



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE FARMACIA

Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema  
biodegradable y bioadhesivo para administración  
pulmonar en el tratamiento de la neumonía

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

L. F. Areli Mastache Juárez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sergio Alcalá Alcalá.

Cuernavaca, Morelos

2019





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 01 de febrero de 2019

Folio: FF/D/SAc/ CIP /MF/003/2019

**L.F. ARELI MASTACHE JUÁREZ**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema biodegradable y bioadhesivo para administración pulmonar en el tratamiento de la neumonía"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**DICTAMEN: Se asignó el siguiente jurado**

**PRESIDENTE: Dr. Efrén Hernández Baltazar**

**SECRETARIO: Dr. Jesús Rivera Islas**

**VOCAL 1: Dr. Gerardo Leyva Gómez**

**VOCAL 2: Dra. Dea Herrera Ruiz**

**VOCAL3: Dra. Elizabeth Piñón Segundo**

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

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

Atentamente  
*Por una humanidad culta*  
*Una universidad de excelencia*

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**  
**JEFATURA DE POSGRADO**



ccp: archivo: Dr. Efrén Hernández Baltazar, Dr. Jesús Rivera Islas, Dr. Gerardo Leyva Gómez, Dra. Dea Herrera Ruiz, Dra. Elizabeth Piñón Segundo

mitv

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

*Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.  
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico,  
es también un niño colocado ante fenómenos naturales  
que le impresionan como un cuento de hadas.*

Maria Salomea Skłodowska-Curie

## Lugar de trabajo

---

---

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 1 de Investigación en Tecnología Farmacéutica y en colaboración con el Laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

## Dedicatoria

---

---

*A mis padres y hermano, Ana Laura Juárez Mondragón, Uriel Mastache Gómez y Uriel Mastache Juárez, por todo el apoyo, ánimos y comprensión que han tenido conmigo, simplemente no hay palabras para describir lo agradecida que estoy con ustedes, son y siempre serán el principal pilar de mi vida, por qué este logro también es de y para ustedes. Los amo.*

*A mi pareja Edgar E. Neri Castro, por siempre alentarme a seguir creciendo, por todo el apoyo y ánimo que me has brindado para poder culminar este proyecto, por estar presente en una etapa más de mi vida, te amo.*

## Agradecimientos

---

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado con la beca 622437.

Al Dr. Sergio Alcalá Alcalá, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por guiarme, alentarme, apoyarme y aconsejarme en todo sentido, lo admiro y estimo mucho Dr. ¡Muchas gracias!

A mi mejor amiga, más que amiga una hermana Nancy S. Gaytán B., por formar parte de mi vida y apoyarme incondicionalmente, compartimos un logro más, te amo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y la Facultad: Cinthya, Kevin, Diana, William, Jorge, Julieta, Jazmín, Omar, Ana, Isabel, Pablo y Chuck, a pesar de que unos ya no

están en el laboratorio, gracias por hacer que mi estancia fuera más agradable, por todos los consejos y comentarios que ayudaron a finalizar este trabajo. Algunos me brindaron más que una simple amistad y pasaron a formar parte de mi vida, por qué al final el laboratorio y la Facultad son como una segunda casa, los quiero.

A mi comité tutorial el Dr. Óscar Torres Ángeles y al Dr. Gerardo Leyva Gómez, por aceptar formar parte de él, por los consejos y comentarios enriquecedores cada fin de semestre.

Al Dr. Óscar Torres Ángeles, por apoyarnos con su área de trabajo y permitirme "jugar" con las bacterias en su laboratorio, y por las charlas.

Al Dr. Jesús Rivera Islas, por ayudarme con el análisis de algunos resultados de este trabajo, consejos, opiniones y pláticas.

A mi comité de revisión de tesis: El Dr. Efrén Hernández Baltazar, el Dr. Jesús Rivera Islas, el Dr. Gerardo Leyva Gómez, la Dra. Dea Herrera Ruíz y la Dra. Elizabeth Piñón Segundo, por el tiempo que se tomaron en leer y revisar el trabajo, así como sus comentarios y observaciones.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitirme trabajar en su laboratorio cuando no podía trabajar en el de la Facultad de Farmacia debido a los daños que sufrió en el sismo del 19 de septiembre de 2017 y durante el periodo de huelga que atravesó la UAEM del 20 de septiembre al 26 de octubre de 2018.

## ÍNDICE GENERAL.

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b> .....	VII
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.</b> .....	VIII
<b>GLOSARIO.</b> .....	IX
<b>RESUMEN</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.</b> .....	3
2.1 Los pulmones.....	3
2.2 Vía inhalatoria para administración de fármacos. ....	4
2.2.1 Dispositivos para la administración de fármacos a través de la vía pulmonar. .....	5
2.2.2 Deposición pulmonar. ....	9
2.2.3 Eliminación de partículas. ....	11
2.3 Neumonía en México. ....	13
2.3.1 Tratamiento de la neumonía. ....	14
2.4 Azitromicina.....	17
2.4.1 Formas farmacéuticas de azitromicina.....	19
2.5 Sistemas de liberación de fármacos basados en partículas poliméricas. ....	20
2.5.1 Procesos para desarrollar micropartículas poliméricas. ....	22
2.6 De la bioadhesión a la mucoadhesión. ....	25
2.6.1 Poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico) .....	28
2.6.2 Teorías de mucoadhesión.....	30
2.6.3 Propiedades que afectan la mucoadhesión. ....	32
<b>3. JUSTIFICACIÓN.</b> .....	34
<b>4. HIPÓTESIS.</b> .....	35
<b>5. OBJETIVO GENERAL.</b> .....	36
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES.</b> .....	36
<b>7. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.</b> .....	37
<b>8. METODOLOGÍAS.</b> .....	40
8.1 Selección y caracterización de los materiales.....	40
8.1.1 Elección del fármaco modelo. ....	40
8.1.1.1 Identidad por IR.....	40
8.1.1.2 Perfil de difracción por DRX.....	40

8.1.1.3 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción. ....	40
8.1.2 Pruebas de solubilidad. ....	41
8.2 Obtención y optimización de las MP's de Gantrez® AN. ....	41
8.2.1 Preparación de las micropartículas. ....	44
8.3 Caracterización de las MP's. ....	45
8.3.1 Tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (Y <sub>1</sub> ). ....	45
8.3.2 Determinación de Potencial Z (Y <sub>2</sub> ). ....	45
8.3.3 Determinación del rendimiento del proceso (Y <sub>3</sub> ). ....	45
8.4 Desarrollo y validación del método analítico para cuantificar AZT. ....	45
8.5 Caracterización de las MP's cargadas con fármaco. ....	48
8.5.1 Tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento del proceso. ....	48
8.5.2 Evaluación de la eficiencia de carga (Y <sub>4</sub> ). ....	48
8.5.3 Morfología de las MP's por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). ...	49
8.5.4 Determinación de la interacción entre los componentes por espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). ....	49
8.5.5 Determinación del perfil de difracción por Difracción de Rayos X (DRX). .	49
8.5.6 Determinación de la interacción de los componentes por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). ....	49
8.6 Evaluación de la eficacia <i>in vitro</i> de las MP's. ....	50
8.6.1 Estudios de liberación. ....	50
8.6.1.1 Modelado matemático del perfil de liberación. ....	51
8.7 Pruebas de bioadhesión. ....	52
8.7.1 Por interacción con soluciones de mucina. ....	52
8.7.2 Por flujo continuo en tejido de pulmón. ....	52
8.8 Formulación de las MP's y evaluación de las propiedades aerolizables. ....	53
8.8.1 Formulación como polvo seco para inhalación. ....	53
8.8.2 Formulación como aerosol en medio acuoso para nebulización. ....	54
8.9 Estudio de eficacia de las MP's con AZT en modelos bacterianos. ....	55
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>57</b>
9.1 Selección de los materiales empleados. ....	57
9.1.1.1 Identidad por IR. ....	59
9.1.1.2 Perfil de difracción por DRX. ....	60
9.1.1.3 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción. ....	61



9.2 Optimización del proceso de obtención de las MP's. ....	64
9.3 Caracterización de las MP's optimizadas de Gantrez® AN. ....	68
9.3.1 Talla promedio, potencial Z y rendimiento del proceso. ....	68
9.4 Validación del método analítico para cuantificar AZT. ....	69
9.5 Caracterización de las MP's cargadas con AZT.....	73
9.5.2 Determinación de la morfología de las micropartículas.....	76
9.5.3 Interacción entre los componentes por FTIR. ....	77
9.5.4 Perfil de difracción por DRX. ....	80
9.5.5 Compatibilidad e interacción de los componentes por DSC. ....	82
9.6 Evaluación de la eficiencia <i>in vitro</i> de las MP's. ....	84
9.6.1 Evaluación del perfil de liberación de las MP's. ....	84
9.6.2 Evaluación de la bioadhesión de los sistemas. ....	86
9.6.2.1 Por interacción con mucina. ....	86
9.6.2.2 Por flujo continuo en tejido de pulmón. ....	88
9.6.3 Formulación y evaluación de las propiedades aerolizables de las MP's... 90	
9.6.3.1 Como polvo seco para inhalación. ....	90
9.6.3.2 Como suspensión para nebulización en aerosol. ....	94
9.6.4 Estudio de eficacia en un modelo <i>in vitro</i> . ....	96
<b>10. CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	100
10.1 CONCLUSIONES PARTICULARES.....	100
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	102
<b>13. ANEXOS.</b> ....	114
13.1 Análisis de varianza de rendimiento, talla, potencial Z y eficiencia de encapsulación. ....	114
13.2 Gráficos de modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación. ....	116
13.3 Tabla de la interacción de las MP's con soluciones de mucina al 1 y 2%. ....	118
13.4 Análisis de varianza para las formulaciones como polvo seco para inhalación. ....	119
13.5 Gráficos y tablas de la determinación del diámetro de masa media aerodinámica. ....	122
13.6 Ensayos de microdilución en placas de 96 pozos. ....	124
13.7 Constancias de participación en congresos. ....	127

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Esquema del árbol traqueobronquial en el pulmón del ser humano, con sus respectivas dimensiones aproximadas. ....	4
<b>Figura 2.</b> Inhaladores de cartucho presurizado (izquierda) y sus componentes. Ejemplos encontrados en el mercado con contadores de dosis (derecha). ....	6
<b>Figura 3.</b> Diferentes tipos de inhaladores de polvo seco existentes en el mercado internacional. ....	7
<b>Figura 4.</b> A) Esquema del funcionamiento de un nebulizador de corriente de aire. B) Esquema de funcionamiento de un nebulizador ultrasónico. C) Ejemplos de nebulizadores en el mercado. ....	8
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de deposición de partículas en el interior de los pulmones. ....	10
<b>Figura 6.</b> Vías de eliminación de partículas depositadas en los pulmones. ....	11
<b>Figura 7.</b> Estructura de azitromicina. ....	17
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de micro-nanoesferas y micro-nanocápsulas. ....	21
<b>Figura 9.</b> Esquema del proceso para desarrollar MP's por emulsión-evaporación/extracción del solvente. ....	23
<b>Figura 10.</b> Esquema del proceso para desarrollar MP's por nanoprecipitación por inyección. ....	24
<b>Figura 11.</b> Esquema del proceso para desarrollar MP's por salting-out. ....	25
<b>Figura 12.</b> Estructura química de Gantrez® AN o Poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico). ....	28
<b>Figura 13.</b> Esquema de degradación de Gantrez® AN. ....	30
<b>Figura 14.</b> Ejemplos de los 6 principales mecanismos de mucoadhesión. ....	32
<b>Figura 15.</b> Sistema montado para los estudios de liberación. ....	51
<b>Figura 16.</b> Fórmulas empleadas para calcular las propiedades reológicas de los polvos. ....	53
<b>Figura 17.</b> Sistema montado para la prueba de aerolización de la formulación en polvo seco. ....	54
<b>Figura 18.</b> Sistema para evaluar la suspensión de MP's para nebulización. ....	55
<b>Figura 19.</b> Esquema de tratamientos para la determinación de la CMI. ....	56
<b>Figura 20.</b> Espectro IR de la azitromicina donada para desarrollar el proyecto (color azul) y el espectro IR correspondiente a la patente, las flechas indican los picos de absorción mencionados en el texto (color negro). ....	59
<b>Figura 21.</b> Difractograma de la (A) AZT anhidra y (B) la AZT dihidratada, las flechas indican los ángulos de los picos mencionados en el texto. ....	60
<b>Figura 22.</b> Espectro de absorción de la AZT anhidra. Rango de 200 – 800 nm. Se muestra el espectro del agua en color azul y AZT en color verde. ....	61
<b>Figura 23.</b> Espectro de absorción de AZT reportado por Nyola, N et al (2013). ...	61
<b>Figura 24.</b> Tamaño promedio y su distribución de las partículas de Gantrez® AN. ....	64

<b>Figura 25.</b> Gráfico de Pareto estandarizada para la talla promedio.....	67
<b>Figura 26.</b> Contornos de superficie de respuesta estimada para la talla de 1 $\mu\text{m}$ .	67
<b>Figura 27.</b> Espectros de absorción en UV-Vis de cada uno de los compuestos para realizar la reacción colorimétrica (rango: 200 – 650 nm).....	70
<b>Figura 28.</b> Coloraciones obtenidas después de hacer reaccionar el $\text{KMnO}_4$ con AZT y el $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Primer matraz corresponde a la solución stock de $\text{KMnO}_4$ . Rango de concentraciones: 10, 15, 20, 25 y 30 $\mu\text{g/mL}$ , de izquierda a derecha. ....	71
<b>Figura 29.</b> Curva de calibración de azitromicina.....	71
<b>Figura 30.</b> Barridos por espectroscopia UV-Vis de la reacción de la solución de $\text{KMnO}_4$ , $\text{K}_2\text{CO}_3$ con agua, las MP's de Gantrez® AN sin fármaco y con AZT (rango: 200 – 650 nm). ....	73
<b>Figura 31.</b> Micrografías por SEM de las (A1-2) MP's sin AZT y (B1-2) .....	77
<b>Figura 32.</b> Espectros IR de las materias primas, las mezclas físicas y las MP's con y sin AZT. Las flechas indican las bandas mencionadas en el texto.....	79
<b>Figura 33.</b> Difractogramas de las materias primas, las mezclas físicas y las MP's con y sin AZT. ....	81
<b>Figura 34.</b> Termogramas de las materias primas, mezclas físicas con y sin fármaco y de las MP's con y sin AZT. ....	83
<b>Figura 35.</b> Perfiles de liberación. Se muestra valor promedio $\pm$ EE: MP's n = 5 y AZT libre n = 3. ....	84
<b>Figura 36.</b> Sistema montado para evaluar la interacción mucina-MP's. ....	87
<b>Figura 37.</b> Tamaño promedio y potencial Z de las MP's al interactuar con mucinas. Se muestra el valor promedio (n = 2) $\pm$ D.E. ....	88
<b>Figura 38.</b> Sistema montado para el experimento de bioadhesión con tejido de pulmón de cerdo.....	89
<b>Figura 39.</b> Tejido de pulmón de cerdo con MP's antes del ensayo (izquierda) y después del ensayo (derecha). ....	89
<b>Figura 40.</b> Ejemplos de evaluaciones de las propiedades de flujo de los polvos. A) Densidad aparente de la formulación. B y C) Densidad compactada. D y E) Evaluación del ángulo de reposo y velocidad de flujo. ....	90
<b>Figura 41.</b> Muestras de polvos vistas en microscopio óptico en un aumento de 100X. A) Cristales de lactosa sola, B) MP's en matriz de manitol sin lactosa, C) MP's dispersas de la mezcla con lactosa (mezcla óptima), D) Cristales de lactosa de la mezcla de MP's con lactosa (mezcla óptima) y E) MP's en matriz de manitol de la mezcla con lactosa (mezcla óptima). Las flechas indican la presencia de MP's... ..	93
<b>Figura 42.</b> A) Dispersión de la formulación óptima por aerolización, B) Formulación adherida al portaobjetos, C) Cristal de manitol sin MP's de la mezcla dispersada (aumento de 100x) y D) Cristal de lactosa de la formulación dispersada (aumento de 100x). ....	94
<b>Figura 43.</b> Placa de 96 pozos de E. coli expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h. ....	97
<b>Figura 44.</b> Gráfico del rendimiento de manufactura de las diferentes partículas obtenidas. Se muestra el valor promedio $\pm$ D.E. (n = 3).....	114

<b>Figura 45.</b> Gráfico del tamaño promedio de las diferentes partículas obtenidas. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey (n = 3).....	114
<b>Figura 46.</b> Gráfico de Potencial Z de las diferentes partículas obtenidas. Se muestra el valor promedio con intervalos de LSD (n = 3). .....	115
<b>Figura 47.</b> Gráfico de la eficiencia de encapsulación. Se muestra el valor promedio con intervalos de LSD (n = 3). .....	115
<b>Figura 48.</b> Gráfico de modelo de orden cero. ....	116
<b>Figura 49.</b> Gráfico de modelo primer orden. ....	116
<b>Figura 50.</b> Gráfico de modelo de Higuchi. ....	117
<b>Figura 51.</b> Gráfico de modelo de Hixson-Crowell. ....	117
<b>Figura 52.</b> Gráfico de modelo de Korsmeyer-Peppas.....	118
<b>Figura 53.</b> Gráfico de la densidad aparente. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey (n = 3).....	119
<b>Figura 54.</b> Gráfico de densidad compactada. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey (n = 3).....	119
<b>Figura 55.</b> Gráfico de índice de Carr. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey (n = 3). ....	120
<b>Figura 56.</b> Gráfico del índice de Hausner. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey (n = 3).....	120
<b>Figura 57.</b> Gráfico del ángulo de reposo. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey: para lactosa y micropartículas (n = 9), para mezclas (n = 6). .....	121
<b>Figura 58.</b> Gráfico de velocidad de flujo. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey: para lactosa y micropartículas (n = 9), para mezclas (n = 6). ....	121
<b>Figura 59.</b> Gráfico de porcentaje acumulado (%) vs el logaritmo del diámetro de membrana, con su respectiva tabla para calcular el MMAD y el GSD a partir de la ecuación. Ensayo 1. ....	122
<b>Figura 60.</b> Gráfico de porcentaje acumulado (%) vs el logaritmo del diámetro de membrana, con su respectiva tabla para calcular el MMAD y el GSD a partir de la ecuación. Ensayo 2. ....	123
<b>Figura 61.</b> Gráfico de porcentaje acumulado (%) vs el logaritmo del diámetro de membrana, con su respectiva tabla para calcular el MMAD y el GSD a partir de la ecuación. Ensayo 3. ....	123
<b>Figura 62.</b> Placa de 96 pozos de <i>B. subtilis</i> expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h. ....	124
<b>Figura 63.</b> Placa de 96 pozos de <i>S. aureus</i> expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h. ....	125
<b>Figura 64.</b> Placa de 96 pozos de <i>P. aeruginosa</i> expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.....	125
<b>Figura 65.</b> Placa de 96 pozos de <i>K. pneumoniae</i> expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.....	126

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Tratamiento indicado para la NAC de acuerdo con el microorganismo aislado.....	16
<b>Tabla 2.</b> Tratamiento de la NAC de acuerdo con diferentes guías clínicas.....	16
<b>Tabla 3.</b> Fases de AZT junto con su fórmula empírica, peso molecular y número CAS.....	18
<b>Tabla 4.</b> Polímeros bioadhesivos empleados en el desarrollo de partículas.....	27
<b>Tabla 5.</b> Factores que evaluar en la producción de las partículas de Gantrez® AN. .....	42
<b>Tabla 6.</b> Tabla Matriz del Diseño Experimental 2 <sup>5-1</sup> a ejecutar. ....	43
<b>Tabla 7.</b> Modelos matemáticos empleados para investigar el mecanismo de liberación de la AZT de las MP's. ....	51
<b>Tabla 8.</b> Características de antibióticos empleados en el tratamiento de la neumonía. ....	58
<b>Tabla 9.</b> Solubilidad de los materiales en diferentes disolventes.....	62
<b>Tabla 10.</b> Solubilidad de reactivos a emplear para la preparación de partículas. .	63
<b>Tabla 11.</b> Matriz del Diseño Experimental 2 <sup>5-1</sup> ejecutada.....	65
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza de los 5 factores con sus combinaciones dobles.	66
<b>Tabla 13.</b> Niveles óptimos predichos para los factores y verificación del modelo.	68
<b>Tabla 14.</b> Parámetros de desempeño de la validación del método analítico para AZT por UV-Vis.....	72
<b>Tabla 15.</b> Caracterización de las partículas de Gantrez® AN cargadas con AZT.	74
<b>Tabla 16.</b> Solubilidad de las MP's cargadas con AZT en disolventes. ....	75
<b>Tabla 17.</b> Eficiencia de encapsulación de azitromicina en las MP's de Gantrez® AN. .....	75
<b>Tabla 18.</b> Diferentes modelos matemáticos ajustados al perfil de liberación.....	85
<b>Tabla 19.</b> Parámetros evaluados para determinar las propiedades reológicas de los polvos.....	91
<b>Tabla 20.</b> MMAD y GSD de la formulación como suspensión para nebulización..	96
<b>Tabla 21.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de AZT sola y encapsulada en las MP's. ....	97
<b>Tabla 22.</b> Tamaño promedio y potencial Z de las MP's al interactuar con mucinas. .....	118
<b>Tabla 23.</b> MMAD y GSD calculados por porcentaje en peso. ....	122
<b>Tabla 24.</b> Cálculo del MMAD a partir de la fórmula.....	124

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

<b>Símbolo/ Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
<b>10X</b>	Aumento de objetivo en microscopía 10 veces.
<b>40X</b>	Aumento de objetivo en microscopía 40 veces.
<b>AZT</b>	Azitromicina.
<b>SCB/BCS</b>	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, siglas en inglés de Biopharmaceutical Classification System.
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono.
<b>CV</b>	Coeficiente de variación.
<b>DDE</b>	Diseño de experimentos.
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal para el 50% de la población.
<b>DRX</b>	Difracción de Rayos-X.
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido, siglas en inglés de Differential Scanning Calorimetry.
<b>EPOC</b>	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos, siglas en inglés de Food and Drug Administration.
<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
<b>FTIR</b>	Infrarrojo con transformada de Fourier, siglas en inglés de Fourier Transform Infra-Red.
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocido como Seguro, siglas en inglés de Generally Recognized As Safe.
<b>GSD</b>	Desviación estándar geométrica, siglas en inglés de Geometric Standard Deviation.
<b>h</b>	Hora.
<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico.
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
<b>kDa</b>	Kilodaltons.
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	Permanganato de potasio.
<b>M</b>	Molar/Molaridad.
<b>MET</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión.
<b>min</b>	Minutos.
<b>MMAD</b>	Diámetro de masa media aerodinámica, siglas en inglés de Mass Median Aerodynamic Diameter.
<b>MPs</b>	Micropartículas.

<b>MSR/RSM</b>	Método de Superficie de Respuesta y siglas en inglés de Response Surface Methodology
<b>N/A</b>	No aplica.
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio.
<b>NPs</b>	Nanopartículas.
<b>Pa</b>	Pascales.
<b>PBS</b>	Solución Buffer fosfato-salino, siglas en inglés de Phosphate Buffered Saline.
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno.
<b>pKa</b>	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil.
<b>PLGA</b>	Ácido poli (láctico-co-glicólico).
<b>PLLA</b>	Ácido poli-L-láctico.
<b>PVA</b>	Alcohol Polivinílico.
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido, siglas en inglés de Scanning Electron Microscopy.
<b>UFC/mL</b>	Unidades Formadoras de Colonias sobre mililitro.
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México.
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia.

## GLOSARIO.

- **Micro-nanosistema:** lo definimos como una plataforma o vehículo de liberación de fármacos cuyo diámetro promedio y distribución se encuentran en el límite superior de los nanómetros y el inferior de los micrómetros. Dado lo anterior, para fines de este trabajo se utilizará el término “micropartículas (MP’s)” o “microsistema” de liberación prolongada, el cual además es de tipo matricial por lo que se podría utilizar el término “microesferas”.

