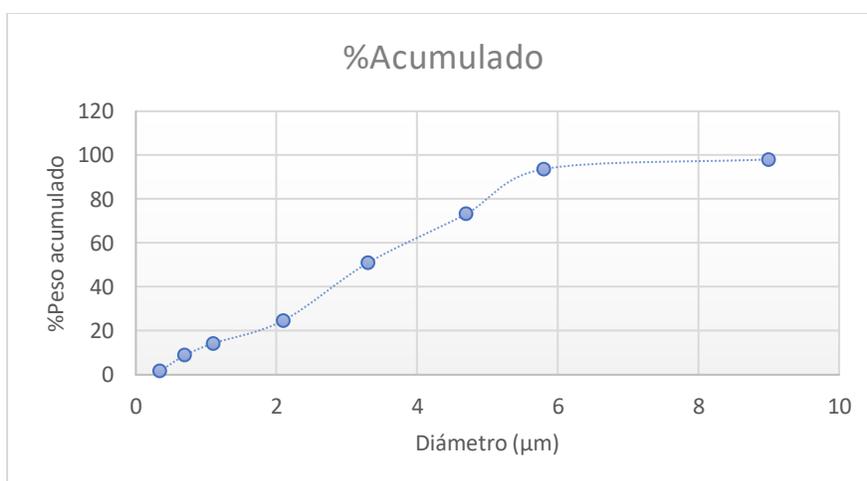


Figura 39. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2)

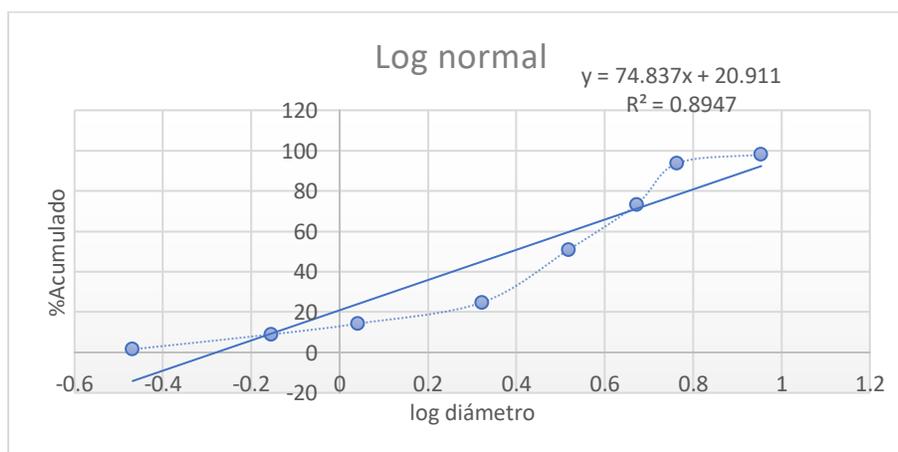


Figura 40. Gráfico log normal con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Respitose ML001 (1:2)

**NLC-vinorelbina: Lactohale® 200 (2:1)**

|        |                             |              | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|-----------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ (Xi) | log diámetro | %Acumulado  |             |           |          |          |
| 7      | 0.34                        | -0.468521083 | 0.822293285 | 1.149954002 | 0.228624  | 0.733624 | 0.467022 |
| 6      | 0.7                         | -0.15490196  | 2.558245774 | 3.771849126 | 0.777321  | 2.369138 | 1.506194 |
| 5      | 1.1                         | 0.041392685  | 6.989492919 | 7.589696412 | 2.697759  | 5.758983 | 2.668029 |
| 4      | 2.1                         | 0.322219295  | 16.99406122 | 17.11131555 | 15.59214  | 16.56584 | 0.845286 |
| 3      | 3.3                         | 0.51851394   | 31.8410233  | 38.45446182 | 28.12071  | 32.8054  | 5.233938 |
| 2      | 4.7                         | 0.672097858  | 51.94152581 | 67.06531739 | 44.30727  | 54.43804 | 11.5826  |
| 1      | 5.8                         | 0.763427994  | 95.29465509 | 96.41214351 | 86.19113  | 92.63264 | 5.606426 |
| 0      | 9                           | 0.954242509  | 99.17770672 | 99.17203312 | 99.8171   | 99.38895 | 0.370803 |

Tabla 37. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (2:1)

