



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE
NANOPLEXOS DE CHITOSAN-ATORVASTATINA, Y SU IMPACTO EN LA
DISOLUCIÓN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN FARMACIA

PRESENTA:

Josué Arquieta Flores

TUTOR:

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO DE 2018





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA COORDINACIÓN DE POSGRADO

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuemavaca, Morelos, México. C.P. 62210
Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



Fecha: 12 de diciembre de 2017
Asunto: Dictamen a solicitud.
Medio de notificación: Impresa
Folio: FF/D/SAc/CIP/MF/138/2017

L.F. JOSUÉ ARQUIETA FLORES
ESTUDIANTE AL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que en sesión ordinaria del Consejo Interno de Posgrado celebrada el día 06 de diciembre de 2017, se analizó su solicitud de cambio de título y asignación de jurado.

Una vez analizado el proyecto le informo que el CIP dictaminó ACEPTAR la solicitud antes mencionada y se asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis: **“OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN IN VITRO DE NANOPLEXOS DE CHITOSAN-ATORVASTATINA, Y SU IMPACTO EN LA DISOLUCIÓN”**.

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dr. Efrén Hernández Baltazar.

SECRETARIO: Dr. Jesús Rivera Islas.

VOCAL 1: Dr. Hugo Morales Rojas.

VOCAL 2: Dra. Adriana Valladares Méndez

VOCAL 3. Dr. Gerardo Leyva Gómez.

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

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

ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”

DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
JEFATURA DE POSGRADO



C.c.p. Dr. Efrén Hernández Baltazar, Dr. Jesús Rivera Islas, Dr. Hugo Morales Rojas, Dra. Adriana Valladares Méndez, Dr. Gerardo Leyva Gómez.

MITV

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Gracias Dios por haberme dado las armas necesarias para seguir adelante, la capacidad de poder estudiar y la sabiduría para entender las cosas más difíciles.

Quiero agradecer a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Sergio Alcalá Alcalá, quien aceptó gentilmente dirigir esta investigación, y durante todo el proyecto me brindó su orientación, confianza, comprensión y paciencia para terminar este trabajo de investigación.

A mis sinodales: Dra. Adriana Valladares Méndez, Dr. Efrén Hernández Baltazar, Dr. Jesús Rivera Islas, Dr. Hugo Morales Rojas y al Dr. Gerardo Leyva Gómez por el tiempo dedicado y a sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A CONACYT por la beca otorgada (741650) para la realización de este trabajo de investigación.

A mi familia por haberme brindado su comprensión y apoyo incondicional durante toda mi carrera, por sus consejos que me orientaron a tomar las mejores decisiones y por creer en mí.

A mis amigos: Por su compañía y los buenos momentos que pasamos juntos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
1.0 INTRODUCCIÓN	5
2.0 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	6
2.1 SOLUBILIDAD DE FÁRMACOS	6
2.1.1 La solubilidad como propiedad biofarmacéutica de un principio activo	7
2.1.2 Factores fisicoquímicos que afectan la solubilidad de fármacos	8
2.2 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA (SCB)	10
2.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA MEJORAR LA SOLUBILIDAD DE LOS FÁRMACOS	11
2.3.1 REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR MÉTODOS FÍSICOS	12
2.3.1.1 Micronización	12
2.3.1.2 Nanosuspensión.....	13
2.3.2 MODIFICACIÓN DEL HÁBITO CRISTALINO.....	14
2.3.3 Complejación.....	15
2.3.4 Solubilización por tensoactivos	16
2.3.5 Dispersiones Sólidas (Ds).....	17
2.3.6 Nanopartículas	18
2.4 LA NANOTECNOLOGÍA EN EL ÁREA FARMACÉUTICA	19
2.4.1 Nanoacarreadores Farmacéuticos.....	20
2.4.1.1 Tipos de Nanoacarreadores.....	21
2.5 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	23
2.5.1 Nanoplexos	24
2.5.1.1 Método de Preparación	25
2.5.1.2 Caracterización de Nanoplexos	26
2.5.2 Uso de polímeros naturales y biodegradables en la obtención de nanopartículas poliméricas	30
2.5.2.1 Chitosán	32
2.6 HIPERCOLESTEROLEMIA	33
2.7 ESTATINAS.....	37

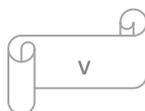
2.7.1 Atorvastatina	39
3.0 JUSTIFICACIÓN	41
4.0 HIPÓTESIS	42
5.0 OBJETIVOS	43
6.0 MATERIALES Y EQUIPOS.....	44
7.0 METODOLOGÍA.....	45
7.1 ELABORACIÓN DE UN DISEÑO FACTORIAL 2 ⁴	45
7.2 PREPARACIÓN DE LOS NANOPLEXOS EMPLEANDO EL DISEÑO FACTORIAL 2 ⁴	46
7.3 OPTIMIZACIÓN DE LOS NANOPLEXOS	47
7.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS NANOPLEXOS DE CHITOSÁN-ATORVASTATINA OBTENIDOS MEDIANTE EL DISEÑO EXPERIMENTAL	47
7.4.1 Determinación del tamaño y potencial Z.....	47
7.4.2 Morfología.....	47
7.5 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA DE ABSORCIÓN DE ATORVASTATINA	48
7.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS A pH 5.3, 1.2 Y 6.8	48
7.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOPLEXOS OPTIMIZADOS.....	49
7.7.1 Determinación de la Eficiencia de Complejación (%Ec).....	49
7.7.2 Determinación del Rendimiento	50
7.7.3 Obtención del Patrón de Difracción de Rayos X.....	50
7.7.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (Dsc)	50
7.7.5 Espectroscopia Infrarroja (FTIR).....	51
7.8 ESTUDIOS DE EFICACIA <i>IN VITRO</i>	51
7.8.1 Determinación de la solubilidad en Condiciones No Sink.....	51
7.8.2 Disolución de polvos en Condiciones Sink	51
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
8.1 OBTENCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS NANOPLEXOS	53
8.1.1 Optimización de los nanoplexos con MSR.....	56
8.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS NANOPLEXOS OBTENIDOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS	58
8.2.1 Verificación de la Talla Estimada en el modelo	58
8.2.2 Potencial Zeta	59
8.2.3 Morfología.....	60
8.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (Dsc)	62

8.2.5 Difracción de Rayos X de polvos	63
8.2.5 Espectroscopia Infrarrojo (FTIR)	65
8.6 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	66
8.6.1 Determinación del pico máximo de absorción de atorvastatina.....	66
8.3.2 Validación de métodos analíticos a pH 5.3, 1.2 y 6.8	67
8.7 EFICIENCIA DE COMPLEJACIÓN (EC)	68
8.8 RENDIMIENTO EN LA ELABORACIÓN DE LOS NANOPLEXOS	70
8.9 SOLUBILIDAD DE POLVOS EN CONDICIONES NO SINK	70
8.10 PERFILES DE DISOLUCIÓN A pH 1.2 Y 6.8.....	71
9.0 CONCLUSIONES.....	73
10.0 REFERENCIAS	75
11.0 ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ϵ	Coeficiente de absortividad molar
λ	Longitud de onda de absorción
AA	Ácido Acético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica
BP	Farmacopea Británica
CD	Ciclodextrina
CFT	Temperatura de Floculación Crítica
CTG	Ciclodextrina-glicosiltransferasa
cLDL	Colesterol de Lipoproteínas de Baja Densidad
CMC	Concentración Micelar Crítica
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EC	Eficiencia de Complejación
ELS	Dispersión de Luz Electroforética
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FTIR	Espectroscopia Infrarrojo
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HPTLC	Cromatografía de Capa Fina de Alto Rendimiento
IR	Infrarrojo
ICm	Intervalo de confianza de la pendiente
ICb	Intervalo de confianza del intercepto
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
Log P	Coeficiente de partición

min	Minutos
mV	Milivoltios
nm	Nanómetros
NPP	Nanopartículas Poliméricas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCS	Espectroscopia de Correlación de Fotones
PE	Polielectrolito
PEG	Polietilenglicol
P.F	Punto de fusión
PM	Peso molecular
% p/v	Porcentaje peso/volumen
PVP	Polivinilpirrolidona
PXRD	Patrón de difracción de rayos X
rpm	Revoluciones por minuto
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
T_{máx}	Tiempo donde se alcanza la concentración máxima
µm	Micrómetros



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos implicados en la absorción de fármacos en la administración oral.	7
Figura 2. Efecto del tamaño de partícula sobre el área superficial y la velocidad de disolución	9
Figura 3. Molinos de chorro; 1. zona de transición; 2. producto terminado; 3. materias primas; 4. presión negativa; 5. cámara de molienda.	12
Figura 4. Homogenización a alta presión	13
Figura 5. Sistemas cristalinos de un IFA	14
Figura 6. a) Representación de la cavidad hidrofóbica e hidrofílica de una ciclodextrina. b) Complejo fármaco-ciclodextrina	16
Figura 7. Proceso de formación de micelas	17
Figura 8. Estructuras posibles de una dispersión sólida a. Fármaco disperso en la matriz polimérica, b. Sistema polímero-fármaco en el que se ha producido un fármaco cristalino. c. Sistema fármaco-polímero con fármacos amorfos dispersos en la matriz polimérica	18
Figura 9. Preparación de nanopartículas por el método de a) Emulsión-evaporación y b) Salting-out	19
Figura 10. Algunos tipos de nanocarreadores	21
Figura 11. Modelos de mecanismos de encapsulación en nanopartículas poliméricas.	23
Figura 12. a) Nanoesferas, b) Nanocápsulas	24
Figura 13. Formación de nanoplexos mediante interacciones electrostáticas entre el fármaco y el polielectrolito de carga opuesta	25
Figura 14. Función de la sal en la complejación de nanoplexos.	26
Figura 15. Representación del potencial zeta.	28
Figura 16. Estructura del quitosán.....	32
Figura 17. Proceso de desacetilación de la quitina.....	33
Figura 18. Acumulación de colesterol en las arterias.	34
Figura 19. Mecanismo de acción de las estatinas.	37
Figura 20. Diagrama de efectos de pareto para el tamaño promedio.	54
Figura 21. Uso de los tensoactivos según el equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB).	56
Figura 22. Superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio.	57
Figura 23. Contornos de la superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio	57
figura 24. Tamaño promedio de los nanoplexos bajo condiciones óptimas.	59
Figura 25. Potencial Zeta de los nanoplexos bajo condiciones óptimas.	60
Figura 26. Micrografías de a) Atorvastatina, b) Chitosán y c) Nanoplexos, por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	61
Figura 27. Termogramas de dsc de atorvastatina, chitosán, mezcla física atorvastatina-chitosán y nanoplexos.	63

Figura 28. Patrón de difracción de Rayos X (DRX).	64
Figura 29. Espectro de FT-IR de atorvastatina, chitosan, mezcla física y nanoplexos	65
Figura 30. Espectro de absorción de la atorvastatina en el rango de 200-600 nm.	67
Figura 31. Solubilidad pura de atorvastatina y los nanoplexos en condiciones no sink.	70
Figura 32. Perfiles de liberación de atorvastatina en nanoplexos, a pH 1.2 y 6.8.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de solubilidad establecidos por la FEUM y la BP	6
Tabla 2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB).	10
Tabla 3. Clasificación de las diferentes técnicas para mejorar la solubilidad.	11
Tabla 4. Campos de aplicación de la nanotecnología	20
Tabla 5. Características y aplicaciones de algunos nanoacarreadores farmacéuticos.	22
Tabla 6. Herramientas y métodos de caracterización de nanoplexos.	27
Tabla 7. Polímeros más utilizados en la elaboración de nanopartículas.	31
Tabla 8. Niveles de lípidos recomendados por el adult treatment panel III guidelines.....	35
Tabla 9. Principales causas de muerte en México.....	36
Tabla 10. Estatinas con sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas	38
Tabla 11. Estructura y propiedades fisicoquímicas de la atorvastatina.	39
Tabla 12. Matriz del diseño factorial con dos niveles y cuatro factores.....	46
Tabla 13. Matriz de diseño factorial 2^4 con resultados de tamaño promedio.	53
Tabla 14. Niveles optimizados y verificación del método	58
Tabla 15. Parámetros para la validación del método analítico a pH 5.3, 1.2 y 6.8.....	68
Tabla 16. Valores de Eficiencia de Complejación.....	68

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el uso e impacto de los nanoplexos de quitosán cargados con atorvastatina, con el propósito de estudiar su efecto sobre la solubilidad y la velocidad de disolución de este fármaco, ya que con una solubilidad acuosa de 20.4 µg/ml a pH 1.2 y de 1.23 mg/ml a pH 6.0, y un logP de 5.7 está clasificado como un fármaco clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad), de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB). La atorvastatina es un fármaco aprobado para el tratamiento de la hipercolesterolemia, el cual es un problema de salud pública que en los últimos años ha ido aumentando y es una de las principales causas de muerte a nivel nacional, debido a los problemas cardiovasculares que provoca. Un nanoplexo es una nanopartícula polimérica formada mediante la interacción electrostática entre un fármaco ionizable y un polielectrolito de carga opuesta, generalmente polímeros sintéticos o naturales iónicos o con grupos ionizables en sus monómeros.

En el proyecto se realizó la optimización de los nanoplexos con base en un diseño experimental factorial 2⁴, empleando como factores la cantidad de fármaco (15 y 30 mg), la cantidad de quitosán (6 y 150 mg), el tipo de estabilizante (Brij 58 o Pluronic F68) y la concentración de estabilizante (0.5 y 1.5 %). Ya optimizados por metodología de superficie de respuesta (MSR), los nanoplexos se prepararon disolviendo 22 mg de atorvastatina en 3 ml de metanol y 22 mg de quitosán en 30 ml de una solución de buffer de acetatos pH 5.3 y ácido acético al 1 %. Empleando el método de nanoprecipitación la solución de atorvastatina fue vertida gota a gota a la solución de quitosán, rápidamente y bajo homogenización a 15,000 rpm, durante 10 minutos. Las nanopartículas se recuperaron mediante centrifugación, posteriormente se caracterizaron determinando la talla promedio (DLS), el potencial Z (MEF), la morfología (SEM), la eficiencia de complejación (UV), la interacción de componentes (DSC, IR), la cristalinidad (XRD), la solubilidad en condiciones de saturación y el perfil de disolución *in vitro* a pH 1.2 y 6.8.

Los resultados evidenciaron nanoplexos esféricos sólidos, con un tamaño de 431.53 ± 12.64 nm y un potencial Z de 36.3 ± 1.0 mV. La eficiencia de complejación obtenida fue de 85.29 ± 0.60 % con un rendimiento del 66 ± 1.2%. Los espectros de rayos (XRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC) e infrarrojo (IR) indicaron que existe una interacción entre el polímero y el fármaco, y sin cambios químicos estructurales. Los perfiles

de disolución a pH 1.2 mostraron que tanto la atorvastatina libre, como la encapsulada en los nanoplexos, se disuelve aproximadamente el 90 % en 24 horas, en contraste con los perfiles a pH 6.8 donde el 100 % de fármaco libre se disuelve a los 30 minutos, mientras que el incluido en los nanoplexos se libera el 100 % en 24 horas. La solubilidad de la atorvastatina en los nanoplexos en condiciones saturadas muestra un aumento de hasta cinco veces más con respecto a la solubilidad acuosa.

En conclusión, se obtuvieron nanoplexos de quitosán cargados con atorvastatina con propiedades tecnológicas para ser formulados en sistemas de liberación modificada, con un impacto positivo en la solubilidad y velocidad de disolución, los cuales pueden ser empleados en la formulación de formas farmacéuticas para diferentes vías de administración, incluida la vía parenteral, en las que habría un ajuste o reducción de la dosis y una menor frecuencia de administración.

SUMMARY

In the present study, the use and impact of chitosan nanoplexes loaded with atorvastatin were evaluated, with the purpose of studying its effect on the solubility and dissolution rate of atorvastatin, since it has a solubility of 20.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ at pH 1.2 and of 1.23 mg / ml at pH 6.0, which is why it is classified as a class II drug (low solubility, high permeability) according to the biopharmaceutical classification system (SCB). Atorvastatin is an approved drug for the treatment of hypercholesterolemia, which is a public health problem that in recent years has been increasing and is one of the leading causes of death nationwide, due to the cardiovascular problems it causes. A nanoplex is a polymeric nanoparticle formed by the electrostatic interaction between an ionizable drug and a polyelectrolyte of opposite charge, generally synthetic or natural ionic polymers or with ionizable groups in their monomers.

In the project, the optimization of nanoplexes was carried out using a factorial design 2^4 , using as factors the amount of drug (30 mg, 15 mg), the amount of chitosan (6 mg, 150 mg), the type of stabilizer (Brij 58, Pluronic F68) and the stabilizer concentration (1.5%, 0.5%). Already optimized by response surface methodology (MSR), the nanoplexes already optimized, the nanoplexes were prepared by dissolving 22 mg of atorvastatin in 3 ml of methanol and 22 mg of chitosan in 30 ml of a buffer solution of acetates pH 5.3 and acid 1% acetic acid. Using the nanoprecipitation method, the atorvastatin solution was poured drop by drop into the chitosan solution, rapidly and under homogenization at 15,000 rpm for 10 minutes. The nanoparticles were recovered by centrifugation, then characterized by determining the average size (DLS), the Z potential (MEF), the morphology (SEM), the complexing efficiency (UV), the interaction of components (DSC, IR), the solubility under saturation conditions and the in vitro dissolution profile at pH 1.2 and 6.8.

The results showed solid spherical nanoplexes, with a size of 431.53 ± 12.64 nm and a Z potential of 36.3 ± 1.0 mV. The efficiency of complexation obtained was $85.29 \pm 0.60\%$ with a yield of $66 \pm 1.2\%$ the spectra of rays (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and infrared (IR) showed that there is an interaction between the polymer and the drug, but without structural chemical changes. The dissolution profiles at pH 1.2 showed that both free atorvastatin and encapsulated in the nanoplexes dissolves approximately 90% in 24 hours in contrast to the profiles at pH 6.8 where 100% of free drug dissolves 30 minutes, while the

one included in the nanoplexes is released 100% in 24 hours. The solubility of atorvastatin in the nanoplexes under saturated conditions shows an increase of these five times more with respect to the aqueous solubility.

In conclusion, chitosan nanoplexes loaded with atorvastatin with technological properties were obtained to be formulated in modified and controlled release systems, with a positive impact in the reduction of the dose and frequency of administration of atorvastatin.

1.0 INTRODUCCIÓN

La ingestión de medicamentos por la vía oral es la más comúnmente empleada debido a su fácil administración, a la buena aceptación por parte del paciente, la rentabilidad y a la flexibilidad en el diseño de la forma de dosificación. Sin embargo, uno de los principales problemas con el diseño de formas de dosificación oral, es su pobre biodisponibilidad, debido a una baja solubilidad y velocidad de disolución, aunado a un amplio metabolismo del principio activo.

La pobre solubilidad de los fármacos que se han venido desarrollando sigue siendo un reto en el desarrollo de formulaciones, pues en la actualidad, más del 40 % de los principios activos en desarrollo son de carácter lipofílico o poco solubles en agua, lo que ha llevado a los profesionales farmacéuticos a enfrentarse a la importante tarea de solucionar los problemas de solubilidad de estos compuestos de interés terapéutico, de manera que puedan ser utilizados en medicamentos clínicamente útiles. Tal es el caso de la atorvastatina, que presenta una limitada biodisponibilidad oral debido a la baja solubilidad y velocidad de disolución. Se han desarrollado muchos enfoques para mejorar la solubilidad y la velocidad de disolución de la atorvastatina como, formación de sales, dispersiones sólidas, complejos de inclusión, surfactantes, polimorfismo, microemulsiones y micronización. Sin embargo, existen limitaciones sustanciales con cada una de estas técnicas.

En este proyecto de investigación se prepararon nanopartículas poliméricas conocidas como nanoplexos, con el objetivo de mejorar la solubilidad acuosa y liberación de la atorvastatina. Estas nanopartículas poliméricas se obtuvieron mediante la interacción electrostática entre el grupo carboxilato de la atorvastatina y el grupo amino del quitosán. Se evaluaron los nanoplexos midiendo parámetros como, la eficiencia de complejación, rendimiento, tamaño, potencial Z y morfología, mediante técnicas como calorimetría diferencial de barrido (DSC), infrarrojo (IR) y rayos X se evaluó la interacción de los componentes y los posibles cambios químicos y estructurales. Por último, se realizaron perfiles de disolución a diferente pH, para determinar el mecanismo de liberación de la atorvastatina en los nanoplexos y una prueba de solubilidad en condiciones saturadas, para comprobar si los nanoplexos mejoran la solubilidad de la atorvastatina.

2.0 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 SOLUBILIDAD DE FÁRMACOS

Solubilidad se define en términos cuantitativos como la concentración de soluto en una solución saturada a una cierta temperatura y de forma cualitativa se puede definir como la interacción espontánea de dos o más sustancias para formar una dispersión molecular homogénea. La solubilidad es una propiedad intrínseca de un material que puede ser alterada solo por la modificación química de la molécula.

Hablando en general, la solubilidad de un componente depende de las propiedades físicas y químicas del soluto y del solvente, así como de factores tales como, temperatura, presión, pH de la solución, y, en menor medida, del estado de subdivisión del soluto [1]. En la tabla 1 se muestra la clasificación de la solubilidad, la cual incluye criterios semicuantitativos, desde muy soluble (completamente miscible), hasta poco soluble, independientemente del disolvente utilizado.

Tabla 1. Criterios de solubilidad establecidos por la FEUM y la BP [2].

Termino descriptivo	Parte del disolvente requerido por una parte del soluto	Rango de solubilidad (mg/ml)
Muy soluble	< 1	> 1000
Totalmente soluble	De 1 a 10	100-1000
Soluble	De 10 a 30	33-100
Escasamente soluble	De 30 a 100	10-33
Ligeramente soluble	De 100 a 1000	1-10
Muy ligeramente soluble	De 1000 a 10000	0.1-1
Prácticamente insoluble	> 10000	< 0.1

2.1.1 La solubilidad como propiedad biofarmacéutica de un principio activo

Para conseguir el efecto terapéutico deseado de un medicamento es necesario que el principio activo llegue a su lugar de acción, para lo cual, este se debe encontrar disuelto en el sitio de absorción. La solubilidad es uno de los parámetros más importantes para lograr la concentración efectiva de fármaco en la circulación sistémica y obtener la respuesta farmacológica deseada. En la Figura 1 se pueden apreciar los procesos por los cuales el medicamento que es administrado por la vía oral tiene que pasar para que el principio activo pueda ser absorbido [3] .



Figura 1. Procesos implicados en la absorción de fármacos en la administración oral.

El reciente descubrimiento de nuevos fármacos ha llevado a encontrar un número creciente con baja solubilidad en agua y por lo tanto con una baja biodisponibilidad, especialmente en la administración por la vía oral. El número de candidatos a fármacos se ha incrementado en recientes años y al menos el 70 % de los nuevos de estos ha mostrado una pobre solubilidad acuosa.

Debido a esto, la absorción suele ser lenta, provocando una biodisponibilidad inadecuada y variable. En muchos casos la baja solubilidad ocasiona que se administren los medicamentos en intervalos de tiempo cortos, e incluso, que se administren en altas concentraciones o dosis elevadas, ocasionando fluctuaciones en el torrente sanguíneo y toxicidad en el organismo [4].