## RESUMEN

Las vías respiratorias se encuentran revestidas por una capa de mucosa, por lo que se está investigando el desarrollar micro o nanopartículas bioadhesivas cargadas con fármacos para tratar enfermedades agudas y crónicas de los pulmones, siendo de interés aquellos fármacos que presentan baja solubilidad y menor eficacia cuando se administran por la vía oral. Estos sistemas particulados ofrecen una liberación prolongada, una mejor biodisponibilidad, disminuyen la frecuencia de dosis, los efectos secundarios y la resistencia bacteriana, para el caso de antibióticos. El polímero Gantrez® AN posee propiedades bioadhesivas, aerolizables, biodegradables y biocompatibles, por lo que es buen candidato para ser empleado como micro o nanoacarreador pulmonar de fármacos. Por otro lado, la azitromicina es un antibiótico que presenta baja solubilidad acuosa y biodisponibilidad oral; sin embargo, es administrado por esta vía para el tratamiento de enfermedades respiratorias como la neumonía.

El objetivo de este proyecto fue desarrollar, caracterizar y evaluar un micro-nanosistema biodegradable y bioadhesivo para la administración pulmonar de azitromicina, como una alternativa para el tratamiento de la neumonía.

Para producir las partículas se empleó el método de emulsión-evaporación del disolvente, donde la fase acuosa ( $X_1$ , 4 y 8 mL) corresponde a una mezcla 90:10 acetona:agua, que contiene el polímero y la azitromicina previamente disueltos por separado (50, 100 y 150 mg). La fase oleosa estuvo compuesta por aceite mineral y Span® 80 ( $X_2$ , al 1 y 3 % p/v) como emulsificante. Con un homogeneizador ULTRA-TURRAX® se agitó la fase oleosa, agregando por goteo la fase acuosa, manteniendo una agitación de 6000 o 12000 rpm ( $X_3$ ), durante 3.5 o 5 minutos ( $X_4$ ), en presencia o ausencia de porógeno ( $X_5$ ), según un Diseño Experimental. La micro-nanosuspensión obtenida se dejó en agitación magnética durante 24 h. Las partículas se recuperaron por centrifugación y se lavaron con cloroformo, para después ser resuspendidas en una solución acuosa de manitol al 5% (p/v), y se liofilizaron. Las partículas optimizadas se caracterizaron por tamaño promedio ( $Y_1$ ), potencial Z ( $Y_2$ ), rendimiento ( $Y_3$ ) y eficiencia de encapsulación ( $Y_4$ ), además de estudios por FTIR, Difracción de Rayos X y DSC para evaluar su estado sólido y las interacciones que pudieran presentarse. Se realizó el perfil de liberación de las partículas con PBS (pH 6.6), a 37 °C, durante 30 h, así como el modelado matemático del mismo. Se determinó la bioadhesión de los sistemas con soluciones de mucina y tejido pulmonar de cerdo. También se evaluaron las propiedades aerolizables de las micropartículas (MP's) como formulaciones para polvo seco para inhalación y como suspensión para nebulización. Finalmente, para evaluar la eficacia antibacteriana de las partículas, se usaron las cepas bacterianas:



*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

En la ejecución del diseño experimental se obtuvieron MP's, con tamaños de 63 a 5396 nm. Empleando el MSR se seleccionaron los niveles óptimos de los factores de estudio para obtener partículas de tamaño menor a 5  $\mu\text{m}$  y con la mejor eficiencia de encapsulación, resultando óptimas aquellas con carga inicial de 100 mg de azitromicina, las cuales presentaron rendimiento de  $81.01 \pm 2.16\%$ , tamaño de  $1104.67 \pm 81.67$  nm, potencial Z de  $-22.50 \pm 0.70$  mV y eficiencia de encapsulación del  $42.17 \pm 8.36\%$ . De acuerdo con lo observado en el FTIR, no hay formación de nuevos enlaces en las partículas cargadas con fármaco. La Difracción de Rayos-X evidenció que el fármaco se amorfiza al incorporarse en las partículas. Con DSC se observó que no hay interacciones significativas entre los componentes de las partículas y que el fármaco se encuentra molecularmente disperso en las MP's. Las MP's presentaron una liberación prolongada, alrededor del 95% del fármaco fue liberado en 24 h, con un mecanismo de liberación de transporte de super caso II, es decir, por medio de procesos de erosión e hinchamiento por parte de las MP's. Las MP's interactúan con las mucinas y presentaron una bioadhesión del  $54.9 \pm 4.5\%$  en tejido pulmonar. Al formularse como polvo seco para inhalación, mezclando con lactosa, presentan buena aerolización y una densidad compactada menor a 0.4g/mL que sugiere que las partículas pueden ser depositadas exitosamente en el interior del pulmón. Cuando se formulan como suspensión para nebulización se obtiene un MMDA menor a 3  $\mu\text{m}$  y una GSD menor a 2, lo que confirma que la distribución de tamaño es estrecha y se encuentra en un tamaño de partícula fino, características adecuadas para lograr un suministro eficiente en los pulmones. La actividad de la azitromicina no se pierde cuando se incorpora en las micropartículas, se obtuvieron CMI's más grandes en comparación con el fármaco solo, debido al efecto de la velocidad de liberación prolongada que presentan.

Se lograron desarrollar, caracterizar y evaluar micropartículas biodegradables y bioadhesivas de Gantrez® AN, encapsulando azitromicina bajo condiciones óptimas, con un tamaño adecuado para administrarse por vía pulmonar y con una eficiencia de encapsulación suficiente para administrar dosis terapéuticas del fármaco en el tratamiento de la neumonía.

## ABSTRACT

The airways are covered by a mucosal layer, so research is underway to develop bioadhesive micro-nanosystems loaded with drugs to treat acute and chronic lung diseases, focus on drugs with low solubility and bioavailability when are administered by oral route. These particulated systems offer prolonged release, better bioavailability, decrease in dosage frequency, less side effects and bacterial resistance in the case of antibiotics. Gantrez® AN is a polymer that has bioadhesive, aerolyzable, biodegradable and biocompatible properties, which lead it to be a good candidate to pulmonary administration as drug carrier. On the other hand, Azithromycin is an antibiotic with low aqueous solubility and oral bioavailability, however, it is administered by this route to treat respiratory diseases such as pneumonia.

The aim of this project was to develop, characterize and evaluate a biodegradable and bioadhesive micro-nanosystem for the pulmonary administration of azithromycin as alternative treatment for pneumonia.

The emulsion-solvent evaporation method was used to produce the particles, where the aqueous phase contains a mixture 90:10 of acetone:water ( $X_1$ , 4 and 8 mL), where the polymer and Azithromycin were previously dissolved by separate (50, 100 and 150 mg). The oil phase consisted of mineral oil and Span® 80 ( $X_2$ , at 1 and 3% w/v) as emulsifier. Using an ULTRA-TURRAX® the oleous phase kept on agitation at 6000 or 12000 rpm ( $X_3$ ), while the aqueous phase was added by dripping, during 3.5 or 5 minutes ( $X_4$ ), in the presence or absence of porogen ( $X_5$ ), according to the Experimental Design. The obtained suspension was left in magnetic agitation for 24 h in order to evaporate the solvent. The particles were recovered by centrifugation and washed with chloroform, and then resuspended in an aqueous solution of mannitol at 5% (w/v), and lyophilized. Optimized particles were characterized by average size ( $Y_1$ ), Z-Potential ( $Y_2$ ), yield ( $Y_3$ ), and encapsulation efficiency ( $Y_4$ ), besides studies by FTIR, X-Ray Diffraction and DSC to evaluate their solid state and interactions. The release profile was performed in PBS (pH 6.6) as dissolution medium, at 37 °C, during 30 h, and data were mathematically modeled. Bioadhesion studies were carried out using mucin solutions and pig lung tissue. The aerolyzable properties of microparticles were also evaluated as dry powder formulations for inhalation and aerosol suspension to nebulization. To evaluate the antimicrobial efficacy, bacterial strains were used: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

The microparticles prepared according to the experimental design showed sizes from 63 to 539641

7 nm. Using the RSM, the optimal factor levels were predicted to obtain particles with size less than 5  $\mu\text{m}$  and the best encapsulation efficiency, so that the optimal

ones were prepared with 100 mg of azithromycin, which presented a size of  $1104.67 \pm 81.67$  nm, a Z-potential of  $-22.50 \pm 0.70$  mV, a yield of  $81.01 \pm 2.16\%$ , and encapsulation efficiency of  $42.17 \pm 8.36\%$ . Based on the FTIR analysis, findings evidenced no formation of new bonds in the drug-loaded particles. The pattern obtained from X-Ray Diffraction showed that the drug was amorphized when is incorporated into the particles. It was observed no significant interactions between components, when thermograms of DSC studies were analyzed, from this it was suggested that drug is molecularly dispersed in the micro-nanospheres. The microparticles presented an extended release because 95% of the drug was released in 24 h by a transport super case II mechanism, which means that erosion and swelling processes are involved. Microparticles interact with mucins, presenting a bioadhesion of  $54.9 \pm 4.5\%$  in lung tissue. When formulated as a dry powder inhalation, mixing with lactose, particles have good aerolyzation and a tapped density less than 0.4 g/mL that suggests they can be deposited inside the lung. When formulated as suspension to nebulize it was determined a MMDA less than 3  $\mu\text{m}$  and a GSD less than 2, confirming the narrow size distribution and a fine particle size, characteristics suitable for an efficient delivery of particles into the lungs. Azithromycin activity is not lost when incorporated into microparticles, however, larger MIC were obtained than free drug, because of the extended release offered by the particles.

It was possible to develop, characterize and evaluate biodegradable and bioadhesive microparticles of Gantrez® AN, encapsulating azithromycin under optimal conditions, with an adequate size to be administered by pulmonary route and enough encapsulation efficiency to administer a dose according to pneumonia therapy.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Además de la vía oral, también existen otras vías de administración de medicamentos, como la vía pulmonar o inhalatoria. Ésta vía presenta varias ventajas en comparación con la convencional (oral), por ejemplo: principalmente se evita el metabolismo de primer paso, se puede obtener un efecto local a nivel pulmonar o efecto sistémico ya que los fármacos pueden atravesar los capilares de los alveolos hacia el torrente sanguíneo, se pueden disminuir la dosis y la frecuencia de administración además de disminuir los efectos adversos, mientras que la absorción de fármacos es más rápida.

Por otro lado, la investigación farmacéutica se ha enfocado en el desarrollo de nuevos sistemas de administración para fármacos ya existentes, y en colaboración con la nanotecnología se han creado y propuesto novedosos sistemas como lo son las nanopartículas y micropartículas poliméricas biodegradables; las cuales son capaces de encapsular fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos, dependiendo la metodología empleada. Además de la encapsulación, estos sistemas presentan diversas ventajas como proteger el fármaco del ambiente externo, se mejora la solubilidad de la molécula activa, se puede obtener una liberación controlada, se puede dar una mejor biodisponibilidad del fármaco y al emplearse polímeros biodegradables no es necesario remover los sistemas del organismo, ya que tienen la capacidad de degradarse en moléculas que no interaccionan con componentes internos, y que entran a procesos metabólicos normales, por lo que no son tóxicos.

Una característica que presenta la vía pulmonar es que se encuentra recubierta por una capa de moco, con lo cual abre un nuevo campo de investigación, que es el desarrollo de nanopartículas y micropartículas poliméricas bioadhesivas, es decir, pequeños sistemas que son capaces de interactuar con la mucosa, brindándonos la ventaja de que pueden mantenerse fijos y liberar el fármaco en un sitio específico por un tiempo prolongado.

En este proyecto se desarrollaron y evaluaron MP's poliméricas biodegradables y bioadhesivas para la administración pulmonar de fármacos, un sistema enfocado para el tratamiento de una enfermedad que ocurre a nivel local, como la neumonía, ya que sigue formado parte de las principales causas de mortalidad en el país. Empleando como fármaco modelo la azitromicina, un antibiótico que, a pesar de no ser el indicado como tratamiento principal, forma parte del esquema de tratamiento de la enfermedad. Siendo un fármaco clase II, es decir de baja solubilidad y alta permeabilidad, las MP's también permitirían mejorar su solubilidad, biodisponibilidad y disminuir la dosis prescrita, así como los efectos secundarios que se presentan o la resistencia bacteriana.

Las MP's se obtuvieron por el método de emulsión/evaporación del disolvente, empleando un polímero bioadhesivo, biodegradable y biocompatible. Una vez obtenidas, estos sistemas se caracterizaron: por talla, potencial Z, morfología, interacción de los componentes por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), la estructura cristalina se evaluó por difracción de rayos X. Se evaluó la eficiencia de carga de las micropartículas, así como el perfil de liberación. También se evaluó el porcentaje de bioadhesión empleando tejido de pulmón de cerdo y por interacción de mucina. Se formularon las MP's como polvo seco para inhalación y como solución para nebulización, para estudiar sus propiedades aerolizables. Por último, se evaluó la eficacia de las partículas con estudios *in vitro* con diferentes cepas bacterianas.

## 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.

### 2.1 Los pulmones.

El “aire”, como lo mencionamos comúnmente, no sólo está compuesto de oxígeno y nitrógeno, sino que, además contiene gran cantidad de partículas que se encuentran suspendidas, que pueden ser sólidas, líquidas, orgánicas, inorgánicas, bacterias, virus, entre otros, y que forman parte del aire que respiramos en nuestra vida cotidiana.<sup>1</sup> Los pulmones son los órganos que se encargan del intercambio gaseoso y de suministrar oxígeno a todas nuestras células.

Los pulmones están compuestos en total de 5 lóbulos; 3 en el pulmón derecho y 2 en el pulmón izquierdo.<sup>2</sup> En el interior se componen de 23 generaciones de tubos o conductos ramificados (conocido como árbol traqueobronquial)<sup>3</sup>, los cuales van cambiando en cuanto a tipos de células (los 3 principales tipos de células son las ciliadas, basales y secretoras), el grosor de las vías y el líquido que las recubre (con un espesor desde 80 nm hasta 10 µm aproximadamente). La generación 0 se conoce como tráquea, posteriormente de la generación 1 hasta la 9 aproximadamente se denominan bronquios, de la generación 10 a la 16 se les conoce como bronquiolos conductores, estas 16 generaciones se conocen como **zona de conducción**. De la generación 17 a la 19 se encuentran los bronquiolos respiratorios, los cuales constituyen la **zona de transición**. Ya en la generación 20 se encuentran las aberturas alveolares, donde terminará en la generación 23 en donde se encuentran los sacos alveolares, toda esta región se conoce como **zona respiratoria** (ver Figura 1).<sup>3,4,5</sup> Poseen más de 300 millones de alvéolos, los cuales están revestidos por una red de capilares, siendo un total de 280 mil millones de capilares, dando lugar a una superficie aproximada de 50 a 140 m<sup>2</sup>.<sup>2,3</sup> La pared de los alveolos está compuesta por células epiteliales alveolares, conocidas como células alveolares tipo I y tipo II, estos últimos segregan un surfactante que ayuda a disminuir la tensión superficial en el alvéolo, además este surfactante facilita el intercambio gaseoso en la interfaz entre el epitelio alveolar y los capilares (distancia aproximada de 0.5 µm).<sup>2</sup>

		Generación	Diámetro, cm	Longitud, cm	Número	Área transversal total, cm <sup>2</sup>	
Zona de conducción	Tráquea	0	1.80	12.0	1	2.54	
	Bronquio	1	1.22	4.8	2	2.33	
		2	0.83	1.9	4	2.13	
	Bronquiolos	3	0.56	0.8	8	2.00	
		4	0.45	1.3	16	2.48	
		5	0.35	1.07	32	3.11	
6		0.25	0.8	64	3.84		
Zona de transición y respiración	Bronquiolos terminales	16	0.06	0.17	$6 \times 10^4$	180.0	
	Bronquiolos respiratorios	17	↓	↓	↓	↓	
		18	↓	↓	↓	↓	
		19	0.05	0.10	$5 \times 10^5$	$10^3$	
	Ductos alveolares	T <sub>3</sub>	↓	↓	↓	↓	
		T <sub>2</sub>	↓	↓	↓	↓	
		T <sub>1</sub>	↓	↓	↓	↓	
	Sacos alveolares	T	23	0.04	0.05	$8 \times 10^6$	$10^4$

Figura 1. Esquema del árbol traqueobronquial en el pulmón del ser humano, con sus respectivas dimensiones aproximadas.<sup>3</sup>

## 2.2 Vía inhalatoria para administración de fármacos.

Los pulmones son los órganos que están en contacto con el aire, lo que los hace susceptibles a desarrollar varias enfermedades, como infecciones respiratorias principalmente. Entre las enfermedades que afectan los pulmones se encuentran: el asma, la hipertensión pulmonar, el trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC), la fibrosis quística, neumonía, tuberculosis, el cáncer pulmonar, entre otros.<sup>2</sup>

Para contrarrestar la exposición de los pulmones al medio ambiente, estos poseen una capa protectora de moco que cubre todo el epitelio. El moco es un hidrogel compuesto principalmente de un 95% de agua, lípidos, sales inorgánicas, enzimas

y glicoproteínas, conocidas como mucinas (en una concentración de 2 a 5% p/v). La función principal del moco es la de proteger y eliminar moléculas extrañas que son inhaladas, también funciona como barrera para prevenir la pérdida de agua y humidificar el aire inhalado. Posee un pH neutro y su grosor varía de 15 a 55  $\mu\text{m}$  en toda la vía pulmonar. Las mucinas están codificadas por los genes *MUC*, actualmente se han identificado 21 genes *MUC*. Las mucinas se dividen en 2 familias: las mucinas asociadas a las membranas, que contribuyen a la señalización intracelular y la formación de la glicocálix, y las mucinas secretadas, que se encargan de formar el gel de moco. De los 21 genes que expresan a las mucinas, 14 se encuentran en las vías respiratorias.<sup>6,7,8</sup>

La administración de fármacos por vía inhalatoria se considera la vía de elección para el tratamiento de enfermedades pulmonares (agudas y crónicas), debido a que los pulmones poseen gran área superficial, alta permeabilidad, un amplio suministro de sangre y se evita el metabolismo de primer paso, en comparación con la vía oral.<sup>9,10</sup> Además de que los fármacos, en este caso antibióticos, se pueden administrar en menores dosis, con una rápida absorción y un efecto o respuesta terapéutica localizada, disminuyendo los efectos secundarios y la resistencia bacteriana.<sup>11</sup>

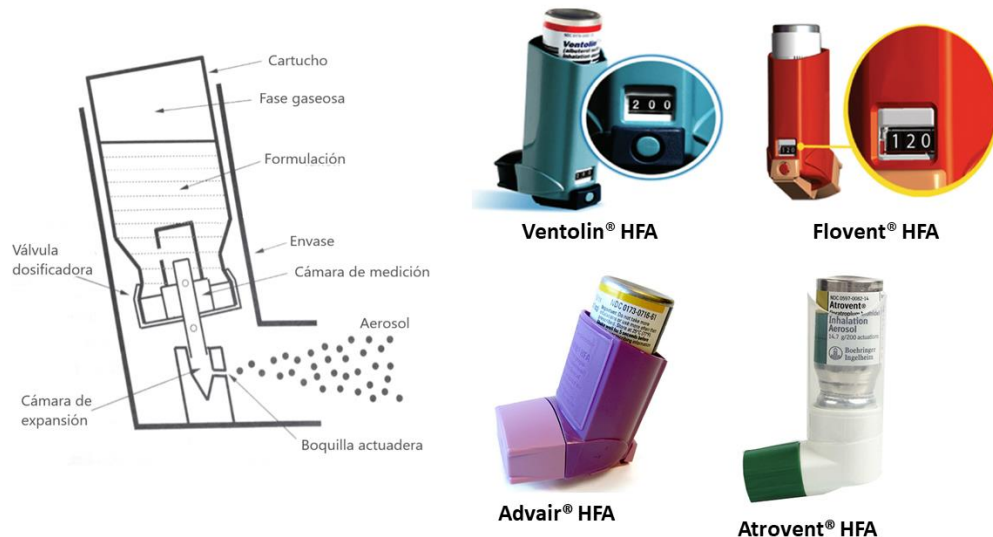
### **2.2.1 Dispositivos para la administración de fármacos a través de la vía pulmonar.**

Para poder administrar el fármaco por la vía inhalatoria, este puede formularse como polvo seco, una suspensión o una solución. Para cada formulación existe un dispositivo que permite dicha administración. De acuerdo con el tipo de dispositivo, existen 3 categorías principales para la administración de fármacos por vía inhalatoria:<sup>12</sup>

- **Inhaladores de cartucho presurizado (pMDI, en inglés).** Administran fármacos aerosolizados, el cual se encuentra en una fase líquida con un



volumen conocido que, al pulsarse, a temperatura ambiente y presión atmosférica pasa a fase gaseosa, emitiendo una dosis fija en cada pulsación, lo que permite una dosificación exacta. Se emplean desde el año 1950, originalmente empleaban como propelentes los clorofluorocarbonados (CFC), pero de acuerdo con el Protocolo de Montreal de 1987, en el que se prohíbe el uso de sustancias que dañan y agotan la capa de ozono, se eliminaron y se reemplazaron por los hidrofluoroalcanos (HFA). Con ello también se hizo un cambio en las formulaciones y válvulas, lo que permitió obtener tamaños de partículas más pequeños, además de integrar ahora un contador de inhalaciones restantes, lo cual permite al usuario alertarlo antes de que el inhalador se quede vacío (Figura 2).<sup>13</sup> El fármaco se encuentra en un tamaño de MMDA entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ . Las ventajas que presenta este dispositivo es que puede transportarse fácilmente debido a su pequeño tamaño, son baratos, se pueden administrar múltiples dosis y de manera consistente. La desventaja que presenta es la difícil sincronización para la dosificación y la inhalación del fármaco, lo que provoca que llegue una menor dosis a los pulmones (cerca del 10 a 20% de la dosis original).<sup>12</sup>



**Figura 2.** Inhaladores de cartucho presurizado (izquierda) y sus componentes. Ejemplos encontrados en el mercado con contadores de dosis (derecha).<sup>14</sup>

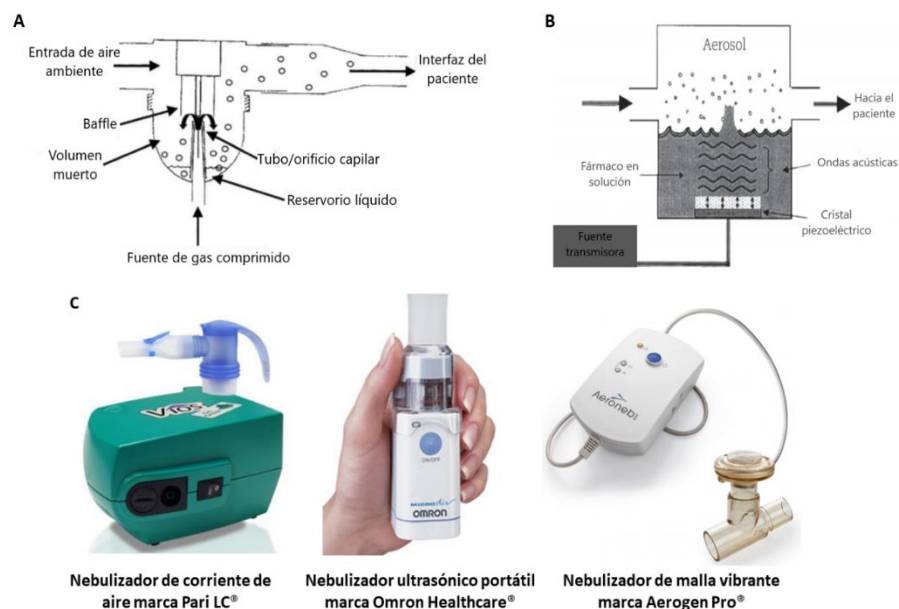
- Inhaladores de polvo seco (DPI, en inglés).** Administran fármacos en dosis individuales, en forma de polvo, el cual está contenido en cápsulas que deben pincharse antes de la administración, donde el polvo va hacia los pulmones por la fuerza de inhalación del paciente. Existen los inhaladores de polvo seco de dosis única y dosis múltiples, que se emplean desde 1970 y 1980, respectivamente (Figura 3). Las partículas tienen un tamaño de MMAD de entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ . Su principal ventaja es que no se requiere coordinación por parte del paciente, ya que, estos sólo se activan cuando el paciente inspira, además de que son compactos y portátiles. Las desventajas que se presentan son: que el paciente no percibe la introducción del fármaco en la vía respiratoria, perjudicando el cumplimiento del tratamiento y deben conservarse en un ambiente seco, ya que la humedad facilita la formación de aglomerados provocando que el canal se obstruya impidiendo la liberación del fármaco.<sup>11,12,13</sup>



**Figura 3.** Diferentes tipos de inhaladores de polvo seco existentes en el mercado internacional.<sup>14</sup>

- Nebulizadores.** Permiten administrar dosis elevadas de fármacos, ya sea que se administre una o varias sustancias en una misma solución. Generan

partículas de aerosol con ayuda de una corriente de gas a alta velocidad, que puede ser aire, oxígeno o con un cristal piezoeléctrico de rápida vibración (Figura 4). Las ventajas que presentan estos dispositivos son que, al tratarse de sólo inspiraciones, puede usarse en pacientes que no tengan la capacidad de coordinación y como no se necesita una técnica de inspiración puede emplearse en pacientes de cualquier edad. La desventaja de estos dispositivos es que algunos tienden a ser grandes y voluminosos, además de que necesitan por lo regular una fuente de energía externa para su funcionamiento. El tiempo de administración del medicamento es más prolongado comparado con los otros dispositivos existentes y presentan grandes pérdidas del fármaco, ya que se ha estimado que con los dispositivos más antiguos solo el 10% de la dosis inicial llega a inspirarse y depositarse eficazmente en los pulmones, pero con los dispositivos actuales se estima que el 60% de la dosis llega a los pulmones.<sup>12,13</sup>



**Figura 4.** A) Esquema del funcionamiento de un nebulizador de corriente de aire. B) Esquema de funcionamiento de un nebulizador ultrasónico. C) Ejemplos de nebulizadores en el mercado.<sup>14</sup>

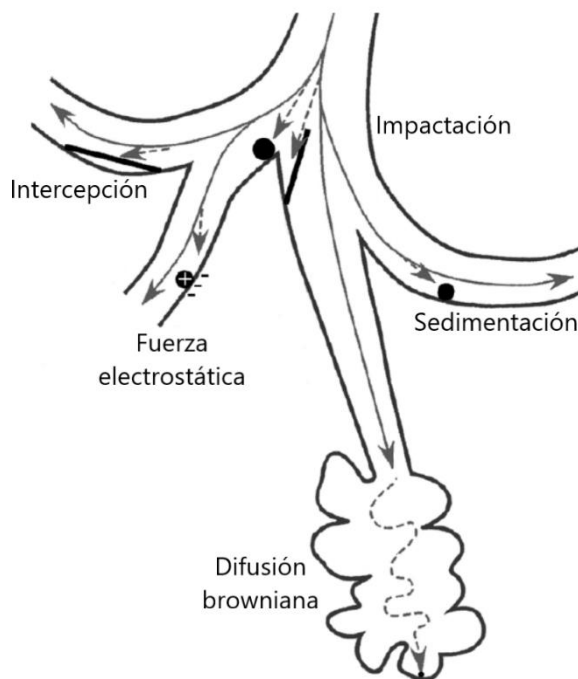
### 2.2.2 Deposición pulmonar.