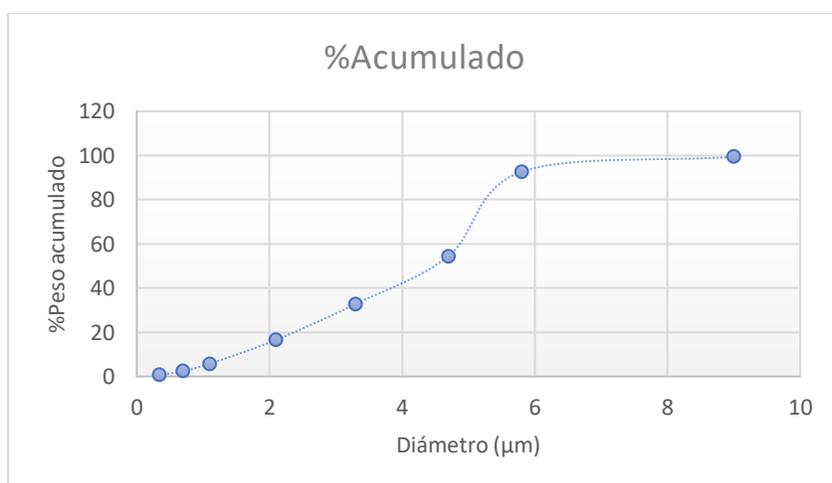


Figura 41. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (2:1)

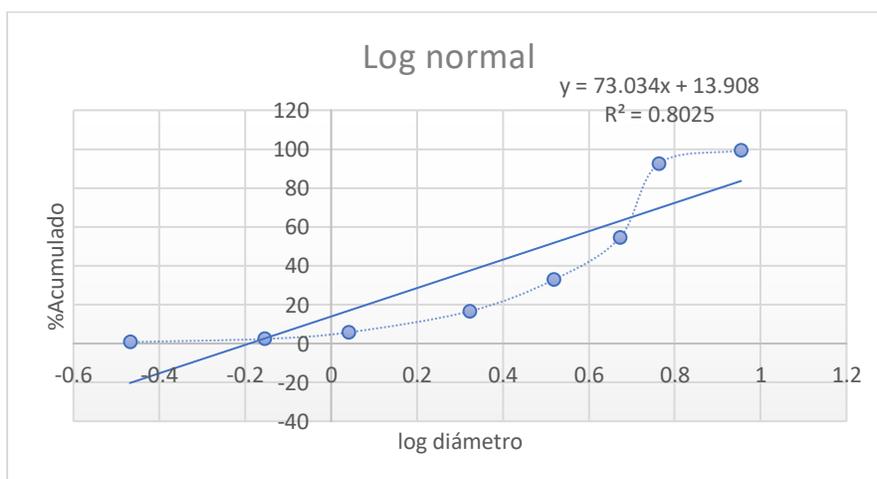


Figura 42. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (2:1)

**NLC-vinorelbina: Lactohale® 200 (1:1)**

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ (Xi) | log diámetro     | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|-----------------------------|------------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
|        |                             |                  | %Acumulado  |             |           |          |          |
| 7      | 0.34                        | -<br>0.468521083 | 0.068259386 | 0.206114737 | 0.793377  | 0.355917 | 0.385071 |
| 6      | 0.7                         | -0.15490196      | 0.443686007 | 0.309172106 | 1.000345  | 0.584401 | 0.366443 |
| 5      | 1.1                         | 0.041392685      | 1.399317406 | 1.064926142 | 1.793722  | 1.419322 | 0.36481  |
| 4      | 2.1                         | 0.322219295      | 2.423208191 | 2.026794916 | 3.311487  | 2.587163 | 0.657852 |
| 3      | 3.3                         | 0.51851394       | 7.030716724 | 5.084163518 | 7.93377   | 6.682884 | 1.456299 |
| 2      | 4.7                         | 0.672097858      | 9.931740614 | 17.51975266 | 20.14488  | 15.86546 | 5.303731 |
| 1      | 5.8                         | 0.763427994      | 71.39931741 | 63.4489866  | 73.71507  | 69.52113 | 5.384593 |
| 0      | 9                           | 0.954242509      | 99.62457338 | 99.96564754 | 100       | 99.86341 | 0.207548 |

Tabla 38. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:1)