2.1.2 Factores fisicoquímicos que afectan la solubilidad de fármacos

La velocidad de disolución se puede definir como la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo, a partir de una forma sólida de dosificación. Entre las principales características fisicoquímicas que afectan la velocidad de disolución y solubilidad de un fármaco se encuentran:

- ✚ El tamaño de partícula.
- ✚ El coeficiente de solubilidad.
- ✚ La cristalinidad.
- ✚ El pH para moléculas ácido-base débil.
- ✚ La temperatura.

La reducción del tamaño de partícula es una de las técnicas tradicionales para mejorar la velocidad de disolución de fármacos de baja solubilidad. Cuando se reduce el tamaño de la partícula aumenta la velocidad de disolución, lo cual se debe a que la superficie de la partícula se ve incrementada al disminuir el tamaño, aumentando de esta manera el área de superficie de contacto entre la partícula y el disolvente, fenómeno que se explica con el modelo de Noyes-Whitney. La figura 2 A muestra como aumenta el área superficial en una partícula cuando se reduce la talla, mientras que la figura 2 B muestra el impacto de la talla en la velocidad de disolución [5].

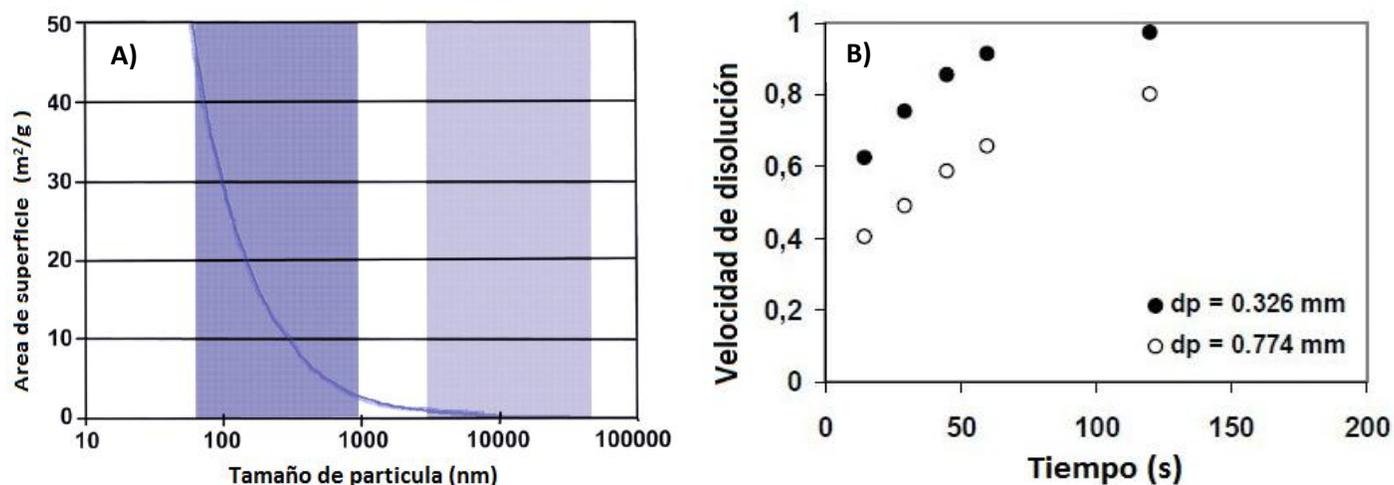


Figura 2. Efecto del tamaño de partícula sobre el área superficial y la velocidad de disolución [6].

En cuanto a la solubilidad, esta depende entre otros factores, de si la molécula está o no ionizada, ya que las especies no ionizadas interaccionan con menor intensidad con las moléculas del agua que las especies ionizadas, las cuales se hidratan más fácilmente. También depende de si se utiliza la sal de un fármaco, ya que por lo general son más solubles, o bien si es una forma anhidra o hidratada ya que las formas hidratadas son más estables y menos solubles que las formas anhidras [7].

Por otro lado, el que el principio activo esté o no cristalizado también afecta la velocidad de disolución, pues en general, las formas amorfas son más solubles que las formas cristalinas, lo cual se debe a que el estado energético de la forma amorfa es generalmente mayor que el de la forma cristalina, por lo cual la forma cristalina es termodinámicamente más estable y menos soluble. Otro aspecto importante en el caso de formas cristalinas, es la posible formación de polimorfos, ya que, a temperatura y presión constante, la forma polimórfica termodinámicamente más estable es la que posee menor energía libre, menor solubilidad y la que posee un punto de fusión más elevado, por lo cual los polimorfos pueden presentar distintas características de solubilidad y por lo tanto distinta velocidad de disolución [7].

2.2 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA (SCB)

El sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) es un marco científico introducido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), el cual se utiliza para clasificar una sustancia farmacológica con base en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, para que de esta forma sea posible correlacionar la disolución *in vitro* y la biodisponibilidad *in vivo* de los fármacos. Por esta razón el SCB es una herramienta importante en el desarrollo de fármacos y principalmente en la formulación de productos farmacéuticos orales.

Respecto al SCB la FDA establece que un fármaco es altamente soluble cuando la dosis más alta de fármaco es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso en un rango de pH de 1.2-7.5, o bien de 1.2-6.8 según la OMS. En cuanto a la permeabilidad, esta clasifica con base en el grado de absorción intestinal de un fármaco en seres humanos, indirectamente mediante la medición de la velocidad de transferencia de masa a través de la membrana intestinal humana o mediante el uso de un modelo *in vivo*. De acuerdo con la FDA, un fármaco se considera altamente permeable si la cantidad absorbida es mayor al 90 %, o bien, mayor de 85 % según la OMS [8]. Así el SCB clasifica los fármacos en cuatro categorías, tomando como referencia los dos factores arriba descritos. En la Tabla 2 se muestran las cuatro categorías con sus respectivos valores.

Tabla 2. Sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB).

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Patrón de absorción
I	Alta	Alta	Bien absorbido
II	Baja	Alta	Bien absorbido
III	Alta	Baja	Variable
IV	Baja	Baja	Pobremente absorbido

2.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA MEJORAR LA SOLUBILIDAD DE LOS FÁRMACOS

Debido a los problemas de solubilidad que presentan actualmente muchos fármacos, hoy en día se pueden emplear diversas metodologías para mejorar la solubilidad y con ello su biodisponibilidad. La descripción de una tecnología como "mejora de la solubilidad" no es del todo correcta, ya que las técnicas utilizadas no aumentan la solubilidad de los compuestos insolubles, si no que presentan el fármaco en una forma óptima para su absorción, dadas sus limitaciones de solubilidad. Las técnicas existentes o reportadas se podrían clasificar en dos categorías: modificaciones físicas y modificaciones químicas, como se muestra en la Tabla 3 [9].

Tabla 3. Clasificación de las diferentes técnicas para mejorar la solubilidad.

Modificaciones físicas	Modificaciones químicas
Reducción del tamaño de partícula	Formación de sales
Micronización	Co-cristalización
Nanosuspensión	Co-solvencia
Modificación del hábito cristalino	Hidrotrópico
Polimorfos	Unión a agentes solubilizantes
Pseudopolimorfos	Nanotecnología (nanocristales)
Complejación	
Uso de agentes complejantes	
Solubilización por surfactantes	
Microemulsiones	
Sistema-automicroemulsionante	
Dispersión del fármaco en un portador	
Dispersiones sólidas	
Soluciones sólidas	
Mezclas eutécticas	

2.3.1 Reducción del tamaño de partícula por métodos físicos

Actualmente los métodos convencionales de reducción del tamaño de partícula, tales como la trituración y el secado por pulverización, se basan en un esfuerzo mecánico para disgregar el principio activo, permitiendo que la reducción del tamaño de partícula sea un método eficaz, reproducible y económico para la mejora de la solubilidad.

Sin embargo, algunos ingredientes farmacéuticos activos no pueden procesarse a través de estos métodos, debido a la sensibilidad de compactación (perdida de la cristalinidad), sensibilidad de temperatura (fusión o cambio a polimorfo diferente) o cambio del estado de hidratación. Por lo tanto, dependiendo de las características de fármaco, los métodos físicos pueden no ser siempre la mejor opción para reducir el tamaño de partícula [10]. Los mayormente empleados son la micronización y la nanosuspensión por homogenización a alta presión.

2.3.1.1 Micronización

La micronización es un método convencional que consiste en la reducción del tamaño de partícula a través de diferentes procesos físicos como la molienda, en la cual se emplean molinos de chorro o molinos de coloide de rotor estator (ver figura 3) [11]. Entre las limitaciones más importantes de la micronización se encuentran el control de la distribución del tamaño de partícula, los alto costos de instalación de los equipos y el no poder controlar la forma de la partícula.

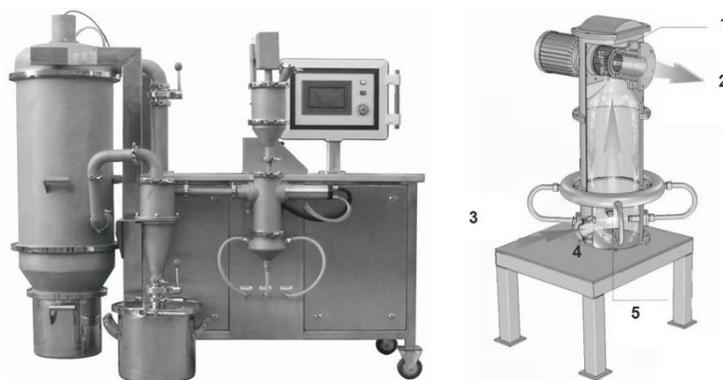


Figura 3. Molinos de chorro; 1. Zona de transición; 2. Producto terminado; 3. Materias primas; 4. Presión negativa; 5. Cámara de molienda.

2.3.1.2 Nanosuspensión

Las nanosuspensiones se han desarrollado como un candidato prometedor para la entrega eficiente de fármacos que son poco solubles tanto en agua como en aceite. Una nanosuspensión farmacéutica es un sistema formado por dos fases que contiene partículas de fármaco con un tamaño nanométrico, las cuales se encuentran estabilizadas gracias a la presencia de tensoactivos. En una nanosuspensión, el tamaño de partícula normalmente es inferior a una micra, en un rango de 200 a 600 nm. Entre los métodos de preparación de una nanosuspensión se encuentran la molienda de medios, la homogeneización a alta presión y la combinación de nanoprecipitación y homogeneización a alta presión [12]. La figura 4 muestra el principio de la reducción del tamaño por homogeneización a alta presión.

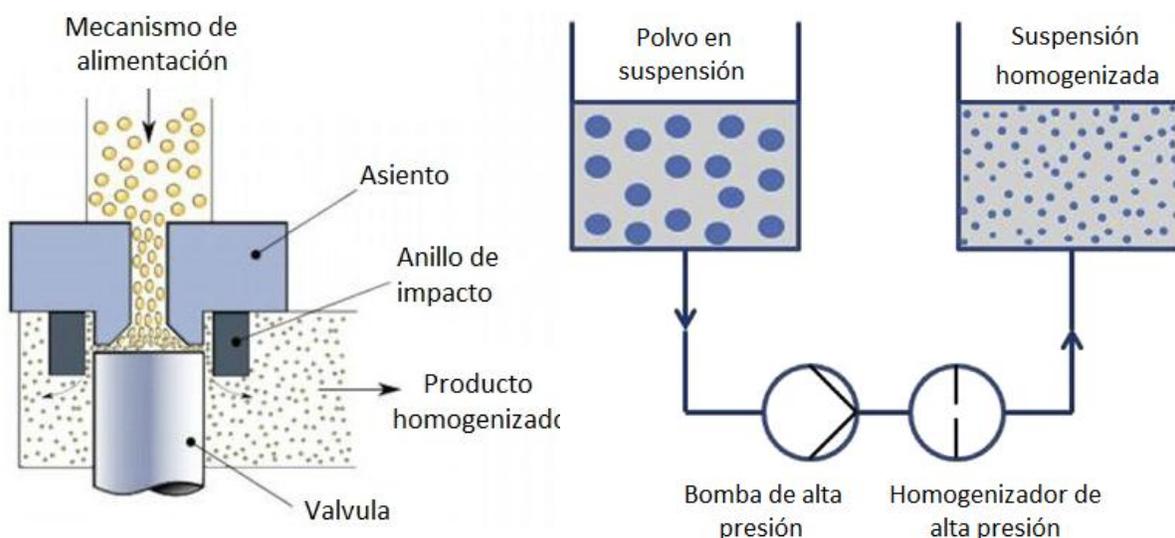


Figura 4. Homogeneización a alta presión [13].

Entre las principales ventajas que presentan las nanosuspensiones se encuentran la fácil preparación, un menor uso de excipientes, una mayor velocidad de disolución y solubilidad de saturación, y un proceso de fabricación a gran escala más simple. Sin embargo, algunos métodos de preparación requieren un alto número de ciclos de homogeneización, lo cual podría ocasionar la contaminación del producto debido al desprendimiento de iones metálicos provenientes de la pared del homogeneizador. Otras de sus desventajas, son las altas cantidades de surfactantes y estabilizadores que se emplean en la elaboración.

2.3.2 Modificación del hábito cristalino

Las técnicas de trituración física pueden producir un número elevado de partículas heterogéneas, cargadas y cohesivas, las cuales nos pueden traer problemas en procesos posteriores y por consiguiente en el rendimiento del producto. Debido a esto se han desarrollado técnicas de ingeniería de cristales, las cuales nos ayudan a cristalizar los fármacos de una manera controlada, obteniendo polvos de alta pureza con una distribución de tamaño de partícula bien definida, hábito cristalino, forma cristalina (cristalina o amorfa), naturaleza superficial y energía superficial [14]. En la figura 5 se muestran los sistemas cristalinos que presentan los ingredientes farmacéuticos activos (IFA).

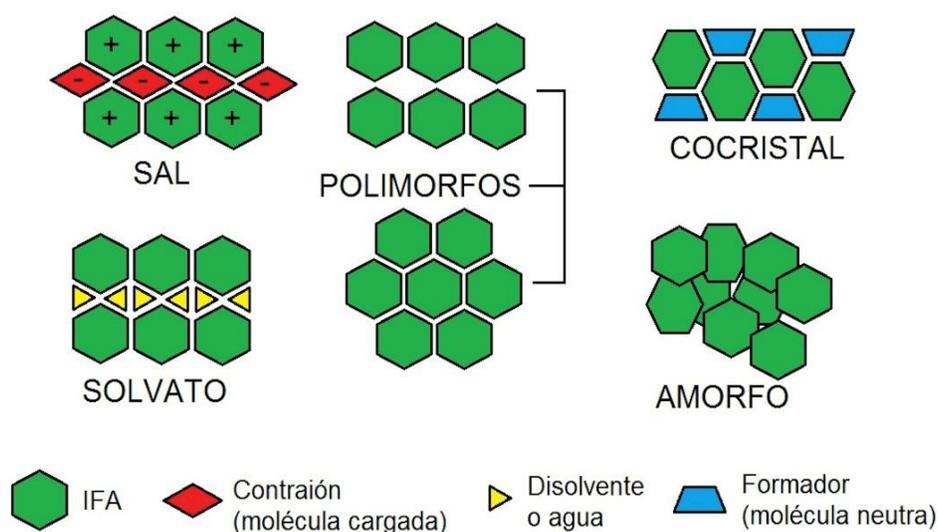


Figura 5. Sistemas cristalinos de un IFA [15].

Una manera de preparar cristales con diferente arreglo cristalino es mediante la manipulación de las condiciones de cristalización, como el uso de diferentes disolventes o cambio en la agitación o adición de otros componentes a la solución del fármaco cristalizante; a tales cristales se les conoce con el nombre de polimorfos. El polimorfismo es la capacidad que posee un compuesto para cristalizar en más de una forma cristalina. Un solo fármaco puede poseer diferentes polimorfos, los cuales son químicamente idénticos, pero exhiben diferentes propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad, la velocidad de disolución, el punto de fusión, densidad y la estabilidad.

Una de las actividades que se desarrollan en la industria farmacéutica, es la búsqueda de las formas metaestables ya que al igual que las formas amorfas se asocian con una mayor energía y, por tanto, una mayor solubilidad. Sin embargo, aunque se busque mejorar la solubilidad a través de las formas metaestables, es preferible desarrollar el polimorfo termodinámicamente más estable, para asegurar un mayor tiempo de vida útil en diferentes condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, el orden de disolución de las diferentes formas sólidas de un fármaco de mayor a menor es amorfo > polimorfo metaestable > polimorfo estable [16]. La consecuencia más importante del polimorfismo es la posible diferencia en la biodisponibilidad de diferentes formas polimórficas de un fármaco, particularmente cuando el fármaco es poco soluble.

2.3.3 Complejación

De todas las técnicas que existen para mejorar la solubilidad, la técnica de formación de complejos de inclusión es una de las técnicas que más se ha utilizado. Los complejos de inclusión se forman introduciendo una molécula no polar o la región no polar de una molécula (conocida como huésped) a la cavidad de otra molécula o grupo de moléculas. Existen diferentes tipos de moléculas huéspedes, pero las más utilizadas son las ciclodextrinas [17].

Las ciclodextrinas se forman mediante la degradación enzimática del almidón, llevada a cabo por la enzima ciclodextrina-glicosiltransferasa (CGT), la cual produce oligómeros cíclicos conocidos como ciclodextrinas (CD). Las ciclodextrinas consisten en oligosacáridos cristalinos, hidrosolubles y cíclicos, los cuales presentan una forma de anillo con una cavidad hidrofóbica y una superficie exterior hidrófila como se ilustra en la Figura 6. Las moléculas que se encuentran en la superficie de las ciclodextrinas las hace solubles en agua, y la cavidad hidrofóbica proporciona un microambiente para moléculas no polares de tamaño apropiado [17]. Respecto a su seguridad varios estudios han demostrado que las ciclodextrinas son prácticamente inocuas, sobre todo al administrarse por la vía oral, pero al administrarse por la vía intravenosa, se ha observado que las ciclodextrinas pueden inducir cambios morfológicos en los eritrocitos, seguidos de hemólisis [18].

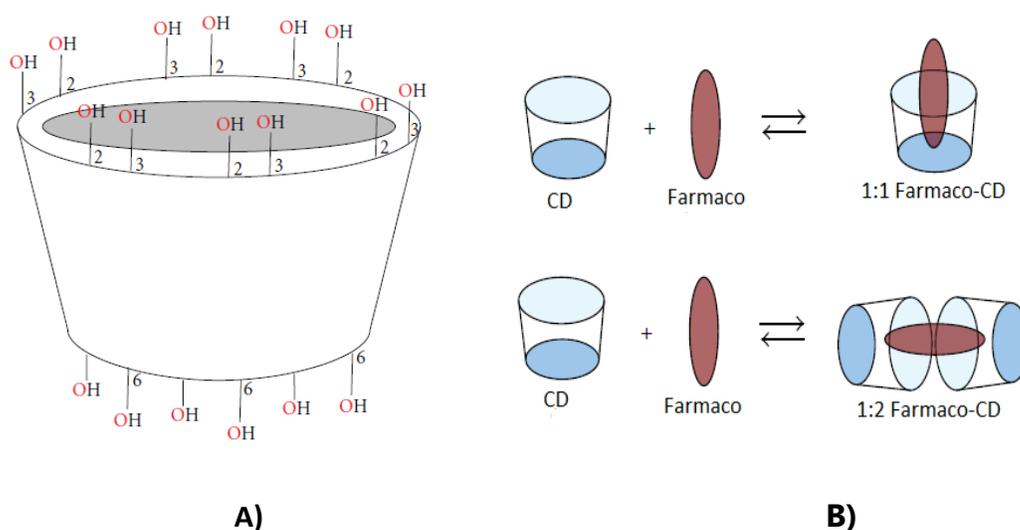


Figura 6. A) Representación de la cavidad hidrofóbica e hidrofílica de una ciclodextrina. B) Complejo Fármaco-Ciclodextrina [17].

2.3.4 Solubilización por tensoactivos

Otro de los métodos más utilizados para mejorar la disolución de fármacos pocos solubles es el uso de tensoactivos, los cuales son moléculas compuestas por un segmento de hidrocarburo conectado a un grupo polar, que reducen la tensión superficial entre dos fases, mejorando de esta manera la disolución de fármacos lipófilos en medio acuoso. Los tensoactivos también se utilizan a menudo para estabilizar microemulsiones y suspensiones en las que se disuelven los fármacos. Otra propiedad que poseen los tensoactivos, es la formación de estructuras micelares cuando la concentración supera un límite conocido como concentración micelar crítica (CMC). La concentración micelar crítica (CMC) se encuentra entre 0.05 y 0.10 % para la mayoría de los tensoactivos. La micelización es el proceso que consiste en la formación de micelas, las cuales mejoran la solubilidad mediante la encapsulación de fármacos dentro de ellas [19]. En la figura 7 se muestra el proceso de formación de micelas al superarse la concentración micelar crítica (CMC).

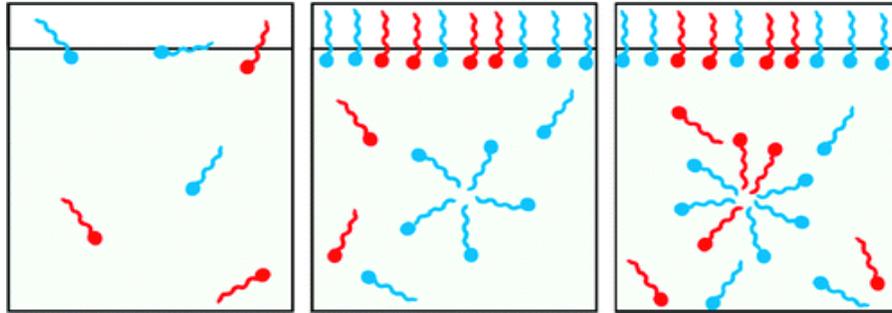


Figura 7. Proceso de formación de micelas [20].

2.3.5 Dispersiones sólidas (DS)

Las dispersiones sólidas (DS) son un grupo de productos conformados por dos componentes diferentes; de una matriz hidrófila inerte en estado sólido que funciona como vehículo y de uno o más fármacos hidrófobos. El objetivo de la tecnología es mejorar la disolución, la absorción y la eficacia terapéutica de fármacos poco solubles, mediante la reducción del tamaño partícula, la mejora de la humectabilidad, porosidad y la generación de un estado amorfo. Entre los vehículos hidrófilos más utilizados se encuentran la polivinilpirrolidona (Povidona, PVP), los polietilenglicoles (PEG) y el Plasdona-S630 [21].

A pesar de las numerosas ventajas que tienen las DS, existe la posibilidad de que durante el procesamiento (estrés mecánico) o almacenamiento (estrés por temperatura y humedad) el fármaco en estado amorfo pueda cristalizar, lo cual trae cambios en sus propiedades biofarmacéuticas y por tanto una disminución de la biodisponibilidad. En la figura 8 se muestran las tres estructuras posibles de una dispersión sólida.

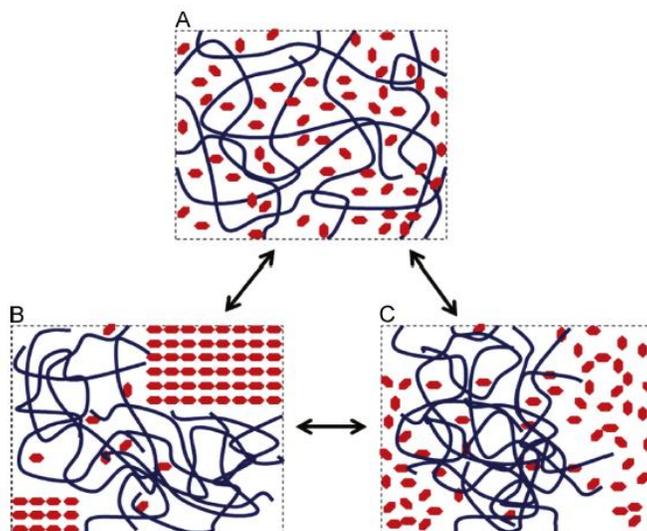


Figura 8. Estructuras posibles de una dispersión sólida A. Fármaco disperso en la matriz polimérica, B. Sistema polímero-fármaco en el que se ha producido un fármaco cristalino. C. Sistema fármaco-polímero con fármacos amorfos dispersos en la matriz polimérica [22].