Una vez que las partículas entran a los pulmones, estas se depositarán en diferentes regiones de las vías respiratorias, para ello se definen 5 mecanismos diferentes de deposición de partículas en los pulmones, los cuales están dados por la diámetro de masa media aerodinámica (MMAD por sus siglas en inglés), que es el diámetro en el que el 50% de la masa del aerosol es más pequeña y el otro 50% es más grande que el parámetro mencionado,<sup>15</sup> la forma de las partículas y si presentan alguna carga electrostática, en la Figura 5 se representa cada uno de los mecanismos descritos a continuación:

- \* **Impactación.** Este mecanismo se observa generalmente para inhaladores de polvo seco (IPS) e inhaladores de dosis medidas (MDI) con tamaños de partícula de masa media de diámetro aerodinámico (MMAD) mayores a 5  $\mu\text{m}$ , en donde las partículas de aerosol pasan a través de la orofaringe a alta velocidad y con suficiente impulso que, cuando entra a las vías respiratorias se mantiene su trayectoria sin importar como vaya cambiando la dirección de la corriente de aire, chocando así con la pared respiratoria y depositándose en las regiones de la orofaringe.<sup>2,15</sup>
- \* **Sedimentación.** En este mecanismo la fuerza gravitacional es la responsable de la deposición de las partículas, ya que va a depender de las maniobras de respiración del paciente para que las partículas tengan mayor tiempo para sedimentarse, por ejemplo conteniendo la respiración, esto ocurre principalmente en la región de los bronquiolos, aunque algunas veces también pueden llegar hasta los alvéolos, se da principalmente con partículas con tamaños entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$ .<sup>2,15</sup>
- \* **Difusión.** En este mecanismo los movimientos brownianos son los responsables de la deposición de las partículas. Las moléculas que están en el tensioactivo pulmonar acuoso provocan un movimiento aleatorio de las partículas cuando entran en contacto con dichas moléculas, dando lugar a la

difusión de la partícula en la región alveolar, esto ocurre con partículas menores a  $0.5 \mu\text{m}^2$

- \* **Fuerza electrostática.** Este mecanismo se da cuando las partículas poseen carga opuesta a la que se presenta en las vías respiratorias.<sup>16</sup>
- \* **Intercepción.** Este mecanismo implica que la deposición se da cuando una partícula presenta forma alargada o de fibra y uno de sus extremos toca la pared de las vías respiratorias, principalmente influenciado por la fuerza de gravedad.<sup>16</sup>

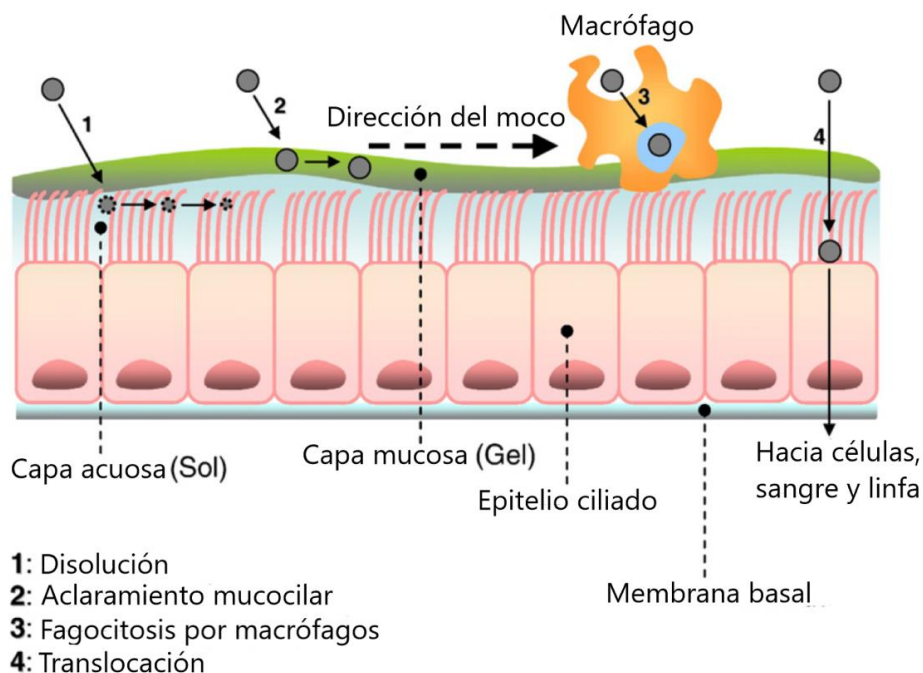


**Figura 5.** Mecanismos de deposición de partículas en el interior de los pulmones.<sup>17</sup>

Se ha descrito que, para lograr un suministro exitoso de partículas en los pulmones, es que estas deben tener un MMAD de entre 1 y 3  $\mu\text{m}$ . Cuando las partículas miden menos de 1  $\mu\text{m}$  pueden ser exhaladas hasta en un 80% después de la inspiración. Además de la influencia del tamaño, existen otros factores que afectan la deposición pulmonar: a) el tamaño de la gota/partícula formada por el dispositivo empleado para la administración, b) la densidad (en caso de polvo seco), c) la anatomía de las vías respiratorias, d) el estado de salud del paciente y e) el patrón de respiración (la contención de la respiración y el flujo respiratorio).<sup>18</sup>

### 2.2.3 Eliminación de partículas.

Una vez que las partículas son depositadas en los pulmones se encuentran con una gran variedad de barreras fisicoquímicas y biológicas. Existen varias vías de eliminación de partículas y sustancias exógenas en el interior de los pulmones, se podrían mencionar la tos, disolución, aclaramiento mucociliar, fagocitosis por macrófagos y translocación (Figura 6).<sup>19</sup>



**Figura 6.** Vías de eliminación de partículas depositadas en los pulmones.<sup>19</sup>

En el caso de la eliminación por disolución, va a depender del sitio de deposición y la cantidad de volumen de fluidos en las vías respiratorias. Si la partícula es soluble en agua, se disolverá fácilmente en la capa acuosa, donde puede ser absorbida hacia torrente sanguíneo o linfa, este proceso se lleva a cabo de 10 a 20 min, dependiendo las características fisicoquímicas de la molécula, por otro lado, también puede ser eliminada por medio del aclaramiento mucociliar.<sup>19</sup>

La eliminación por aclaramiento mucociliar ocurre en las vías respiratorias ciliadas; desde la tráquea hasta los bronquios, sobre las cuales se encuentra la capa acuosa y posteriormente la capa de moco. Debido al movimiento de los cilios se da el movimiento de la capa de mucosa, la cual transporta las partículas atrapadas en ella hacia la faringe/laringe, donde el moco es tragado hacia el tracto gastrointestinal o puede ser expulsado por medio de la tos. Esto dependerá del número de cilios, la cantidad y la calidad del moco, así como por el tamaño de las partículas, ya que, se ha observado que partículas grandes son eliminadas de los bronquiolos en 24 h, mientras que las partículas pequeñas menores a 100 nm son eliminadas completamente en 10 días.<sup>19</sup>

A nivel alveolar se encuentran los macrófagos alveolares, que son los responsables de la eliminación de partículas extrañas por medio de fagocitosis, donde las partículas serán desintegradas (por la presencia de enzimas en el lisosoma formado) o pueden acumularse en el sistema linfático, terminando en los ganglios mediastinales o hiliares, ya que aquí no ocurre el proceso de aclaramiento mucociliar. Esta eliminación se lleva a cabo de 6 a 12 h después de que las partículas se depositan en el alvéolo.<sup>19</sup>

Existe otro mecanismo llamado "Translocación" en el cual, las partículas transitan en las células epiteliales por el intersticio hacia el torrente sanguíneo o hacia sistema linfático (la cual es facilitada debido a los macrófagos). Se cree que el transporte está mediado por proteínas, las cuales reconocen a las partículas, uniéndose a ellas y así facilitar su reconocimiento por parte de los receptores celulares. Dependiendo la naturaleza de la partícula, es decir, el material con la que esté fabricada, estas pueden internalizarse en las células y unirse a mitocondrias o al núcleo. En caso de

que la partícula transite al torrente sanguíneo puede ser transportada hacia cualquier órgano y causar efectos no deseados, como la acumulación de plaquetas, inflamación, estrés oxidativo, citotoxicidad y respuestas inmunológicas. Se ha observado que por este mecanismo las partículas se distribuyen a todo el organismo después de 1 h de haberse inhalado.<sup>19</sup>

Otro factor que ayuda a la eliminación de partículas en el pulmón son las enzimas catabólicas, por ejemplo, las isoformas CYP2S y CYP2F se han identificado que son específicas para el área pulmonar, así como algunas esterasas y peptidasas, localizadas en la región traqueobronquial, en donde, moléculas pequeñas como los péptidos pueden estar sujetos a degradación enzimática. Se ha informado que las partículas que logran asentarse en el pulmón periférico tienen un tiempo de residencia de aproximadamente 24 h en un paciente adulto sano.<sup>2,20,21</sup>

### **2.3 Neumonía en México.**

La neumonía forma parte de las 30 causas de mortalidad a nivel mundial. A pesar de que actualmente existan varias herramientas y métodos de prevención y diagnóstico para esta enfermedad, sigue siendo un problema de salud pública en México.<sup>22</sup>

La Organización Mundial de la Salud define la neumonía como una infección de los pulmones provocada por una gran variedad de microorganismos adquiridos fuera del ámbito hospitalario y que determinan la inflamación del parénquima pulmonar y de los espacios alveolares. La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es aquella patología que adquiere la población en general y se desarrolla en una persona no hospitalizada o en los pacientes hospitalizados que presentan esta infección aguda en las 24 a 48 horas siguientes a su hospitalización.<sup>22</sup>

De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social, la incidencia de esta enfermedad oscila entre 1.6 y 13.4 casos por 1000 habitantes/año, esto también dependerá del área geográfica.<sup>23</sup>



En un comunicado de prensa del INEGI sobre “Características de las defunciones registradas en México durante el 2017”, publicado apenas el 31 de octubre de 2018, coloca a la neumonía y la influenza en la posición número 9 de las principales causas de muerte, con un total de 21 892 casos, dentro de esta cifra las personas mayores a 65 años representan el 64.9%. En cuanto a los menores de 10 años, la neumonía se ubica entre las 5 principales causas de muerte.<sup>24</sup> Por otro lado, hasta la semana número 51, que corresponde del 16 al 22 de diciembre de 2018, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, registró un total de 110 245 casos de neumonías y bronconeumonías en el país.<sup>25</sup>

Los síntomas más frecuentes que presenta una persona que padece neumonía son: fiebre (con o sin escalofríos), tos (con o sin esputo), dificultad para respirar, dolor de pecho, crujido sobre la región afectada, egofonía (alteración de la voz) y leucocitosis polimorfonuclear.<sup>26</sup>

La neumonía puede clasificarse de acuerdo con el agente causal (por ejemplo; neumonía bacteriana, atípica relacionada a microorganismos poco frecuentes, vírica y hongos), afectación anatomopatológica (lobar, bronconeumonía y neumonía necrotizante), tipo de huésped (inmunocompetente e inmunodeprimido) y el ámbito de adquisición (adquirida en la comunidad y adquirida en el hospital).<sup>27</sup>

### **2.3.1 Tratamiento de la neumonía.**

En el caso de NAC causada por bacterias, las más frecuentes son el *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, bacilos Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros.<sup>28</sup>

En la mayoría de los casos, la bacteria predominante en la NAC bacteriana es *Streptococcus pneumoniae*, ya que, de cada tres neumonías bacterianas, dos corresponden a dicha bacteria. En cuanto a *Haemophilus influenzae*, se estima que causa del 3 al 15% de los casos de NAC. Para el *Staphylococcus aureus*, esta

bacteria causa del 2 – 5% de los casos de NAC, principalmente cuando la neumonía es grave y es presentada por ancianos y pacientes con gripe, cuanto más grave es la enfermedad más frecuente será la presencia de *S. aureus*. En el caso de *K. pneumoniae* provoca NAC cuando el paciente presenta alguna comorbilidad como EPOC, asma, diabetes, alcoholismo o estuvieron bajo tratamiento con antibiótico previamente, con una prevalencia de 2 a 11% y una tasa de mortalidad aproximada del 50%, según la terapia actual, junto con *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>22,27</sup>

Actualmente existen muchas guías para el tratamiento de la NAC para seleccionar el mejor tratamiento con antibiótico de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, el patógeno principal y el tipo de paciente. Por ejemplo, una NAC no tan grave la presentan regularmente jóvenes y sin otras enfermedades, esta es causada comúnmente por neumococo o microorganismos atípicos, por lo que, se indica como tratamiento amoxicilina y azitromicina, y como alternativa el uso de una quinolona. En pacientes que presenten una NAC grave, los patógenos asociados comúnmente son *H. influenzae* y bacilos Gram negativos, indicándose como tratamiento un beta-lactámico (como ceftriaxona o amoxicilina con ácido clavulánico) junto con un macrólido. En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestra el tratamiento principal de acuerdo con el tipo de microorganismo aislado.<sup>29</sup>

**Tabla 1.** Tratamiento indicado para la NAC de acuerdo con el microorganismo aislado.<sup>29</sup>

Microorganismo aislado	Tratamiento recomendado
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Elección: amoxicilina Alternativa: quinolona
<i>Legionella pneumophila</i>	Elección: quinolona Alternativa: azitromicina
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Elección: macrólido Alternativa: tetraciclinas*
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	Elección: linezolid Alternativas: vancomicina o ceftarolina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Betalactámico antipseudomónico** ± amikacina Alternativa: quinolona
<i>Virus influenza</i>	Ceftriaxona + macrólido + oseltamivir Alternativa: quinolona + oseltamivir
* En áreas con porcentajes elevados de resistencia a los macrólidos. ** Según el resultado del antibiograma.	

En la Tabla 2, se muestra una comparación del tratamiento de la NAC de acuerdo con diferentes guías clínicas y el tipo de paciente (si presenta o no comorbilidades).

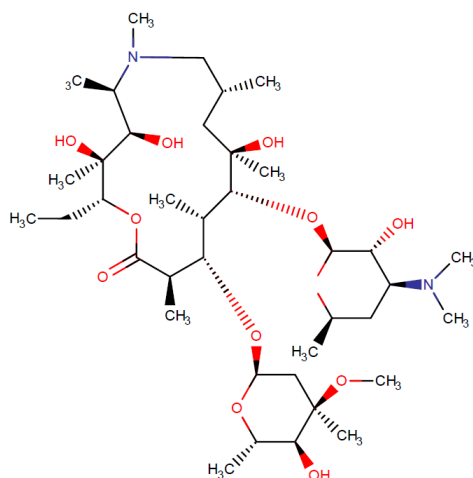
**Tabla 2.** Tratamiento de la NAC de acuerdo con diferentes guías clínicas.<sup>30</sup>

	Norteamericana (IDSA/ATS)		Europea		Británica (NICE)	
	Terapia de elección	Alternativa	Terapia de elección	Alternativa	Terapia de elección	Alternativa
<b>Sin comorbilidades</b>	Macrólido	Doxiciclina	Amoxicilina	Macrólido	Amoxicilina	Macrólido o tetraciclina
<b>Con comorbilidades</b>	Beta-lactámico ± macrólido	Fluorquinolona	Aminopenicilina ± macrólido	Fluorquinolona		

## 2.4 Azitromicina.

En este proyecto se utilizó la azitromicina como fármaco modelo, ya que es uno de los antibióticos que se prescriben para el tratamiento de NAC, aunque no es de primera elección, puede servir como modelo para ser encapsulado en micro-nanopartículas de Gantrez con la idea de que puedan ser utilizadas para otros tipos de fármacos que presenten características parecidas a la azitromicina, así como para mejorar el tratamiento cuando se combina con los antibióticos principales indicados para la enfermedad.

La azitromicina es un antibiótico de la familia de los macrólidos, es un derivado semisintético de la eritromicina, se diferencia de este por la adición de un átomo de nitrógeno sustituido con un metilo en el anillo de lactona (Figura 7). Es usado principalmente para el tratamiento de infecciones respiratorias, otitis media, infecciones genitales, en la terapia de prevención de la endocarditis bacteriana en pacientes sometidos a procedimientos dentales, infecciones dermatológicas y de tejidos blandos.<sup>31,32</sup>



**Figura 7.** Estructura de azitromicina.<sup>32</sup>

Tiene un pKa de 8.74, posee una solubilidad de 0.01 mg/mL, un LogP de 4.02 y de acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica es clase II, es decir presenta baja solubilidad pero alta permeabilidad.<sup>33</sup> Existe en 3 fases: anhidra, monohidrato

y dihidrato, siendo el dihidrato la fase más estable del fármaco. En la siguiente tabla se muestra la fórmula empírica, el peso molecular y el número CAS de cada fase respectivamente.<sup>31</sup>

**Tabla 3.** Fases de AZT junto con su fórmula empírica, peso molecular y número CAS.<sup>31</sup>

Forma de azitromicina	Fórmula empírica	Peso molecular (g/mol)	Número CAS
Anhidra	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	748.98	83905-01-5
Monohidrato	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}H_2O$	767.02	121479-24-4
Dihidrato	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}2H_2O$	785.00	117772-70-0

La azitromicina presenta un espectro antimicrobiano contra patógenos como *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis* y otros microorganismos como *Campylobacter*, *Chlamydia trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.<sup>34</sup> En cuanto a su mecanismo de acción, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en la subunidad ribosomal 50S de los ribosomas 70S bacterianos, dicha unión inhibe la actividad de la peptidil transferasa e interfiere con la translocación de aminoácidos en el proceso de traducción.<sup>32,35</sup>

Al administrarse por vía oral, la azitromicina al ser absorbida se distribuye ampliamente en todo el cuerpo, excepto en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo. Al administrarse por vía oral una dosis de 500 mg, la concentración plasmática máxima es de 0.4 µg/mL y aparece de 2 a 3 h después. Cuando se administra una dosis de 250 mg/día durante 4 días, la concentración plasmática se mantiene en 0.24 µg/mL. Presenta una biodisponibilidad oral de 37% aproximadamente, un volumen de distribución de 31.1 L/kg y un aclaramiento renal de 630 mL/min. Debido a que el fármaco es absorbido por todos los tejidos y posteriormente es liberado de estos lentamente es por lo que se sugiere que presenta una vida media prolongada

de 68 h. Se sugiere que el fármaco presenta metabolismo hepático y se elimina principalmente por excreción biliar y sólo el 12% del fármaco se elimina sin cambios a través de la orina.<sup>31,32,35</sup>

Dentro de los efectos secundarios que se presentan al administrar azitromicina son mareos, náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, flatulencia, dolor de cabeza y trastornos del gusto y olfato, raramente se presenta estreñimiento, ansiedad, agitación y los potencialmente graves pueden ser angioedema e ictericia colestásica.<sup>31,35</sup>

#### **2.4.1 Formas farmacéuticas de azitromicina.**

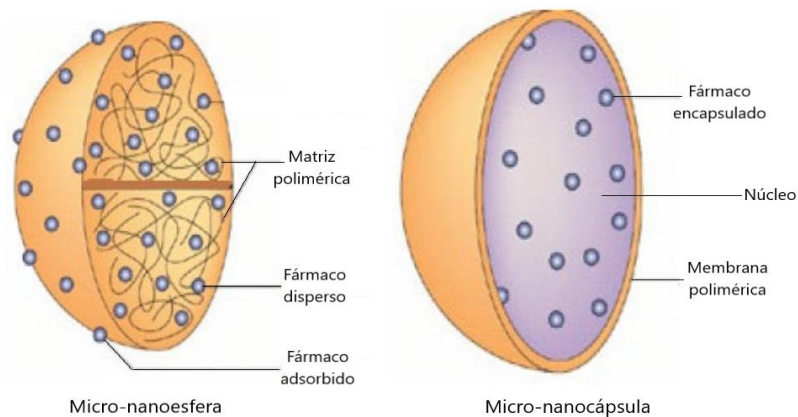
Actualmente en el mercado existen alrededor de 370 formas farmacéuticas de azitromicina entre patentes y genéricos, que corresponden a tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas, suspensiones, gránulos para suspensión, gotas oftálmicas y polvo liofilizado para inyección. Con dosis que van desde los 200 mg hasta los 2 g, para administrarse por vía oral, intravenosa y oftálmica, por lo que no existe en el mercado una formulación que se administre por vía pulmonar.<sup>32</sup>

Existen varios estudios sobre desarrollo de partículas encapsulando la azitromicina, empleando polímeros biodegradables como el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) o el ácido poli-L-láctico (PLLA), donde logran encapsular menos del 60% del fármaco, realizan perfiles de liberación *in vitro* observando que logran obtener una liberación sostenida hasta 24 h y evalúan las partículas contra diferentes bacterias, observando que el fármaco encapsulado es más efectivo que el fármaco solo.<sup>36, 37, 38</sup> Todo lo anterior justifica que la actividad de AZT puede ser mejorada si se formula en una micropartícula, lo cual permitirá una mayor eficiencia comparada con las formulaciones presentes en el mercado.<sup>39</sup>

## 2.5 Sistemas de liberación de fármacos basados en partículas poliméricas.

En los últimos años, a raíz del surgimiento de la nanotecnología y con esta la nanomedicina, la investigación se ha centrado en el desarrollo de nuevos y eficientes sistemas de suministro de fármacos, especialmente en el desarrollo de sistemas micro- y nanoparticulados, como los puntos cuánticos, dendrímeros, liposomas, microesferas, entre otros, destacando las micro y nanopartículas poliméricas. En el caso de las nanopartículas estas se encuentran en el rango “nano” con tamaño de entre 10-1000 nm, por otro lado, las micropartículas comprenden el rango de tamaño de entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$ .