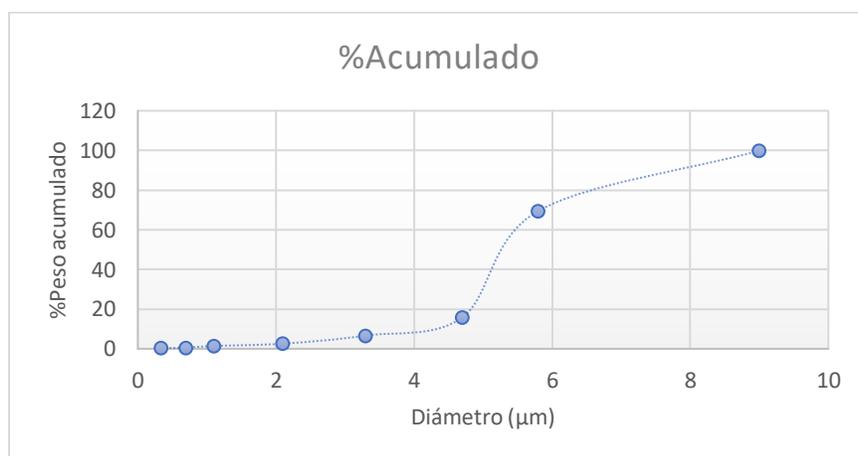


Figura 43. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:1)

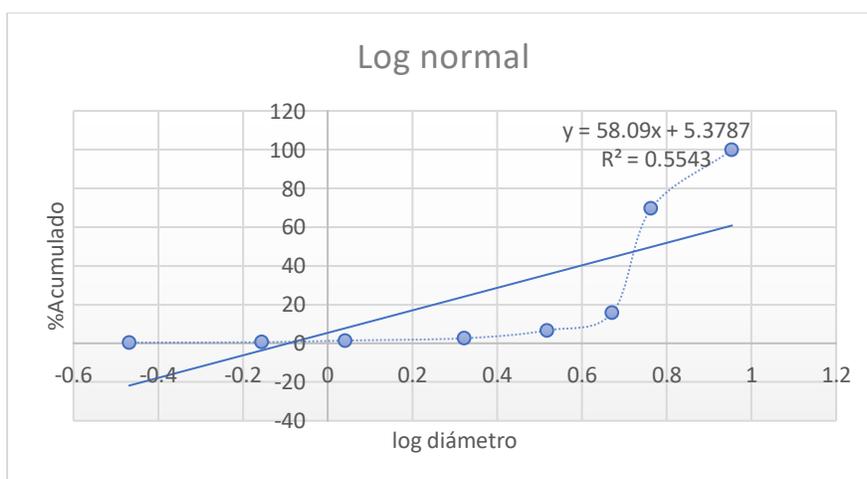


Figura 44. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:1)

**NLC-vinorelbina: Lactohale® 200 (1:2)**

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ (Xi) | log diámetro | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|-----------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
| 7      | 0.34                        | -0.468521083 | 0.067567568 | 0.223763706 | 2.290769  | 0.8607   | 1.240936 |
| 6      | 0.7                         | -0.15490196  | 0.292792793 | 0.447527411 | 4.536176  | 1.758832 | 2.406494 |
| 5      | 1.1                         | 0.041392685  | 5.653153153 | 4.564779593 | 13.58585  | 7.934593 | 4.924291 |
| 4      | 2.1                         | 0.322219295  | 13.96396396 | 13.67196241 | 23.8376   | 17.15784 | 5.786685 |
| 3      | 3.3                         | 0.51851394   | 35.24774775 | 36.2497203  | 58.81152  | 43.43633 | 13.32473 |
| 2      | 4.7                         | 0.672097858  | 92.07207207 | 84.02327143 | 85.50692  | 87.20075 | 4.283411 |
| 1      | 5.8                         | 0.763427994  | 98.71621622 | 97.98612665 | 97.18757  | 97.9633  | 0.764578 |
| 0      | 9                           | 0.954242509  | 100         | 99.93287089 | 99.34225  | 99.75838 | 0.361931 |

Tabla 39. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:2)