2.3.6 Nanopartículas

Una forma de dosificación que está atrayendo especial atención en el área farmacéutica para mejorar la solubilidad de fármacos es el uso de nanopartículas, las cuales son estructuras que miden menos de 1 μm de diámetro. Cuando el tamaño de partícula de un fármaco se reduce de 8 μm a 200 nm hay un aumento de 40 veces en la relación de área superficial volumen, este aumento en el área superficial genera un incremento importante en la velocidad de disolución. Por lo cual el uso de nanopartículas ha demostrado ser un método útil en el desarrollo de productos farmacéuticos con problemas de baja solubilidad y biodisponibilidad. En la figura 9 se muestran algunos métodos de preparación de nanopartículas. Entre las principales ventajas que presentan las nanopartículas se encuentran [23]:

- ✚ Aumento en la absorción y biodisponibilidad.
- ✚ Dosis más pequeñas y uniformes.
- ✚ Aumento en la velocidad de disolución.
- ✚ Disminución de la toxicidad, debido a la administración de pequeñas dosis.

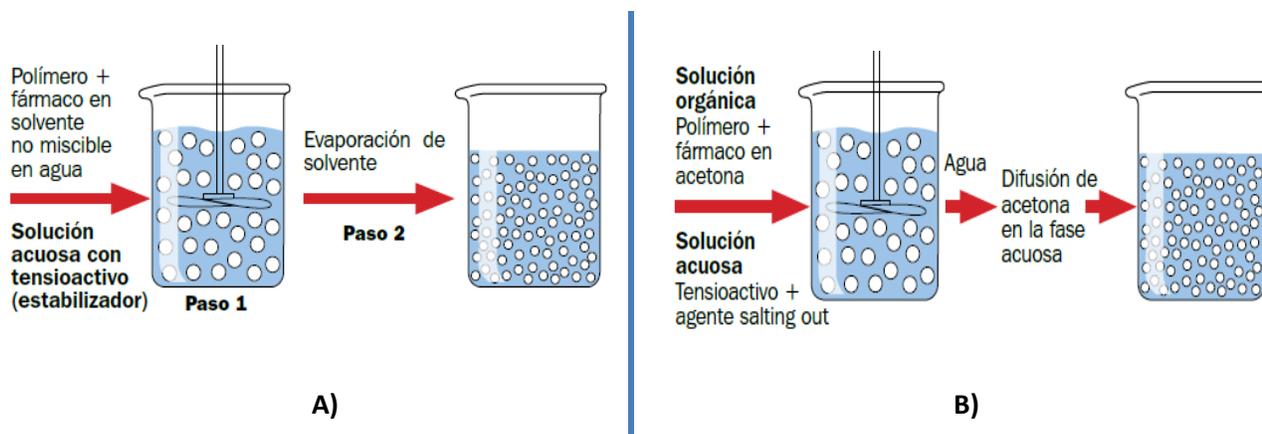


Figura 9. Preparación de nanopartículas por el método de A) Emulsión- evaporación y B) Salting-out [24].

2.4 LA NANOTECNOLOGÍA EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

La nanotecnología nace durante el siglo XX, cuando el físico Richard Feynman propone la idea de conocer, manipular y controlar la materia en una escala atómica o molecular, y se define como la ciencia que se encarga del estudio, diseño, caracterización, síntesis y aplicación de materiales y sistemas en una escala atómica o molecular (entre 1 y 100 nm).

Esta ciencia tiene como objetivo mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales y aplicarlas en las diferentes áreas de la tecnología como la óptica, la química, la eléctrica, y la medicina [25]. En cuanto a la manufactura de nanoestructuras existen dos enfoques principales para ello, uno es el *bottom-up* o construcción de abajo hacia arriba y el otro es el *top-down* o construcción de arriba hacia abajo. En el proceso *bottom-up* se construyen nanoestructuras mediante el ensamblaje de átomos o moléculas empleando reacciones químicas o fisicoquímicas para generar las nanoestructuras. Por otro lado, la técnica del *top-down*, es utilizada para reducir la talla de materiales hasta la escala nanométrica, empleando técnicas como, la fragmentación, corte, o la homogenización a alta presión descrita anteriormente. [26]. Existen diferentes áreas de investigación donde se ha aplicado la nanotecnología, (ver tabla 4).

Tabla 4. Campos de aplicación de la nanotecnología [27] [28] [29].

Campo de aplicación	Aplicación
Química y cosméticos	Productos químicos y compuestos a escala nanométrica, pinturas, revestimientos, etc.
Materiales	Nanopartículas, nanotubos de carbono, biopolímeros, puntos, recubrimientos.
Ciencias de la alimentación	Procesamiento, comida nutracéutica, nanocápsulas.
Medio ambiente y energía	Ayuda a la fabricación de materiales cuidando el medio ambiente (filtros de purificación de agua y aire, pilas de combustible fotovoltaicas).
Militar y energía	Biosensores, armas, mejora sensorial.
Electrónica	Nos brinda herramientas para fabricar nanomateriales con un mejor rendimiento a un bajo costo (chips semiconductores, almacenamiento de memoria).
Herramientas científicas	Microscopio de efecto atómico, microscópico y de efecto túnel.
Medicina	Nanopartículas para el diagnóstico, tratamiento e investigación de diferentes patologías.

2.4.1 Nanoacarreadores farmacéuticos

En el área de la tecnología farmacéutica, la nanotecnología ha demostrado ser una herramienta útil, ya que ha permitido hacer frente a diferentes tipos de problemas, por ejemplo, la baja biodisponibilidad, la inestabilidad, la baja solubilidad, la entrega no específica, la poca eficacia terapéutica, los niveles sanguíneos inconstantes y la dosificación frecuente.

La investigación farmacéutica, a través de la nanotecnología, desarrolla nanoestructuras farmacéuticas mejor conocidas como nanoacarreadores, los cuales presentan como ventajas que protegen al fármaco de la degradación enzimática e hidrolítica en el tracto gastrointestinal, entregan el fármaco en una zona específica del cuerpo, controlan la velocidad de liberación de este, promueven un estado de mayor saturación en el sitio de absorción (mejora de la solubilidad), previenen el efecto del primer paso hepático, mejoran la biodisponibilidad, permiten tener una liberación controlada reduciendo las fluctuaciones y debido a su pequeño tamaño pueden atravesar tejidos y ser absorbidos por las células, además de la factibilidad de formularse en diferentes formas farmacéuticas [30].

2.4.1.1 Tipos de Nanoacarreadores

Actualmente, la investigación farmacéutica se ha enfocado en el desarrollo y la manipulación de nuevos materiales, con el propósito de generar sistemas más avanzados y eficientes de liberación de fármacos que los sistemas convencionales que existen actualmente. Respecto a los materiales empleados, estos determinan el tipo de nanoacarreador que se obtiene, así como sus características y el proceso de liberación de los fármacos que se incorporan en su interior [31]. Hoy en día existen una amplia gama de nanoacarreadores con diferentes características fisicoquímicas y estructurales. La figura 10 muestra algunos tipos de nanoestructuras y la tabla 5 describe sus aplicaciones.

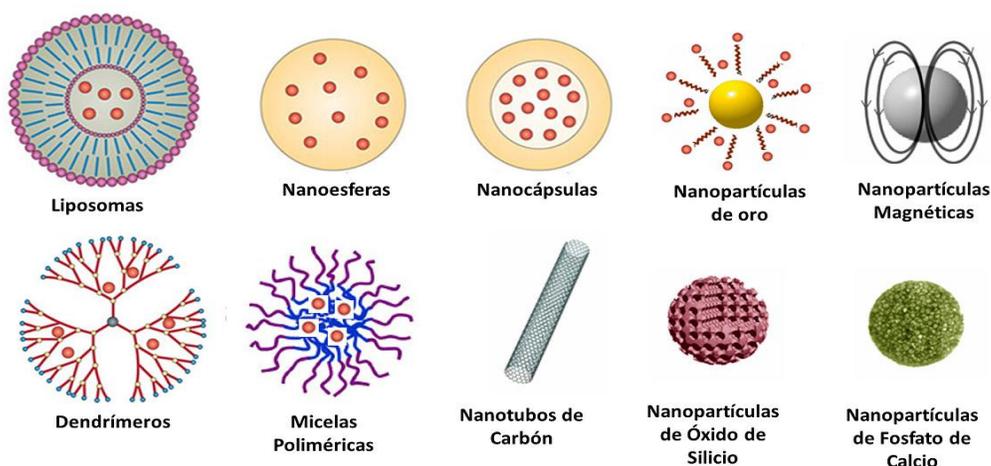


Figura 10. Algunos tipos de nanacarreadores [32].

Tabla 5. Características y aplicaciones de algunos nanoacarreadores farmacéuticos [33].

Tipos de nanoacarreadores	Tamaño (nm)	Características	Aplicaciones
Nanotubos de carbono	0.5-3 Diámetro 20-1000 Longitud	Forma cristalina de hojas de carbono, con resistencia notable y propiedades eléctricas.	Mejora de la solubilidad, administración de genes y péptidos, penetración en citoplasma y núcleo.
Dendrimeros	< 10	Sistema polimérico altamente ramificado, producido por polimerización.	Circulación prolongada y controlada de bioactivos.
Liposomas	50-100	Vesículas de fosfolípidos, biocompatibles, versátiles, con buena eficiencia de atrapamiento.	Entrega pasiva y activa de genes, proteínas y péptidos.
Nanopartículas metálicas	< 100	Coloides de oro y plata de tamaño muy pequeño.	Suministro de fármacos y genes, ensayos de diagnóstico altamente sensibles, ablación térmica y mejora de la radioterapia.
Puntos cuánticos de nanocristales	2-9.5	Material semiconductor, fluorescencia brillante y amplia excitación UV.	Imágenes a color múltiples de células hepáticas, hibridación de ADN, inmunoensayo, marcador de células cancerosas.
Micelas poliméricas	10-100	Alto atrapamiento de drogas, carga útil, bioestabilidad.	Entrega pasiva y activa de medicamentos, diagnóstico.
Nanopartículas poliméricas	10-1000	Biodegradable, biocompatible, ofrece protección a los fármacos.	Entrega controlada y sostenida de medicamentos.

De estos nanosistemas, las partículas poliméricas han llamado la atención porque tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de fármacos para las diferentes vías de administración y por periodos sostenidos.

2.5 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NPP) se preparan a partir de polímeros y co-polímeros, biodegradables, de origen natural o sintético, y biocompatibles cuando son empleados en las áreas de la salud. Presentan un tamaño entre 10-100 nm, sin embargo, la literatura farmacéutica las ubica como estructuras menores a 1 μm . En cuanto al fármaco, dependiendo del método de encapsulación, este puede atraparse, dispersarse, disolverse o adsorberse sobre las nanopartículas, como muestra en la Figura 11 [34].

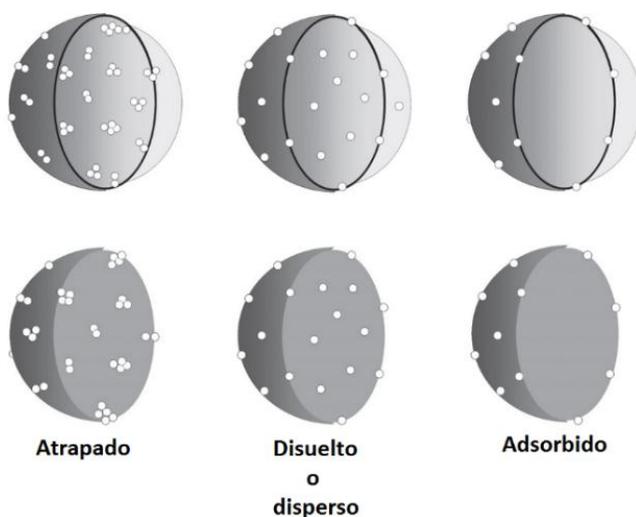


Figura 11. Modelos de mecanismos de encapsulación en nanopartículas poliméricas.

De acuerdo con la preparación de las nanopartículas, se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas son sistemas matriciales donde el fármaco puede ser adsorbido en la superficie de la esfera o estar disperso en su matriz, mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares donde el fármaco se encuentra dentro de una cavidad, se componen de un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica, donde los fármacos suelen ser disueltos, pero también pueden adsorberse en la superficie. Ver figura 12. [35].

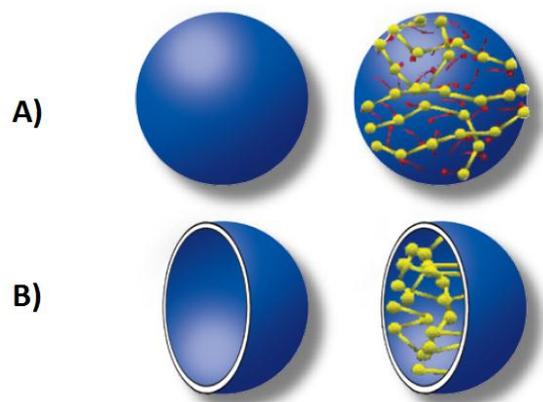


Figura 12. A) Nanoesferas, B) Nanocápsulas [35].

2.5.1 Nanoplexos

Recientemente ha surgido otro tipo de nanopartículas poliméricas, conocidas como nanoplexos o nanocomplejos, las cuales son nanopartículas formadas por la unión de un fármaco a un polielectrolito de carga opuesta. Ese tipo de nanopartículas se forman al hacer reaccionar un fármaco catiónico o aniónico con un polielectrolito (PE) con carga opuesta. Entre las principales ventajas que presentan los nanoplexos se encuentran [36]:

- ✚ La fácil y rápida preparación, ya que solo consiste en la mezcla de una solución de fármaco con una solución de polielectrolito.
- ✚ La reducción del uso intensivo de disolventes.
- ✚ La disminución en el uso de energía, ya que los nanoplexos en comparación con otras nanoestructuras requieren poca energía.
- ✚ El uso de instrumentos poco sofisticados para la preparación.

Los nanoplexos se han propuesto para la mejora de la solubilidad y la velocidad de disolución; se ha comprobado que los nanoplexos con fármacos poco solubles en agua como los de clase II y IV, mejoran significativamente su solubilidad y velocidad de disolución y con ello la biodisponibilidad. También se ha sugerido usarlos como vectores en la administración de genes no virales, los cuales se utilizan para tratar diferentes enfermedades como el SIDA, el cáncer, la demencia e isquemia cerebral [37].

También se han usado en la administración de proteínas y péptidos, como las vacunas, ya que protegen al fármaco de la degradación gastrointestinal por las enzimas digestivas, esto gracias a que las proteínas al ser moléculas cargadas pueden formar el complejo con el polielectrolito, haciéndolas adecuadas para la formación de nanoplexos [37].

2.5.1.1 Método de preparación

Dependiendo del pka del fármaco, los nanoplexos se preparan disolviendo un fármaco en una solución ácida o básica para formar un catión o un anión. Cuando un fármaco es anfótero y se disuelve en una solución acuosa con un pH ácido, como el ácido acético (AA) ($\text{pH} < \text{pka}$), esta forma cationes, mientras que un fármaco ácido cuando se disuelve en una solución acuosa con un pH básico, como el hidróxido de sodio ($\text{pH} > \text{pka}$), esta forma aniones. Cuando la solución de fármaco está en su forma ionizada, esta se añade a una solución de polielectrolito ionizada con carga opuesta, lo cual ocasiona que se produzcan interacciones electrostáticas entre el fármaco y polielectrolito, generando un complejo fármaco-polielectrolito insoluble como se muestra en la Figura 13 [38].

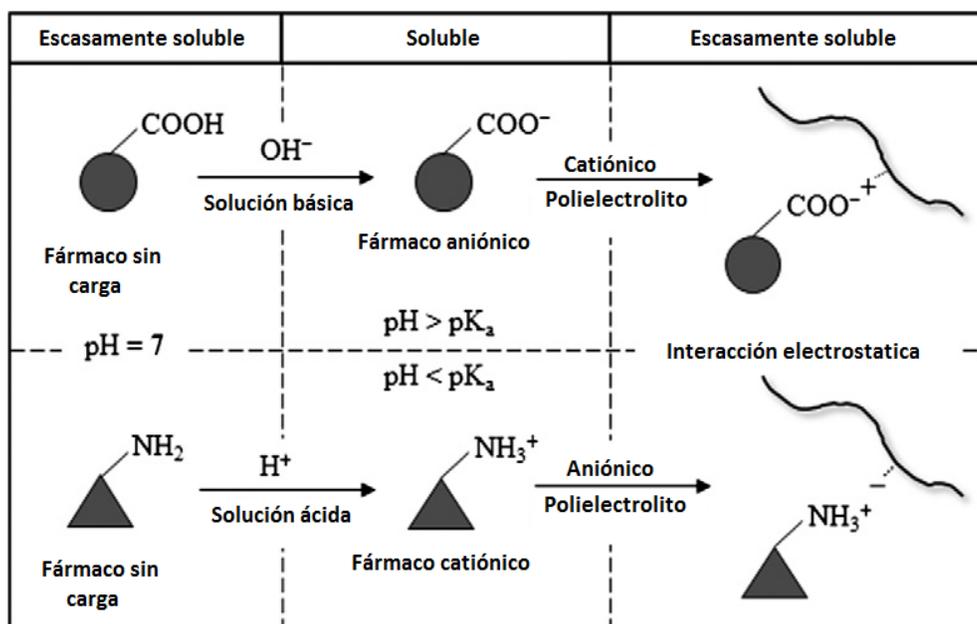


Figura 13. Formación de nanoplexos mediante interacciones electrostáticas entre el fármaco y el polielectrolito de carga opuesta [39].

Cuando se alcanza cierta concentración en la interacción fármaco-políelectrolito, los complejos comienzan a agregarse debido a las atracciones hidrofóbicas del fármaco, generando un nanoplexo insoluble en presencia de una sal. La sal juega un papel importante, ya que minimiza las repulsiones entre las cadenas de polielectrolitos con carga similar, facilitando la formación de los nanoplexos como se observa en la Figura 14. La fuerte interacción electrostática fármaco-PE evita que las moléculas de fármaco formen estructuras cristalinas al precipitar, generando un nanoplexo amorfo [39].

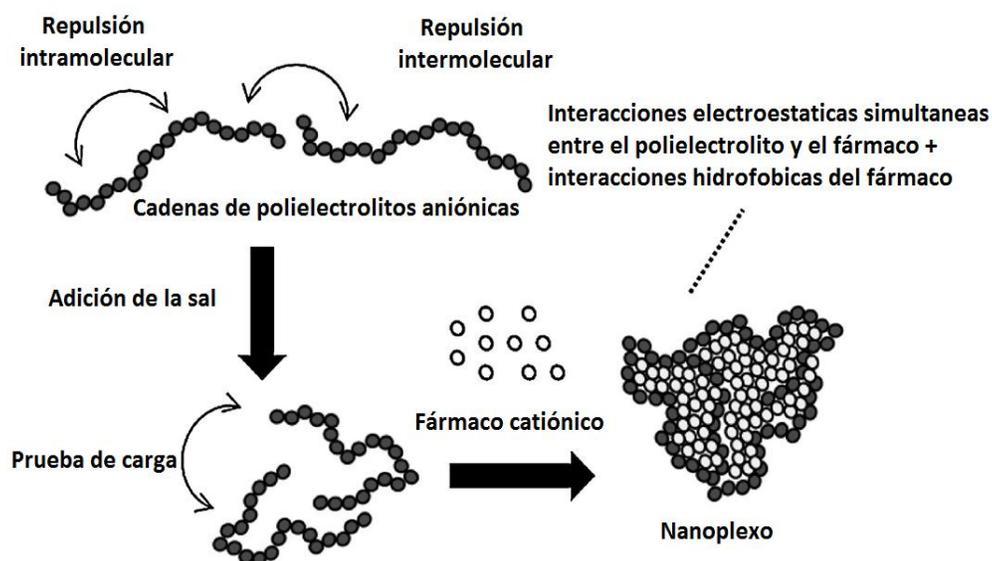


Figura 14. Función de la sal en la complejación de nanoplexos [40].

2.5.1.2 Caracterización de nanoplexos

Considerando la importancia de las propiedades superficiales y características fisicoquímicas de las nanopartículas, estas deben ser caracterizadas durante su elaboración, con el propósito de asociar estas propiedades con el comportamiento *in vitro* / *in vivo*. Algunas propiedades como la distribución del tamaño de partícula, el diámetro de partícula promedio y la carga superficial afectan la estabilidad física y la distribución *in vivo* de las nanopartículas. Por lo cual las nanopartículas se caracterizan generalmente por su tamaño, morfología, cristalinidad, carga de fármaco y carga superficial, mediante el uso de diferentes técnicas, las cuales se resumen en la Tabla 6. [41]

Tabla 6. Herramientas y métodos de caracterización de nanoplexos [41].

Parámetro	Método de caracterización
Interacción acarreador-fármaco	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) Espectroscopia de rayos-X (XRD) de polvos Espectroscopia de infrarrojo (IR)
Determinación de carga	Anemometría láser Doppler Potenciómetro Zeta
Análisis de la superficie	Espectrometría de masas de iones secundarios estáticos Adsorción de gases
Estabilidad de fármaco	Bioensayo del fármaco extraído de nanopartículas Análisis químico del medicamento
Estabilidad de dispersión de nanopartículas	Temperatura de floculación crítica (CFT)
Tamaño de partícula y distribución	Dispersión dinámica de luz Espectroscopia de correlación de fotones (PCS) Microscopía electrónica de barrido (SEM) Microscopía electrónica de transmisión (TEM)
Perfil de liberación	Características de liberación <i>in vitro</i> en condiciones fisiológicas y condiciones sink
Hidrofobicidad superficial	Medición de ángulo de contacto de agua Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

Entre las propiedades mayormente caracterizadas en los nanoplexos se encuentran las que se describen a continuación.

a) Tamaño de partícula

Algunas características de las nanopartículas como la carga de fármaco, el mecanismo de liberación, la distribución *in vivo*, la selección de tejidos, la toxicidad y el destino biológico, están íntimamente relacionadas con el tamaño, por lo cual su determinación y su morfología se han convertido un factor importante en la caracterización del producto. Al disminuir el tamaño de partícula aumenta el área de superficie de contacto, por lo cual, la mayor parte del fármaco cargado en ellos estará expuesto en la superficie de la partícula, lo que conduce a una liberación rápida del fármaco. Por el contrario, al tener partículas de un mayor tamaño el fármaco difunde más lentamente. Sin embargo, las partículas más pequeñas tienden a agregarse durante su almacenamiento, por lo tanto, se debe tomar en cuenta el tamaño y la estabilidad máxima asociada [42].

b) Carga superficial

La determinación de la carga superficial en las nanopartículas es muy importante, ya que determina su interacción electrostática con compuestos farmacológicos y medios biológicos. Otro factor importante respecto a la carga superficial es la estabilidad coloidal, la cual se analiza mediante el potencial zeta de las nanopartículas. El potencial zeta es una medida indirecta del potencial eléctrico en la doble capa interfacial, es decir, el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern e indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes cargadas en una dispersión (ver figura 15). La determinación del potencial zeta nos permite predecir si una dispersión coloidal de nanopartículas será estable durante su almacenamiento, de manera general, se deben obtener valores altos de potencial zeta, ya sea negativos o positivos ($> \pm 30\text{mV}$), lo cual evitará que las nanopartículas formen agregados y precipiten [42].