Estas partículas están formadas por una matriz polimérica, en la cual se encuentra el fármaco. Se distinguen dos tipos de partículas en ambas escalas (nanómetros y micrómetros): las nanoesferas y las microesferas (micro-nanoesferas), y por otro lado las nanocápsulas y las microcápsulas (micro-nanocápsulas) (Figura 8). El fármaco se puede encontrar de varias maneras en la partícula, ya sea como una mezcla con la matriz polimérica o en el centro y forme el núcleo de la partícula, mientras que el polímero se encuentra rodeándolo. Destacando las micro-nanoesferas, actualmente existe mucha investigación de micro-nanoesferas poliméricas encapsulando fármacos y moléculas para administración por vía pulmonar, algunos ejemplos son; microesferas de quitosán encapsulando docetaxel para el tratamiento de cáncer de pulmón, las cuales pueden distribuirse ampliamente en los pulmones<sup>40</sup>; nanoesferas de PLGA encapsulando rifampicina para el tratamiento de tuberculosis, las cuales presentan mejor actividad antimicrobiana *in vitro* comparado con el fármaco solo<sup>41</sup>; microesferas de PLLA encapsulando insulina las cuales poseen buenas propiedades aerolizables y una liberación sostenida durante 24 h<sup>42</sup>, entre otros.



**Figura 8.** Representación esquemática de micro-nanoesferas y micro-nanocápsulas.<sup>43</sup>

Algunas de las razones para encapsular los fármacos, es que, se puede presentar una liberación controlada, se protege al fármaco de sufrir degradación por cualquier agente en el ambiente externo, se enmascaran las propiedades organolépticas y se facilita el manejo de compuestos cuando son tóxicos.<sup>44</sup>

Las partículas poliméricas están hechas de polímeros naturales y/o sintéticos, con buenas propiedades de biodegradación, alta estabilidad *in vitro* e *in vivo* y biocompatibilidad, como por ejemplo el ácido (Poli-láctico-co-glicólico) (PLGA), quitosano, alginato, Carbopol®, gelatina, entre otros.

El encapsulamiento de antibióticos en micro-nanosistemas ha llamado la atención debido a que la liberación del fármaco es más lenta y sostenida, mejorando la farmacocinética, disminuyendo la dosis, la frecuencia de administración, y los efectos no deseados, ayudando en la biodistribución, la resistencia bacteriana y la terapia, lo cual podría impactar de forma directa en la calidad de vida de los pacientes que presentan cuadros de neumonía.<sup>45, 46</sup>



### **2.5.1 Procesos para desarrollar micropartículas poliméricas.**

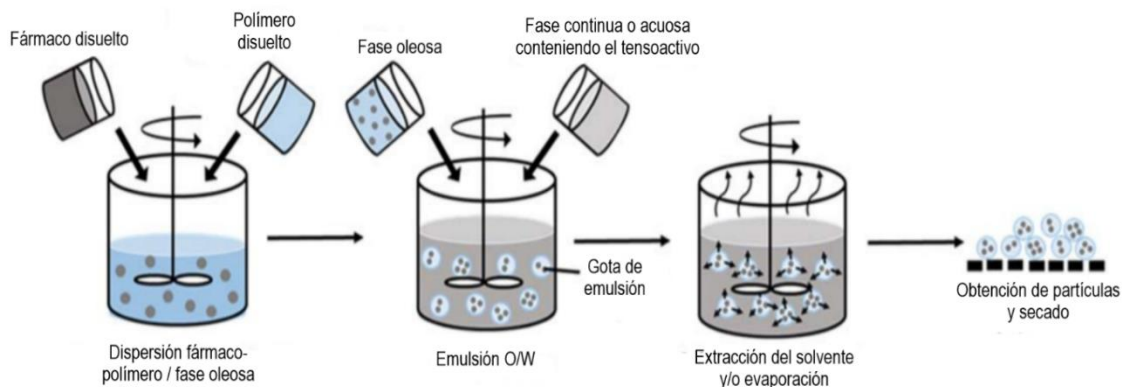
Existen varios métodos para producir partículas poliméricas, esto dependerá de las características fisicoquímicas del fármaco y las propiedades del polímero, considerando como el factor más importante la interacción entre el fármaco y el polímero, tomando en cuenta también los disolventes a emplear.<sup>47</sup>

Para la preparación de nanopartículas y micropartículas es preferible utilizar polímeros preformados (naturales o sintéticos) en lugar de los monómeros de los polímeros, ya que así se evita la presencia de residuos y contaminaciones potencialmente tóxicos que puedan quedar después de los procesos de reacción y purificación, así como evitar obtener polímeros con un rango de peso molecular muy heterogéneo.<sup>48</sup>

Algunos métodos para preparar partículas son los siguientes:

- **Método de emulsión evaporación/extracción del solvente.**

Este método consiste en 2 pasos; el primero en formar una emulsión simple: agua en aceite (w/o) o emulsiones dobles, por ejemplo: agua en aceite con agua (w/o/w) y viceversa en ambos casos. Generalmente en la fase orgánica se disuelve el polímero junto con el principio activo en un disolvente volátil, el cual se emulsifica en una fase acuosa que contiene el tensoactivo, para ello se requiere la aplicación de energía externa, como la homogenización a alta velocidad o ultrasonificación. El segundo paso consiste en evaporar o extraer solvente, esto se puede hacer en condiciones de agitación magnética a temperatura ambiente o bajo presión reducida, lo que inducirá la precipitación del polímero con el fármaco en su interior. Posteriormente, las partículas se obtienen por ultracentrifugación y se lavan con agua para eliminar restos de tensoactivo, para después ser liofilizadas (Figura 9).<sup>49,50</sup>



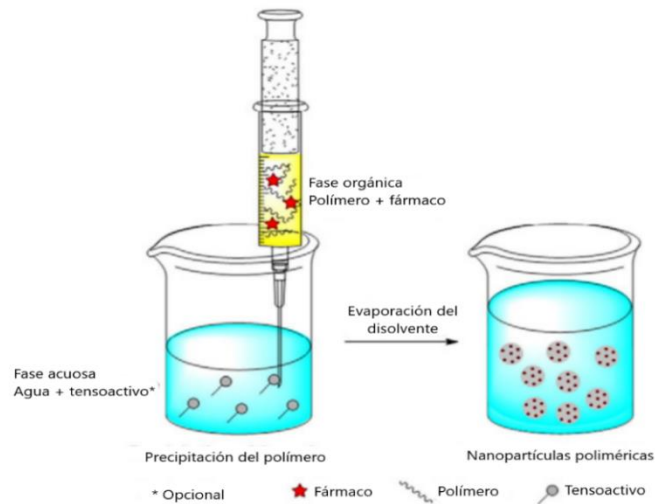
**Figura 9.** Esquema del proceso para desarrollar MP's por emulsión- evaporación/extracción del solvente.<sup>51</sup>

Algunas de las ventajas que presenta el producir partículas por este método son: el obtener un amplio rango de tamaños desde pequeñas hasta grandes, ya que esto se obtiene al modificar las condiciones de velocidad y agitación. Dependiendo del tipo de emulsión simple o doble, pueden encapsularse principios activos hidrofóbicos e hidrofílicos.<sup>52,53</sup>

- **Nanoprecipitación por inyección.**

Este método se conoce también como desolvatación o desplazamiento de solvente. Se basa en la deposición interfacial del polímero y el fármaco disueltos en una fase orgánica, la cual se agregará a una fase acuosa, gota a gota bajo agitación constante, donde se producirá el desplazamiento de la fase orgánica, lo que dará lugar a la precipitación del polímero junto con el fármaco, dando como resultado la formación de las partículas instantáneamente, esto ocurre debido a la disminución de la tensión interfacial entre las fases. Como disolventes orgánicos se emplean aquellos que son miscibles en agua (por ejemplo: acetona, etanol, metanol, entre otros) y pueden ser eliminados fácilmente por evaporación, el más usado es la acetona. También se pueden emplear mezclas binarias de disolventes para la fase orgánica, esto siempre que

se mantengan las condiciones de solubilidad y miscibilidad entre los componentes de las fases. Por otro lado, se puede hacer uso de tensoactivo, el cual se disuelve en la fase acuosa, esto para dar estabilidad a la suspensión coloidal (Figura 10).<sup>50,54,55,</sup>



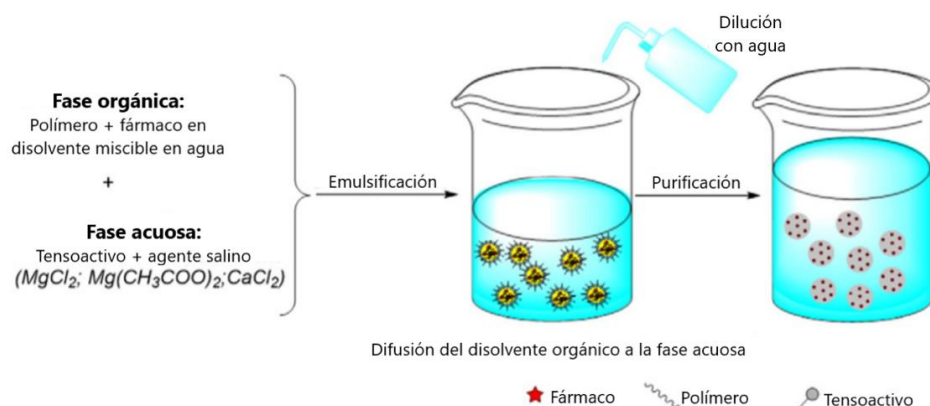
**Figura 10.** Esquema del proceso para desarrollar MP's por nanoprecipitación por inyección.<sup>55</sup>

Algunas ventajas que presenta este método son que se puede aplicar a una gran variedad de polímeros, péptidos, ciclodextrinas y fármacos anfífilicos, no se requiere el uso de material especializado, se pueden obtener MP's con un tamaño definido y una distribución de tamaño estrecha.<sup>50,54,55,</sup>

- **Salting-out.**

Este método consiste en emplear disolventes miscibles en agua para disolver el polímero y el fármaco, el más empleado es la acetona, el cual forma la fase orgánica. Por otro lado, para la fase acuosa se utiliza agua junto con el agente salino (los agentes más usados son: cloruro de magnesio, cloruro de calcio y acetato de magnesio) en una alta concentración para evitar que la acetona se mezcle con la fase acuosa y empleando un tensoactivo para dar estabilidad a la

suspensión coloidal. La emulsión resultante se obtiene principalmente por el efecto Ouzo o de emulsión espontánea, donde no es necesario emplear una fuerza de cizallamiento alta. Posteriormente se agrega un gran volumen de agua a la emulsión, provocando que la acetona difunda en la fase acuosa, lo que conduce a la precipitación del polímero, induciendo así la formación de las partículas (Figura 11). Para poder recuperar las partículas y eliminar el agente salino se emplea la técnica de filtración por flujo cruzado.<sup>49,50,55</sup>



**Figura 11.** Esquema del proceso para desarrollar MP's por salting-out.<sup>55</sup>

Algunas ventajas de este método son que no se necesita la aplicación de calor para la eliminación de las sales, por lo que puede emplearse para encapsular fármacos o moléculas sensibles al calor, se evita el uso de disolvente clorados, los cuales son tóxicos para el ser humano y el medio ambiente.<sup>49,50,55</sup>

## 2.6 De la bioadhesión a la mucoadhesión.

Una característica que se encuentra en investigación es la administración de partículas en zonas con mucosa, por lo que se busca desarrollar sistemas mucoadhesivos para así disminuir la dosis y efectos secundarios, asegurando el cumplimiento terapéutico. Para ello se emplean polímeros bioadhesivos. Rodríguez,

I.C. (2000) describe la bioadhesión como: “la capacidad de ciertas macromoléculas sintéticas o biológicas, de adherirse a los tejidos de organismos vivos”. Teniendo en cuenta que la mayoría de las regiones del organismo donde se administran fármacos están revestidas por una capa de mucus, el término se modifica a “mucoadhesión”. Por lo que el objetivo de los sistemas mucoadhesivos es mantenerse fijos en el lugar donde se pretende realizar la liberación y/o absorción del fármaco, prolongando el tiempo de permanencia.<sup>56</sup> Algunas ventajas que se tienen al usar sistemas bioadhesivos son:

- Reducción de la frecuencia de administración del fármaco, esto debido a que el sistema permanece más tiempo en la mucosa y hay una liberación controlada en el sitio de interés.
- Biodisponibilidad mejorada con una menor concentración, debido a un tiempo de contacto prolongado.
- Se evita el metabolismo de primer paso.
- Se previene la degradación enzimática de proteínas y péptidos, debido a la alta intimidad que hay entre el sistema de liberación y la superficie de absorción.<sup>57</sup>

Los sistemas mucoadhesivos pueden administrarse por varias rutas, como por ejemplo la vía ocular, nasal, bucal, pulmonar, vaginal y rectal. Para su desarrollo se emplean polímeros bioadhesivos, en la mayoría de los casos son biodegradables y presentan baja toxicidad. En la Tabla 4 se mencionan algunos polímeros bioadhesivos y su respectiva fuerza de bioadhesión, que se emplean para el desarrollo de partículas mucoadhesivas.<sup>58</sup>

**Tabla 4.** Polímeros bioadhesivos empleados en el desarrollo de partículas.<sup>58</sup>

Polímero	Fuerza de bioadhesión
Carboximetilcelulosa de sodio	Excelente
Carbopol®	Excelente
Policarbofil	Excelente
Alginato de sodio	Excelente
Hidroxipropilmetilcelulosa	Excelente
Poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico)	Muy buena
Goma karaya	Muy buena
Gelatina	Muy buena
Goma guar	Muy buena
Pectina	Buena
Quitosano	Buena

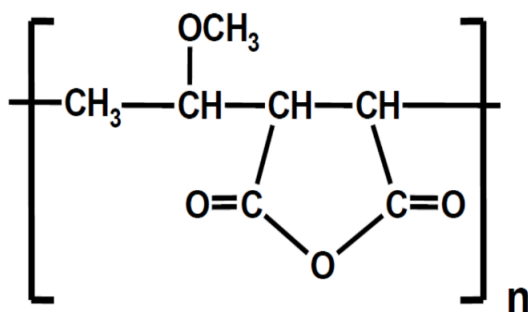
Se ha definido que los polímeros bioadhesivos/mucoadhesivos deben poseer las mismas características y deben actuar como un sistema de administración de fármacos. De acuerdo con Vinod et al. (2012) y Sudhakar et al. (2006), un polímero bioadhesivo ideal debe tener las siguientes características:

- Debe hincharse en el ambiente biológico acuoso del sitio de absorción.
- Debe interactuar con los componentes del moco para tener una buena adhesión.
- Debe permitir la liberación del fármaco cuando se hincha.
- Se debe de eliminar o degradar en monómeros u oligómeros no tóxicos, no irritantes, no absorbibles e inactivos.
- Debe poseer cantidad suficiente de grupos químicos para formar enlaces de hidrógeno.
- Debe poseer flexibilidad en su cadena.
- Debe tener una buena tensión superficial para inducir su extensión en el moco.
- Debe resistir la descomposición durante su almacenamiento.<sup>58</sup>

### 2.6.1 Poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico)

Entre los polímeros empleados en la industria farmacéutica, otros de gran interés son los polianhídridos, ya que al igual que los polisacáridos y los poliésteres, son biodegradables.<sup>59</sup>

El copolímero usado en este proyecto es el poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico) conocido comercialmente como Gantrez® AN, es un polianhídrido que contiene unidades alternadas de metil vinil éter y anhídrido maleico (Figura 12)<sup>60</sup>, es empleado en la industria farmacéutica debido a sus propiedades adhesivas, biocompatibles, biodegradables y de baja toxicidad oral (DL<sub>50</sub> en conejillos de indias: 8 a 9 g/kg), se emplea como agente espesante, de suspensión, adhesivo para dentaduras postizas, adyuvante para parches transdérmicos y como protector de fármacos contra la degradación. Recientemente se ha recurrido su uso para la fabricación de micropartículas y/o nanopartículas bioadhesivas para administración oral principalmente.<sup>61,62,63</sup> Físicamente es un polvo blanco higroscópico e inodoro, que cuando está en solución es un líquido viscoso, ligeramente turbio e inodoro.<sup>63</sup> Su fórmula empírica es (C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)<sub>x</sub>. Se incluye en la lista de “Generalmente reconocido como seguro” (GRAS en inglés) de la FDA.<sup>64</sup>



**Figura 12.** Estructura química de Gantrez® AN o Poli (metil vinil éter-anhídrido co-maleico).<sup>65</sup>

Este copolímero es comercializado por ASHLAND™, dentro de la serie de Gantrez® AN existen el 119, 139, 149 y 169, donde la única diferencia es el incremento del peso molecular promedio del copolímero conforme aumenta el número.<sup>60</sup>

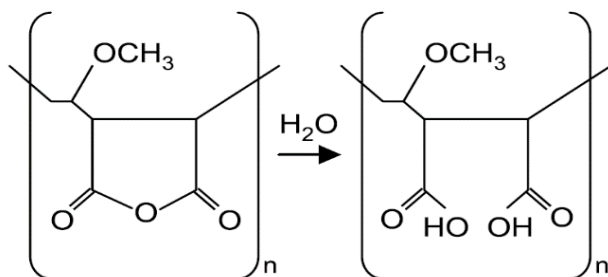
Actualmente existe una amplia investigación acerca de la preparación de MP's de Gantrez encapsulando o incorporando fármacos u otras moléculas, principalmente para una administración oral, ejemplo de ellos son las microesferas de Gantrez® encapsulando curcumina y recubiertas con Eudragit® (tamaño aproximado de 5  $\mu$ m) para tratar la inflamación intestinal<sup>66</sup>, nanopartículas de Gantrez® y polietileno de sebacato encapsulando rifampicina (tamaño entre 350 – 450 nm) para el tratamiento de tuberculosis<sup>67</sup>, nanopartículas de Gantrez®-pegiladas encapsulando paclitaxel (tamaños de 170 – 190 nm)<sup>68</sup> y nanopartículas de Gantrez® encapsulando ciclosporina (tamaño de 200 nm).<sup>69</sup> En todos los sistemas se buscó obtener una liberación controlada y mejorar la permeabilidad del fármaco.

Además de la encapsulación y protección de fármacos, también se emplea debido a que su superficie puede ser modificada por ligandos sin necesidad de activar sus grupos funcionales por reacciones adicionales<sup>70</sup>, esto para cambiar sus propiedades fisicoquímicas, mejorar la biodistribución de las partículas y la liberación del fármaco.<sup>71</sup>

Se ha descrito que las nanopartículas de este material presentan fuertes interacciones bioadhesivas con la mucosa intestinal, donde logran ser atrapadas por el “moco”, en algunos casos se difunden llegando hasta la superficie celular favoreciendo la absorción y por lo tanto mejorando la biodisponibilidad del fármaco, y si no es así, son eliminadas por medio de la rotación de moco.<sup>62,59,72</sup>

Una característica que presentan los polianhídros es la degradación hidrolítica, cuando se degrada cada enlace anhídrido da como producto grupos de ácido carboxílico (Figura 13). De acuerdo con la teoría de adsorción de adhesión, los ácidos carboxílicos pueden mejorar la capacidad de adhesión del polímero al formar enlaces hidrógeno con componentes de la mucosa, como la mucina y así prolongar el tiempo de residencia del polímero dentro del cuerpo.<sup>65,67</sup>





**Figura 13.** Esquema de degradación de Gantrez® AN.<sup>73</sup>

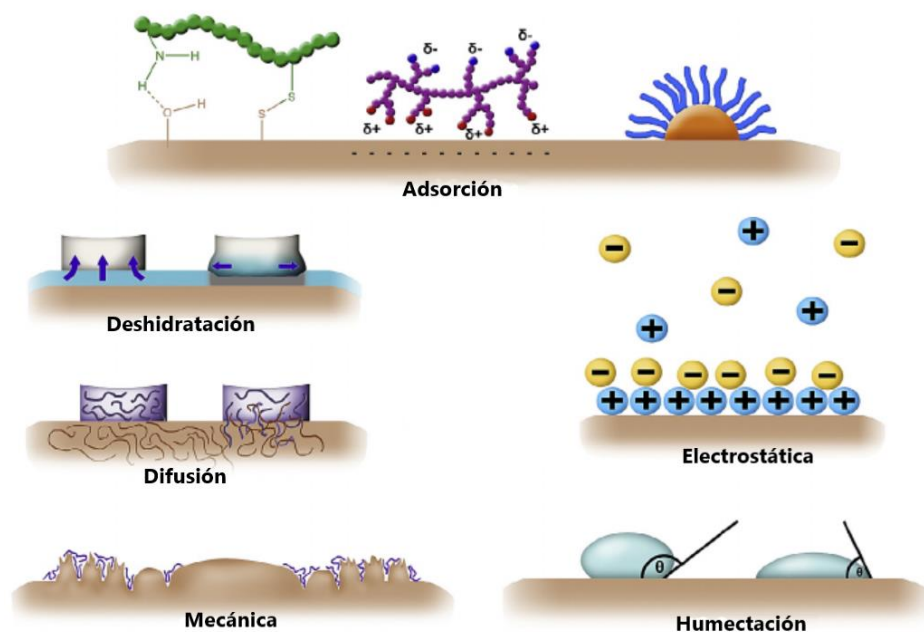
### **2.6.2 Teorías de mucoadhesión.**

Existen 6 principales teorías sobre la mucoadhesión, las cuales describen diferentes fenómenos que pueden ocurrir para que se logre dicho proceso (Figura 14).

- ∞ Teoría de la humectación: describe que la adhesión se da como un proceso de incrustación, donde el sistema bioadhesivo penetra en la superficie irregular del sustrato, seguido por un endurecimiento, produciendo un anclaje. Esta teoría se aplica a sistemas con baja viscosidad, regularmente líquidos.<sup>58,74</sup>
- ∞ Teoría de la deshidratación: describe que un sistema bioadhesivo se gelifica en contacto con la membrana de la mucosa húmeda. Donde el polímero absorbe agua de la capa de moco hasta llegar a un equilibrio, facilitando la unión, provocando a la vez un proceso de deshidratación rápido en la superficie lo que dará lugar a la adhesión.<sup>75</sup>
- ∞ Teoría de la difusión: describe que la adhesión se da por el entrelazamiento de las cadenas del polímero y el sustrato, por ejemplo, las cadenas de mucina que se encuentran en el moco, donde la difusión va a depender de varios factores como: el tiempo de contacto, el coeficiente de difusión del polímero, la densidad de reticulación, el peso molecular del polímero, la flexibilidad de la cadena polimérica, la temperatura, entre otras. Donde, por la existencia de gradientes de concentración se impulsarán las cadenas del polímero hacia la red del moco y las cadenas de mucina irán hacia la matriz polimérica, hasta alcanzar un equilibrio de penetración.

Se estima que la profundidad para tener una buena mucoadhesión está en el rango de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$ .<sup>58,74,75</sup>

- ∞ Teoría de adsorción: describe que la adhesión se da por interacciones de superficie entre el polímero y la mucosa. Estas interacciones pueden ser primarias como los enlaces covalentes, iónicos o metálicos, los cuales proporcionan una interacción permanente. Otro tipo de interacciones son las secundarias que engloba las fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrógeno o interacción hidrofóbica. Generalmente la mucoadhesión se da por interacciones secundarias.<sup>58,74,75</sup>
- ∞ Teoría electrostática: describe que la adhesión se da por una transferencia de electrones entre la capa de mucosa y la forma farmacéutica mucoadhesiva, dando lugar a la formación de una doble capa de cargas eléctricas formada entre la interfaz de la mucina contenida en la capa de moco y la matriz polimérica de la forma farmacéutica mucoadhesiva, esta interacción va a depender de las diferencias de las estructuras electrónicas de cada componente.<sup>58,74,75</sup>
- ∞ Teoría mecánica: describe como afecta el área de contacto para que se logre la adhesión entre la forma farmacéutica mucoadhesiva y la capa de moco. Esta teoría describe el mecanismo de mucoadhesión principalmente de la cavidad oral, donde la mucoadhesión dependerá de en qué parte de la boca se coloque la forma farmacéutica, ya que, las superficies irregulares y las microfisuras proporcionarán un área de mayor contacto, y por lo tanto una mejor mucoadhesión.<sup>75</sup>



**Figura 14.** Ejemplos de los 6 principales mecanismos de mucoadhesión.<sup>75</sup>

### 2.6.3 Propiedades que afectan la mucoadhesión.

Existen varias propiedades de los polímeros que terminan afectando su interacción con la mucosa, a continuación, se enlistan algunas propiedades.