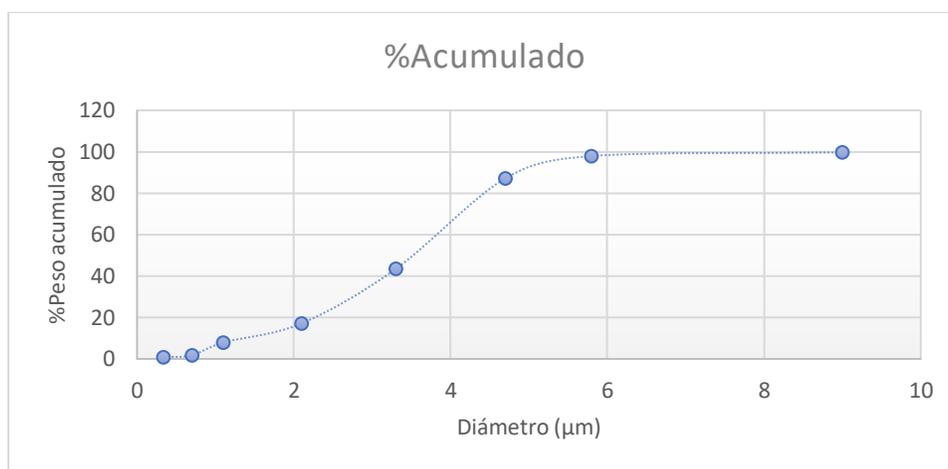


Figura 45. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:2)

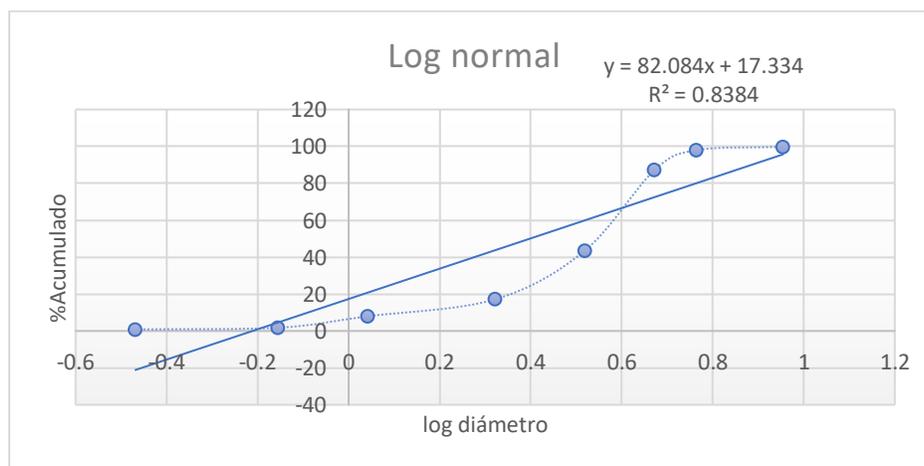


Figura 46. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:2)

**NLC-vinorelbina: Lactohale® 200 (1:3)**

| Número | Diámetro $\mu\text{m}$ (Xi) | log diámetro     | Réplica 1   | Réplica 2   | Réplica 3 | Promedio | SD       |
|--------|-----------------------------|------------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
|        |                             |                  | %Acumulado  |             |           |          |          |
| 7      | 0.34                        | -<br>0.468521083 | 0.797365228 | 0.865800866 | 1.213347  | 0.958838 | 0.223052 |
| 6      | 0.7                         | -0.15490196      | 6.153579477 | 1.818181818 | 6.639703  | 4.870488 | 2.654526 |
| 5      | 1.1                         | 0.041392685      | 11.24978332 | 4.658008658 | 11.74587  | 9.217888 | 3.956754 |
| 4      | 2.1                         | 0.322219295      | 17.88871555 | 10.38961039 | 23.10415  | 17.12749 | 6.391357 |
| 3      | 3.3                         | 0.51851394       | 39.45224476 | 26.02597403 | 45.31513  | 36.93112 | 9.888629 |
| 2      | 4.7                         | 0.672097858      | 66.66666667 | 56.70995671 | 70.20559  | 64.52741 | 6.997527 |
| 1      | 5.8                         | 0.763427994      | 93.20506154 | 90.64935065 | 94.30401  | 92.71947 | 1.875095 |
| 0      | 9                           | 0.954242509      | 99.28930491 | 99.93073593 | 98.09572  | 99.10525 | 0.93125  |

Tabla 40. Desglose de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:3)