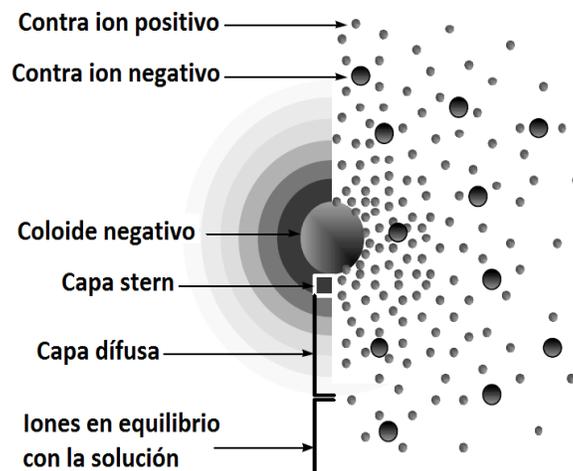


Figura 15. Representación del potencial zeta.

c) Carga del fármaco

Un sistema de nanopartículas exitoso es aquel en donde se puede encapsular una alta concentración de fármaco. Este proceso se puede realizar por dos métodos:

- ✚ **Método de incorporación:** En este método el fármaco es incorporado durante la formación de las nanopartículas.

- ✚ **Método de adsorción / absorción:** El fármaco se adsorbe/absorbe en las nanopartículas al encontrarse en una solución saturada de fármaco.

La eficiencia de carga del fármaco depende en gran medida de su solubilidad en el material matriz o en el polímero, además de otros factores, como la composición del polímero, el peso molecular, la interacción fármaco-polímero y la presencia de ciertos grupos funcionales. La cantidad de fármaco encapsulado se puede determinar mediante diferentes técnicas analíticas como HPLC, HPTLC o espectrofotometría UV/Vis. Para ello se debe implementar y validar un proceso para extraer el fármaco encapsulado de manera directa (rompiendo las nanopartículas) o indirecta (fármaco no encapsulado en la fase continua). Para ambos métodos primero se realiza una ultracentrifugación para poder separar las nanopartículas de la fase continua. Una vez cuantificada la concentración de fármaco en la muestra, se determina la eficiencia de encapsulación %, mediante la relación de fármaco añadido en la elaboración de las nanopartículas y la cantidad de fármaco encapsulado en ellas. También se puede medir la carga de fármaco, relacionando la masa de fármaco encapsulado con la masa de polímero. Por último, se puede determinar el rendimiento del proceso, considerando la cantidad de fármaco y polímero empleado en la elaboración de nanopartículas, así como la cantidad de nanopartículas que se obtuvieron [43].

d) Liberación del fármaco

Otro de los factores que ayuda a obtener un sistema de nanopartículas exitoso, es el mecanismo de liberación del fármaco, por lo tanto, es importante comprender la manera y el grado en que se liberan las moléculas de fármaco, así como la biodegradación de la matriz polimérica. En general la velocidad de liberación del fármaco depende de:

- ✚ La solubilidad del medicamento.
- ✚ Que tan lejos difunde el fármaco a través de la matriz.
- ✚ Combinación del proceso de erosión / difusión.
- ✚ Grado de erosión / degradación de la matriz.
- ✚ Tiempo de desorción del fármaco a través de la superficie.

Cuando se recubre una nanopartícula con polímero, la velocidad de liberación disminuye debido al movimiento del fármaco desde el núcleo a través de la membrana polimérica. Este fenómeno se puede observar al encapsular el fármaco mediante el método de incorporación, el cual tiene un pequeño efecto de explosión seguido una liberación sostenida. Por lo cual la membrana polimérica es un factor que limita la difusividad del fármaco y por consiguiente su solubilidad. Existen varios métodos para determinar la liberación *in vitro* del fármaco, como las siguientes [43]:

- ✚ Difusión con membranas sintéticas o biológicas, a un pH fisiológico, en condición sink.
- ✚ Bolsa de diálisis inversa.
- ✚ Agitación, seguido por ultracentrifugación.
- ✚ Ultrafiltración.

e) Interacción de componentes

Para determinar la interacción fármaco / polímero, así como cambios estructurales en las moléculas activas encapsuladas, se utilizan técnicas como la difracción de rayos-X de polvos y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta última técnica también nos permite evaluar el comportamiento térmico de los componentes de las nanopartículas después de ser sometidas a las condiciones de fabricación [44].

2.5.2 Uso de polímeros naturales y biodegradables en la obtención de nanopartículas poliméricas

En los últimos años, ha aumentado el uso de polímeros biodegradables debido a que presentan buena biocompatibilidad, un buen diseño, fácil preparación y una gran variedad de estructuras. En el área farmacéutica, especialmente en la administración y entrega de fármacos, los polímeros están teniendo un papel significativo, debido a que se pueden suministrar con agentes terapéuticos directamente en el sitio donde se requiere [45]. A pesar de tener un amplio conocimiento en la química de polímeros, actualmente solo disponemos de un número limitado de polímeros que pueden usarse en la elaboración de nanopartículas. La principal razón por la que se dispone de un limitado de polímeros se debe a que deben cumplir con varios requisitos para poder ser utilizados.

En primer lugar, deben ser biodegradables, es decir, una vez que ingresen en el organismo deben ser totalmente eliminados en un corto periodo de tiempo, permitiendo de esta manera la administración de dosis múltiples sin correr riesgo de una acumulación incontrolada. En segundo lugar, no deben ser tóxicos y generar inmunogenicidad, es decir, una respuesta alérgica al entrar en el organismo. En tercer lugar, deben ser formuladas con las propiedades adecuadas respecto al objetivo por el cual fueron diseñadas. En la Tabla 7 se muestra una lista con los polímeros más utilizados en la elaboración de nanopartículas.

Tabla 7. Polímeros más utilizados en la elaboración de nanopartículas [46].

Material	Nombre completo	Abreviación o nombre comercial
Homopolímeros sintéticos	Poli (lactida)	PLA
	Poli (ϵ -caprolactona)	PCL
	Poli (isociano cianoacrilato)	PICBA
	Poli (isohehexilcianoacrilato)	PIHCA
	Poli (n-butilcianoacrilato)	PBCA
	Poli (acrilato) y poli (metacrilato)	Eudragit
Polímeros naturales	Chitosán	
	Alginato	
	Gelatina	
	Albúmina	
Copolímeros	Poli (lactida) -poli (etilenglicol)	PLA-PEG
	Poli (láctido-co-glicólido) -poli (etilenglicol)	PLGA-PEG
	Poli (ϵ -caprolactona) -poli (etilenglicol)	PCL-PEG
	Poli (hexadecilcianocianocrilato-co-polietilenglicol) cianoacrilato	Poly(HDCA-PEGCA)
Coloides estabilizadores	Dextran	
	Pluronic F68	F68
	Alcohol de polivinilo	PVA
	Tween® 20 or Tween® 80	

Actualmente algunos de ellos se utilizan en formas farmacéuticas orales, tópicas o incluso en la industria alimentaria y solo algunos de ellos han sido aprobados para su administración parenteral. Recientemente se han desarrollado gran cantidad de copolímeros, como poli (etilenglicol) o polisacáridos, debido a la necesidad de obtener nanopartículas que puedan ser controladas para su destino *in vivo*. Otra de las características encontradas en estos copolímeros, es su capacidad para estabilizar a las nanopartículas sin la necesidad de usar tensoactivos [46].

En el presente proyecto de investigación se seleccionó el chitosán debido a cumple con todas las propiedades para formar nanopartículas, pero principalmente porque es un polielectrolito catiónico en soluciones ácidas, debido a que tiene un pka de 6.5.

2.5.2.1 Chitosán

El chitosán es un amino polisacárido natural con un amplio uso en el área biomédica e industrial. Este polímero cuenta con estructuras, propiedades y funciones altamente sofisticadas, por lo cual su investigación y desarrollo se ha intensificado en muchas partes del mundo, considerándolo un material con un gran potencial en el futuro. El chitosán ha llamado la atención debido a que cuenta con una excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, es seguro para el medio ambiente y además presenta una baja toxicidad e inmunogenicidad [47]. El chitosán es un polímero policationico compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas entre sí por en laces β (1,4), como se muestra en el Figura 16.

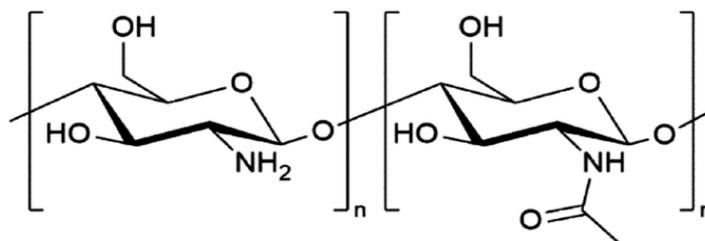


Figura 16. Estructura del chitosán [47].

Este polímero tiene un grupo amino y dos grupos hidroxilo en el residuo glucosídico repetitivo y se obtiene principalmente mediante la desacetilación de la quitina, un polímero de origen natural que se encuentra en el exoesqueleto de insectos, crustáceos y hongos. La desacetilación de la quitina normalmente se lleva a cabo por un proceso de hidrólisis en la posición acetada, utilizando una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido potasio (KOH) al 40-45 % (p/v) a 90-120 °C durante 4 o 5 horas, en la Figura 17 se muestra el proceso de desacetilación.

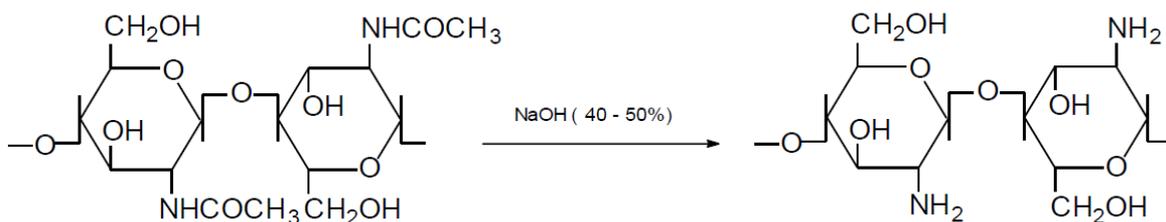


Figura 17. Proceso de desacetilación de la quitina.

En el mundo se cosechan anualmente varios millones de toneladas de quitina, procedentes del desperdicio de conchas de gambas, langostas y cangrejos, por lo cual este biopolímero se encuentra fácilmente disponible a un bajo costo. Oficialmente el chitosán es nombrado por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) como: poli (2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa).

Los grupos amino libres en la cadena polimérica al estar en un medio ácido ($\text{pH} < 6$), tienden a protonarse, ocasionando que el chitosán sea soluble en la mayoría de los ácidos orgánicos como el acético, fórmico, tartárico y cítrico. La protonación de los grupos amino libres produce la especie cargada $-\text{NH}_3^+$ adquiriendo el polímero un comportamiento de policación, esto le da al chitosán la capacidad de interactuar con sustancias cargadas negativamente como las proteínas o el mucus, también le da propiedades bioadhesivas y adsorbentes. Por otro lado, al encontrarse las aminas en un medio básico ($\text{pH} > 6$), estas se desprotonan, perdiendo su carga y su solubilidad acuosa [48][49].

2.6 Hipercolesterolemia

La hipercolesterolemia se define como la elevación de los niveles plasmáticos de colesterol por encima de los valores normales. Este aumento está asociado a problemas coronarios, el tipo de dieta, el sexo de la persona, el estilo de vida y la síntesis endógena del organismo. En el mundo un 38 % de pacientes tiene un exceso de colesterol en sangre que podría derivar en enfermedades cardiovasculares.

El colesterol es una molécula lipídica que tiene un papel muy importante como precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares, además también ayuda a mantener la integridad estructural de las membranas celulares. Este lípido se produce principalmente en el hígado, aunque también se puede obtener mediante los alimentos.

Sin embargo, a pesar de ser una sustancia importante para la vida, un aumento importante de colesterol en sangre ocasiona que este se acumule en las arterias, generando placas de ateroma, que con el tiempo ocasionan aterosclerosis, es decir, un estrechamiento o endurecimiento de las arterias por acumulación de colesterol en sus paredes, como se muestra en la Figura 18 [49].

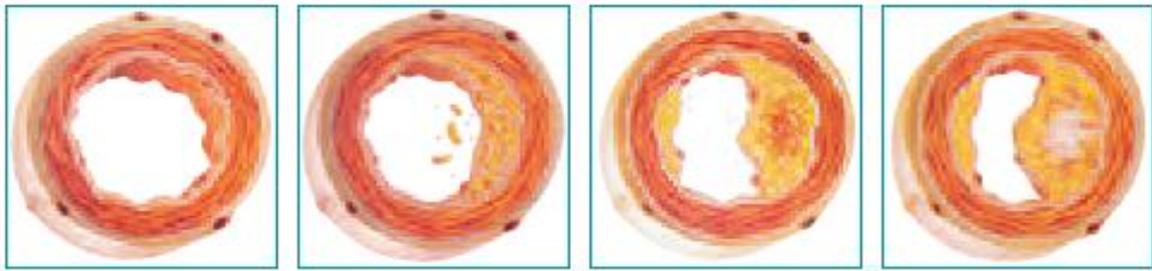


Figura 18. Acumulación de colesterol en las arterias.

Las moléculas de colesterol se transportan a través de la sangre unidas a dos tipos de lipoproteínas:

- ✚ **Lipoproteínas de baja densidad (LDL):** Este tipo de lipoproteínas transporta el colesterol a los tejidos para su utilización. Este tipo de colesterol es el que nos conviene mantener en niveles bajos, ya que en exceso se adhiere a las paredes de los vasos sanguíneos.
- ✚ **Lipoproteínas de alta densidad (HDL):** Estas lipoproteínas recogen el colesterol sobrante de los tejidos y lo llevan hasta el hígado donde es eliminado. Por lo cual, al tener una mayor cantidad de colesterol HDL, mayor será la cantidad de colesterol eliminado de la sangre. En la Tabla 8 se muestran los valores de lípidos recomendados.

Tabla 8. Niveles de lípidos recomendados por el Adult Treatment Panel III Guidelines [50]

Lípidos	Niveles (mg/dl)	Categoría
Colesterol LDL	< 100	Optimo
	100-129	Deseable
	130-159	Limite alto
	160-189	Alto
	≥ 190	Muy alto
Colesterol total	< 200	Deseable
	200-239	Limite alto
	≥ 240	Alto
Colesterol HDL	< 40	Bajo
	≥ 60	Alto
Triglicéridos	< 150	Normal
	150-199	Limite alto
	200-499	Alto
	≥ 500	Muy alto

La aterosclerosis producida por el acumulamiento de colesterol en las arterias es la principal causa de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas, por lo cual, un nivel alto de colesterol en sangre es un factor de riesgo que aumenta las posibilidades de padecer una enfermedad cardiovascular. En México la principal causa de muerte son las enfermedades cardiovasculares, siendo la hipercolesterolemia el principal factor de riesgo. En la tabla 9 podemos apreciar las principales causas de muerte en México en el 2016 de acuerdo con el INEGI.

Tabla 9. Principales causas de muerte en México.

Causas de muerte	Defunciones 2016
Enfermedades del corazón	136,342
Enfermedades isquémicas del corazón	97,743
Diabetes mellitus	105,572
Tumores malignos	82,502
Enfermedades del hígado	38,755
Enfermedad alcohólica del hígado	14,029
Accidentes	37,418
De tráfico de vehículos de motor	16,179
Enfermedades cerebrovasculares	34,782
Agresiones	24,559
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	23,271
Influenza y neumonía	21,572
Insuficiencia renal	13,132
Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	12,641
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	9,157
Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	7,388
Lesiones autoinfligidas intencionalmente	6,370
Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	5,280
Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana	4,630
Enfermedades infecciosas intestinales	3,908
Anemias	3,504
Septicemia	2,744

El tratamiento para controlar los niveles de colesterol dependerá de la cantidad de colesterol que la persona presente, pero antes de controlarlo con medicación, primeramente, se deben cambiar ciertos hábitos de vida para reducir los niveles de colesterol malo, que se depositan en las paredes de las arterias y aumentar los valores de colesterol bueno. En cuanto al tratamiento farmacológico, este se basa en el uso de estatinas, resinas, fibratos, ácido nicotínico, inhibidores de la absorción de colesterol y fitosteroles.

2.7 Estatinas

Las estatinas son uno de los grupos farmacológicos más ampliamente recetados en el mundo. La eficacia hipolipemiante de las estatinas radica en su capacidad para reducir la síntesis intracelular hepática de colesterol y la concentración en sangre de cLDL.

Las estatinas ayudan a reducir los niveles de colesterol en sangre, mediante la inhibición competitiva, parcial y reversible de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, una enzima que ayuda al organismo a producir colesterol, mediante la conversión de la HMG-CoA a mevalonato, precursor del colesterol, como se muestra en la Figura 19. Cuando la enzima HMG-CoA es inhibida, se deja de producir colesterol, lo cual ocasiona que el hígado aumente la expresión de receptores LDL. Estos receptores captan las partículas de LDL que se encuentran en la sangre, reduciendo de esta manera los niveles de colesterol cLDL [51].

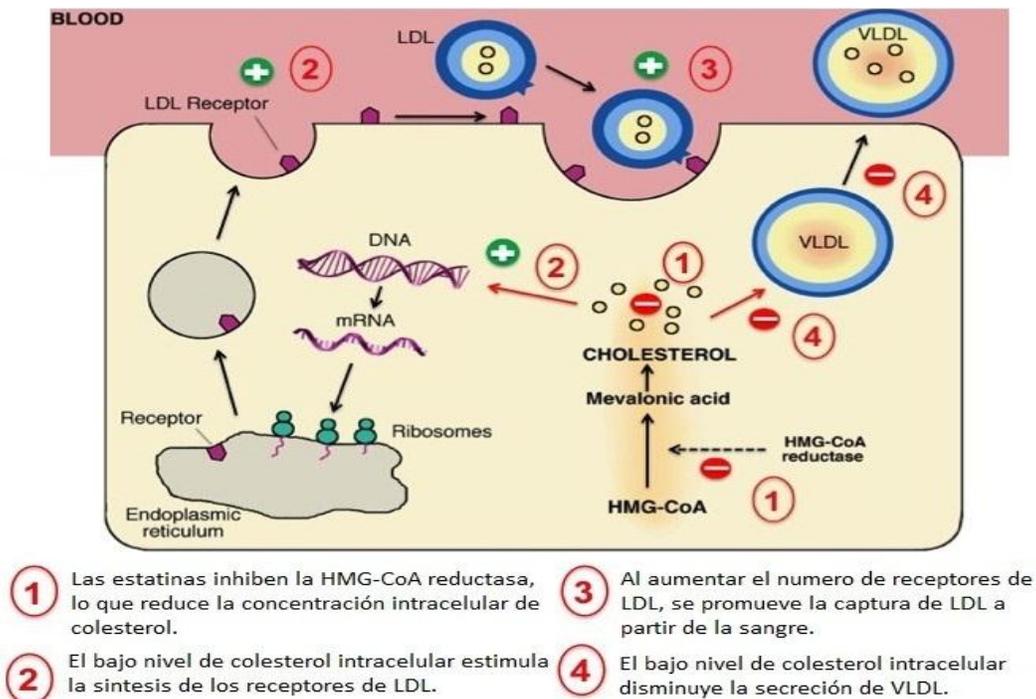


Figura 19. Mecanismo de acción de las estatinas.

Las estatinas son uno de los fármacos más eficaces para reducir los niveles de colesterol, reduciendo hasta en un 20-45 % los valores de LDL, también pueden reducir los valores de triglicéridos y elevar los niveles de HDL.

En comparación con otros medicamentos, las estatinas son seguras, y presentan pocos efectos secundarios, como fatiga, trastornos gastrointestinales, estreñimiento y calambres. En general la mayoría de las personas no presentan estos efectos [52]. En la tabla 10 se muestran las estatinas con sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas más importantes.

Tabla 10. Estatinas con sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas [53]

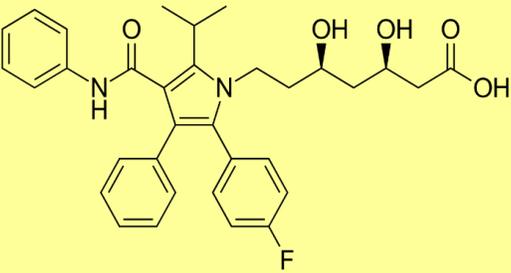
Estatina	Punto de fusión (°C)	pKa	Solubilidad (mg/mL)	Log P	SCB	Biodisponibilidad oral
Atorvastatina	159-161	4.46	0.0100	5.70	II	12-14%
Lovastatina	174.5	14.9 ^a	0.0004	4.26	II	≤ 5%
Simvastatina	135-138	14.9 ^a	0.0100	4.68	II	≤ 5%
Rosuvastatina (Ca, Zn)	NR	4.0 ^a	0.0880	0.13	NR	20%
Pravastatina	171-173	4.36	33.0	0.59	III	17%
Fluvastatina	194-197	4.4	33.0	4.50	I	24%
Pitavastatina	NR	4.1 ^a	0.004 ^a	3.75 ^a	NR	51%

Como podemos observar la mayoría de las estatinas son case II, presentan una baja solubilidad y por consiguiente una baja biodisponibilidad.

2.7.1 Atorvastatina

La atorvastatina es de la familia de las estatinas de primera elección en el tratamiento de las hipercolesteremias, es insoluble en soluciones acuosas con un $\text{pH} \leq 4$, muy poco soluble en agua destilada y soluciones buffer de fosfatos $\text{pH} 7.4$, ligeramente soluble en etanol y muy soluble en metanol [54]. En la Tabla 11 se muestra la estructura de la atorvastatina con sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas más importantes.

Tabla 11. Estructura y propiedades fisicoquímicas de la Atorvastatina [55].

Propiedades	Atorvastatina
Nombre químico	Acido (3R, 5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4 (fenilcarbamoil)-5-(propan-2-il)-1H-pirrol-1-il]-3,5-dihidroxiheptanóico 
Efectividad terapéutica	Alta
Log P	5.7
Peso molecular (g/mol)	558.7
pka	4.46
Solubilidad en agua	0.0204 mg / ml (pH 2.1) 1.23 mg / ml (pH 6.0)
Permeabilidad	Alta
Biodisponibilidad oral	5 a 30 %
Vía de administración	Oral
Forma farmacéutica	Tabletas (10, 20 y 40 mg)

La atorvastatina es rápidamente absorbida después de su administración oral, alcanzando su concentración máxima (Tmax) en 1-2 horas, tiene un volumen de distribución de 565 L y una unión a proteínas plasmáticas de 98%. Presenta una absorción en intestinos de 30 a 85%, con una biodisponibilidad de 5 a 30% debido al metabolismo del primer paso hepático. La vida media de la atorvastatina es de casi 20 horas, la cual la hace tener una mejor eficiencia como hipocolesterolemiantes. Es metabolizada ampliamente en el hígado y más del 70% de sus metabolitos son excretados por las heces [56]. Generalmente este fármaco es bien tolerado, pero puede presentar algunos efectos secundarios como mialgia, estreñimiento, astenia, dolor abdominal y náuseas. Es importante destacar que una desventaja que presenta es la baja solubilidad acuosa en el sitio de absorción cuando se administra de forma oral, lo que lleva a dosis repetidas y frecuentes.