- \* **Concentración del polímero:** Este va a depender de la forma farmacéutica final en la que se encuentre el polímero. Ya que, en una forma semisólida el polímero debe estar en una concentración óptima, por qué en una concentración más alta podría reducir la mucoadhesión por la menor disponibilidad de las cadenas para interactuar con el moco. En una forma sólida, la mucoadhesión aumenta conforme se aumente la concentración.<sup>58</sup>
- \* **Grado de hidratación e hinchamiento:** Muchos de los polímeros mucoadhesivos poseen grupos funcionales hidrófilos (grupos hidroxilo y carboxilo), es decir, que tienen la tendencia de interactuar o disolverse por el agua y otras sustancias polares, lo que permite la unión por puentes de hidrógeno con la capa del moco y su hinchamiento en medio acuoso.<sup>74</sup> Se ha observado

que en algunos casos cuando el polímero se encuentra húmedo la mucoadhesión aumenta, esto debido a que cuando el polímero se hidrata tiende a hincharse, en donde sus cadenas se encuentran relajadas y hay una mayor distancia entre ellas, lo que conduce a una mayor flexibilidad mejorando la interpenetración con la capa de moco. Sin embargo, un exceso de hidratación del polímero tiende a disminuir su mucoadhesión, debido a que se hace más resbaladizo.<sup>58,74</sup>

- \* **Reticulación:** Este va relacionado con la propiedad de hinchamiento de los polímeros. La densidad de reticulación es inversamente proporcional al grado de hinchamiento. Una baja densidad de reticulación da como resultado una mayor flexibilidad. Por el contrario, si se tiene una alta densidad de reticulación la flexibilidad se reduce, disminuyendo la capacidad de las cadenas de polímeros de interpenetrarse en la capa del moco. En el caso de que se tenga un polímero muy reticulado, lo mejor es adicionar un promotor de adhesión, como cadenas poliméricas libres o polímero injertados en la red.<sup>58,74</sup>
- \* **pH:** Este parámetro puede influir en la mucoadhesión en la interfaz entre el polímero y la capa de moco, por los grupos ionizables que posee el polímero. La mayoría de los polímeros son polianiones, los cuales poseen un grupo carboxílico, se ha observado que presentan buena adhesión cuando el pH está debajo de su pKa, al aumentar el pH la adhesión va disminuyendo, sin embargo, no se ha observado una pérdida total de adhesión con pH's más altos. También se ha observado que cuando los grupos carboxílico se protonan reaccionan con las moléculas de mucina, por medio de la formación de puentes de hidrógeno.<sup>58,74</sup>
- \* **Peso molecular del polímero:** Este valor depende mucho del tipo de polímero. Por lo general se obtiene un enredo efectivo con pesos moleculares altos y la interpenetración de las moléculas del polímero se favorece con pesos moleculares bajos. Se ha observado que las fuerzas de mucoadhesión aumentan cuando el peso molecular del polímero es hasta 100 000 kDa, después de ese valor ya no hay mayor bioadhesión.<sup>58,74</sup>

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Con base en lo descrito anteriormente, en este trabajo se busca proponer una nueva forma farmacéutica, basada en las ventajas que ofrece la microencapsulación, desarrollando sistemas microparticulados con antibiótico, para mejorar su solubilidad, disminuir la dosis terapéutica, la frecuencia de administración y los efectos secundarios, para el tratamiento de la neumonía, así como la reducción del estado agudo y prolongado de la infección que puedan llevar a la mortalidad en la población mexicana, siendo más susceptibles los niños menores de 10 años y los adultos mayores a 50 años. Haciendo uso de materiales biodegradables que no comprometan ni ocasionen toxicidad en el organismo para la administración de fármacos por medio de la vía pulmonar, con el fin de que se realice una rápida absorción y se presente un efecto terapéutico casi inmediato, aumentar la biodisponibilidad y evitar el metabolismo de primer paso, en comparación de cuando son administrados por vía oral o parenteral. Además de utilizar un antibiótico y una formulación que presente propiedades tecnológicas adecuadas para ser administrada por la vía pulmonar, con la finalidad de que se genere un efecto local y que pueda ser potencialmente administrado en ambas poblaciones susceptibles.

#### **4. HIPÓTESIS.**

Es posible encapsular cantidades terapéuticas de azitromicina en sistemas biodegradables poliméricos microparticulados, los cuales tendrán propiedades tecnológicas aerolizables y bioadhesivas para ser administradas por la vía pulmonar, con una liberación prolongada y efectivos para el tratamiento de la neumonía.

## 5. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar, caracterizar y evaluar la eficacia *in vitro* de un sistema microparticulado biodegradable y bioadhesivo para la administración pulmonar de azitromicina.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES.

6.1 Definir materiales poliméricos a emplear, así como el fármaco modelo (azitromicina).

6.2 Seleccionar el método de manufactura de las micropartículas y obtener las condiciones óptimas de preparación mediante un Diseño Experimental.

6.3 Llevar a cabo la caracterización física de las micropartículas optimizados.

6.4 Desarrollar y validar métodos analíticos para cuantificar el fármaco modelo en las diferentes etapas del proyecto.

6.5 Determinar la eficiencia de encapsulación del fármaco modelo.

6.6 Formular las micropartículas optimizadas como polvo seco y en aerosol para inhalación.

6.7 Evaluar *in vitro* la eficacia de los sistemas obtenidos mediante estudios de liberación, pruebas de bioadhesión y propiedades aerodinámicas.

6.8 Llevar a cabo estudios de eficacia de las micropartículas en un modelo *in vitro* en cepas bacterianas.

## 7. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.

- MATERIALES

- Vasos de precipitados de 100, 250 y 1000 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL.
- Probeta de 10, 100 y 250 mL.
- Matraces aforados de 10, 25, 100 y 1000 mL.
- Tubos de ensayo de 15 mL.
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Espátula.
- Celda de cuarzo.
- Celda de plástico para Zetasizer.
- Celda de plástico para medir Potencial Z.
- Puntas de 10 y 1000  $\mu$ L.
- Cajas Petri de plástico.
- Asa para sembrar.
- Placas de 96 pozos.
- Agitadores magnéticos.
- Agitador de vidrio.
- Jeringas de 3 mL.
- Papel filtro, Whatman.
- Malla número 200.
- Mortero con pistilo.
- Tubo de PVC.
- Acrílico para pruebas de disolución.
- Membranas de filtración de 10, 8, 3, 2, 0.8, 0.65, 0.45 y 0.1  $\mu$ m.
- Pulmón de cerdo.

- REACTIVOS

*FÁRMACO*

Azitromicina anhidra, donado por IIQUIAP, S.A. DE C.V.

*POLÍMERO*

Gantrez® AN – 119, donado por ISP TECHNOLOGIES, INC.

*FASE ACUOSA*

Agua destilada.

Acetona, SIGMA – ALDRICH.

*FASE OLEOSA*

Aceite mineral NF55, DROGUERIA COSMOPOLITA.

Span® 80, SIGMA – ALDRICH



- OTROS

- \* Lauril sulfato de sodio, HYCEL DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- \* Bicarbonato de amonio >99.0%, SIGMA – ALDRICH.
- \* Fosfato de sodio dibásico anhidro, MEYER.
- \* Fosfato de potasio monobásico, MERCK.
- \* Tween 80, DROGUERIA COSMOPOLITA.
- \* Cloruro de sodio, MEYER.
- \* Permanganato de potasio, BAKER ANALYZED.
- \* Carbonato de potasio anhidro, FERANDELH, S.A. DE C.V.
- \* D-Manitol, SIGMA – ALDRICH.
- \* Agua desionizada.
- \* Ácido clorhídrico, J.T. BAKER.
- \* Alcohol etílico, HYCEL.
- \* Alcohol metílico, MEYER.
- \* Cloroformo anhidro  $\geq 99\%$ , SIGMA – ALDRICH.
- \* Mucina de estómago porcino tipo II, SIGMA – ALDRICH.
- \* Lactosa monohidratada (LACTOPRESS SD), DFE pharma.
- \* Agar soya tripticaseina, BD Bioxon.
- \* Agar cetrimida, BD Bioxon.
- \* Extracto de levadura, BD Bioxon.
- \* Caldo Müller-Hinton, BD Difco

- CEPAS BACTERIANAS

Las siguientes cepas son aislados de casos clínicos y fueron proporcionadas por el Dr. Óscar Torres Ángeles del cepario del Laboratorio 9 de Microbiología y parasitología de la Facultad de Farmacia.

- *Escherichia coli*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Bacillus subtilis*.
- *Klebsiella pneumoniae*.

- EQUIPO

- Balanza analítica Explorer, marca OHAUS.
- pH-metro SM-38W, marca Science MED.
- Espectrofotómetro UV – Vis Cary 60, marca Agilent Technologies.
- Centrifuga MIKRO 120, marca Hettich Zentrifugen.
- Zetasizer nano ZS90, marca Malvern.
- ULTRA-TURRAX® T18 digital, marca IKA.
- Estufa IN-H04, marca J. M. ORTIZ.
- Vórtex MX-S, marca Science MED.
- Parrilla de agitación, marca Biomega.
- Parrilla múltiple de agitación, marca VARIOMAG-USA.
- Liofilizador FreeZone 2.5, marca LABCONCO.
- Termocirculador Sous vide, marca PolyScience.
- Lector de placas Elx808, marca Biotek.
- Nebulizador LC Sprint, marca Pari.

## **8. METODOLOGÍAS.**

### **8.1 Selección y caracterización de los materiales.**

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los materiales y métodos para preparar MP's con polímeros bioadhesivos y biodegradables.

#### **8.1.1 Elección del fármaco modelo.**

Se buscó información sobre los fármacos empleados en el tratamiento de la neumonía, así como sus propiedades fisicoquímicas, clasificación biofarmacéutica, espectro antimicrobiano y formulaciones existentes en el mercado.

##### **8.1.1.1 Identidad por IR.**

Se tomaron alrededor de 3 mg del fármaco modelo (AZT). Para obtener el espectro IR, la muestra se colocó sobre el cristal ATR en un espectrómetro de infrarrojo marca ABB, modelo MB300, del laboratorio L-322 de la Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. El rango de muestreo fue de 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  y se realizaron 150 escaneos la muestra. El espectro obtenido se comparó con el reportado por el proveedor.

##### **8.1.1.2 Perfil de difracción por DRX.**

Se tomaron 20 mg del fármaco modelo (AZT). La muestra se colocó en la platina del difractómetro de rayos X para polvos marca Bruker, modelo D2 PHASER, de 5 a 45° ( $2\theta$ ) durante 22 min, en el laboratorio 2 de la Facultad de Farmacia. El difractograma obtenido se comparó con los difractogramas existentes del fármaco en la base de datos del Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge, usando el software Mercury.

##### **8.1.1.3 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción.**

Se pesó 1 mg de AZT y se disolvió en 1 mL de metanol, posteriormente con la fórmula  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ , se realizaron los cálculos para preparar concentraciones de

AZT en un rango de 25 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , en matraces de 10 mL aforando con agua destilada. En una celda de cuarzo de 1 cm de ancho se colocaron las muestras y en el espectrofotómetro UV-Vis, marca Agilent, modelo Cary 60, se obtuvieron los espectros de absorción del fármaco en un rango de 200 – 800 nm.

### **8.1.2 Pruebas de solubilidad.**

Se pesaron 10 mg de Gantrez® AN y AZT, se colocaron en un tubo de ensayo por separado y se agregaron los disolventes a evaluar en cantidades de 100  $\mu\text{L}$  (etanol, metanol, acetona, agua, solución acuosa ácida, solución acuosa básica, solución acuosa con PVA, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo y aceite mineral), posteriormente se agitaron en vórtex y se observó la muestra hasta que el polímero o fármaco estuvieran disueltos. Se registró la cantidad de  $\mu\text{L}$  agregados de cada disolvente evaluado.

### **8.2 Obtención y optimización de las MP's de Gantrez® AN.**

Se empleó un Diseño Experimental Fraccionado  $2^{5-1}$ , realizado en el software Statgraphics Centurion XVI. Se seleccionaron como Factores: el volumen de fase acuosa ( $X_1$ ), el porcentaje de estabilizante ( $X_2$ ), la velocidad de agitación ( $X_3$ ), el tiempo de agitación ( $X_4$ ) y el porcentaje de porógeno ( $X_5$ ), cada uno con sus respectivos niveles (superior e inferior), ver Tabla 5, teniendo como variable de respuesta la talla promedio obtenida en nm, este último factor se seleccionó para originar poros en el interior de la matriz y generar menos densidad y propiedades para suspenderse en aerosol. Se obtuvo una matriz de diseño con 16 experimentos con combinaciones aleatorias de los factores y niveles (Tabla 6).

**Tabla 5.** Factores que evaluar en la producción de las partículas de Gantrez® AN.

<b>Diseño Exploratorio 2<sup>5-1</sup></b>		
<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>	
	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>
<b>X<sub>1</sub>: Volumen fase acuosa (mL)</b>	4	8
<b>X<sub>2</sub>: % Estabilizante (Span® 80)</b>	1	5
<b>X<sub>3</sub>: Velocidad de agitación (rpm)</b>	6 000	12 000
<b>X<sub>4</sub>: Tiempo de agitación (min)</b>	1	5
<b>X<sub>5</sub>: Porógeno (%)</b>	0	1
Y <sub>1</sub> : Variable dependiente (respuesta): Talla promedio en nm		

**Tabla 6.** Tabla Matriz del Diseño Experimental  $2^{5-1}$  a ejecutar.

Corrida o Experimento	Factores					Respuesta
	X <sub>1</sub> Volumen fase acuosa (mL)	X <sub>2</sub> % Estabilizante (Span® 80)	X <sub>3</sub> Velocidad de agitación (rpm)	X <sub>4</sub> Tiempo de agitación (min)	X <sub>5</sub> Porógeno (%)	Y <sub>1</sub> Talla promedio ± DE (nm)
F1	4	1	6 000	1	1	
F2	4	5	6 000	1	0	
F3	8	5	12 000	1	0	
F4	4	1	6 000	5	0	
F5	4	5	12 000	1	1	
F6	4	1	12 000	5	1	
F7	4	5	12 000	5	0	
F8	8	5	6 000	5	0	
F9	4	5	6 000	5	1	
F10	8	5	6 000	1	1	
F11	8	5	12 000	5	1	
F12	8	1	12 000	5	0	
F13	8	1	12 000	1	1	
F14	8	1	6 000	5	1	
F15	8	1	6 000	1	0	
F16	4	1	12 000	1	0	

### 8.2.1 Preparación de las micropartículas.

Las MP's se obtuvieron empleando el método de emulsificación- evaporación de disolvente propuesto por Alcalá-Alcalá, S et al (2015)<sup>76</sup>, siguiendo las condiciones del Diseño Experimental. Se preparó la fase oleosa en un tubo Falcon con 16 mL de aceite mineral y Span® 80 a la concentración indicada para cada corrida ( $X_2$ ). Por otro lado, se preparó el volumen de la fase acuosa ( $X_1$ ) en un vaso de precipitados con una mezcla acetona:agua (9:1). A continuación, se pesaron 500 mg de Gantrez® AN y se disolvieron en la fase acuosa, junto con el porógeno, cuando aplicaba ( $X_5$ ). Después, la fase oleosa se colocó en un homogeneizador ULTRA-TURRAX® agitando a diferentes velocidades y tiempos ( $X_3$  y  $X_4$ ); mientras estaba en funcionamiento el homogeneizador, con la ayuda de una jeringa se agregó la solución del polímero gota a gota, esto durante 3 minutos y medio. Una vez pasado el tiempo, la emulsión obtenida se colocó en un vaso de precipitado y se dejó en agitación magnética durante 24 h para evaporar la fase de orgánica (acetona). En seguida, las MP's se recuperaron por centrifugación a 14000 rpm durante 20 min. Se realizaron lavados con cloroformo y agua. Por último, se resuspendieron en agua y se liofilizaron con manitol al 5%, a una presión de 5 Pa y una temperatura de -46 °C durante 48 h, en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 8.2.2 Optimización de las MP's.

Para optimizar el proceso se empleó el Método de Superficie de Respuesta en el software Statgraphics Centurion XVI, con lo cual se predijeron los niveles de los factores para obtener la talla de las MP's de 1  $\mu\text{m}$ , con la finalidad de que el sistema tenga el tamaño adecuado para llegar hasta los bronquiolos y alvéolos. La producción de las MP's se llevó a cabo por triplicado con la metodología descrita en el punto 8.2.1 para verificar las predicciones.

### 8.3 Caracterización de las MP's.

#### 8.3.1 Tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (Y<sub>1</sub>).

Se resuspendieron 20 mg de partículas en un tubo eppendorf con 1.5 mL de agua destilada, se agregó Tween 80 hasta obtener una concentración 1% p/v. Después se llevaron a un baño de ultrasonido durante 40 min. En una celda de plástico de 1 cm de grosor se colocaron 1.2 mL de la suspensión anterior y se leyeron en un equipo Zetasizer nano ZS90, a un ángulo de detección de 90°, con 3 repeticiones (de 10 lecturas cada una) para cada muestra y un tiempo de equilibrio de 20 s para una temperatura de 25 °C.

#### 8.3.2 Determinación de Potencial Z (Y<sub>2</sub>).

De una suspensión de MP's preparada como en el punto anterior con agua desionizada y con ayuda de una jeringa se colocaron las muestras en una celda para la determinación del potencial Z, y se leyeron en el equipo Zetasizer nano ZS90, con 3 repeticiones (de 10 lecturas cada una) para cada muestra y un tiempo de equilibrio de 20 s para una temperatura de 25 °C.

#### 8.3.3 Determinación del rendimiento del proceso (Y<sub>3</sub>).

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

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

En donde el peso total corresponde al peso de cada componente empleado para fabricar las partículas: Gantrez® AN y manitol.<sup>77</sup>

### 8.4 Desarrollo y validación del método analítico para cuantificar AZT.

Por medio de espectrofotometría UV-Vis, se desarrolló y validó un método para la cuantificación del fármaco, evaluando los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de



cuantificación. Para el desarrollo se realizó una metodología por espectrofotometría de luz visible, a través de un proceso de reducción con permanganato de potasio, con una técnica reportada por Ghari T et al (2014).<sup>78</sup> El cual consistió en preparar las siguientes soluciones:

- Solución de carbonato de potasio (0.1 M).  
Se pesó 1.3831 g de  $K_2CO_3$  que se disolvieron en un matraz volumétrico con un poco de agua destilada y se llevó a aforo a 100 mL.
- Solución de permanganato de potasio (0.001 M).  
Se pesó 0.01 g de  $KMnO_4$  que se disolvieron en un matraz volumétrico con un poco de agua destilada y se llevó a aforo a 50 mL.
- Solución stock de azitromicina.  
Se pesó 0.05 g de AZT que se disolvieron con un poco de metanol en un matraz volumétrico y se llevó a aforó a 10 mL. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la solución con metanol y se transfirió a otro matraz volumétrico con un poco de agua destilada y se llevó a aforó a 50 mL.

Para la curva de calibración se seleccionó un rango de trabajo de 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g/mL}$ . Con ayuda de la fórmula:  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$  se realizaron los cálculos necesarios para poder preparar cada una de las concentraciones.

Las muestras se prepararon como sigue: en un matraz volumétrico de 10 mL se agregó el volumen necesario de la solución stock de azitromicina, posteriormente se agregó 1 mL de la solución de  $KMnO_4$ , después se agregó 1 mL de la solución de  $K_2CO_3$  y se llevó a aforo con agua destilada, agitando con vórtex. Se dejaron reaccionar cada una de las muestras 30 min y se midieron en el espectrofotómetro UV-Vis marca Agilent, modelo Cary 60, a una longitud de onda de 547 nm. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en oscuridad.

Los parámetros de desempeño se determinaron como lo estipula la Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.:

- **Linealidad:** se realizó una curva de calibración con cinco puntos, en un rango de 10 a 30  $\mu\text{g/mL}$  a la longitud de onda seleccionada, con las absorbancias obtenidas se realizó la regresión lineal, para obtener la pendiente, el intercepto, la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). La curva se realizó por triplicado.
- **Precisión:** se prepararon 3 concentraciones conocidas de la curva (10, 20 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ) se leyeron a la longitud de onda seleccionada y se obtuvieron las absorbancias con las cuales se determinó su %CV. Las concentraciones se realizaron por triplicado.
- **Exactitud:** se prepararon 3 concentraciones de la curva (10, 20 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ), se leyeron a la longitud de onda seleccionada, con las absorbancias obtenidas se calculó el % de recobro, los intervalos de confianza ( $IC_{\mu}$ ) y el %CV. Las concentraciones se realizaron por triplicado.
- **Especificidad:** se pesaron 10 mg de MP's sin AZT y con AZT liofilizadas, se disolvieron en metanol, posteriormente se llevó a cabo la reacción con  $\text{KMnO}_4$ , se hizo un barrido de las muestras para identificar si hay o no cambios en la longitud de onda seleccionada para cuantificar el fármaco.
- **Límite de detección:** se determinó con la siguiente ecuación:  $LD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{b}$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta y  $b$  es la pendiente de la recta de la ecuación obtenida en la regresión lineal.
- **Límite de cuantificación:** se determinó con la siguiente ecuación:  $LC = \frac{10 \cdot \sigma}{b}$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta y  $b$  es la pendiente de la recta de la ecuación obtenida en la regresión lineal.

## 8.5 Caracterización de las MP's cargadas con fármaco.

### 8.5.1 Tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento del proceso.

Estas determinaciones se realizaron para las MP's con cantidades iniciales de AZT (50, 100 y 150 mg), siguiendo la metodología descrita en los puntos 8.3.1, 8.3.2 y 8.3.3.

### 8.5.2 Evaluación de la eficiencia de carga (Y<sub>4</sub>).

Para llevar a cabo esta evaluación se utilizaron las condiciones optimizadas de manufactura, agregando cantidades iniciales de azitromicina de 50, 100 y 150 mg, los cuales fueron incorporados de la siguiente manera. Siguiendo el método de manufactura del punto 8.2.1, la fase acuosa fue separada en dos porciones de 4 mL cada una, en una de ellas se disolvió el polímero y en otro el fármaco. Al momento de hacer la emulsión las fases acuosas se incorporaron a la fase oleosa empleando dos jeringas, recuperando las partículas por centrifugación y liofilizando a las condiciones ya descritas. Se pesaron entre 10 y 12 mg de las partículas liofilizadas que fueron disueltos en 8 mL de metanol. De la solución anterior se tomó 1 mL y se llevó a aforo con agua destilada a un volumen de 2.5 mL. De esta última se tomó 1 mL y se agregó a un matraz volumétrico de 10 mL, posteriormente se agregó 1 mL de la solución de KMnO<sub>4</sub> y 1 mL de la solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, los cuales se llevaron a aforo con agua destilada, agitando en vórtex. Se dejaron reaccionar cada una de las muestras 30 min y se midieron en espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 547 nm. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en obscuridad. Con ayuda de la ecuación de la recta obtenida del método validado previamente se determinó la concentración de azitromicina contenida en las partículas en mg, empleando los factores de dilución correspondientes. Con la siguiente fórmula se calculó la eficiencia de carga, la evaluación se realizó por triplicado:<sup>79</sup>

$$EC (\%) = \frac{\text{Cantidad total de AZT encapsulada}}{\text{Peso inicial de la AZT}} \times 100$$

### **8.5.3 Morfología de las MP's por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

Se colocó una pequeña cantidad de polvo liofilizado de las MP's (con y sin fármaco) sobre una cinta de doble cara de carbono. Posteriormente, se recubrieron con oro con un espesor de ~10 nm, en una máquina de pulverización catódica marca JEOL, modelo JFC-1100, durante 3 min para observarla en el microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-7600F, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. También se observó la muestra en polvo liofilizado, sin recubrir con oro.