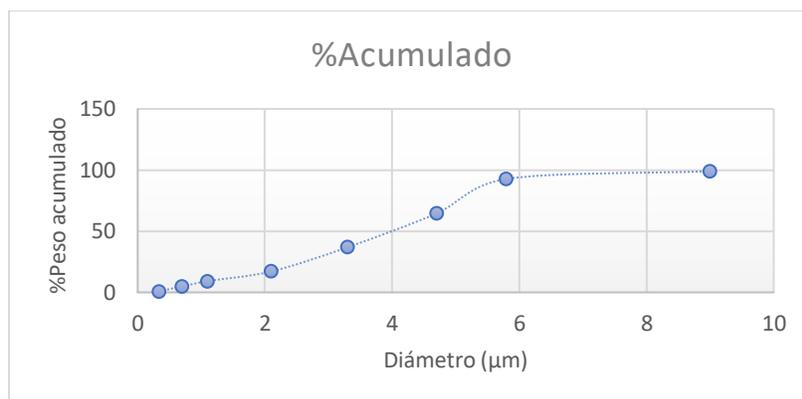


Figura 47. Gráfico porcentaje acumulado vs diámetro de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:3)

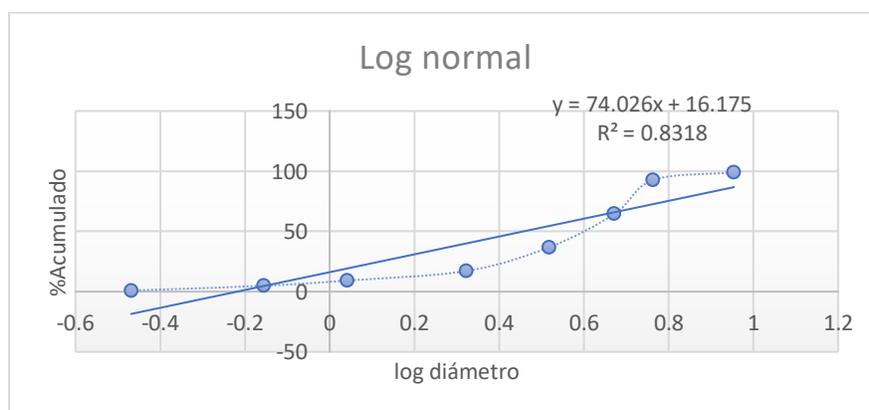


Figura 48. Gráfico log normal de experimento con impactador de cascada para NLC-vinorelbina: Lactohale 200 (1:3)

## 13 ABREVIATURAS

AIC: Criterio de selección de Akaike

DPI: Polvo seco para inhalación

GSD: Desviación estándar geométrica

NLC: Acarreador lipídico nanoestructurado

NLC-vinorelbina: Acarreador lipídico nanoestructurado cargado con vinorelbina

NSCLC: Cáncer pulmonar de células no pequeñas

MMAD: Masa media aerodinámica

MSC: Criterio de selección del modelo

PDI: Índice de Polidispersidad

SCLC: cáncer pulmonar de células pequeñas

VIN: vinorelbina

## 14 BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Salud, S. de. 145. Cada año mueren cerca de ocho mil mexicanos por cáncer de pulmón | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. *Prensa Secretaría de Salud* <https://www.gob.mx/salud/prensa/145-cada-ano-mueren-cerca-de-ocho-mil-mexicanos-por-cancer-de-pulmon?idiom=es>.
3. Amararathna, M., Goralski, K., Hoskin, D. W. & Rupasinghe, H. P. V. *Pulmonary Nano-Drug Delivery Systems for Lung Cancer: Current Knowledge and Prospects. J Lung Health Dis* vol. 3 (2019).
4. Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Traini, D. & Young, P. M. Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: Advantages and challenges. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 481–489 (2015).
5. ALA. What Causes Lung Cancer | American Lung Association. <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/learn-about-lung-cancer/what-is-lung-cancer/what-causes-lung-cancer>.
6. Hussain, S. Nanomedicine for treatment of lung cancer. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 890 137–147 (Springer New York LLC, 2016).
7. Zappa, C. & Mousa, S. A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* **5**, 288–300 (2016).
8. Naccache, J. M. *et al.* Lung cancer and interstitial lung disease: A literature review. *Journal of Thoracic Disease* vol. 10 3829–3844 (2018).
9. Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E. & Adjei, A. A. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. in *Mayo Clinic Proceedings* vol. 83 584–594 (Elsevier Ltd, 2008).
10. Mohammad Abu Taher, Mohammad Abu Bin Nyeem, M. M. B. & Ahammed, and M. M. Vinca alkaloid- the second most used alkaloid for cancer treatment- A review. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ.* **2**, 723–727 (2017).
11. Navelbine (vinorelbine) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. <https://reference.medscape.com/drug/navelbine-vinorelbine-342246#4>.
12. Vinorelbine - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00361>.
13. PubChem. Vinorelbine | C45H54N4O8 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinorelbine#section=2D-Structure>.
14. Camerini, A. *et al.* Metronomic oral vinorelbine for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a multicenter international retrospective analysis. *Clin. Transl. Oncol.* **21**, 790–795 (2019).
15. Patil, J. S. & Sarasija, S. Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. *Lung India* vol. 29 44–49 (2012).
16. Lee, W. H., Loo, C. Y., Traini, D. & Young, P. M. Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: Advantages and challenges. *Asian Journal of*