3.0 JUSTIFICACIÓN

La atorvastatina es un fármaco sintético de la familia de las estatinas, insoluble en soluciones acuosas con un $\text{pH} \leq 4$, este fármaco está clasificado como clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad), de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica.

Debido a la baja solubilidad y al aumento en la utilización de fármacos clase II para el tratamiento de enfermedades de interés nacional, como la hipercolesterolemia, en este trabajo de investigación se propone el uso de nanocomplejos, utilizando un polímero biodegradable (chitosán) en conjunto con atorvastatina, con el objetivo de ofrecer una alternativa para mejorar la solubilidad y la velocidad de disolución de fármacos clase II, que tengan un impacto positivo en los tratamientos terapéuticos, además de ofrecer sistemas de liberación controlada que puedan ser formulados e incluidos en diferentes formas farmacéuticas, incluso con la ventaja de ser administrados por diferentes vías, como la vía parenteral.

4.0 HIPÓTESIS

Es posible la obtención de nanoplexos con atorvastatina empleando un biopolímero catiónico (chitosán), mediante el método de nanoprecipitación en medio acuoso por interacciones electrostáticas, los cuales tendrán un efecto significativo en la solubilidad y la velocidad de disolución del fármaco.

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener, caracterizar y evaluar “*in vitro*” propiedades biofarmacéuticas de nanocomplexos de quitosán con atorvastatina.

5.2 Objetivos específicos

- ✚ Preparar y optimizar nanoplexos de quitosán cargados con atorvastatina, empleando un diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta.
- ✚ Realizar la caracterización física de los nanocomplexos obtenidos, empleando técnicas como dispersión dinámica de luz, microscopía electrónica, calorimetría diferencial de barrido, infrarrojo y difracción de rayos X, para determinar talla, morfología, eficiencia de complejación, rendimiento, interacción de componentes y carga superficial.
- ✚ Desarrollar y validar métodos analíticos empleando espectrofotometría UV.
- ✚ Determinar la eficiencia de acomplejación y el rendimiento en la preparación de los nanoplexos de quitosán-atorvastatina.
- ✚ Realizar las pruebas de solubilidad en condiciones de saturación y estudios de disolución “*in vitro*” en medios de simulación gastrointestinal.

6.0 MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos

Fármaco

- ✚ Atorvastatina de calcio (DVA MEXICANA)
- ✚ Ácido acético glacial 1 %

Polímero

- ✚ Chitosán (bajo peso molecular, 75-85 % desacetilado, SIGMA-ALDRICH)

Tensoactivo

- ✚ Pluronic F 68 (SIGMA-ALDRICH)
- ✚ Brij 58 (SIGMA-ALDRICH)

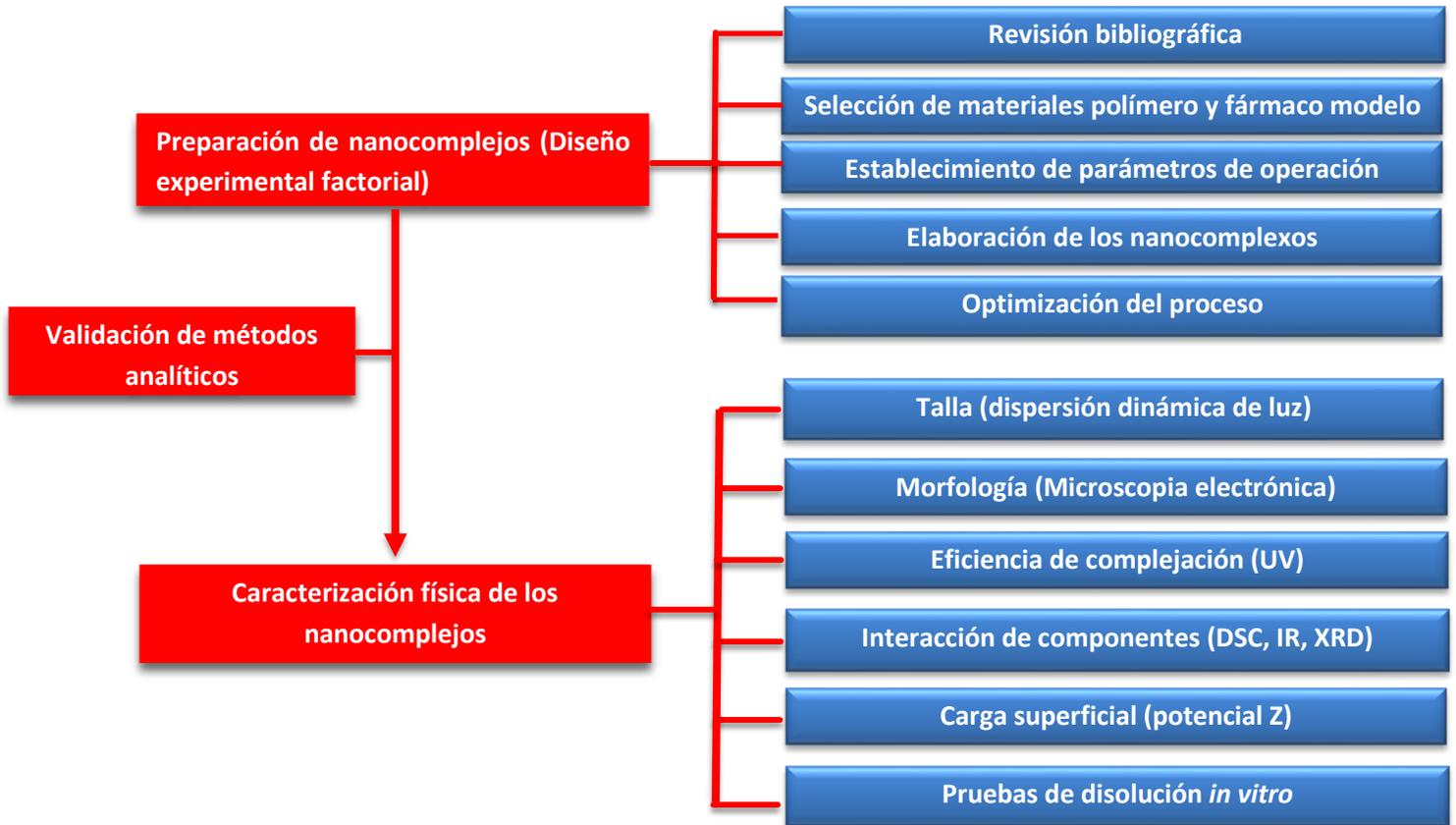
Soluciones amortiguadoras

- ✚ Buffer de acetatos pH 5.3
- ✚ Buffer de fosfatos pH 6.8
- ✚ Buffer de HCl pH 1.2
- ✚ Ácido acético glacial 1%

Equipos

- ✚ Homogeneizador de alto corte (Heidolph silentcrusher)
- ✚ Potenciómetro (Jenco VisionPlus pH 6175)
- ✚ Espectrofotómetro (Cary 60 UV/Vis)
- ✚ Zetasizer (Nano-ZS90)
- ✚ Espectrofotómetro de infrarrojo (Nicolet 6700 FT-IR)
- ✚ Espectrofotómetro de Rayos X (Bruker Phaser D2)
- ✚ Balanza analítica (Explorer OHAUS)
- ✚ Agitador magnético (Biomega research products)
- ✚ Microscopio electrónico de barrido (JEOL)
- ✚ Calorímetro (TA Instrument Q20)
- ✚ Disolutor (Pharma AllianceGroup SRT-08Sx)

7.0 METODOLOGÍA



7.1 Elaboración de un diseño factorial 2^4

Se elaboró un diseño factorial con cuatro factores a dos niveles (+ alto y - bajo), utilizando el software statgraphics centurión XVI. II. Los factores que se emplearon en el estudio fueron X_1 = la concentración de fármaco (Atorvastatina 30, 15 mg), X_2 = la concentración de polímero (Chitosán 150, 6 mg), X_3 = el tipo de estabilizante (Brij 58, Pluronic F68) y X_4 = la concentración de estabilizante (519, 173 mg). En la Tabla 12. Se muestran las variables codificadas de cada uno de los factores.

Tabla 12. Matriz del diseño factorial con dos niveles y cuatro factores.

Experimentos	Atorvastatina (X ₁)	Chitosán (X ₂)	Estabilizante Brij 58, Pluronic F68 (X ₃)	Concentración de estabilizante (X ₄)
1	+	-	-	+
2	-	+	-	-
3	-	+	+	+
4	+	+	-	+
5	-	+	-	+
6	+	+	+	+
7	+	-	+	-
8	+	+	-	-
9	-	-	-	+
10	-	+	+	-
11	+	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	+	-
14	-	-	+	+
15	+	+	+	-
16	+	-	+	+

Las variables de respuesta fueron el tamaño de partícula promedio; Y₁ = tamaño promedio en nm, Y₂ = la morfología y Y₃ = potencial Z.

7.2 Preparación de los nanoplexos empleando el diseño factorial 2⁴

Siguiendo la combinación de niveles de la matriz del diseño, se prepararon 30 ml de una solución ácida, utilizando 15 ml de buffer de acetatos pH 5.3 (para que el chitosán, como la atorvastatina se encuentren en su forma ionizada), 10.5 ml de ácido acético y 4.5 ml de agua desionizada. Enseguida se agregó el chitosán a la solución preparada con anterioridad a las cantidades preestablecidas, dejando en agitación por 5 minutos. Posteriormente, a esta solución con chitosán se le agregó el estabilizante (Pluronic F 68 o Brij 58) y se le dejó en agitación por 5 minutos (solución A). Por otro lado, se preparó otra solución hidroalcohólica, disolviendo atorvastatina en 3 ml de metanol y dejando en agitación durante 2 minutos (solución B). La solución A se mantuvo bajo homogenización a 15000 rpm, para después agregar la solución B gota a gota, manteniéndola en homogenización durante 10 minutos. Los nanoplexos obtenidos se recuperaron por centrifugación a 15000 rpm por una hora, para finalmente ser liofilizados a -80°C.

7.3 Optimización de los nanoplexos

Mediante el menú de optimización por MSR en el software statgraphics centurión se determinaron los valores óptimos de los factores para poder obtener nanoplexos con un tamaño objetivo de 400 nm. Los nanoplexos, ya con los niveles óptimos, se prepararon utilizando 30 ml de una solución utilizando 15 ml de buffer de acetatos pH 5.3, 10.5 ml de ácido acético y 4.5 ml de agua desionizada. Después se agregaron 22 mg de chitosán a la solución preparada anteriormente dejando en agitación 5 minutos. Posteriormente, a esta solución con chitosán se le agregaron 195 mg de pluronic y se dejó en agitación por 5 minutos. Enseguida se preparó otra solución, disolviendo 22 mg de atorvastatina en 3 ml de metanol, dejando en agitación durante 2 minutos. Por último, se agregó la solución de atorvastatina a la solución de chitosán rápidamente bajo homogenización a 15000 rpm durante 10 minutos.

7.4 Caracterización física de los nanoplexos de Chitosán-Atorvastatina obtenidos mediante el diseño experimental

7.4.1 Determinación del tamaño y potencial Z

El tamaño de partícula y el potencial Z, se determinó mediante las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) y dispersión de luz electroforética (ELS), utilizando el equipo Zetasizer Nan-ZS90. Para la determinación de la talla se diluyeron 50 μ l de la suspensión de nanoplexos en una celda con 1000 μ l de agua desionizada, determinando el tamaño de partícula a una temperatura de 25 °C, con un total de 30 lecturas por muestra a 90° de inclinación y utilizando buffer de acetatos pH 5.3 como medio dispersante. Para la medición del potencial Z se siguió el mismo procedimiento, utilizando agua desionizada como dispersante y celdas para potencial Z a una temperatura de 25 °C.

7.4.2 Morfología

La morfología de los nanoplexos se determinó con el uso del microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-6700F. La preparación de las muestras se realizó colocando una gota pequeña de la suspensión de nanoplexos sobre un cubreobjetos. Posteriormente se dejó secar la muestra a temperatura ambiente.

7.5 Determinación de la longitud de onda de máxima de absorción de atorvastatina

Para la determinación del máximo de absorción de la atorvastatina se utilizó el espectrofotómetro UV/VIS Cary 60. Primeramente, se preparó una solución con 10 mg de atorvastatina aforados con 10 ml de metanol, siendo esta nuestra solución stock. De esta solución preparada se tomaron 5 ml y se aforaron con 25 ml de buffer para obtener una concentración de 200 µg/ml. Posteriormente se realizó un barrido en un rango de 200-600 nm utilizando la solución anterior. Para la determinación del máximo de absorción se realizó el barrido por triplicado.

7.6 Validación de métodos analíticos a pH 5.3, 1.2 y 6.8

El método a pH 5.3 fue empleado para la determinación de la eficiencia de complejación, mientras que los métodos a pH 1.2 y 6.8 para la cuantificación de atorvastatina en las pruebas de solubilidad y perfiles de disolución. En el estudio de validación se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño:

a) Linealidad

Se tomaron 5 matraces aforados de 10 ml y a partir de una solución stock preparada como se indica en el punto 7.5, tomando muestras para preparar las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml. Posteriormente se determinó su absorbancia en el espectrofotómetro UV/VIS. Este procedimiento se realizó por triplicado, determinando el r^2 , el ICm, ICb y el CV de las pendientes.

b) Exactitud-Veracidad

Este parámetro evaluó la exactitud utilizando tres concentraciones con tres réplicas de cada concentración en el punto bajo, medio y alto de la curva de calibración. Posteriormente se calculó la exactitud mediante el porcentaje de recobro de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Concentración calculada}}{\text{Concentración real}} \times 100$$

c) Repetibilidad

Se evaluó utilizando nueve determinaciones cubriendo el intervalo especificado para el procedimiento, es decir tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración. Las concentraciones empleadas fueron 5, 15 y 25 µg/ml. Al final se calculó el coeficiente de variación.

d) Límite de detección

1.- Se evaluó el límite de detección mediante la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. La determinación se realizó mediante a siguiente ecuación:

σ = Desviación estándar del intercepto

S = Pendiente

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

e) Límite de cuantificación

1.- Se evaluó el límite de detección mediante la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. La determinación se realizó mediante a siguiente ecuación:

σ = Desviación estándar del intercepto

S = Pendiente

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

7.7 Caracterización de los nanoplexos optimizados**7.7.1 Determinación de la eficiencia de complejación (%EC)**

Se emplearon métodos:

a) Con membranas de diálisis

Se colocaron seis bolsas de diálisis en vaso de precipitados con 100 ml de agua destilada, las cuales se dejaron sumergidas previamente durante 24 horas. Después, se les colocaron 2 ml de una suspensión de nanoplexos a concentración conocida. Posteriormente las bolsas con muestra fueron sumergidas en 30 ml de buffer de acetatos pH 5.3. Por último, se tomó una muestra del medio a diferentes tiempos hasta concentración constante, cuantificando por UV. Las determinaciones se obtuvieron por triplicado.

b) Por centrifugación

Las suspensiones de nanoplexos se centrifugaron a 11000 rpm durante una hora. Posteriormente se tomó una muestra del sobrenadante, la cual se leyó en el espectrofotómetro UV/VIS a 240 nm, obteniendo la absorbancia. Para hacer el cálculo de la concentración en ambos métodos se utilizó la ecuación 1.

Ecuación 1 **Eficiencia de complejación** = $\frac{M_i - M_n}{M_i} \times 100$

Donde M_i es la cantidad de atorvastatina añadida y M_n es la cantidad de atorvastatina no conjugada o libre determinada a partir de los métodos.

7.7.2 Determinación del rendimiento

El rendimiento de producción de nanoplexos se determinó mediante la ecuación 2, en el que la masa total de nanoplexo producido se refiere a la masa de nanoplexo recuperada después de la liofilización (M_n) y M_t es la cantidad de atorvastatina y chitosán añadidos.

Ecuación 2 **Rendimiento** = $\frac{M_n}{M_t} \times 100$

7.7.3 Obtención del patrón de difracción de Rayos X

El patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) fue determinado usando un difractómetro de rayos X Bruker Phaser D2. Se analizaron cuatro muestras en el estudio (atorvastatina, chitosán, mezcla física 1:1 atorvastatina-chitosán y nanoplexos), colocando una pequeña muestra de polvo sobre un patillo de silicio. Las muestras se analizaron en un rango de 5° a 60° (2θ), con un tamaño de paso de $0.02^\circ/s$.

7.7.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para evaluar el comportamiento térmico de los nanoplexos en comparación con la atorvastatina pura y el chitosán, se utilizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido, empleando un calorímetro TA instrument Q20. Se pesaron muestras individuales de 3.7 mg de atorvastatina pura, chitosán puro, mezcla física atorvastatina-chitosán y nanoplexos que se colocaron en recipientes de aluminio herméticos. Las muestras se analizaron a una velocidad de $10^\circ\text{C} / \text{min}$, en un rango de temperatura de $20\text{-}350^\circ\text{C}$.

7.7.5 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

Para investigar los cambios estructurales en los nanoplexos, se utilizó la técnica de espectroscopia infrarroja, empleando un espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet 6700 FT-IR. Se pesaron 10 mg de muestras individuales de atorvastatina, chitosán, mezcla física atorvastatina-chitosán y nanoplexos. Posteriormente se colocaron las muestras sobre la placa de diamante del equipo en un rango de número de onda 4000-525 cm^{-1} , con un promedio de 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

7.8 Estudios de eficacia *in vitro*

7.8.1 Determinación de la solubilidad en condiciones no sink

Para determinar la solubilidad en condiciones no sink se prepararon dos soluciones; una con 5 mg de atorvastatina en 5 ml de agua desionizada y otra con 5 mg de nanoplexos en 5 ml de agua desionizada. Posteriormente ambas soluciones se dejaron en agitación a 1000 rpm a 37 °C durante 2 horas. Concluido este tiempo se tomaron 3 ml de muestra de cada solución, los cuales se centrifugaron (5000 rpm durante 5 minutos) y filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 1 μm . Por último, se determinó la concentración mediante espectroscopia UV/VIS.

7.8.2 Disolución de polvos en condiciones sink

Se obtuvieron los perfiles de disolución durante 24 horas, empleando el aparato uno de la farmacopea (FEUM) y dos soluciones amortiguadoras; una de HCl pH 1.2 y otra de fosfatos pH 6.8. El medio de disolución se degasificó previamente durante 15 minutos. Posteriormente se montó el aparato de disolución a 37 °C y a 100 rpm con las muestras de atorvastatina pura y los nanoplexos, colocados directamente en las canastillas. También se evaluaron blancos de Chitosán y una mezcla física de Chitosán-atorvastatina. El volumen de medio fue de 900 ml. Por último, se tomaron muestras de 3 ml con un filtro de tamaño de poro de 0.45 μm a los 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 720, 1440 minutos, leyendo en el espectrofotómetro UV/VIS para determinar concentración y con ello obtener los perfiles de disolución.

7.9 Análisis estadístico

Para la optimización con diseños experimentales se utilizó la metodología de superficie de respuesta, encontrando significancia de efectos y del modelo cuando $P < 0.05$. Para el análisis bivariado se utilizó una prueba t-student para muestras independientes, considerando significancia estadística cuando $P < 0.05$. Para la validación de métodos se recurrió al análisis de regresión con análisis de varianza y estadística descriptiva con niveles de confianza al 95 %.

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Obtención y optimización de los nanoplexos

En esta prueba se utilizaron los diseños factoriales 2^k , ya que este tipo de diseños nos permiten estudiar el efecto principal primario de varios factores sobre una o varias variables de respuesta. En nuestro trabajo de investigación se elaboró un diseño factorial 2^4 , donde se estudió el efecto de la concentración de atorvastatina, chitosán, estabilizante y el tipo de estabilizante sobre la variable de respuesta de talla, con el propósito de obtener nanoplexos de tamaño entre 300-500 nm ($\bar{X} = 400$ nm). En la Tabla 13 se muestran los tamaños promedio obtenidos de las dieciséis corridas mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), la cual es una técnica no invasiva que nos permite medir el tamaño y distribución en la región micro y nanométrica. Como se puede observar las corridas experimentales donde se obtuvieron sistemas con un tamaño de partícula nanométrico cercano al tamaño esperado fueron la 1, 7, 9 y 12.

Tabla 13. Matriz de diseño factorial 2^4 con resultados de tamaño promedio.

Formulaciones	Atorvastatina (mg)	Chitosán (mg)	Estabilizante Brij 58, Pluronic F68	Concentración de estabilizante (mg)	Tamaño (nm)
1	30	6	Pluronic F 68	519	361.9
2	15	150	Pluronic F 68	173	1915.0
3	15	150	Brij 58	519	13.0
4	30	150	Pluronic F 68	519	1320.0
5	15	150	Pluronic F 68	519	2642.0
6	30	150	Brij 58	519	12.0
7	30	6	Brij 58	173	348.2
8	30	150	Pluronic F 68	173	1256.0
9	15	6	Pluronic F 68	519	804.8
10	15	150	Brij 58	173	2182.0
11	30	6	Pluronic F 68	173	2059.0
12	15	6	Pluronic F 68	173	806.0
13	15	6	Brij 58	173	309.9
14	15	6	Brij 58	519	8.4
15	30	150	Brij 58	173	1260.0
16	30	6	Brij 58	519	8.3

El diseño experimental permitió obtener, un rango de tamaños amplio en las zonas micro y nanométricas, lo que se considera adecuado, ya que se buscaba obtener partículas con un tamaño nanométrico. Por lo cual, a partir de estos de datos se procedió a realizar un análisis estadístico por metodología de superficie de respuesta, para poder obtener las condiciones experimentales (niveles óptimos de los factores) para generar nanopartículas con un tamaño objetivo de 400 nm.

Para la evaluación de los efectos principales de las variables independientes estudiadas se empleó el análisis de Pareto, el cual representa en forma decreciente el grado de importancia o peso que tienen los diferentes efectos de los factores en el proceso, operación o resultado. El objetivo de este análisis es el poder identificar los factores más importantes o significativos. En la figura 20 podemos ver que tanto el tipo de estabilizante como la concentración de chitosán tienen un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, es decir, estos son los dos factores más importantes del estudio que impactan de manera directa en el valor de talla promedio, ya que rebasan la línea de significancia con $P < 0.05$. También podemos apreciar que el cambio de un nivel bajo a uno alto de la concentración de atorvastatina, el tipo estabilizante y la concentración de estabilizante, tienen un efecto negativo en el valor de talla, es decir, la reducen, mientras que la concentración de chitosán tiene un efecto positivo (la talla promedio aumenta con la cantidad de chitosán).

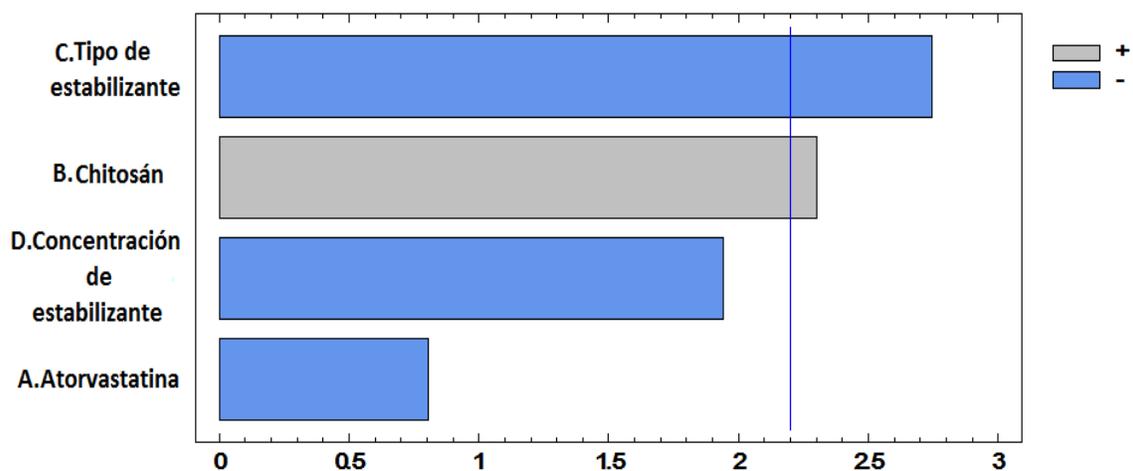


Figura 20. Diagrama de efectos de Pareto para el tamaño promedio.