### **8.5.4 Determinación de la interacción entre los componentes por espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).**

Se tomaron alrededor de 3 mg de las materias primas (Gantrez® AN, azitromicina, manitol), mezclas físicas con y sin fármaco, MP's (con y sin fármaco). Para obtener el espectro IR, cada muestra se colocó sobre el cristal ATR en un espectrómetro de infrarrojo marca ABB, modelo MB300, del laboratorio L-322 de la Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. El rango de muestreo fue de 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  y se realizaron 150 escaneos para cada muestra.

### **8.5.5 Determinación del perfil de difracción por Difracción de Rayos X (DRX).**

Para esta prueba se tomaron 20 mg de las materias primas (Gantrez® AN, azitromicina, manitol), mezclas físicas con y sin fármaco, MP's (con y sin fármaco). Cada muestra se colocó en la platina del difractómetro de rayos X para polvos marca Bruker, modelo D2 PHASER, de 5 a 45° ( $2\theta$ ) durante 22 min, en el laboratorio 2 de la Facultad de Farmacia.

### **8.5.6 Determinación de la interacción de los componentes por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).**

En charolas herméticas de aluminio Tzero de baja masa de la marca TA, se pesaron de 3.5 a 5 mg de cada muestra (materias primas, mezclas físicas, MP's con y sin

fármaco), posteriormente con ayuda de la prensa se sellaron las charolas con su respectiva tapa. Las charolas se colocaron en un calorímetro marca TA Instrument, modelo Q20. Las muestras se analizaron a una velocidad de 10 °C/min, con un rango de temperatura de 20 a 350°, con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. Se usó indio como referencia para calibrar el equipo, todo lo anterior realizado en el laboratorio L-322 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

## **8.6 Evaluación de la eficacia *in vitro* de las MP's.**

### **8.6.1 Estudios de liberación.**

Las pruebas se realizaron con 100 mg de MP's optimizadas de tres diferentes lotes (es decir, elaboradas con una cantidad inicial de 100 mg de AZT), los cuales contenían una cantidad aproximada de 40 mg de AZT. También se colocaron en el estudio muestras de 40 mg de azitromicina materia prima. Las muestras fueron colocadas en una membrana de diálisis (corte de peso molecular: 14000 Da), para el caso de las MPs se colocaron 300 µL de buffer PBS (0.02 M), pH 6.6 con lauril sulfato de sodio al 0.2% (v/v) para hidratarlas, y para el caso de la AZT materia prima la muestra se colocó en polvo dentro de la bolsa de diálisis. Después las bolsas se sumergieron en vasos de precipitado que contenían 30 mL de buffer PBS (0.02 M) pH 6.6 con lauril sulfato de sodio al 0.2% (v/v) como medio de liberación. Los vasos se colocaron en baño maría a una temperatura de 37 °C, bajo agitación magnética a 100 rpm (Figura 15). Se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 30 h, las cuales se midieron por medio de espectrofotómetro Vis con el método validado. La muestra sustraída fue reemplazada con la misma cantidad de buffer nuevo de PBS para mantener el volumen constante y condiciones "sink".<sup>36,80</sup> Los estudios se realizaron por triplicado, reportando el perfil de liberación, en gráficos de porcentaje liberado VS tiempo.



**Figura 15.** Sistema montado para los estudios de liberación.

**8.6.1.1 Modelado matemático del perfil de liberación.**

Una vez obtenidos los datos de las muestras a diferentes tiempos, se realizó el modelado matemático (Tabla 7). Para saber qué modelo se ajusta mejor, se determinó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la constante de velocidad.

**Tabla 7.** Modelos matemáticos empleados para investigar el mecanismo de liberación de la AZT de las MP's.

Modelo matemático	Ecuación
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0t$
Primer orden	$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{K_1t}{2.303}$
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KPT}t^n$
Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{Q_0} - \sqrt[3]{Q_t} = K_{HC}$

## 8.7 Pruebas de bioadhesión.

### 8.7.1 Por interacción con soluciones de mucina.

En el estudio se empleó mucina de estómago tipo II al 1 y 2% p/v. Se pesaron 60 mg de MP's cargadas y liofilizadas que se resuspendieron en 3 mL de buffer de fosfato-salino, pH 6.6 (0.02 M). Por otro lado, se pesaron 60 mg de mucina que fueron disueltos en 3 mL de buffer de fosfato-salino, pH 6.6 (0.02 M), por separado. Posteriormente, la solución de mucina se mezcló en un tubo de ensayo con la suspensión de MP's para obtener una concentración final de mucina al 1%. La suspensión anterior se colocó en un baño maría a 37 °C, en agitación magnética a 100 rpm. Después se tomaron muestras a los 30, 60, 120 y 240 min para determinar el tamaño promedio y potencial Z, en el equipo Zetasizer Z90, como se describió antes. Para la prueba con mucina al 2%, se pesaron 120 mg de mucina, siguiendo el mismo procedimiento. Los experimentos se realizaron por duplicado.<sup>81,82,83</sup>

### 8.7.2 Por flujo continuo en tejido de pulmón.

Para el ensayo se realizaron cortes de pulmón de cerdo de 2 x 2 cm; el tejido no recibió ningún tratamiento previo. 30 mg de MP's con fármaco liofilizadas fueron esparcidos sobre el pedazo de tejido. El tejido se colocó sobre una rampa a 45° para permitir que el fluido fluya libremente y se introdujo en una cámara con 75 % de humedad relativa, a temperatura ambiente, durante 10 min para que las MP's se hidrataran. Posteriormente, se dejó caer sobre las muestras una solución de buffer de PBS, pH 6.6 (0.02 M) con un flujo de 1 mL/min durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, las MP's que permanecieron sobre el tejido fueron removidas, se secaron en una estufa a 50 °C hasta 24 h, se pesaron y se verificó que se mantuviera peso constante. Con la siguiente fórmula se calculó el porcentaje de MP's que se quedaron adheridas al tejido después de los 20 min (el experimento se realizó 6 veces):<sup>84,85,86</sup>

$$\% \text{ de bioadhesión} = \frac{\text{Peso de micro-nanopartículas final}}{\text{Peso de micro-nanopartículas inicial}} \times (100)$$

## 8.8 Formulación de las MP's y evaluación de las propiedades aerolizables.

### 8.8.1 Formulación como polvo seco para inhalación.

Para poder evaluar las partículas por medio de la aerosolización, se realizó la formulación de las MP's como polvo seco para inhalación. Esto fue realizando mezclas de MP's con lactosa de grado inhalable, la cual actúa como excipiente vehículo para aerolización. Se mezclaron proporciones de MP's con lactosa a 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2 y 1:2.5, manteniendo una cantidad de 250 mg de MP's constante. Antes de realizar los procedimientos se tamizaron los polvos en una malla de número 200. Para determinar la densidad aparente y compactada, se usó 1 g de lactosa, 700 mg de MP's y las mezclas de lactosa y MP's de acuerdo con las proporciones mencionadas. Los polvos se colocaron en una probeta de 10 mL, se registró el volumen inicial (volumen aparente, sin asentar), seguido de esto se levantó la probeta a una altura de 5 cm y se impactó 250 veces sobre una superficie plana y suave, y se registró el volumen final del polvo. Para la determinación del ángulo de reposo se empleó un embudo de vidrio con un diámetro de 7.3 cm y un diámetro del orificio de 0.5 cm, se colocó a una altura de 12.5 cm, se agregaron los polvos en el embudo, se tomó el tiempo en que cayó cada uno y se midió el diámetro de la base y la altura del lecho del polvo. Para determinar el ángulo de reposo, la densidad aparente y compactada, el índice Carr y el índice de Hausner se emplearon sus respectivas fórmulas (Figura 16). Todo se realizó por triplicado.

<b>Densidad aparente</b>	<b>Densidad compactada</b>	<b>Índice de Carr</b>	<b>Índice de Hausner</b>
$\rho_a = \frac{m}{V_o}$	$\rho_c = \frac{m}{V_f}$	$Carr = 100 (V_o - V_f)/V_o$	$HR = \frac{V_o}{V_f}$
$m = \text{masa de la muestra (g)}$	$m = \text{masa de la muestra (g)}$	$V_o = \text{volumen inicial sin asentar (mL)}$	$V_f = \text{volumen final asentado (mL)}$
$V_o = \text{volumen inicial sin asentar (mL)}$	$V_f = \text{volumen final asentado (mL)}$	$V_f = \text{volumen final asentado (mL)}$	
<b>Velocidad de flujo</b>		<b>Ángulo de reposo</b>	
$VF = \frac{P}{t}$		$AR = \tan^{-1}(2h)/D$	
$m = \text{peso de la muestra (g)}$		$h = \text{altura (cm)}$	
$t = \text{tiempo (s)}$		$D = \text{diámetro (cm)}$	

**Figura 16.** Fórmulas empleadas para calcular las propiedades reológicas de los polvos.



Una vez seleccionada la formulación óptima, se realizó una prueba de fluidez, colocando 50 mg de la muestra a una distancia de 15 cm de donde se encontraba un portaobjeto limpio (como se muestra en la Figura 17) y con ayuda del compresor del nebulizador se aerolizó la mezcla de polvos, midiendo la distancia a la que fue dispersado el polvo y observando al microscopio óptico las partículas que se impactaron en el portaobjetos.<sup>87,88</sup>

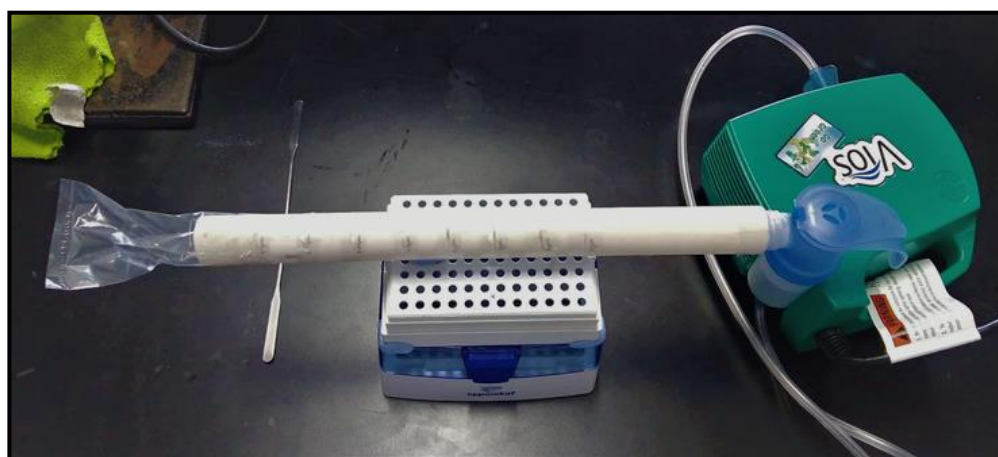


**Figura 17.** Sistema montado para la prueba de aerolización de la formulación en polvo seco.

### **8.8.2 Formulación como aerosol en medio acuoso para nebulización.**

Primero se preparó la suspensión para nebulizar, la cual consistió en una solución salina de NaCl al 0.9%, con lauril sulfato de sodio como agente tensoactivo al 0.01%. De la solución anterior se vertieron 4 mL en un tubo falcon de 15 mL, donde se agregaron y dispersaron 50 mg de MP's. Basándonos en el fundamento y funcionamiento del Impactador de Cascada de Andersen, se desarrolló un método para determinar el diámetro de masa media aerodinámica (MMAD, siglas en inglés) y la desviación estándar geométrica (GSD, siglas en inglés) de la suspensión para nebulización, empleando un tubo de PVC de 30 cm de largo, ya que la longitud de las vías respiratorias reportada por Levitzky, M.G. (2007) da un total de 31 cm aproximadamente,<sup>3</sup> con un diámetro de 2.1 cm para permitir la entrada de la boquilla del nebulizador. Se realizaron 8 ranuras con 2.5 cm de separación entre cada una, con una distancia de 10 cm desde el inicio del tubo a la primer ranura para permitir

que la nube de aerosol pueda formarse adecuadamente, en cada ranura se colocaron una serie de membranas de filtración con los siguientes tamaños de poro y en el siguiente orden: 10, 8, 3, 2, 0.8, 0.65, 0.45 y 0.1  $\mu\text{m}$ , se procuró que los tamaños fueran similares al impactador de cascada de la marca TISCH Enviromental,<sup>89</sup> cada ranura se selló con parafilm para evitar alguna pérdida. Posteriormente se colocó el tubo en la boquilla del nebulizador sobre uno de los extremos del tubo de PVC, mientras que en el otro extremo se sujetó una bolsa de plástico para recoger las MP's nebulizadas (ver Figura 18). Todas las membranas del sistema se pesaron antes de iniciar el experimento. Se colocaron 2 mL de la suspensión de MP's en el nebulizador, el cual fue accionado durante 5 min. Después, se desmontó el sistema, se sacaron las membranas, se dejaron secar a temperatura ambiente y se pesaron para determinar el MMAD y la GSD. El experimento se realizó por triplicado.<sup>88,90,91,92</sup>

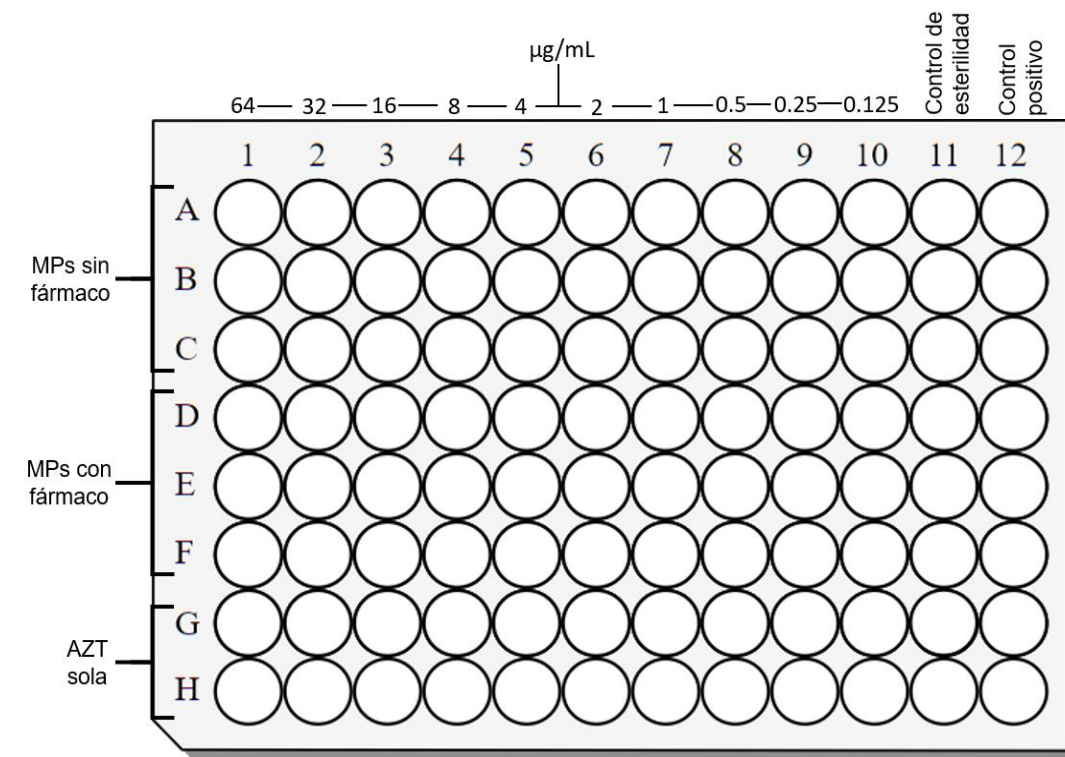


**Figura 18.** Sistema para evaluar la suspensión de MP's para nebulización.

### 8.9 Estudio de eficacia de las MP's con AZT en modelos bacterianos.

Para estudiar la eficacia de los sistemas se realizaron pruebas de susceptibilidad bacteriana. Las cepas bacterianas *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aureginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron utilizadas. Se retaron las siguientes muestras: las MP's con fármaco, la azitromicina en solución hidroalcohólica, y como controles las MP's sin

fármaco. La CMI se determinó por medio del método de microdilución (de acuerdo al CLSI, 2017), en placa de 96 pozos, donde se colocaron muestras con las siguientes concentraciones de AZT: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125  $\mu\text{g/mL}$  en caldo Müller-Hinton, siguiendo el esquema de la Figura 19, posteriormente se agregaron inóculos de  $5 \times 10^5$  UFC/mL por pozo, se dejó incubando la placa durante 48 h, con  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$ , tomando lectura de las absorbancias a 24 y 48 h, en un lector de microplacas Biotek, modelo Elx808 a una longitud de onda de 630 nm, para con estos datos calcular el punto de corte.<sup>93,94,95</sup> Esta evaluación se realizó en el laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, UAEM.



**Figura 19.** Esquema de tratamientos para la determinación de la CMI.

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **9.1 Selección de los materiales empleados.**

#### **9.1.1 Fármaco modelo y su caracterización.**

Para la selección del fármaco, se realizó una búsqueda bibliográfica y hemerográfica sobre los tratamientos indicados para la neumonía. En la Tabla 7 se resumen los fármacos que se prescriben para el tratamiento, así como algunas de sus características fisicoquímicas, su espectro antimicrobiano, las formas farmacéuticas, vías de administración de cada uno, dosis y si pertenecen o no al cuadro básico de medicamentos del IMSS.

**Tabla 8.** Características de antibióticos empleados en el tratamiento de la neumonía.<sup>22, 96, 97, 98</sup>

Antibiótico	Familia	pKa	Solubilidad (mg/mL)	Permeabilidad (x10 <sup>4</sup> cm/s)	LogP	BCS	Espectro antimicrobiano	Vía de administración	Dosis	CBM
Amoxicilina	Penicilinas	2.4, 9.6	1	Baja, 0.3	0.87	IV	<i>S. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>H. influenzae</i>	Oral (Cápsulas, suspensión)	1 g / 8 h	Sí
Cefuroxima	Cefalosporina (2da gen)	2.5	0.01	S/D	-0.16	IV	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i>	Oral (Tabletas, suspensión); Parenteral (sol. Inyectable, I.V., I.M.)	500 mg / 12 h	Sí
Ceftriaxona	Cefalosporina (3ra gen)	S/D	400 mg / 100 mL	S/D	N/A	S/D	<i>S. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i>	Parenteral (I.V., I.M.)	0.5 – 1 g / 12h	Sí
Eritromicina	Macrólidos	8.8	0.01	S/D	3.06	II	<i>M. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>	Oral (cápsulas, tabletas, suspensión); Parenteral (I.M.)	500 mg / 6 h	Sí
Clarithromicina	Macrólidos	8.99	0.01	S/D	3.16	II	<i>M. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i>	Oral (Tabletas)	500 mg / 12 h	Sí
Azitromicina	Macrólidos	8.74	0.01	S/D	4.02	II	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i>	Oral (Tabletas, cápsulas, suspensión)	500 mg / 24 h	Sí
Doxiciclina	Tetraciclinas	3.4, 7.7, 9.5	0.1	S/D	-0.02	IV	<i>M. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>C. pneumoniae</i>	Oral (cápsulas, tabletas)	100 mg / 12 h	Sí
Levofloxacino	Quinolonas	5.69	10	S/D	2.1	I	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i>	Oral (Tabletas), parenteral (I.V.)	500 mg / 12 h	Sí
Moxifloxacino	Quinolonas	S/D	S/D	S/D	2.9	S/D	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Mycoplasma spp.</i> , <i>Chlamydia spp.</i>	Oral (Tabletas), parenteral (I.V.)	400 mg / 24 h	Sí
Amikacina	Aminoglucósido	8.1	soluble en agua/insoluble en etanol	S/D	S/D	S/D	<i>Klebsiella spp.</i>	Parenteral (I.V., I.M.)	15 mg/kg – 24 h	Sí

BCS: Sistema de clasificación biofarmacéutico (siglas en inglés de *Biopharmaceutics Classification System*).

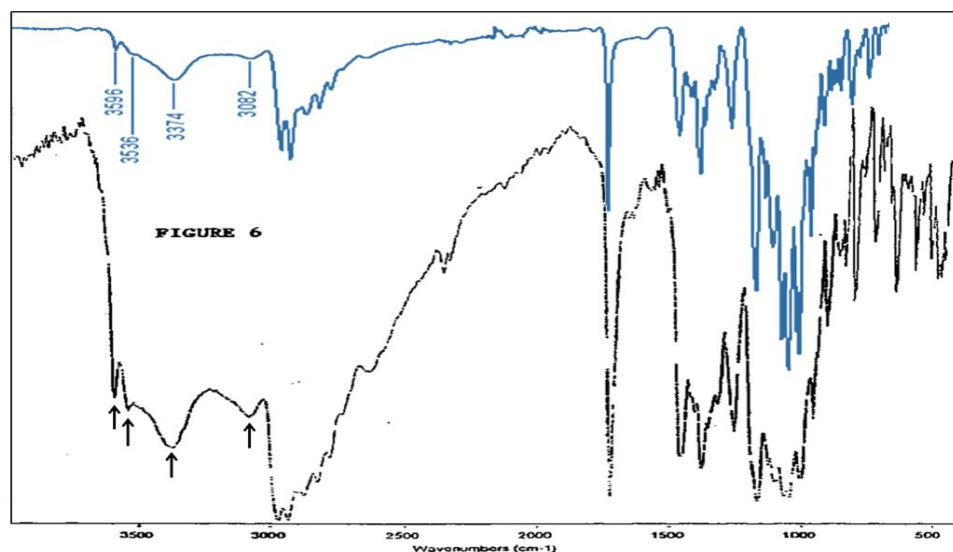
CBM: Cuadro básico de medicamentos.<sup>99</sup>

S/D: Sin dato, no se encontró el dato o no está reportado.

Se seleccionó como fármaco modelo la azitromicina, basándonos en las propiedades fisicoquímicas, la clase SCB a la que pertenece y el espectro antimicrobiano que posee. El cual, debido a que es Clase II (baja solubilidad) y un pKa básico es candidato para ser encapsulado en MP's de liberación prolongada, pues estas favorecen la biodisponibilidad y solubilización de este tipo de fármacos<sup>45</sup>, además de poseer un amplio espectro sobre patógenos que colonizan los pulmones durante infecciones respiratorias como la neumonía.