*Pharmaceutical Sciences* vol. 10 481–489 (2015).

17. Borghardt, J. M., Kloft, C. & Sharma, A. Inhaled Therapy in Respiratory Disease: The Complex Interplay of Pulmonary Kinetic Processes. *Canadian Respiratory Journal* vol. 2018 (2018).
18. Society, A. C. ¿Qué es el cáncer de pulmón? <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon/acerca/que-es-cancer-de-pulmon.html>.
19. Meldrum, O. W. & Chotirmall, S. H. Mucus, microbiomes and pulmonary disease. *Biomedicines* **9**, (2021).
20. Thiel, C. G. Cascade impactor data and the lognormal distribution: Nonlinear regression for a better fit. *J. Aerosol Med. Depos. Clear. Eff. Lung* **15**, 369–378 (2002).
21. Fernández Tena, A. & Casan Clarà, P. Depósito pulmonar de partículas inhaladas. *Archivos de Bronconeumología* vol. 48 240–246 (2012).
22. Fröhlich, E. & Salar-Behzadi, S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: Role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in Silico Studies. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 15 4795–4822 (2014).
23. Klinger-Strobel, M. *et al.* Aspects of pulmonary drug delivery strategies for infections in cystic fibrosis-where do we stand? *Expert Opinion on Drug Delivery* vol. 12 1351–1374 (2015).
24. Rosière, R., Berghmans, T., De Vuyst, P., Amighi, K. & Wauthoz, N. cancers The Position of Inhaled Chemotherapy in the Care of Patients with Lung Tumors: Clinical Feasibility and Indications According to Recent Pharmaceutical Progresses. doi:10.3390/cancers11030329.
25. Mehta, P. Dry Powder Inhalers: A Focus on Advancements in Novel Drug Delivery Systems. *J. Drug Deliv.* **2016**, 1–17 (2016).
26. Chandel, A., Goyal, A. K., Ghosh, G. & Rath, G. Recent advances in aerosolised drug delivery. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 112 (2019).
27. El-Gendy, N., Bailey, M. M. & Berkland, C. Particle Engineering Technologies for Pulmonary Drug Delivery. in *Controlled Pulmonary Drug Delivery* 283–312 (Springer New York, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-9745-6\_13.
28. Poonia, N., Kharb, R., Lather, V. & Pandita, D. Nanostructured lipid carriers: Versatile oral delivery vehicle. *Future Science OA* vol. 2 (2016).
29. Ngan, C. L. & Asmawi, A. A. Lipid-based pulmonary delivery system: a review and future considerations of formulation strategies and limitations. *Drug Deliv. Transl. Res.* **8**, 1527–1544 (2018).
30. Salvi, V. R. & Pawar, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **51**, 255–267 (2019).
31. Naseri, N., Valizadeh, H. & Zakeri-Milani, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* vol. 5 305–313 (2015).