En el caso del polímero, se aprecia que, a menor concentración de chitosán, el tamaño de partícula disminuye y a mayor concentración el tamaño aumenta, este comportamiento en la reducción del tamaño de partícula se debe principalmente a que se reduce la cantidad de grupos amonio (NH_3^+) presentes en el chitosán que pueden interactuar con los iones carboxilatos (COO^-) de la atorvastatina, por lo cual el tamaño de los nanoplexos tiende a ser menor, que al tener una mayor concentración de chitosán, pues al contar con una mayor cantidad de grupos amonio (NH_3^+) habrá una mayor interacción con los iones carboxilatos de la atorvastatina generando un aumento en el tamaño de los nanoplexos.

Respecto a la cantidad de fármaco, aunque no tiene un efecto estadísticamente significativo, se observó que la concentración de atorvastatina no influye en el tamaño promedio de los nanoplexos, es decir que se pueden obtener nanoplexos del tamaño de 400 nm utilizando altas y bajas concentraciones. Esto puede deberse a que la atorvastatina solo presenta dos ácidos carboxílicos en su estructura, mientras que el chitosán presenta un alto número de grupos amino libres en sus cadenas poliméricas, por lo cual la cantidad de atorvastatina no influye en el tamaño de los nanoplexos.

En cuanto al tipo de tensoactivo, aunque ambos son no-iónicos, se encontró que con el Pluronic F 68 el tamaño de partícula era menor que al utilizar el Brij 58, lo cual puede deberse a que Pluronic F 68 tiene un HLB de 29, el cual es mayor que el del Brij 58 que tiene un HLB de 16, lo cual puede explicarse por un efecto solubilizante sobre la atorvastatina que genera menos interacciones con el polímero [57]. El equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB) de un tensoactivo es una medida del grado en el que es hidrófilo o lipófilo. Un tensoactivo considerado lipófilo presenta un valor bajo de HLB de entre 1-8, mientras que los hidrófilos presentan un HLB alto de 9-18. El sistema HLB es muy útil para distinguir los tensoactivos según sus aplicaciones. En la Figura 21 se muestran las aplicaciones de los tensoactivos de acuerdo a su grado de HLB, como podemos observar el Pluronic F 68 debido a su alto valor de HLB (> 24) tiene una función más como agente solubilizante, mientras que el Brij 58 debido a su valor de HLB (16) tiene una función más como emulsionante o/w, por lo cual este puede ser el motivo de que el tamaño de partícula sea menor al utilizar el Pluronic F 68 [57].

Por otro lado, y aun cuando no es estadísticamente significativa, también se observó que a mayor concentración de estabilizante el tamaño de partícula disminuía, lo cual se debe a que los tensoactivos tienen la función de reducir la tensión superficial entre dos fases. Los tensoactivos no iónicos se conocen como anfifílicos, debido a que presentan en su estructura un extremo hidrofílico que es soluble en agua y un extremo hidrófobo, que es insoluble en agua. El grupo hidrófilo tiene un efecto solubilizante y tiende a llevar a la molécula a disolución completa, en cambio el grupo hidrófobo, tiende a contrarrestar la tendencia del otro. Cuando se logra el equilibrio entre ambos grupos el tensoactivo tiende a concentrarse en la interfase, donde los grupos hidrófilos se orientan hacia la fase acuosa y los hidrófobos hacia la no acuosa. Por lo cual, al agregar una alta concentración de Pluronic F 68 a la solución de nanoplexos, ocasionó que las moléculas lipofílicas de la atorvastatina no interaccionaran completamente con las moléculas del Chitosán, generando nanoplexos de un menor tamaño.

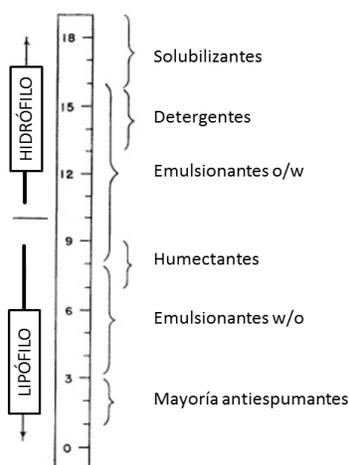
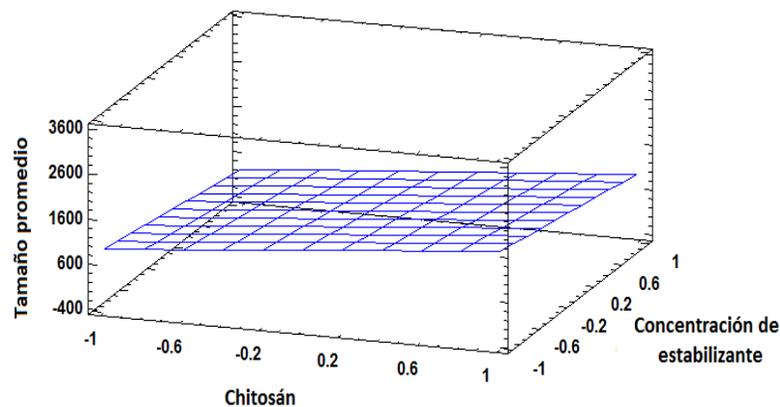


Figura 21. Uso de los tensoactivos según el equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB).

8.1.1 Optimización de los nanoplexos con MSR.

Aunque el tipo de estabilizante fue el factor más significativo, al ser un factor categórico, se decidió mantener constante al estabilizante (Pluronic F-68). Por lo cual se eligieron los siguientes dos factores en importancia, la concentración de chitosán y de estabilizante, los cuales se muestran en la figura 22 de superficie de respuesta.

Como podemos observar los valores de tamaño promedio más bajos, se encuentran cuando tenemos una baja concentración de chitosán y una alta concentración de estabilizante, lo cual se debe a lo mencionado anteriormente.



$$\text{Talla} = 956.661 - 128.486 \cdot \text{Atorvastatina} + 368.348 \cdot \text{Chitosan} - 438.927 \cdot \text{Estabilizante} - 310.352 \cdot \text{Conc Estab} \quad r^2 = 61.06 \%$$

Figura 22. Superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio.

En la figura 23 se muestra el gráfico de contorno de superficie de repuesta, donde se pueden apreciar las zonas de superficie que estiman tamaños de nanoplexos en diferentes rangos. Como el objetivo es encontrar un tamaño de 400 nm (zona rosa), entonces podemos utilizar altas concentraciones de estabilizante (Pluronic F68), pero con bajas concentraciones de chitosán, por la interacción de cargas.

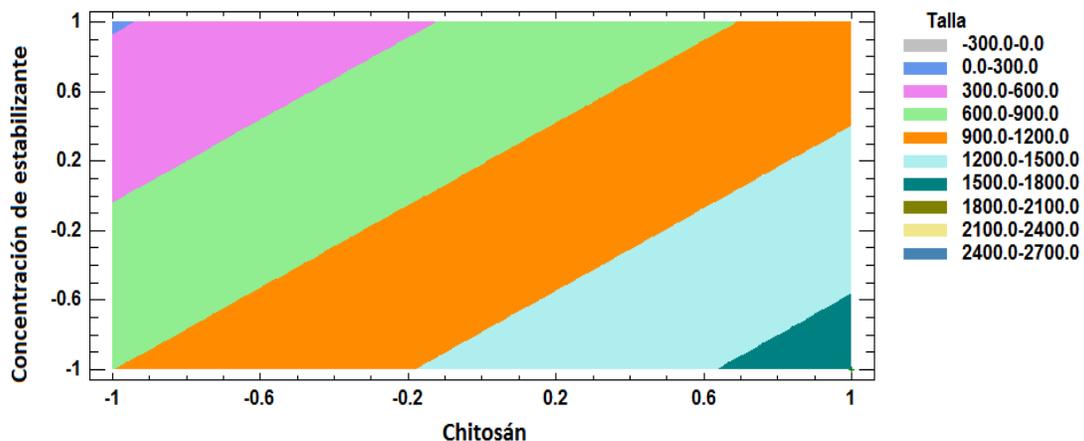


Figura 23. Contornos de la superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio.

La tabla 14 se muestran los niveles estimados óptimos de cada uno de los factores que optimizan la respuesta a una talla de 400 nm; 22 mg de atorvastatina, 22 mg de Chitosán y Pluronic F68 al 0.65%. Estas condiciones fueron ejecutadas por triplicado para verificar la predicción del modelo, obteniendo los valores de tamaño promedio experimentales, los valores se muestran en la tabla 14 y figura 24.

Tabla 14. Niveles optimizados y verificación del método.

Factor	Niveles		Óptimos		Respuesta		Error de la predicción
	Bajo	Alto	Valor codificado	Valor natural	Estimada	Observada	
Estabilizante X1	-1	1	~1	Pluronic	400 nm	431 ± 12 nm	7.8 %
Chitosán X2	-1	1	-0.70	22 mg			
Concentración de estabilizante X3	-1	1	0.32	0.65 %			
Atorvastatina X4	-1	1	-0.03	22 mg			

8.2 Caracterización física de los nanoplexos obtenidos bajo condiciones óptimas

8.2.1 Verificación de la talla estimada en el modelo

En la siguiente gráfica se muestra la talla promedio de los nanoplexos obtenidos bajo condiciones óptimas, empleando nuevamente la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Como se puede observar los nanoplexos presentaron un tamaño aproximado de 421.1 nm, semejante al que se había predicho en el modelo estadístico. También se observaron otras dos pequeñas poblaciones de partículas, unas cercanas a 100 nm y otras de aproximadamente 8000 nm. Al inicio de este estudio se planteó obtener nanoplexos de atorvastatina con un tamaño de 400 nm, con el objetivo de mejorar la disolución de la atorvastatina mediante la reducción del tamaño de partícula, lo cual se logró, ya que el tamaño promedio de la atorvastatina pura era de 50 μ m, es decir que se logró reducir su tamaño por debajo de los 400 nm.

Como ya sabemos, la solubilidad es uno de los parámetros más importantes para lograr la concentración deseada de fármaco en la circulación sistémica y obtener la respuesta farmacológica deseada, la cual está intrínsecamente relacionada con el tamaño de partícula; a medida que una partícula se hace más pequeña aumenta la relación superficie / volumen, lo que permite un aumento en el área superficial, que da paso a una mayor interacción entre la partícula y el disolvente, favoreciendo la humectación y aumentando de esta manera la velocidad de disolución [58].

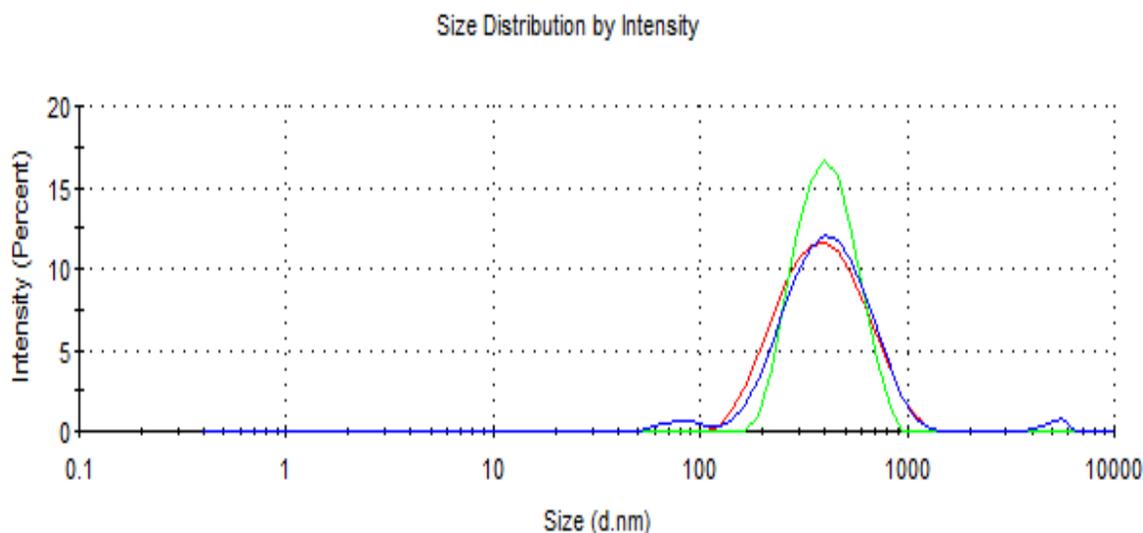


Figura 24. Tamaño promedio de los nanoplexos bajo condiciones óptimas.

8.2.2 Potencial Zeta

En la figura 25 se muestran los valores obtenidos de potencial zeta de los nanoplexos bajo condiciones óptimas. Como ya sabemos el potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad. Como se puede observar los nanoplexos de atorvastatina presentaron un potencial zeta de 36.3 ± 1.0 mV, con una buena calidad en la lectura. Este valor alto de potencial zeta nos dice que los nanoplexos de atorvastatina presentan una buena estabilidad en la suspensión, por lo que resistirán a la agregación, pues si los valores son menores a ± 30.0 mV, las nanopartículas tienden a atraerse, formando flóculos en lugar de una dispersión.

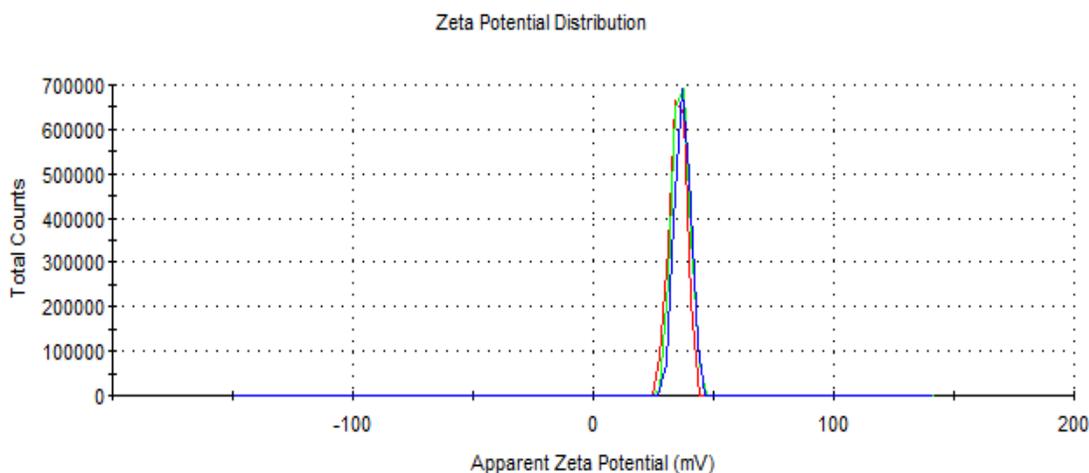


Figura 25. Potencial Zeta de los nanoplexos bajo condiciones óptimas.

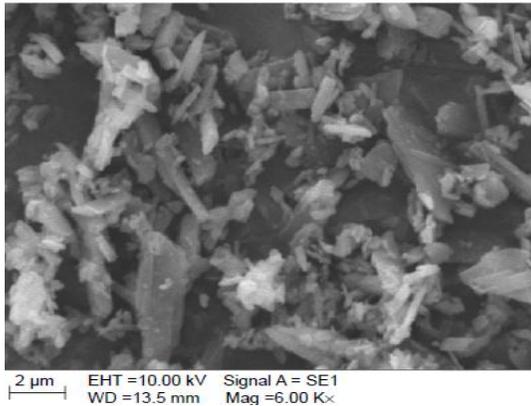
Por lo tanto, las suspensiones coloidales con un valor alto de potencial zeta tenderán a estabilizarse eléctricamente, mientras que las soluciones coloidales con bajos valores de potencial zeta formarán agregados o flóculos, mismos que serían indeseables para una formulación estable y segura, ya que estos nanoplexos pueden ser administrados por la vía inyectable. [59].

8.2.3 Morfología

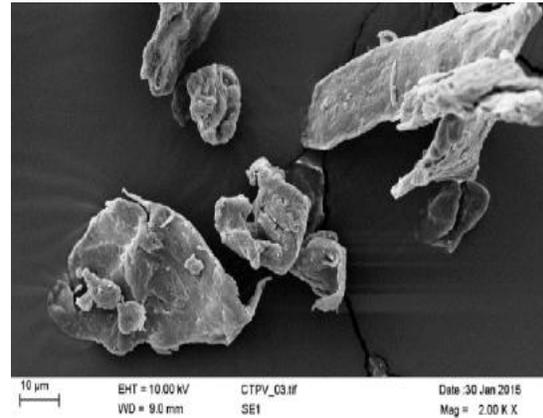
En la Figura 26 se muestran las micrográficas de la atorvastatina, del quitosán y la de los nanoplexos de atorvastatina obtenida mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual es una técnica que nos permite producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra mediante la interacción electrón-materia, ya que esta técnica emplea un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.

Como se puede observar en la imagen la atorvastatina presenta partículas en forma de aguja y de forma irregular con un tamaño promedio de 50 μm , lo que coincide con los estudios de rayos x mostrados más adelante, evidenciado que la atorvastatina usada en este estudio presenta una forma amorfa. En cuanto al quitosán, se muestra una superficie rugosa y con forma de poliedro irregular con un tamaño de 10 μm . En la figura 26-C, se pueden observar los nanoplexos como nanoestructuras esféricas y solidas en comparación con la forma de la atorvastatina y del quitosán puros.

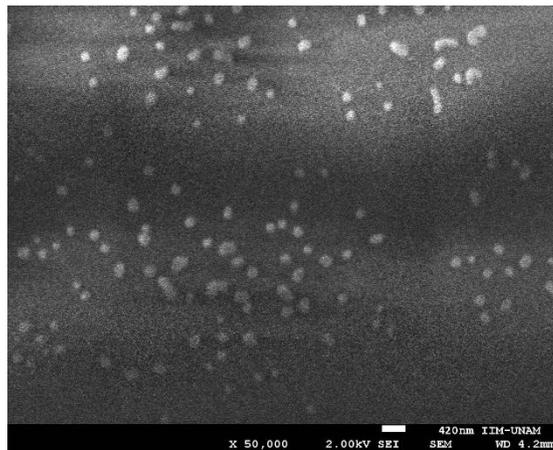
Esta técnica de microscopía electrónica nos confirmó que el tamaño de los nanoplexos se encuentra alrededor de los 400 nm, tal como se encontró mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS).



A) Atorvastatina.



B) Chitosán.



C) Nanoplexos de atorvastatina.

Figura 26. Micrografías de A) Atorvastatina, B) Chitosán y C) Nanoplexos, por microscopía electrónica de barrido (SEM).

8.2.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la figura 27 se muestran los termogramas de la atorvastatina, del chitosán, de la mezcla física atorvastatina / chitosán 1:1 y de los nanoplexos de atorvastatina, obtenidos mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido. Esta técnica nos permite determinar las características de los materiales con base a la cantidad de calor que absorben o liberan cuando son calentados o enfriados a velocidad constante en un determinado intervalo de temperaturas. Las principales aplicaciones de esta técnica son, la medida de la capacidad calorífica aparente, la determinación de temperaturas de transformación o transición (transición vítrea, transformaciones polimórficas, fusión, ebullición, sublimación, descomposición), estabilidad térmica y cinética de cristalización de materiales.

En este estudio la DSC se utilizó para poder determinar las transiciones endotérmicas y exotérmicas de la atorvastatina y del chitosán, así como los cambios que ocurren en la formación de los nanoplexos al interaccionar ambas materias primas. Como se puede observar la atorvastatina presentó un pico endotérmico amplio en un rango de temperatura de 40 a 120 °C debido a la pérdida de agua, seguido de una transición vítrea (T_g) en el rango de temperatura de 145-149 °C. Se observó también un pico endotérmico a 235 °C correspondiente a la descomposición de la atorvastatina [60]. En el caso del chitosán este presentó dos picos, uno endotérmico a 96.94 °C correspondiente a la pérdida de agua de los grupos amino ($-NH_2$) e hidróxido ($-OH$) contenida en la cadena principal del polímero y un pico exotérmico a 304.90 °C correspondiente a la descomposición de los grupos amino ($-NH_2$) [61]. En la mezcla física se observaron las mismas señales de la atorvastatina y el chitosán, lo cual nos dice que tanto a atorvastatina como el chitosán no interaccionaron al mezclarse físicamente. En cuanto a los nanoplexos de atorvastatina se puede observar un pico endotérmico a 80 °C debido a la pérdida de agua, seguido de una transición vítrea (T_g) a 120 °C correspondiente a la atorvastatina. Como sabemos la transición vítrea (T_g) de la atorvastatina se encuentra entre 145-149 °C, pero en los nanoplexos se encuentra a 120 °C, este cambio en la transición vítrea (T_g) nos confirma la interacción electrostática entre la atorvastatina y el chitosán, ya que la interacción entre ambos genera nanopartículas con una estructura más amorfa a la que ya presentan. También se puede observar un pico endotérmico a 230 °C correspondiente a la descomposición de la atorvastatina, seguido de un pico exotérmico a 270 °C debido a la descomposición del chitosán.

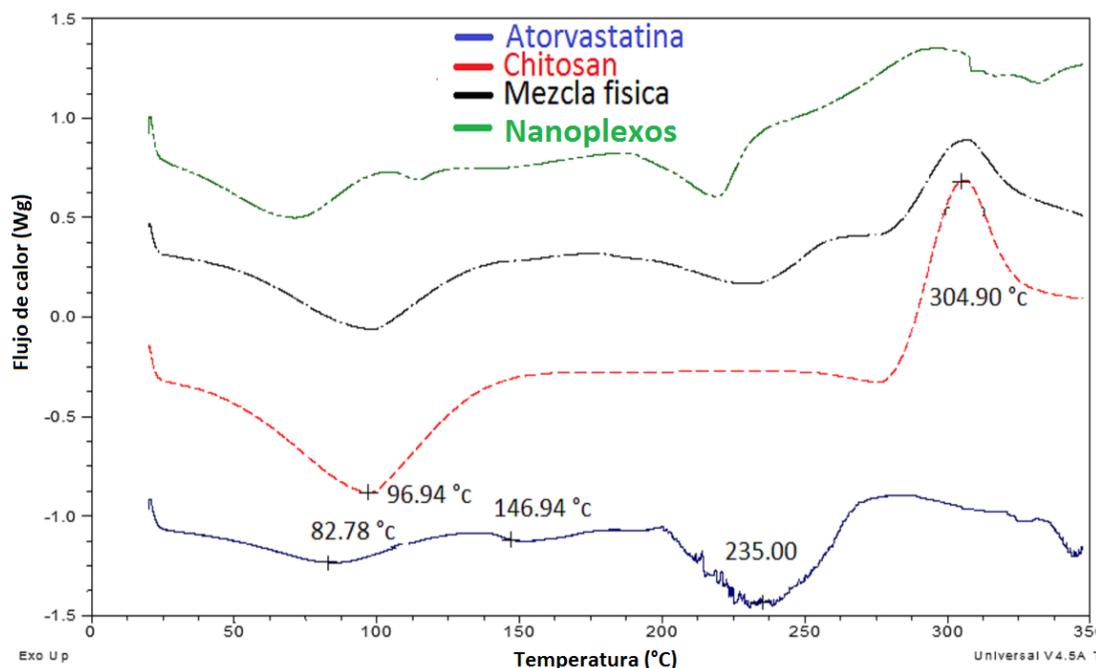


Figura 27. Termogramas de DSC de atorvastatina, Chitosán, mezcla física atorvastatina-Chitosán y nanoplexos.