### 9.1.1.1 Identidad por IR.

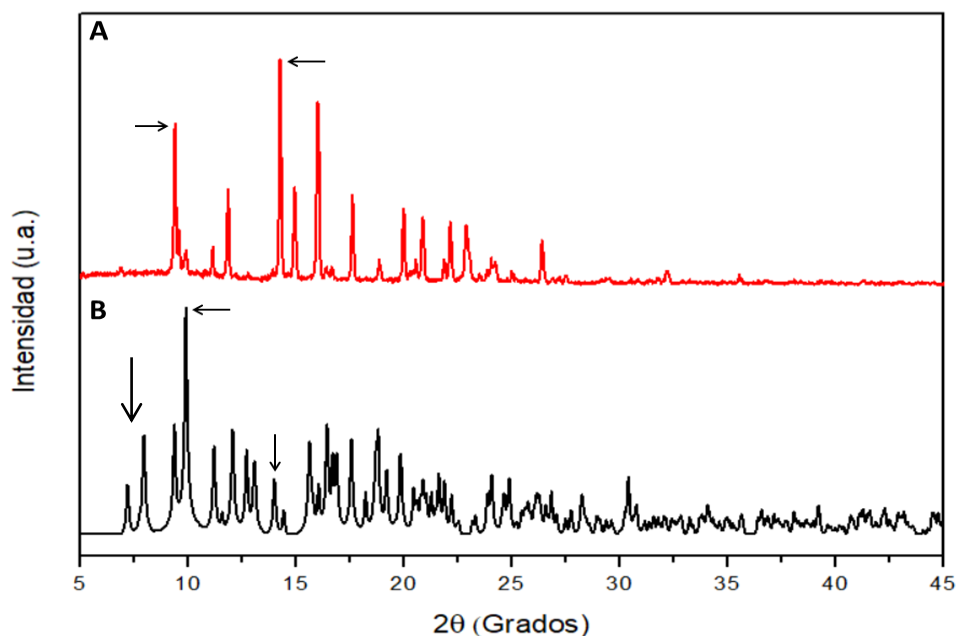
La azitromicina fue donada por IIQUIAP, S.A. DE C.V. la cual es una nueva forma cristalina de azitromicina anhidra, patentada por De la Torre-García, J.A. et al (2003). Se obtuvo el espectro IR de la materia prima (Figura 20) y se comparó con el reportado por la patente. En esta se menciona que el fármaco presenta picos de absorción a  $3600\text{ cm}^{-1}$ ,  $3553\text{ cm}^{-1}$ ,  $3375\text{ cm}^{-1}$  y  $3075\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente. El espectro obtenido presenta picos de absorción un poco desplazados a  $3596\text{ cm}^{-1}$ ,  $3536\text{ cm}^{-1}$ ,  $3374\text{ cm}^{-1}$  y  $3082\text{ cm}^{-1}$ , lo cual concuerda con el espectro de la patente (Figura 20).<sup>100</sup>



**Figura 20.** Espectro IR de la azitromicina donada para desarrollar el proyecto (color azul) y el espectro IR correspondiente a la patente, las flechas indican los picos de absorción mencionados en el texto (color negro).<sup>100</sup>

### 9.1.1.2 Perfil de difracción por DRX.

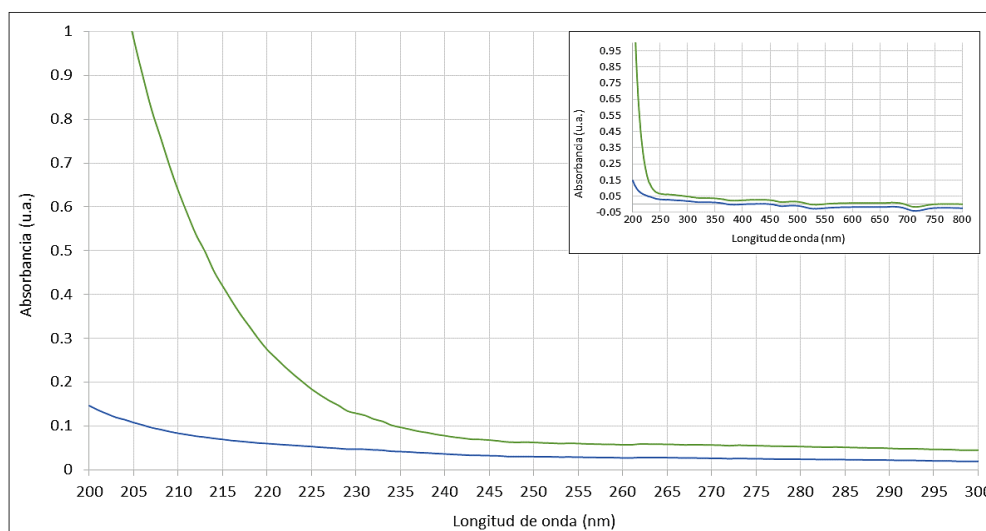
Ya que los autores de la patente no reportaron el perfil de difracción, se buscaron hidratos y solvatos de la azitromicina en la base de datos del Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge y se visualizaron con el software Mercury, con el fin de asegurarnos de que nuestra materia prima no corresponde a ninguno de los hidratos de la AZT. En el difrctograma de rayos X de polvos (DXR) de la azitromicina anhidra (materia prima), se observan señales angostas y bien definidas correspondientes a una estructura cristalina, descripción que concuerda con lo que descrito por el proveedor (Patente US 6,528,492 B1, Figura 21-A). En cuanto a los hidratos, sólo se encontró el difractograma de la azitromicina dihidratada (CCDC code: GEGJAD; Figura 21-B)<sup>101</sup>, en la cual se observa el pico más intenso a 9.89°, mientras que en la AZT anhidra se observa más intenso a 14.26° (Figura 21-A). Además, se observan dos señales en la región de 6 a 9° que están ausentes en AZT anhidra, así como una vasta población de señales en la región de 15 a 30° en la AZT dihidratada. Con lo anterior se confirma que nuestra materia prima no corresponde a la AZT dihidratada.



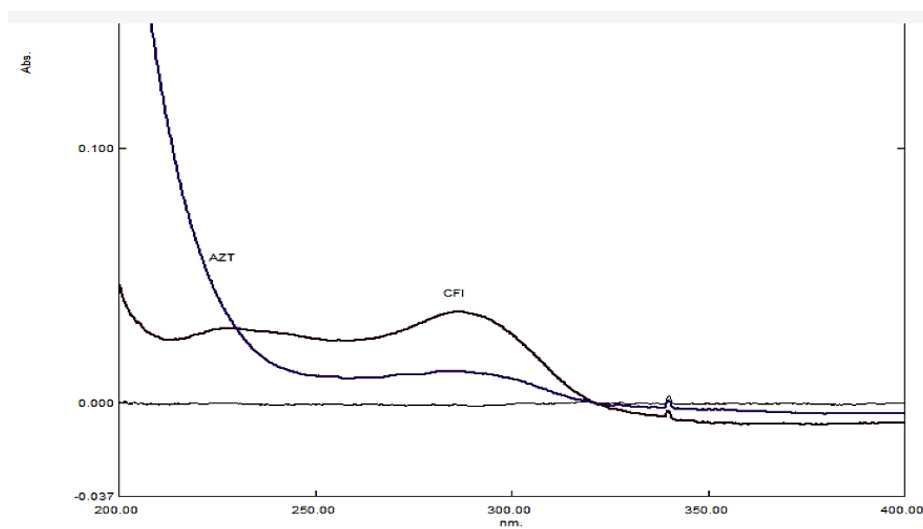
**Figura 21.** Difractograma de la (A) AZT anhidra y (B) la AZT dihidratada, las flechas indican los ángulos de los picos mencionados en el texto.<sup>101</sup>

### 9.1.1.3 Identificación de la longitud de onda de máxima absorción.

En la Figura 22, se muestra el espectro de absorción de la AZT anhidra, en un rango de 200 a 800 nm. No se observa una longitud máxima de absorción específica. En la literatura Nyola, N et al (2013), empleó una longitud de onda de 235 nm para cuantificar el fármaco por medio de espectrofotómetro UV (Figura 23).<sup>102</sup> Otros trabajos reportan longitudes de onda en 210 nm y 215 nm para detectar la AZT por medio de HPLC.<sup>103,104</sup> Por lo que se buscó un método para cuantificar el fármaco por medio de espectroscopía UV-Vis descrito más adelante.



**Figura 22.** Espectro de absorción de la AZT anhidra. Rango de 200 – 800 nm. Se muestra el espectro del agua en color azul y AZT en color verde.



**Figura 23.** Espectro de absorción de AZT reportado por Nyola, N et al (2013).<sup>102</sup>



### 9.1.2 Selección de materiales por pruebas de solubilidad y definición del método de manufactura de MP's de Gantrez.

Una vez seleccionado el fármaco lo siguiente fue determinar su solubilidad y la del polímero Gantrez® AN en diferentes disolventes. En la Tabla 9 se muestra la solubilidad del Gantrez® AN y la azitromicina anhidra, el grado de solubilidad se reportó como lo estipula la FEUM (11<sup>va</sup> edición, 2014).

**Tabla 9.** Solubilidad de los materiales en diferentes disolventes.

Disolvente	Grado de solubilidad	
	Gantrez® AN	Azitromicina anhidra
Agua	Fácilmente soluble	Insoluble
Etanol	Fácilmente soluble	Muy soluble
Metanol	Muy soluble	Muy soluble
Acetona	Muy soluble	Muy soluble
Acetonitrilo	N/A	Muy soluble
Acetato de etilo	Insoluble	Muy soluble
Diclorometano	Insoluble	Muy soluble
Cloroformo	Insoluble	Muy soluble
Alcohol polivinílico al 1%	Insoluble	Insoluble
Solución ácida (HCl, 0.1M)	Ligeramente soluble	Insoluble
Solución básica (NaOH, 0.1 M)	Fácilmente soluble	Insoluble
Aceite mineral	Insoluble	Insoluble

N/A: No aplica, no se evaluó el disolvente para la materia prima.

Se decidió emplear la acetona como disolvente para la manufactura de las partículas, por qué ambos componentes (polímero y fármaco) son muy solubles. Así como la selección de un disolvente donde los componentes sean insolubles, escogiendo el aceite mineral.

Para fines del proceso de manufactura de las MP's, también se determinó la solubilidad entre dos disolventes (acetona con aceite mineral) para diseñar la metodología de la preparación de partículas. Por otro lado, se determinó la solubilidad del bicarbonato de amonio, este reactivo se emplea como agente

porógeno en la producción de partículas, lo cual es otra característica que se desea obtener en las partículas a producir. La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos.

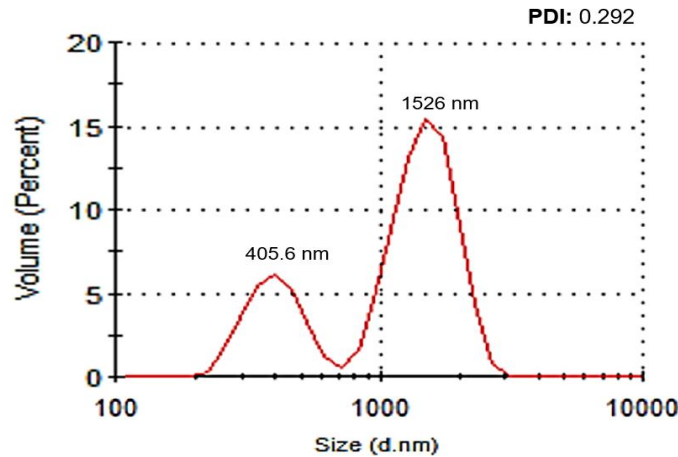
**Tabla 10.** Solubilidad de reactivos a emplear para la preparación de partículas.

Mezcla soluto + solvente	Grado de solubilidad
Acetona en aceite mineral	Insoluble
Bicarbonato de amonio en aceite mineral	Insoluble
Bicarbonato de amonio en acetona	Insoluble

Ya que el bicarbonato de amonio resultó ser insoluble en aceite mineral y en acetona, se realizó una mezcla de acetona:agua (90:10), para determinar si el bicarbonato de amonio podía ser soluble (ya que se sabe que es soluble en agua). Al observar que dicho compuesto es soluble en una mezcla de esos disolventes, se evaluó también la solubilidad del polímero y de la AZT en esta mezcla, encontrando buena solubilidad de todos los componentes. Por ello, se decidió usar los siguientes materiales en el proceso de manufactura de los sistemas: acetona, agua, aceite mineral y bicarbonato de amonio.

Buscando en referencias, para la preparación de las partículas, se usó como método guía el propuesto por Alcalá-Alcalá, 2015,<sup>76</sup> el cual consiste en crear microesferas porosas por doble emulsión-evaporación del solvente (tipo W/O/W). En nuestro caso se modificó a una emulsión-evaporación del solvente, donde la fase acuosa corresponde a una mezcla de acetona:agua (90:10) con el polímero disuelto, mientras que la fase oleosa corresponde al aceite mineral con Span® 80 como estabilizante (W/O). Las fases se homogenizan a 10 000 rpm. Posteriormente la mezcla se deja en agitación con una parrilla eléctrica para evaporar la fase de acetona:agua durante 24 h. Por último, las partículas formadas se lavaron al vacío con cloroformo.<sup>76</sup> El método se reprodujo para evaluar su factibilidad para obtener MP's de Gantrez, midiendo en un equipo Zetasizer los tamaños obtenidos. Se

obtuvieron dos poblaciones de partículas, nanopartículas con un tamaño promedio de 405.6 nm y micropartículas con un tamaño promedio de 1.52  $\mu\text{m}$  (ver Figura 24).



**Figura 24.** Tamaño promedio y su distribución de las partículas de Gantrez® AN.

Con base en los resultados de esta prueba preliminar se decidió trabajar y optimizar a través de un diseño experimental la manufactura de las partículas.

### 9.2 Optimización del proceso de obtención de las MP's.

Debido a que con la metodología empleada se obtienen micro y nanopartículas, el siguiente paso fue desarrollar un diseño exploratorio para observar que factores influyen en el proceso de desarrollo de las partículas y poder llevar a cabo procesos de optimización. Con el software Statgraphics Centurion XVI se obtuvo un diseño exploratorio fraccionado  $2^{5-1}$ , cuya matriz de diseño con resultados se muestra en la Tabla 11; se ejecutaron los 16 experimentos o corridas y se midió la talla promedio de cada uno como variable de respuesta, obteniendo un amplio rango de tamaños, que van desde 63 a 5396 nm.

Tabla 11. Matriz del Diseño Experimental 2<sup>5-1</sup> ejecutada.

Corrida o Experimento	Factores					Respuesta
	X <sub>1</sub> Volumen fase acuosa (mL)	X <sub>2</sub> % Estabilizante (Span® 80)	X <sub>3</sub> Velocidad de agitación (rpm)	X <sub>4</sub> Tiempo de agitación (min)	X <sub>5</sub> Porógeno (%)	Y <sub>1</sub> Talla promedio ± DE (nm)
F1	4	1	6 000	1	1	579 ± 19
F2	4	5	6 000	1	0	1039 ± 332
F3	8	5	12 000	1	0	63 ± 1
F4	4	1	6 000	5	0	415 ± 12
F5	4	5	12 000	1	1	186 ± 4
F6	4	1	12 000	5	1	1110 ± 67
F7	4	5	12 000	5	0	356 ± 13
F8	8	5	6 000	5	0	721 ± 29
F9	4	5	6 000	5	1	2574 ± 475
F10	8	5	6 000	1	1	1093 ± 20
F11	8	5	12 000	5	1	640 ± 10
F12	8	1	12 000	5	0	63 ± 1
F13	8	1	12 000	1	1	1842 ± 26
F14	8	1	6 000	5	1	5396 ± 465
F15	8	1	6 000	1	0	66 ± 1
F16	4	1	12 000	1	0	63 ± 4

Posteriormente los datos obtenidos se analizaron de igual manera con el software Statgraphics Centurion XVI, en el menú de DDE. El análisis de varianza que se presenta en la Tabla 12 muestra los efectos que son significativos, es decir un p-valor menor a 0.05 (valores-P o P-value en color rojo), mientras que el modelado de los datos por regresión múltiple tiene un valor de  $r^2$  del 97.38% (R-squared).

**Tabla 12.** Análisis de varianza de los 5 factores con sus combinaciones dobles.  
p-valor < 0.05 = valores estadísticamente significativos (color rojo).

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Fase Acuosa	752990.	1	752990.	4.55	0.0998
B: Estabilizante	342518	1	342518.	2.07	0.2235
C: Agitación	3.79568E6	1	3.79568E6	22.95	0.0087
D: Tiempo Agitación	2.6855E6	1	2.6855E6	16.24	0.0157
E: Porógeno	6.11944E6	1	6.11944E6	37.01	0.0037
AB	2.30812E6	1	2.30812E6	13.96	0.0202
AE	1.52955E6	1	1.52955E6	9.25	0.0383
BE	2.15576E6	1	2.15576E6	13.04	0.0225
CD	2.78306E6	1	2.78306E6	16.83	0.0148
CE	672810.	1	672810.	4.07	0.1139
DE	1.47562E6	1	1.47562E6	8.92	0.0404
Error Total	661419.	4	165355.		
Total (corr.)	2.52825E7	15			

R-cuadrada: 97.3839%

La magnitud del efecto de los factores y sus interacciones se puede ver con la gráfica de Pareto (Figura 25), donde los factores significativos son aquellos que pasan la línea en color azul, observando que el factor porógeno, la velocidad de agitación y la interacción de estos son los efectos que más influyen en el tamaño promedio de las partículas obtenidas. Las barras en gris muestran un efecto positivo en el tamaño, es decir que la variable de respuesta (tamaño promedio) aumenta cuando los niveles del factor aumentan, mientras que la barra azul muestra un impacto negativo (el tamaño disminuye cuando los niveles del factor aumentan).

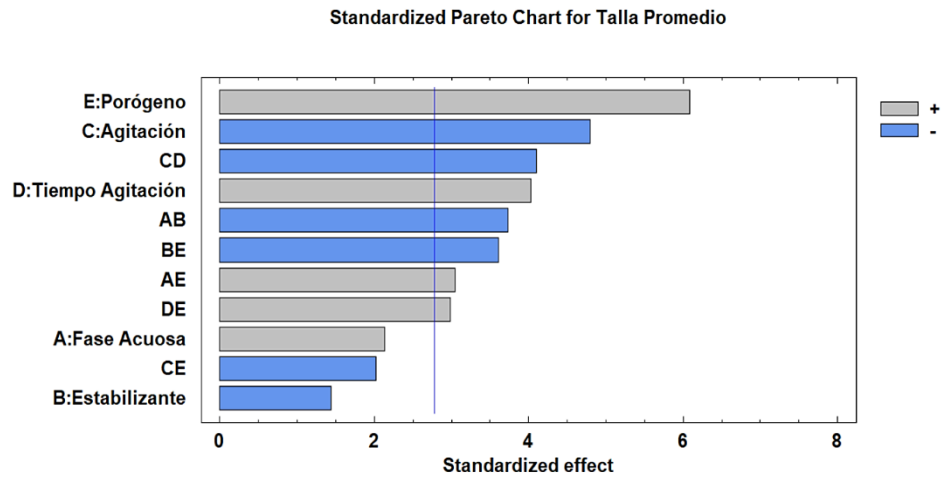


Figura 25. Gráfico de Pareto estandarizada para la talla promedio

El análisis de regresión nos arrojó la siguiente ecuación de ajuste para poder optimizar los niveles de los factores:

$$Y1 = -2539.56 + 238.734 * X_1 + 680.094 * X_2 + 0.114531 * X_3 + 678.594 * X_4 + 802.25 * X_5 - 94.9531 * X_1 * X_5 + 309.188 * X_1 * X_5 - 367.062 * X_2 * X_5 - 0.0695104 * X_3 * X_4 - 0.136708 * X_3 * X_5 + 303.688 * X_4 * X_5$$

Con la ecuación anterior se obtuvo a través del software el gráfico de superficie de respuesta estimada, a partir de la cual se decidió optimizar el proceso, teniendo como objetivo de optimización obtener MP's de 1 µm (Figura 26).

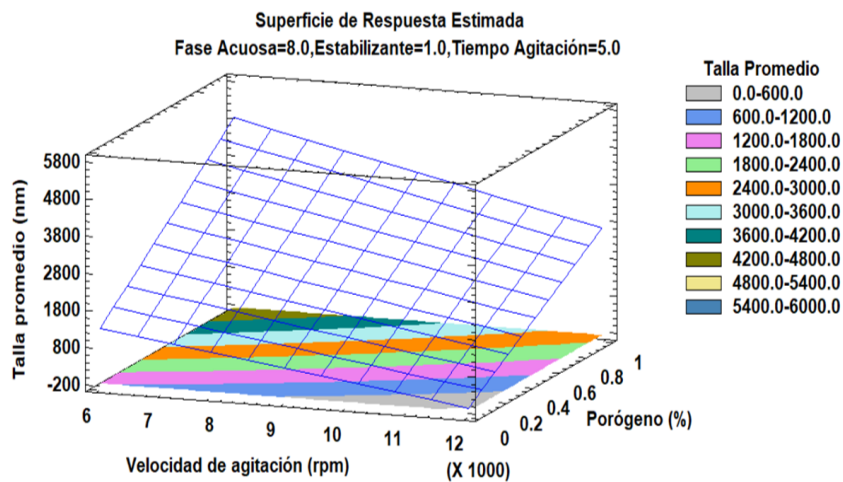


Figura 26. Contornos de superficie de respuesta estimada para la talla de 1 µm.

Se decidió desarrollar partículas con ese tamaño, ya que, se sabe que dependiendo del tamaño es como se depositarán las partículas en el interior del pulmón. Como se mencionó anteriormente, una característica que se desea de las partículas es que sean porosas, lo cual es conveniente para el desarrollo de las MP's de 1  $\mu\text{m}$ , ya que, será necesario agregar agente porógeno para poder desarrollarlas.

### 9.3 Caracterización de las MP's optimizadas de Gantrez® AN.

#### 9.3.1 Talla promedio, potencial Z y rendimiento del proceso.

Las condiciones de manufactura ya optimizadas se reprodujeron por triplicado para poder verificar el modelado y las predicciones sobre el tamaño promedio. En la Tabla 13 se muestran los valores predichos para cada factor, el tamaño objetivo de la optimización de 1000 nm, el valor obtenido experimentalmente de  $1030.77 \pm 230.83$  nm, así como el error en la predicción, obteniendo un valor del 3%.

**Tabla 13.** Niveles óptimos predichos para los factores y verificación del modelo.

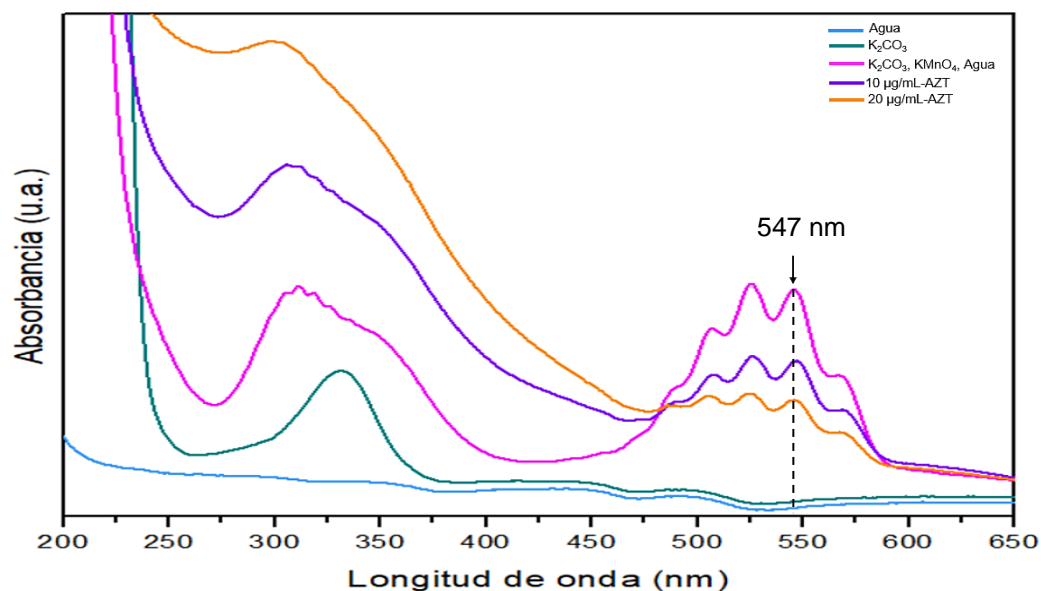
Factores					Variable de respuesta		Error de la predicción
Valores predichos					Objetivo de optimización	Valor experimental	
X <sub>1</sub> (mL)	X <sub>2</sub> (%)	X <sub>3</sub> (rpm)	X <sub>4</sub> (min)	X <sub>5</sub> (%)	Y1 (nm)	Y1 (nm)	3%
8	1	6000	5	0.5	1000	$1030.77 \pm 230.83$	

Se muestran valores promedio (n = 3)  $\pm$  D.E.