32. Patil-Gadhe, A., Kyadarkunte, A., Patole, M. & Pokharkar, V. Montelukast-loaded nanostructured lipid carriers: Part II Pulmonary drug delivery and in vitro-in vivo aerosol performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**, 169–177 (2014).
33. Patil-Gadhe, A. & Pokharkar, V. Pulmonary targeting potential of rosuvastatin loaded nanostructured lipid carrier: Optimization by factorial design. *Int. J. Pharm.* **501**, 199–210 (2016).
34. Kaur, P., Garg, T., Rath, G., Murthy, R. S. R. & Goyal, A. K. Development, optimization and evaluation of surfactant-based pulmonary nanolipid carrier system of paclitaxel for the management of drug resistance lung cancer using Box-Behnken design. *Drug Deliv.* **23**, 1–14 (2014).
35. Taratula, O., Kuzmov, A., Shah, M., Garbuzenko, O. B. & Minko, T. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *J. Control. Release* **171**, 349–357 (2013).
36. Bahadori, F., Topçu, G., Eroğlu, M. S. & Önyüksel, H. A new lipid-based nano formulation of vinorelbine. *AAPS PharmSciTech* **15**, 1138–1148 (2014).
37. Kale, V. V., Gadekar, S. & Ittadwar, A. M. Particle size enlargement: Making and understanding of the behavior of powder (Particle) system. *Syst. Rev. Pharm.* **2**, 79–85 (2011).
38. Prakash, S. S. Studies on Flowability, Compressibility and In-vitro Release of Terminalia Chebula Fruit Powder Tablets. *Iran. J. Pharm. Res.* (2011).
39. USP 35. Physical Tests and Determinations. 232–252 (2012).
40. Danaei, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* **10**, 1–17 (2018).
41. Lai, C. W., Low, F. W., Tai, M. F. & Abdul Hamid, S. B. Iron oxide nanoparticles decorated oleic acid for high colloidal stability. *Adv. Polym. Technol.* **37**, 1712–1721 (2018).
42. Nabi-Meibodi, M. *et al.* Optimized double emulsion-solvent evaporation process for production of solid lipid nanoparticles containing baclofene as a lipid insoluble drug. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **23**, 225–230 (2013).
43. Mathur, P., Sharma, S., Rawal, S., Patel, B. & Patel, M. M. Fabrication, optimization, and in vitro evaluation of docetaxel-loaded nanostructured lipid carriers for improved anticancer activity. *J. Liposome Res.* (2019) doi:10.1080/08982104.2019.1614055.
44. Sharma, A. & Baldi, A. *Nanostructured Lipid Carriers: A Review.* (2018).
45. Eliyahu, S., Aharon, A. & Bianco-Peled, H. Acrylated chitosan nanoparticles with enhanced mucoadhesion. *Polymers (Basel)*. **10**, (2018).
46. Bejarano, A. F., Erazo, L. E., Luengas, Y. & Álvarez, A. Estudio del efecto de un agente crioprotector en la liofilización de una emulsión directa O/W.
47. Deshpande, A. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles in Drug Delivery: Opportunities and Challenges. in *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices* 291–330 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-42978-8.00012-7.

48. Patil, T. S. & Deshpande, A. S. Nanostructured lipid carriers-based drug delivery for treating various lung diseases: A State-of-the-Art Review. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 547 209–225 (2018).
49. Li, Y. *et al.* A novel active targeting preparation, vinorelbine tartrate (VLBT) encapsulated by folate-conjugated bovine serum albumin (BSA) nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Materials (Basel)*. **5**, 2403–2422 (2012).
50. Bosquillon, C., Lombry, C., Pr at, V. & Vanbever, R. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Control. Release* **70**, 329–339 (2001).
51. Pilcer, G., Wauthoz, N. & Amighi, K. Lactose characteristics and the generation of the aerosol. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 233–256 (2012).
52. Finlay, W. H. & Darquenne, C. Particle Size Distributions. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **33**, 178–180 (2020).
53. Lee, M. & Archai, D. Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care. in *Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care* (American Society of Health-System Pharmacists, 2007).
54. DFE Pharma. The custom-made solutions of DFE Pharma Inhalation.
55. Mathematical models of drug release. *Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. Syst.* 63–86 (2015) doi:10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9.
56. Zhang, Y. *et al.* DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* **12**, 263–271 (2010).
57. Aguzzi, C., Cerezo, P., Salcedo, I., Sánchez, R. & Viseras, C. Mathematical models describing drug release from biopolymeric delivery systems. <https://doi.org/10.1179/175355510X12723642365566> **25**, 205–211 (2013).