8.2.5 Difracción de Rayos-X de polvos

En la figura 28 se muestran los patrones de difracción de rayos X de la atorvastatina, del chitosán, de la mezcla física atorvastatina/chitosán 1:1 y de los nanoplexos de atorvastatina. La difracción de rayos x (DRX) es una técnica que a través de un difractograma nos permite determinar la estructura cristalina y la composición de un nuevo compuesto, es decir, nos permite conocer la posición que ocupan los átomos, iones, o moléculas que lo conforman e inclusive determinar los tamaños de partículas de estos. En nuestro estudio esta técnica se utilizó para determinar si la atorvastatina y el chitosán presentaban una forma amorfa o cristalina y si la formación de los nanoplexos de atorvastatina mediante la interacción de ambos compuestos presentaría un cambio en su arreglo cristalino. Como se puede observar tanto la atorvastatina como el chitosán presentan picos difusos amplios a $2\theta \approx 20^\circ$ lo cual nos dice que ambos polvos presentan una forma amorfa ya que su patrón de difracción de rayos x no presenta picos agudos característicos de las formas cristalinas. En cuanto a los nanoplexos de atorvastatina no se observaron grandes cambios en su patrón de difracción, se observaron picos anchos y poco definidos a $2\theta \approx 19^\circ$ muy similares a los observados en los patrones de difracción de la atorvastatina y del chitosán puros.

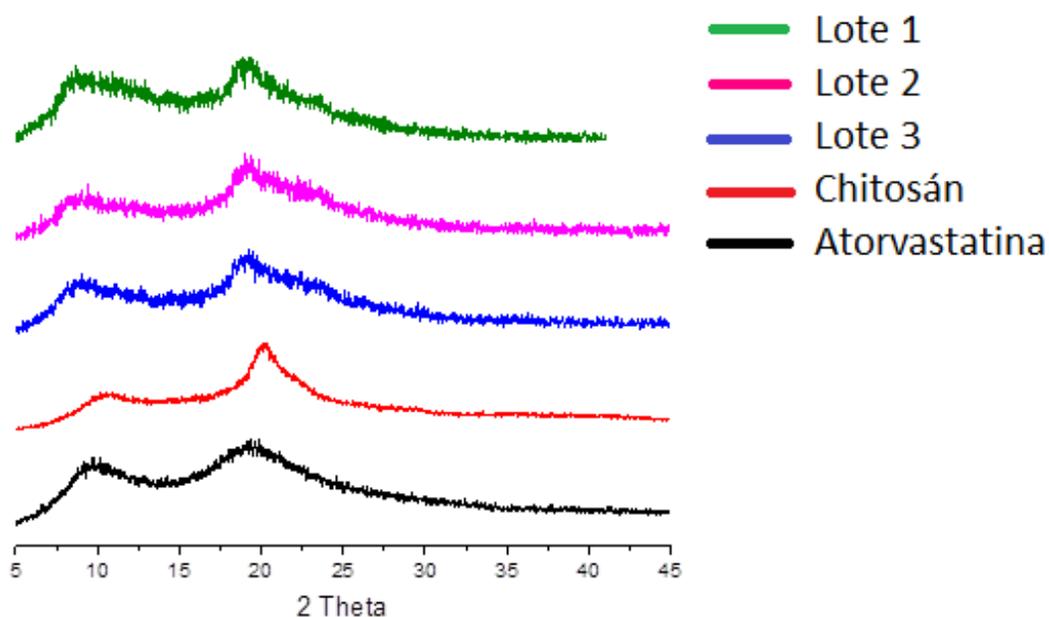


Figura 28. Patrón de difracción de Rayos x (DRX).

Por lo tanto, la interacción electrostática entre la atorvastatina y el chitosán genera nanoplexos con una estructura amorfa. La forma amorfa de los nanoplexos se debe a la fuerte y rápida interacción electrostática entre la atorvastatina y el chitosán que evita que las moléculas de atorvastatina formen estructuras cristalinas ordenadas al precipitar. El que los nanoplexos presenten una estructura amorfa nos dice que estos tendrán una buena solubilidad, ya que se sabe que las formas amorfas son más solubles que las formas cristalinas. Esto se debe a que la cantidad de energía en el proceso de disolución-solubilidad, que se necesita para llevar una molécula desde una sustancia en estado cristalino sólido al disuelto, es mayor a la energía que se necesita para arrancar una molécula que se encuentra en estado amorfo.

8.2.5 Espectroscopia infrarrojo (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica que nos permite identificar moléculas a través de las características vibracionales de sus enlaces químicos. Cada enlace químico vibra a una frecuencia característica, la cual se encuentra dentro del intervalo de la radiación infrarroja. En este estudio se empleó espectroscopia infrarroja (FTIR) para determinar los grupos funcionales de la atorvastatina y del chitosán, así como los cambios que ocurren en los nanoplexos al interaccionar ambas materias primas. En la figura 29 se muestra el espectro de infrarrojo de la atorvastatina, del chitosán, de la mezcla física atorvastatina / chitosán 1:1 y de los nanoplexos de atorvastatina.

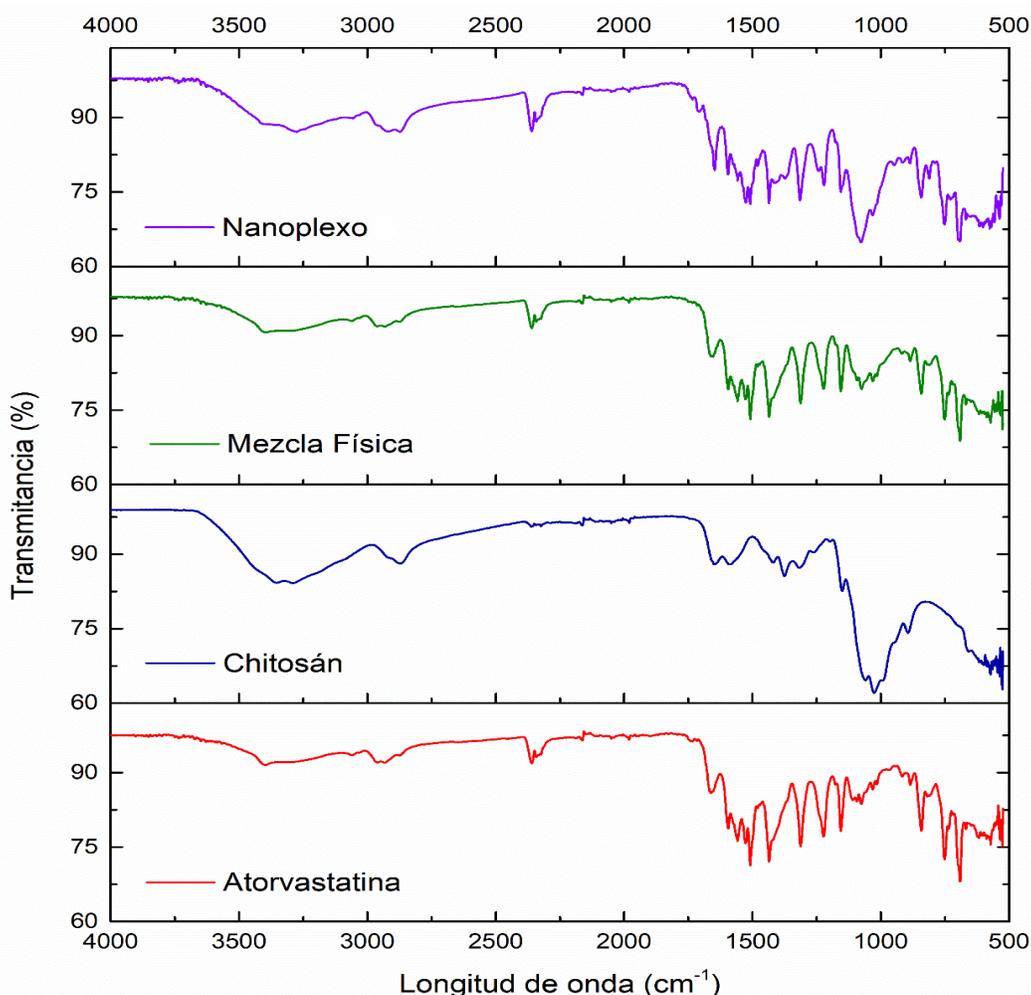


Figura 29. Espectro de FT-IR de atorvastatina, chitosan, mezcla física y nanoplexos

Como podemos observar la atorvastatina mostró bandas características a 3360 cm^{-1} (estiramiento O-H), 3375 cm^{-1} (estiramiento N-H), 3250 y 3050 cm^{-1} (estiramiento asimétrico y simétrico O-H), $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento C-H), 1657 y 1590 cm^{-1} (estiramiento C=O asimétrico y simétrico), 1521 y 1443 cm^{-1} (estiramiento C-C), 1326 cm^{-1} (deformación -CH₃ y -CH₂), 1228 cm^{-1} (estiramiento C-N), 1170 cm^{-1} (estiramiento C-O), 1121 y 1063 cm^{-1} (flexión en el plano C-H aromático), 848 , 819 y 750 cm^{-1} (flexión fuera del plano C-H aromático) y 692 , 633 y 594 cm^{-1} (flexión por deformación C-H). En el caso del chitosán se aprecian bandas entre $3250\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ (O – H y N – H) característicos de alcoholes, aminas y amidas presentes en la estructura del sólido desacetilado. Se observan también bandas a 2842 cm^{-1} (estiramiento C – H), $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ (estiramientos C = O y N = H) característicos de grupos amida, 1645 cm^{-1} y 1432 cm^{-1} (C = O) presente en un grupo amida (I) y un grupo amida (II), 1367 cm^{-1} (estiramiento C – H) presente en el grupo acetamida (R-NHCOCH₃) residual, que está allí debido a la desacetilación incompleta de la quitina, o debido a grupos O-H unidos a los anillos. La banda observada a 1081 cm^{-1} se debe a la presencia del grupo piranósico. En cuanto a la mezcla física atorvastatina / chitosán 1:1, se observan los mismos picos correspondientes a la atorvastatina, lo cual indica que la atorvastatina y el chitosán no interactúan en una mezcla física. Con respecto a los nanoplexos se encontró que tanto la atorvastatina como el chitosán interactuaron físicamente ya que se observaron bandas características de ambas materias primas en los nanoplexos, sin que se produjeran cambios químicos.

8.6 Desarrollo de la metodología analítica

8.6.1 Determinación del pico máximo de absorción de atorvastatina

La Figura 30 muestra el espectro de absorción de la atorvastatina, que consiste en una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida a diferentes valores de longitud de onda (λ), que en este estudio se realizó de $200 - 600\text{ nm}$.

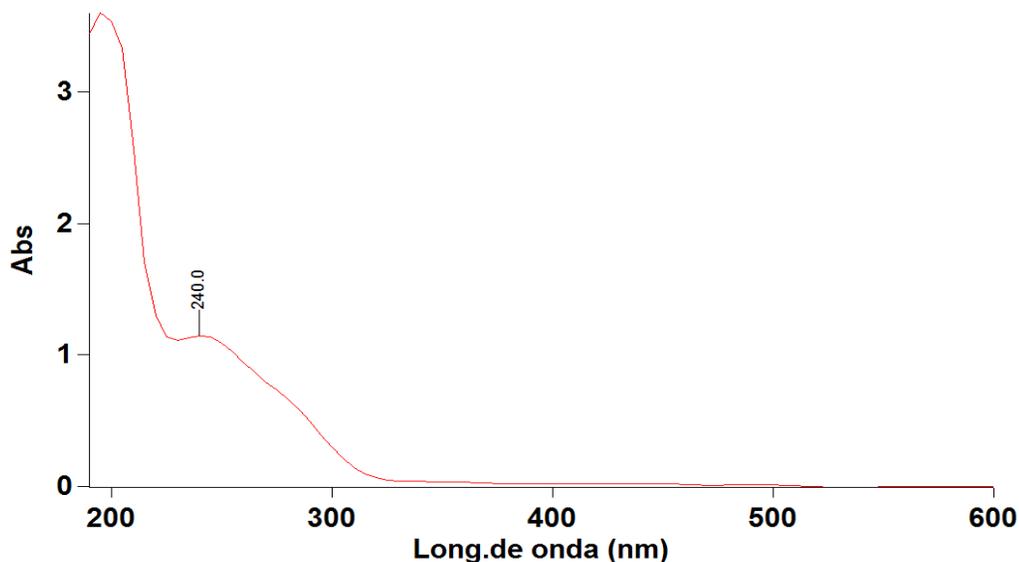


Figura 30. Espectro de absorción de la atorvastatina en el rango de 200-600 nm.

Como podemos observar la atorvastatina tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 240 nm, que concuerda con lo reportado por varios autores en sus trabajos de investigación. A partir de esta longitud de onda se realizó la validación de los métodos analíticos, verificando también su identidad [62].

8.3.2 Validación de métodos analíticos a pH 5.3, 1.2 y 6.8

Se desarrollaron tres métodos, uno a pH 5.3 para evaluar la eficiencia de complejación, y dos a pH's 1.2 y 6.8 para cuantificar atorvastatina en las pruebas de solubilidad y perfiles de disolución. La validación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la FEUM 11va edición volumen II y la ICH Q2 (R1). Se evaluaron los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. Para evaluar la linealidad método se realizó el análisis de regresión calculando el C.V % (ver Tabla 15), el coeficiente de determinación (r^2) y los intervalos de confianza a 95 % para las constantes del modelo lineal. El valor de r^2 nos indica la bondad de ajuste del modelo a los datos.

Tabla 15. Parámetros para la validación del método analítico a pH 5.3, 1.2 y 6.8.

Parámetro de desempeño	Criterio	Resultado		
		pH 5.3	pH 1.2	pH 6.8
Linealidad	$CV_m \leq 2\%$	1.14 %	1.95 %	1.45 %
	IC_m , no debe incluir el cero	0.033 a 0.034	0.030 a 0.031	0.033 a 0.034
	IC_b , debe incluir el cero	-0.011 a 0.002	-0.017 a 0.0003	-0.004 a 0.010
	$r \leq 0.99$	0.9997	0.9996	0.9997
	$r^2 \geq 0.99$	0.9995	0.9992	0.9995
Repetibilidad	$CV_{abs} \leq 2\%$	1.49 %	1.87 %	1.59 %
Exactitud	$CV_{recobro} \leq 2\%$	1.18 %	0.26 %	0.83 %
	$IC_{recobro}$, debe incluir el 100%	98.50-100.13 %	99.78-100.1 %	99.2-100.3 %
Límite de detección	No aplica	0.3073 $\mu\text{g/ml}$	0.4426 $\mu\text{g/ml}$	0.3471 $\mu\text{g/ml}$
Límite de cuantificación	No aplica	0.9314 $\mu\text{g/ml}$	1.3413 $\mu\text{g/ml}$	1.0520 $\mu\text{g/ml}$

Como se puede observar en la tabla 15, los métodos analíticos cumplen con los criterios establecidos en las guías de validación, por lo que se consideran confiables para su uso previsto, siendo lineales, exactos y repetibles.

8.7 Eficiencia de complejación (EC)

En la Tabla 16 se muestra la eficiencia de encapsulación de los nanoplexos de atorvastatina optimizados, con los dos métodos empleados: 1. Empleando membranas de diálisis y 2. Por centrifugación y cuantificación en sobrenadante.

Tabla 16. Valores de eficiencia de complejación.

Método 1 Membranas de diálisis	Método 2 Centrifugación
85.29 \pm 0.60 %	89.80 \pm 0.39 %

Como podemos ver la eficiencia de complejación promedio para una relación atorvastatina / chitosán 1:1 se encuentra en concordancia con las bibliografías consultadas donde se obtienen eficiencias de encapsulación promedio que van desde 85 - 95 %, reportadas para nanoplexos de ibuprofeno [63]. Este valor de eficiencia de encapsulación es satisfactorio, ya que la mayoría de atorvastatina está siendo encapsulada en los nanoplexos. Respecto a estos valores de EC, podemos decir que se deben primeramente a la concentración de ácido acético usada (0.1 %), lo cual ocasiona que una mayor cantidad de grupos amino (NH_2) en el chitosán estén protonados (NH_3^+), debido a que el pH del medio se vuelve más ácido.

Otro factor importante es la cantidad de chitosán, ya que al tener una relación 1:1 con la atorvastatina se asegura que la mayoría de los iones carboxilato (COO^-) de la atorvastatina en la solución interaccionen con los grupos amino protonados (NH_3^+) del chitosán, lo cual se debe a que el chitosán presenta un alto número de grupos amino libres en sus cadenas poliméricas, mientras que la atorvastatina únicamente presenta un ácido carboxílico por molécula. Con base a lo anterior, se puede sugerir que un exceso de chitosán no es necesario para obtener un alto porcentaje de eficiencia de complejación de atorvastatina.

Otro de los factores que influyeron en los altos valores de eficiencia de encapsulación, fueron las interacciones hidrofóbicas, las cuales se originan cuando una molécula no es capaz de interaccionar con las moléculas de agua. Por lo cual, la concentración de atorvastatina empleada en la elaboración de nanoplexos, fue la adecuada para permitir que las moléculas de atorvastatina interaccionaran entre sí por interacciones hidrofóbicas, debido a la cercanía que existía entre ellas, generando una alta eficiencia de encapsulación [40]. Las diferencias mostradas en los métodos ($P < 0.05$) se pueden asociar a que en el método por membrana de diálisis existe un t_{lag} en el paso del fármaco a través de la membrana y hacia el medio de disolución.

8.8 Rendimiento en la elaboración de los nanoplexos

Por medio del análisis de tres lotes de nanoplexos se obtuvieron los valores de rendimiento después del proceso de elaboración de estos. El rendimiento obtenido para una relación atorvastatina / chitosán 1:1 fue de 66 ± 1.2 %, el cual difiere con otros reportados por Wean Sin Cheow y Kunn Hadinoto, quienes encontraron para una relación fármaco / polímero 1:1, un rendimiento de 90 %.

Este resultado puede explicarse con base en nuestro proceso de elaboración donde se tuvo un efecto solubilizante por parte del tensoactivo, y las operaciones realizadas durante la manufactura, pues en varias etapas se pudo apreciar pérdidas en la recuperación.

8.9 Solubilidad de polvos en condiciones “no sink”

En la figura 31 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de solubilidad teniendo un medio en condiciones no sink. Como podemos observar en la gráfica la atorvastatina presentó una solubilidad de 27.04 $\mu\text{g/ml}$, mientras que los nanoplexos de atorvastatina presentaron una solubilidad de 137.18 $\mu\text{g/ml}$, es decir una solubilidad cinco veces mayor a la de la atorvastatina en su estado puro.

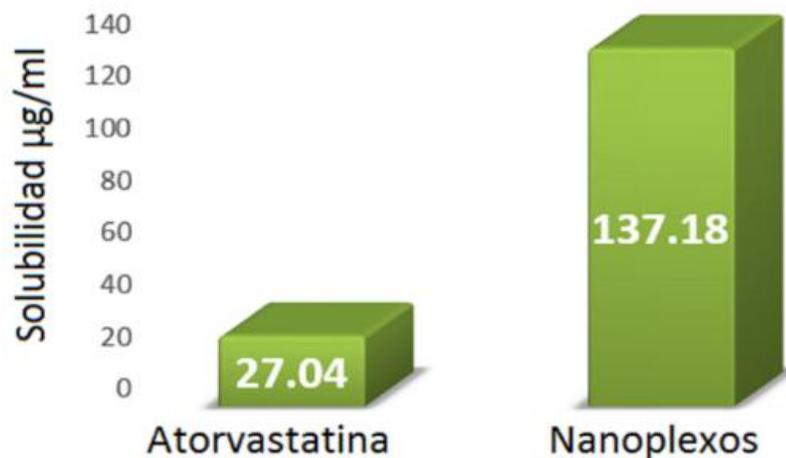


Figura 31. Solubilidad pura de atorvastatina y los nanoplexos en condiciones no sink.

Este incremento en el valor de la solubilidad podría explicarse por un fenómeno en el que el chitosán inhiba la precipitación de atorvastatina en el equilibrio, este fenómeno lo han descrito algunos autores como efecto resorte-paracaídas, el cual consiste en mantener un estado de saturación en el medio mediante el uso de inhibidores de la precipitación como lo son algunos polímeros. Generalmente un fármaco en una solución supersaturada es termodinámicamente inestable y tiende a regresar a su estado de equilibrio a través de la cristalización y precipitación del fármaco (nucleación y crecimiento cristalino). El mecanismo por el cual los polímeros inhiben la precipitación es mediante la interrupción de la nucleación y mediante su adsorción sobre la superficie de los cristales para bloquear el acceso de las moléculas de soluto, evitando o retardando el crecimiento de los cristales. Otro factor importante que aumentó la solubilidad fue el estado amorfo que presentaban los nanoplexos ya que las formas amorfas son más solubles [64].

8.10 Perfiles de disolución a pH 1.2 y 6.8

En la figura 32 podemos observar los perfiles de disolución de la atorvastatina pura y la de los nanoplexos en condiciones "sink". Esta prueba se realizó para poder determinar el mecanismo de liberación de la atorvastatina a partir de los nanoplexos. Para un pH 1.2, podemos observar que la atorvastatina pura se disolvió cerca de un 87 % de fármaco en 24 horas, mientras que en los nanoplexos se disolvió cerca del 75 % de fármaco en 24 horas, con perfiles de disolución similares y una disolución lenta, lo cual puede explicarse debido a que la atorvastatina presenta una baja solubilidad en medios con un pH ácido, provocando una disociación lenta con el chitosán, haciendo resistente a la partícula en medio gástrico.

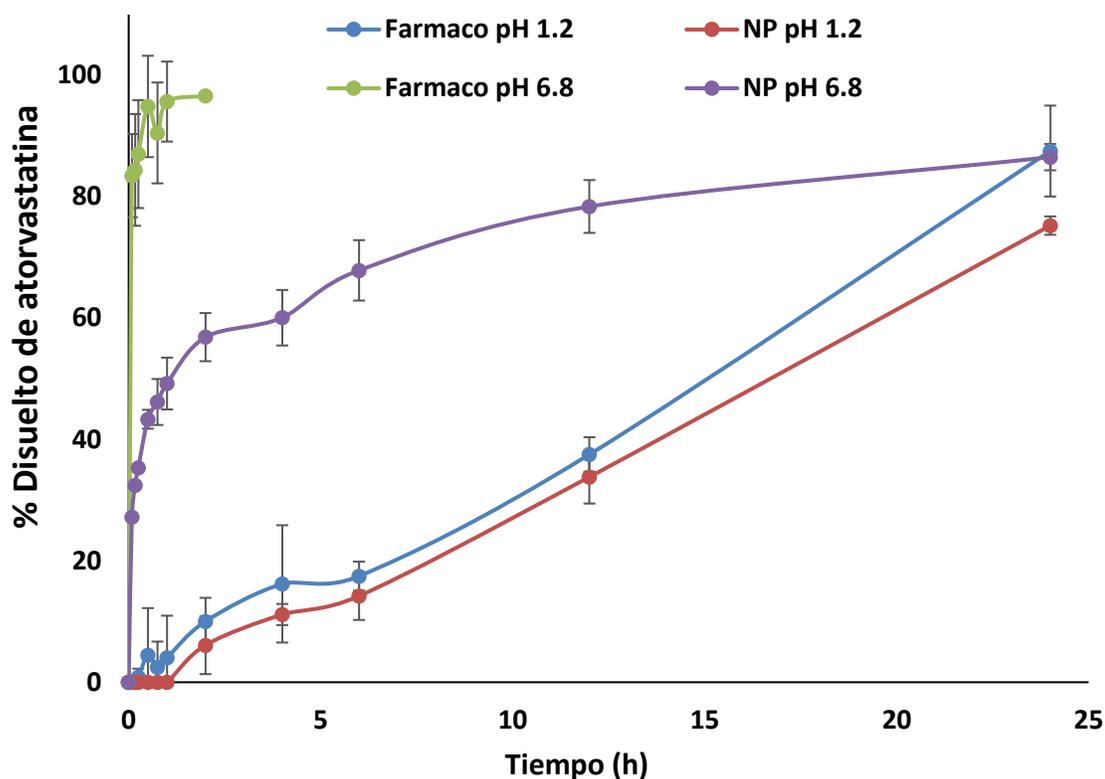


Figura 32. Perfiles de liberación de atorvastatina en nanoplexos, a pH 1.2 y 6.8.

Por otro lado, los perfiles de disolución a pH 6.8 presentan otro comportamiento, la atorvastatina se disolvió al 100 % en los primeros 30 minutos, lo cual se debe a que la atorvastatina es más soluble en pH's más altos (pues tiene un pka de 4.46). Sin embargo, en los nanoplexos la atorvastatina alcanzó un 86 % a las 24 horas de prueba, sugiriendo una liberación de manera controlada, es decir, el fármaco se va liberando de las cadenas poliméricas por disociación más lenta, también debido a que el polímero es menos soluble a este pH, creando una matriz que libera lentamente el fármaco. Ese tipo de liberación eliminaría o disminuiría los efectos secundarios, ya que reduciría la administración de dosis simultáneas de fármaco durante el día, administrándose una única dosis, considerando además que el quitosán presenta también propiedades mucoadhesivas. Esto ocasionaría que los niveles de fármaco en el organismo permanezcan estables durante el día, por lo menos durante 24 h.

9.0 CONCLUSIONES

Con base en todos los resultados de las pruebas realizadas anteriormente, hemos determinado que es posible obtener nanoplexos con atorvastatina empleando un biopolímero catiónico (chitosán), a través del método de nanoprecipitación en medio acuoso mediante interacciones electrostáticas, los cuales tendrán una mejora significativa en el aumento de la solubilidad y en la disminución de la velocidad de disolución.

- Se elaboraron nanoplexos de chitosán bajo condiciones óptimas con una forma esférica y un tamaño promedio de 431 ± 12 nm.
- La caracterización fisicoquímica que incluyó tamaño promedio, potencial z, morfología por SEM, DSC, rayos-X e IR, evidenciaron la obtención de los nanoplexos y el tipo de interacción entre el polímero y el fármaco, destacando estructuras nanométricas, esféricas, solidas que se encuentran en un polvo amorfo.
- Respecto a la validación de métodos, las metodologías mostraron cumplimiento con los parámetros de desempeño que los hicieron apropiados para realizar la cuantificación de la atorvastatina en el estudio.
- Se logró obtener una eficiencia de encapsulación del 85.29 ± 0.60 %, siendo encapsulado la mayor parte del fármaco. En cuanto a el rendimiento este fue de 66 ± 1.2 % lo cual es bajo, pero mediante diferentes técnicas podría recuperarse el polímero sobrante, evitando así grandes pérdidas durante la manufactura. Sin embargo, con estos parámetros es posible obtener nanoplexos con cantidades terapéuticas de atorvastatina.
- Con la elaboración de los nanoplexos se mejoró la solubilidad de la atorvastatina cinco veces más que la solubilidad de la atorvastatina pura, lo cual podría mejorar la biodisponibilidad de la atorvastatina en el organismo. En cuanto a los perfiles de disolución se encontró que los nanoplexos de atorvastatina liberan el fármaco de manera controlada a un pH de 6.8, por lo cual podrían formularse como sistemas de liberación controlada.

En conclusión, los nanoplexos podrían mejorar de manera significativa la solubilidad de fármacos en medios acuosos, aumentando su biodisponibilidad en el organismo y disminuyendo las reacciones adversas ocasionadas por las fluctuaciones debido a la administración de dosis constantes durante el día.

10.0 REFERENCIAS

- [1] Sharma D., Jain A. & Talsera A. (2011). Solubilization of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2, pp. 91-99.
- [2] Michael E. (2001). *Solubility*. Pharmaceutics: The science of dosage form design (p. 3). New York: Churchill Livingstone.
- [3] Patrick J. (2006). *Drug released and dissolution*. Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences (p. 302). Philadelphia: Wolters Kluwer.
- [4] Katherine A. (2015). Uso de cocrisales para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. *Revista Pensamiento Actual*, 15, pp. 207-215.
- [5] Graciela V. & Oscar D. (2012). Modelado cinético de la disolución de hidroboracita en soluciones de ácido nítrico. *Información Tecnológica*, 23, pp. 109-114.
- [6] Mitali K., Lin L. & Rainer H. (2012). Overcoming the challenge of poor drug solubility. *Pharmaceutical Engineering*, 32, pp. 1-7.
- [7] Jose L. (2001). *Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. España, Madrid: Síntesis.
- [8] Baena Y. & Ponce D. (2008). Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Revista Colombiana Ciencias Químicas Farmacéuticas*, 37, pp. 18-37.
- [9] Satish K., Kalpesh S., Venkatesh B., Anup M. & Dheeraj T. (2011). Strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 8, pp. 74-81.
- [10] Swati S., George M. & Lincy J. (2012). Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2, pp. 12-17.
- [11] Jinal N., Dharmendra M., Nirav A. & Moin K. (2012). Techniques to improve the solubility of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3, pp. 1459-1469.
- [12] Mohini S. & Sheetal Z. (2013). Solubility enhancement by various techniques. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, pp. 4558-4572.
- [13] Prakash K., Jieun R., Hyeongmin K., Iksoo K., Jeong T., Hyunil K., Jae M., Gyiae Y. & Jaehwi L. (2014). Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, pp. 304-316

- [14] Ketan T., Anuradha K. & Jignasa K. (2012). Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN pharmaceuticals*, 2012, pp. 1-10.
- [15] Marlene M., Oscar Z., David O., & Juan S. (2014). Los cocristales farmacéuticos: conceptos generales. *Real Academia Farmacéutica*, 80, pp. 265-273.
- [16] Machin, R. (2012). *Síntesis y caracterización de polímeros de ciclodextrina. Aplicación a la liberación de fármacos*. Universidad de Navarra.
- [17] Alexander T. & David A. (2006). *Physicochemical principles of Pharmacy*. London: Pharmaceutical Press.
- [18] Robert O., Alan B. & Dave A. (2012). *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*. New York: Springer.
- [19] Amit C., Upendra N., Neha G. & Sharma K. (2012). Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2, pp. 32-67.
- [20] Xiaohong C., Yan J., Chunsheng Y., Xingyu L., Hong C., Shizhen M., Maili L., Hanzhen Y., Pingya L. & Youru D. (2010). Mechanism of surfactant micelle formation. *Journal Physical Chemistry*, 114, pp. 7808–7816.
- [21] Varun R., Venkateswarlu L. & Srikanth L. (2010). Solubility enhancement techniques. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5, pp. 41-51.
- [22] Yanbin H. & Wei-Guo D. (2014). Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4, pp. 18-25.
- [23] Vijaykumar N., Venkateswarlu V. & Raviraj P. (2012). Drug Nanoparticles. *The Delivery of Nanoparticles*, 2, pp. 111-132
- [24] Juan M., Santiago D. & Daniel A. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. *Nuestra Farmacia*, 53, pp. 40-47.
- [25] Majid A., Kolsoom A., Iraj N. & Mohammad S. (2011). Nanotechnology and nuclear medicine; research and preclinical applications. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, 14, pp. 149-198.
- [26] Anna P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, 5, pp. 81-89.
- [27] Sovan L., Utpal J., Manna P., Mohanta P. & Manavalan R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1, pp. 228-234.

- [28] Alan R. (2005). Real life applications of nanotechnology in electronics. *On Board Technology*, 1, pp. 36-39.
- [29] Surendiran A., Sandhiya S. & Adithan C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian Journal of Medical Research*, 130, pp. 689-701.
- [30] Dan P., Jeffrey M., Seungpyo H., Omid C., Rimona M. & Robert L. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2, pp. 751-760.
- [31] Ijeoma F., Andreas G., Woei P. & Aikaterini L. (2013). *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*. New York: Springer.
- [32] Sergio A. & David Q. (2014). La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. *Mundo Nano*, 7, pp. 32-48.
- [33] Bhatia S. (2016). *Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications*. Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae (pp. 33-93). Switzerland: Springer.
- [34] Sílvia S., Marta P. & Adriana R. (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2, pp. 147-157.
- [35] Amol T., & Padmini R. (2015). Polymeric nanoparticles based topical drug delivery: an overview. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5, pp. 5-12.
- [36] Wean S., & Kunn H. (2012). Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367, pp. 518-526.
- [37] Wean S. & Kunn H. (2012). Green amorphous nanoplex as a new supersaturating drug delivery system. *Langmuir*, 28, pp. 6265-6275.
- [38] Minh H., Hong Y. & Tie Y. (2015). Cost-effective alternative to nano-encapsulation: Amorphous curcumin-chitosan nanoparticle complex exhibiting high payload and supersaturation generation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96, pp. 1-10.
- [39] Rupali N., Raosaheb S. (2015). A review of nanotechnology with an emphasis on Nanoplex. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, pp. 255-263.
- [40] Wean S. & Kunn H. (2012). Green preparation of antibiotic nanoparticle complex as potential anti-biofilm therapeutics via self-assembly amphiphile-polyelectrolyte complexation with dextran sulfate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, pp. 55-63.
- [41] Saurabh B. (2016). *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Switzerland: Springer.

- [42] Konwar R. & Ahmed A. (2013). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *International Research Journal of Pharmacy*, 4, pp. 47-57.
- [43] Abhishek G., Sharad V., Pramod K., & Nitin K. (2011). Formulation, characterization and application on nanoparticle. *Der Pharmacia Sinica*, 2, pp. 17-26.
- [44] Carolina G. (2014). Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Revista Farmacológica De Chile*, 7, pp. 7-16.
- [45] Devasier B. & Sanghyo K. (2014). *Polymer nanoparticles for smart drug delivery*. Application of nanotechnology in drug delivery (pp. 257-310). Republic of Korea: Intech.
- [46] Christine V. & Kawthar B. (2008). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26, pp. 1025-1058.
- [47] Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R. & Chiellini E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36, pp. 981-1014.
- [48] Omar C., Carlos P. & Inés R. (2009). Polímeros naturales recolectores de iones metálicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10, pp. 81-94.
- [49] Marguerite R. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, pp. 603-63.
- [50] Elvia C., Eddie A., Javier A., Rita G., Ricardo J. & Arturo V. (2013). Guía de práctica clínica diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Revista Médica Mexicana del Seguro Social*, 51, pp. 700-709.
- [51] Camelia S. & Anca S. (2001). Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5, pp. 378-387.
- [52] Marián C. (2008). Hipercolesterolemia diagnóstico y tratamiento. *Actualidad Científica Avances Farmacológicos*, 27, pp. 109-111.
- [53] Base de datos sistema de clasificación biofarmacéutica, *Caracterización de atrvatatina*. <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>, consulta octubre 2017.
- [54] Dina L. (2016). Formulation and evaluation of nanocrystals of a lipid lowering agent. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15, pp. 71-82.
- [55] Maggon K. (2005). human medicines 2002-2004. *Drug Discovery Today*, 118, pp. 28-35. 2017, De DrugBank base de datos.
- [56] Laurence L. (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mexico: McGraw-Hill.
- [57] Ashish G. (2014). Determination of hydrophilic-lipophilic balance value. *International Journal of Science and Research*, 3, pp. 573-575.

- [58] Jiao Sun., Fan W., Yue S., Zhennan S. & Wenjun Z. (2012). Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals. *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp. 5733-5744.
- [59] Soheyla H. & Foruhe Z. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12, pp. 255-264.
- [60] Ganesh S., Vibha P., Lokesh K. & Arvind K. (2009). Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech*, 11, pp. 598-609
- [61] Samaneh S., Osman Y. & Elvan Y. (2012). Photoinduced graft copolymerization onto chitosan under heterogeneous conditions. *Journal of Macromolecular Science*, 49, pp. 591-598.
- [62] Namdeo R., Ramesh S. & Sameer J. (2014). Dual wavelength spectrophotometric method for simultaneous estimation of atorvastatin calcium and felodipine from tablet dosage form. *Hindawi Publishing Corporation Advances in Chemistry*, 2014, pp. 1-7.
- [63] Amos O., Rachel A. & Adeola T. (2016). Thermodynamic Changes Induced by Intermolecular Interaction Between Ibuprofen and Chitosan: Effect on Crystal Habit, Solubility and In Vitro Release Kinetics of Ibuprofen. *Pharmaceutical Research*, 33, pp. 337-357.
- [64] Yanbin H. & Wei G. (2014). Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4, pp. 18-25.

11.0 ANEXOS**11.1 Solubilidad de la atorvastatina en mezclas de N,N-Dimetilformamida (DFM), Metanol (CH₃OH), Hidróxido de sodio (NaOH) y Agua.**

Mezclas	Valores de solubilidad
DMF/NaOH/H ₂ O	< 0.25 mg/ml
Metanol/NaOH/H ₂ O	< 0.25 mg/ml
DFM/NaOH	> 0.95 mg/ml
Metanol/NaOH	> 0.99 mg/ml

11.2 Linealidad del método analítico a pH 5.3.

Conc	Abs	m	media	DE	CV (%)
5	0.1645	0.0329			
5	0.1642	0.0328	0.1643	0.0001	0.0929
5	0.1643	0.0328			
10	0.3334	0.0333			
10	0.3385	0.0338	0.3356	0.0026	0.7810
10	0.3349	0.0334			
15	0.4952	0.0330			
15	0.4938	0.0329	0.4931	0.0025	0.5118
15	0.4903	0.0326			
20	0.672	0.0336			
20	0.6623	0.0331	0.6693	0.0061	0.9136
20	0.6736	0.0336			
25	0.8378	0.0335			
25	0.8361	0.0334	0.8392	0.0041	0.4887
25	0.8439	0.0337			
	MEDIA	0.0332			
	DE	0.0003			
	CV %	1.14			

11.3 Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 5.3.

Repetibilidad		
Conc µg/ml	Abs	m
5	0.1573	0.0314
5	0.1571	0.0314
5	0.1569	0.0313
15	0.486	0.0324
15	0.4884	0.0325
15	0.4791	0.0319
25	0.8089	0.0323
25	0.8091	0.0323
25	0.8071	0.0322
	MEDIA	0.0320
	DE	0.0004
	CV (%)	1.49

Exactitud			
Conc µg/ml	Abs	Con. Cal	% Recobro
5	0.1651	5.0415	100.8308
5	0.1654	5.0504	101.0089
5	0.1656	5.0563	101.1275
15	0.4907	14.7032	98.0217
15	0.4904	14.6943	97.9624
15	0.4939	14.7982	98.6547
25	0.8287	24.7329	98.9317
25	0.8370	24.9792	99.9169
25	0.8311	24.8041	99.2166
		MEDIA	99.5190
		DE	1.25
		CV %	1.25
		IC	0.86
		LI	98.65
		LS	100.38

11.4 Limite de detección y límite de cuantificación del método analítico a pH 5.3.

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Límite de detección	
σ = DE del intercepto	0.0031
S = Pendiente	0.0336
LD	0.3073

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

Límite de cuantificación	
σ = DE del intercepto	0.0031
S = Pendiente	0.0336
LC	0.9314

11.5 Linealidad del método analítico a pH 1.2.

Conc	Abs	m	media	DE	CV (%)
10	0.2987	0.0298			
10	0.2979	0.0297	0.2986	0.0007	0.2513
10	0.2994	0.0299			
15	0.4574	0.0304			
15	0.4551	0.0303	0.4571	0.0019	0.4186
15	0.4589	0.0305			
20	0.6067	0.0303			
20	0.6043	0.0302	0.6048	0.0016	0.2753
20	0.6035	0.0301			
25	0.7851	0.0314			
25	0.7861	0.0314	0.7856	0.0005	0.0653
25	0.7858	0.0314			
30	0.9325	0.0310			
30	0.9344	0.0311	0.9343	0.0018	0.1980
30	0.9362	0.0312			
	MEDIA	0.0306			
	DE	0.0005			
	CV %	1.95			

11.6 Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 1.2

Repetibilidad		
Conc µg/ml	Abs	m
10	0.3082	0.0308
10	0.3044	0.0304
10	0.3044	0.0304
20	0.6043	0.0302
20	0.6067	0.0303
20	0.6080	0.0304
30	0.9498	0.0316
30	0.9408	0.0313
30	0.9478	0.0315
	MEDIA	0.0308
	DE	0.0005
	CV (%)	1.87

Exactitud			
Conc µg/ml	Abs	Con. Cal	% Recobro
10	0.3040	9.9840	99.8402
10	0.3065	10.0638	100.6389
10	0.3044	9.9974	99.9744
20	0.6171	19.9872	99.9361
20	0.6173	19.9936	99.9680
20	0.6165	19.9680	99.8402
30	0.9289	29.9488	99.8296
30	0.9285	29.9361	99.7870
30	0.9291	29.9552	99.8509
		MEDIA	99.9628
		DE	0.26
		CV %	0.26
		INTERVALO DE CONFIANZA	0.18
		LI	99.78
		LS	100.14

11.7 Limite de detección y límite de cuantificación del método analítico a pH 1.2.

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Límite de detección	
σ = DE del intercepto	0.0042
S = Pendiente	0.0313
LD	0.4426

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

Límite de cuantificación	
σ = DE del intercepto	0.0042
S = Pendiente	0.0313
LC	1.3413

11.8 Linealidad del método analítico a pH 6.8.

Conc	Abs	m	media	DE	CV (%)
10	0.3508	0.0350			
10	0.3487	0.0348	0.3509	0.0023	0.6708
10	0.3534	0.0353			
15	0.5150	0.0343			
15	0.5144	0.0342	0.5153	0.0011	0.2206
15	0.5166	0.0344			
20	0.6774	0.0338			
20	0.6817	0.0340	0.6791	0.0022	0.3367
20	0.6782	0.0339			
25	0.8391	0.0335			
25	0.8498	0.0339	0.8449	0.0054	0.6419
25	0.8460	0.0338			
30	1.0227	0.0340			
30	1.0306	0.0343	1.0317	0.0096	0.9353
30	1.0419	0.0347			
	MEDIA	0.0343			
	DE	0.0004			
	CV %	1.45			

11.9 Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 6.8.

Repetibilidad		
Conc µg/ml	Abs	m
10	0.3598	0.0359
10	0.3615	0.0361
10	0.362	0.0362
20	0.7192	0.0359
20	0.7126	0.0356
20	0.7148	0.0357
30	1.0546	0.0351
30	1.0422	0.0347
30	1.0435	0.0347
	MEDIA	0.0355
	DE	0.0005
	CV (%)	1.59

Exactitud			
Conc µg/ml	Abs	Con. Cal	% Recobro
10	0.3408	9.9120	99.1202
10	0.3430	9.9765	99.7653
10	0.3434	9.9882	99.8826
20	0.6774	19.7829	98.9149
20	0.6817	19.9090	99.5454
20	0.6782	19.8064	99.0322
30	1.0227	29.9090	99.6969
30	1.0306	30.1407	100.4692
30	1.0419	30.4721	101.5738
		MEDIA	99.7778
		DE	0.82
		CV %	0.83
		INTERVALO DE CONFIANZA.	0.57
		LI	99.20
		LS	100.35

11.10 Limite de detección y límite de cuantificación del método analítico a pH 6.8.

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Límite de detección	
σ = DE del intercepto	0.0035
S = Pendiente	0.0340
LD	0.3471

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

Límite de cuantificación	
σ = DE del intercepto	0.0035
S = Pendiente	0.0340
LC	1.0520

11.11 Eficiencia de encapsulación por diálisis.

Muestra	Microgramos libres			Miligramos libres		% Encapsulado
1	6.32	189.88	3133.04	3.13	14.24	85.75
2	6.70	201.09	3318.11	3.31	15.08	84.91
3	6.25	187.56	3094.85	3.09	14.06	85.93
4	6.89	206.88	3413.59	3.41	15.51	84.48
5	6.71	201.45	3323.99	3.32	15.10	84.89
6	6.32	189.70	3130.10	3.13	14.22	85.77

11.12 Eficiencia encapsulación por centrifugación y cuantificación en sobrenadante.

Muestra	Microgramos libres			% Encapsulado
1	24.63	73.90	2217.15	89.92
2	24.11	72.33	2170.14	90.13
3	25.98	77.96	2338.93	89.36

11.13 Tamaño de partícula de la Atorvastatina cálcica mediante la ecuación de Hatch Choate.

ATORVASTATINA							
Clases		d	n	nd	d-d _{in}	(d-d _{in}) ²	n(d-d _{in}) ²
0	10	5	44	220.00	-45.35	2056.6444	90492.354
10	25	17.5	43	752.50	-32.85	1079.1384	46402.950
25	50	37.5	39	1462.50	-12.85	165.1287	6440.020
50	75	62.5	29	1812.50	12.15	147.6166	4280.882
75	100	87.5	26	2275.00	37.15	1380.1046	35882.718
100	200	150	26	3900.00	99.65	9930.0744	258181.933
			Σ 207	Σ 10422.50			441680.857
dIn	50.35 μm						
DesIn	46.19						

11.14 Porcentaje disuelto en los perfiles de disolución a pH 1.2 y 6.8.

Tiempo (h)	% Disuelto a pH 1.2		Tiempo (h)	% Disuelto a pH 6.8	
	Fármaco	Nanoplexos		Fármaco	Nanoplexos
0	0	0	0	0	0
0.08	0	0	0.08	83.45	27.20
0.16	0	0	0.16	84.40	32.43
0.25	0.81	0	0.25	86.99	35.34
0.50	4.47	0	0.50	94.85	43.32
0.75	2.45	0	0.75	90.49	46.16
1	4.01	0	1	95.65	49.21
2	10.02	6.10	2	96.59	56.85
4	16.20	11.15	4	0	60.04
6	17.47	14.20	6	0	67.85
12	37.52	33.82	12	0	78.37
24	87.51	75.22	24	0	86.50

11.15 Participación en eventos académicos.

*Congreso Nacional de
Ciencias Farmacéuticas*
Tequila, Jalisco
3 a 7 de Septiembre de 2017
"Una vuelta al medicamento de 50 años"

TEF0036

La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
otorga el presente

RECONOCIMIENTO a:

**Josue Arquieta Flores, Efrén Hernández Baltazar, Gerardo Leyva
Gómez, Sergio Alcalá Alcalá**

Por la presentación del trabajo
**Obtención, caracterización y optimización de nanoplexos de chitosan-
atorvastatina**


QFB. Victoria Ruiseco Nocetti
Presidencia AFM


Dra. Elizabeth Sánchez González
Dirección de Ciencia y Tecnología