#### 9.4 Validación del método analítico para cuantificar AZT.

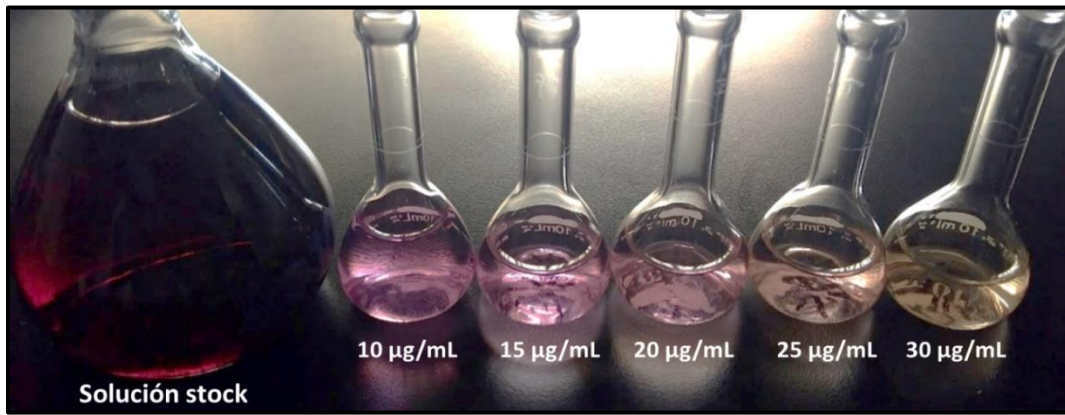
Debido a que la azitromicina no posee grupos cromóforos es complejo cuantificar el fármaco por UV (como se observó en el punto 9.1.1.3) por lo que se recurrió a usar una cinética de reacción mediante un método colorimétrico, empleando compuestos que reaccionan con el fármaco para poder cuantificar indirectamente la cantidad de este. Algunas ventajas que tienen estos métodos son: la selectividad de la medición ya que están basadas en la absorbancia con el tiempo de reacción, es sensible y el costo de la metodología es bajo, ya que se usan reactivos comunes y económicos.<sup>105</sup> La metodología empleada en nuestro caso fue por medio de la reducción del permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) en un medio alcalino (solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) en presencia de un grupo amino (azitromicina). El permanganato de potasio se usa como agente oxidante en métodos analíticos para determinar varios compuestos. Esto debido a que el manganeso presenta 6 estados de oxidación de 2+ a 7+, las reacciones se rigen por el pH del medio, ya que el ión manganeso heptavalente ( $\text{MnO}_4^-$ , VII) cambia de color púrpura a verde (ion manganato  $\text{MnO}_4^{2-}$ , VI) en medio alcalino, también presentándose el ion hipomanganato ( $\text{MnO}_4^{3-}$ , V) que es de color azul, mientras que en medio neutro y ácido se presenta el dióxido de manganeso ( $\text{MnO}_2$ , IV) que se presenta como un precipitado marrón, el cual es más estable que el manganeso (III) de color rosa y manganeso (II) que es incoloro o rosa muy pálido, los cuales no existen mucho tiempo.<sup>105,106,107,108</sup> La monitorización de los colores se hace por espectroscopia UV-Vis, a diferentes longitudes de onda, característicos de cada color. En la Figura 27, se muestra el gráfico de los barridos de espectrometría UV-Vis de cada uno de los compuestos para desarrollar las reacciones colorimétricas y así seleccionar la longitud de onda adecuada para poder realizar la curva de calibración de azitromicina.





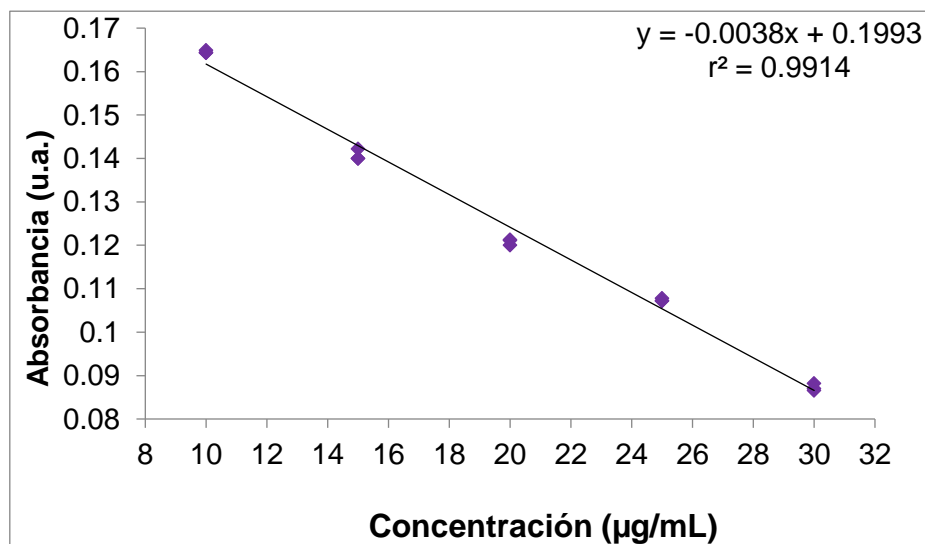
**Figura 27.** Espectros de absorción en UV-Vis de cada uno de los compuestos para realizar la reacción colorimétrica (rango: 200 – 650 nm).

Como se aprecia en la Figura 27, se seleccionó la longitud de onda de 547 nm para trabajar, ya que esta longitud, junto con 526 nm, son características del manganeso (VII) o el color púrpura del permanganato, además de que los materiales no presentan interferencia.<sup>109</sup> En la Figura 28, se muestran las coloraciones obtenidas para cada concentración como propuesta de curva de calibración, las cuales fueron 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL, observándose que a mayor concentración de AZT, la coloración final es amarilla.



**Figura 28.** Coloraciones obtenidas después de hacer reaccionar el  $\text{KMnO}_4$  con AZT y el  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Primer matraz corresponde a la solución stock de  $\text{KMnO}_4$ . Rango de concentraciones: 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g/mL}$ , de izquierda a derecha.

En la Figura 29 se muestra el gráfico correspondiente a la curva de calibración de la azitromicina con su respectiva  $r^2$  y ecuación de la recta, mientras que en la Tabla 14 se muestran los parámetros de desempeño que se evaluaron para validar la metodología para la cuantificación del fármaco.



**Figura 29.** Curva de calibración de azitromicina.

**Tabla 14.** Parámetros de desempeño de la validación del método analítico para AZT por UV-Vis.

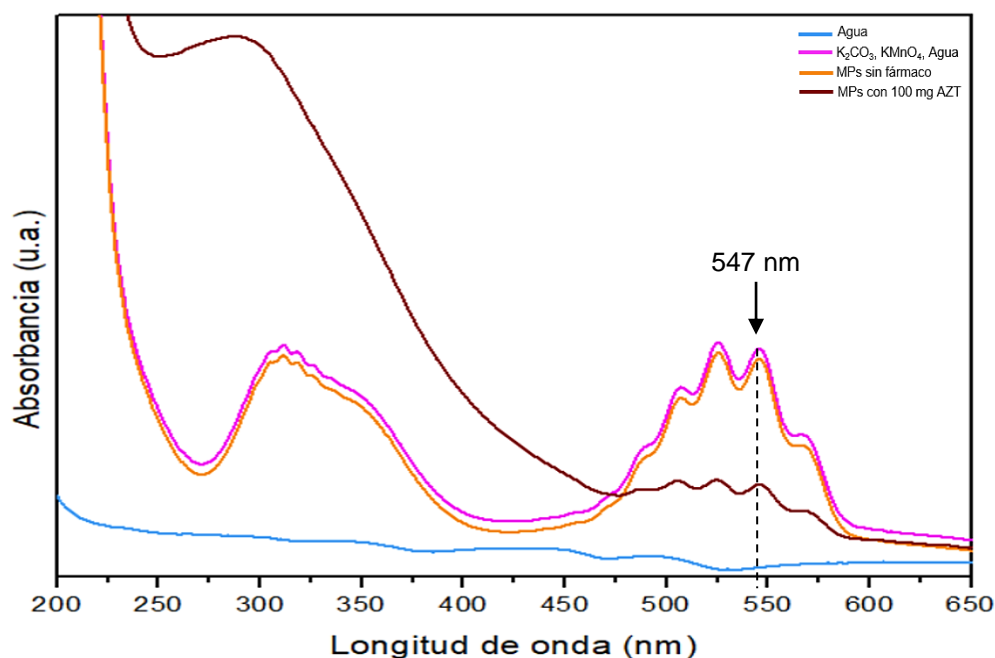
Parámetro	Criterio	Resultado	Cumple
Linealidad	$R^2 \geq 0.98$	$R^2 \geq 0.99$	Sí
Precisión (repetibilidad)	$CV \leq 3\%$	$CV = 0.46\%$	Sí
Exactitud	IC( $\mu$ ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 97-103%. $CV \leq 3\%$ .	IC( $\mu$ ) = de 96.93 a 101.66% Promedio aritmético = 99.29% $CV = 3.09\%$	Sí
Especificidad	En la longitud de onda del analito no hay otras señales.	No hay interferencia por parte de los excipientes (Figura 32).	Sí
Límite de detección	-	1.81 $\mu\text{g/ml}$	-
Límite de cuantificación	-	5.48 $\mu\text{g/ml}$	-

IC = Intervalos de confianza al 95%.

El subíndice indica el CV obtenido para cada concentración de la curva.

Criterios tomados de la Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.<sup>110</sup>

En la Figura 30, se muestran los barridos por espectroscopia UV-Vis de la reacción colorimétrica, de las MP's con y sin fármaco, esto para evaluar la especificidad del método y determinar si pudiera haber interferencia en las señales por la presencia de los materiales o excipientes de las partículas. Observando que no hay cambios en dicha longitud, es decir, no hay reacción de los materiales, por lo que la señal observada en el cambio de color solo es debido a la AZT.



**Figura 30.** Barridos por espectroscopia UV-Vis de la reacción de la solución de  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  con agua, las MP's de Gantrez® AN sin fármaco y con AZT (rango: 200 – 650 nm).

Con base en los resultados reportados se puede decir que el método desarrollado es adecuado para cuantificar AZT en los sistemas y en un medio acuoso en presencia de diferentes excipientes para todas las etapas del proyecto.

## 9.5 Caracterización de las MP's cargadas con AZT.

### 9.5.1 Talla promedio, potencial Z, rendimiento y eficiencia de encapsulación.

Una vez optimizado el proceso para desarrollar las partículas, se incorporó la azitromicina en el desarrollo de éstas. Se desarrollaron partículas incorporando diferentes cantidades de fármaco, 50, 100 y 150 mg. En la Tabla 15, se muestra el rendimiento obtenido, la talla promedio y el potencial Z, cuando las partículas se cargan con fármaco.

**Tabla 15.** Caracterización de las partículas de Gantrez® AN cargadas con AZT.

Partícula	Talla (nm)*	Potencial Z (mV)*	Rendimiento (%)*
MP's - 50 mg	1479.33 ± 68.39	-19.70 ± 3.03	83.22 ± 6.52
MP's - 100 mg	1104.67 ± 81.67	-22.50 ± 0.70	81.01 ± 2.16
MP's - 150 mg	1119.83 ± 290.13	-23.07 ± 5.98	63.37 ± 12.79

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

\*p-valor > 0.05, sin diferencia significativa.

Se obtuvo un rendimiento que va del 63% al 83%, esto puede depender principalmente por las condiciones de manufactura al preparar cada tipo de partícula, pues en los pasos de proceso puede haber pérdidas, sobre todo en la etapa de recuperación. La talla para cada tipo de micropartícula es similar a la del proceso de predicción y optimización sin fármaco. Para el potencial Z, se obtuvieron valores negativos, esto se debe a que el polímero tiene una carga negativa ya que posee grupos carboxilo (-COOH) al hidrolizarse parcialmente en medio acuoso.<sup>111</sup>

Se empleó ANOVA de una vía con prueba post-hoc de LSD para saber si había diferencias significativas en el rendimiento, la talla y el potencial Z al incorporar las diferentes cantidades de fármaco. Para los 3 parámetros se obtuvieron p-valores mayores a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula (0.051 para rendimiento, 0.129 para la talla y 0.055 para el potencial Z), indicándonos que no hay cambios significativos al incorporar las diferentes cantidades de AZT en las MP's.

Para cuantificar el fármaco encapsulado y determinar la eficiencia de encapsulación se decidió desintegrar las MP's en un disolvente en el que el fármaco y las partículas fueran solubles. Primero se evaluó la solubilidad de las partículas en 3 disolventes (ver Tabla 16), observando que el único disolvente en el cual son solubles por completo fue en el metanol, donde la azitromicina también es soluble, es por eso por lo que se optó por solubilizar las partículas y el fármaco en ese disolvente.

**Tabla 16.** Solubilidad de las MP's cargadas con AZT en disolventes.

Solvente	Grado de solubilidad
Metanol	Muy soluble
Acetona	Insoluble
Acetonitrilo	Insoluble

Ya que el método validado arrojó que los excipientes no interfieren con la cuantificación de la AZT, se realizó la determinación de eficiencia de carga. En la Tabla 17 se muestra la cantidad de fármaco expresado en porcentaje que se pudo encapsular en las partículas, así como los mg encapsulados. Se observa que nuestros sistemas logran una eficiencia de encapsulación entre 28 – 42%, el ANOVA de 1 vía evidenció que no hay diferencias significativas (p-valor: 0.092) en la carga de AZT cuando se emplean cantidades iniciales crecientes de fármaco. Esto posiblemente se deba a que cuando se forman las MP's estas llegan a un punto de saturación del fármaco, por lo que no es posible encapsular mayor cantidad.

**Tabla 17.** Eficiencia de encapsulación de azitromicina en las MP's de Gantrez® AN.

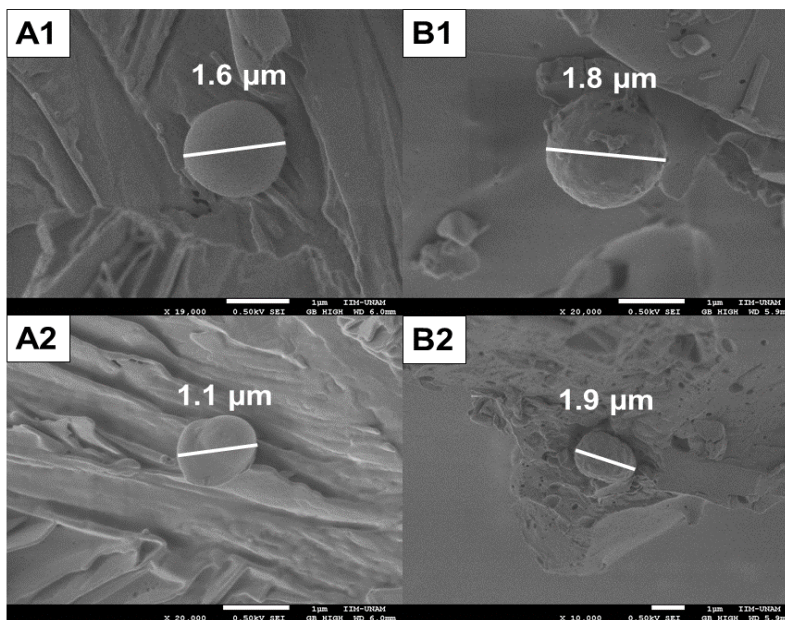
Partículas	Eficiencia de carga (%)	mg de AZT encapsulados
MP's - 50 mg	28.10 ± 5.29	14.05 ± 0.6
MP's - 100 mg	42.17 ± 8.36	42.17 ± 0.7
MP's - 150 mg	31.83 ± 5.80	47.74 ± 0.7

Se muestra el valor promedio (n = 3) ± D.E.  
p-valor > 0.05, sin diferencia significativa.

Considerando que no hay diferencias significativas en la talla promedio, el potencial Z y la eficiencia de encapsulación en las condiciones de carga (50, 100 y 150 mg), se decidió trabajar con MP's preparadas con 100 mg iniciales de AZT para los estudios de caracterización física y las pruebas de eficacia *in vitro*, ya que tienen un rendimiento alto, un tamaño de partícula adecuado y un potencial Z relativamente más negativo que las otras partículas, y que se encuentran en un rango de tamaño de 1.1  $\mu\text{m}$ .

#### **9.5.2 Determinación de la morfología de las micropartículas.**

Se decidió determinar la morfología de las MP's sin fármaco y con AZT, se usó la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido, SEM (siglas en inglés), esta técnica nos proporciona información sobre la topografía, composición y estructura cristalográfica de una muestra, esto debido a que se hace pasar un haz de electrones de alta energía (5 – 30 kV) que interacciona con la muestra a analizar.<sup>112</sup> Con esta técnica fue posible corroborar el tamaño promedio obtenido anteriormente por dispersión dinámica de luz. En la Figura 31 se muestran las micrografías de las MP's sin fármaco (lado izquierdo) y las MP's con AZT (lado derecho). Observando que las MP's sin fármaco tienen un tamaño aproximado de  $1.35 \pm 0.35 \mu\text{m}$ , mientras que en las MP's con fármaco tienen un tamaño aproximado de  $1.85 \pm 0.07 \mu\text{m}$ . Lo cual concuerda con lo obtenido por medio de dispersión de luz dinámica donde las MP's se encuentran con un tamaño alrededor de 1  $\mu\text{m}$ . En cuanto a la morfología se observan MP's esféricas y sólidas, lo que podría sugerir la ausencia de poros.



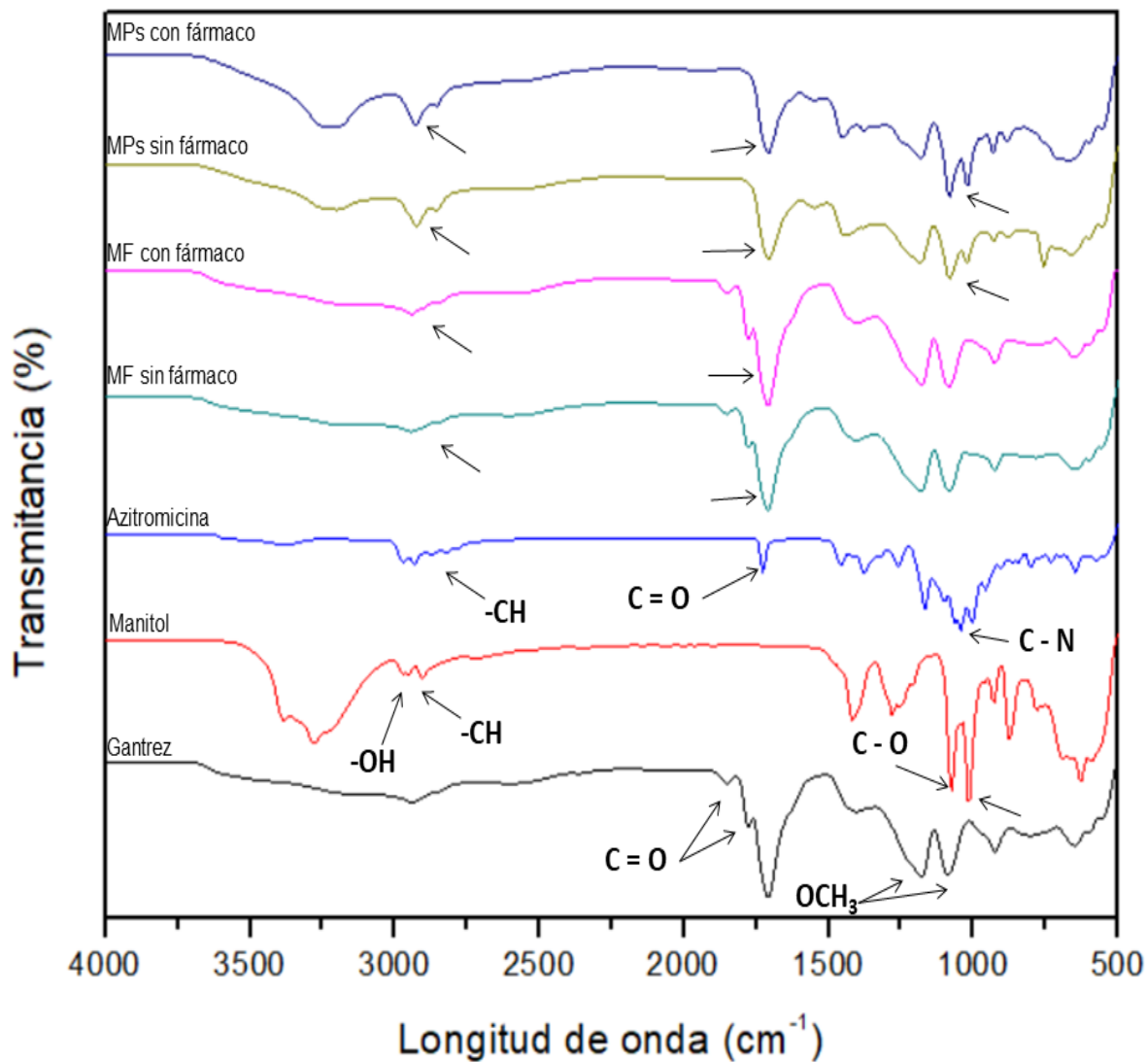
**Figura 31.** Micrografías por SEM de las (A1-2) MP's sin AZT y (B1-2) MP's cargadas con AZT.

### 9.5.3 Interacción entre los componentes por FTIR.

La técnica de FTIR nos permite saber que grupos funcionales están presentes en las moléculas, debido a que se hace pasar radiación a través de una muestra y esta es capaz de absorber o emitir los fotones, provocando que su estado energético cambie, manifestándose como un cambio en su estado electrónico vibracional o rotacional, lo cual es detectado por el equipo. Además de que cada cambio es propio de cada molécula, por lo que nos puede brindar información sobre la formación de nuevos enlaces y los cambios que pudieran ocurrir al mezclarse físicamente varias sustancias o al ser transformadas en partículas.<sup>113</sup> En la Figura 32, se muestran los espectros de FTIR de las materias primas, las mezclas físicas y las MP's con y sin fármaco. En el espectro del polímero (Gantrez® AN) se observa las bandas de los grupos carbonilo (C = O) del anhídrido cíclico a  $1851\text{ cm}^{-1}$  y  $1774\text{ cm}^{-1}$ , y las bandas correspondientes al grupo metil éter en  $1180\text{ cm}^{-1}$  y  $1087\text{ cm}^{-1}$ .<sup>62</sup> En cuanto al espectro del crioprotector (manitol), se observan bandas a  $3386\text{ cm}^{-1}$  y  $3278\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a los grupos hidroxilo (-OH); en  $2970\text{ cm}^{-1}$ ,  $2947\text{ cm}^{-1}$  y en  $2908$



$\text{cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del  $-\text{CH}$ ; en las bandas a  $1072 \text{ cm}^{-1}$  y  $1018 \text{ cm}^{-1}$  corresponden al enlace  $\text{C} - \text{O}$ .<sup>114</sup> Para el espectro del fármaco (AZT): se observan bandas en la región de  $2970 \text{ cm}^{-1}$  a  $2777 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde al enlace  $-\text{CH}$  de los grupos metilo; en  $1728 \text{ cm}^{-1}$  corresponde al carbonilo ( $\text{C} = \text{O}$ ); las bandas en  $1164 \text{ cm}^{-1}$  y  $1041 \text{ cm}^{-1}$  corresponden al enlace  $\text{R-O-R}$  y el enlace  $\text{C-N}$  respectivamente (Ver resultados del punto 9.1.1.1).<sup>115,116</sup> En cuanto a las mezclas físicas con y sin fármaco, no se observa aparición o desaparición de bandas de las materias primas, lo que indica que no hay interacción significativa en los compuestos, ya que realmente se observa el espectro del polímero, esto puede deberse a que la cantidad de fármaco y manitol es pequeña en relación con el polímero.<sup>62</sup> Para el caso de las MP's con y sin fármaco se observan bandas que corresponden al Gantrez® AN y al manitol, en la región de  $2931$  a  $2854 \text{ cm}^{-1}$  puede haber una suma de las vibraciones de la AZT y del manitol, observando que las bandas en esa región son más intensas en las partículas que en las materias primas. Se observa que la banda del polímero en  $1180 \text{ cm}^{-1}$ , así como las bandas en  $1080 \text{ cm}^{-1}$  y  $1018 \text{ cm}^{-1}$  del manitol se mantienen integras en las MP's con y sin fármaco. No se observan bandas del fármaco en las MP's, esto puede deberse a que la AZT se encuentra dispersa en el interior de la partícula, además de que la cantidad del fármaco es muy pequeña en comparación del polímero (relación 1:5, AZT: Gantrez® AN).



**Figura 32.** Espectros IR de las materias primas, las mezclas físicas y las MP's con y sin AZT. Las flechas indican las bandas mencionadas en el texto.

#### 9.5.4 Perfil de difracción por DRX.

La Difracción por Rayos X es una técnica que se usa para caracterizar e identificar las fases cristalinas de un material en bulto, su ventaja es que no destruye el material analizado.<sup>117</sup> En la Figura 33, se muestran los difractogramas de las materias primas, las mezclas físicas con y sin fármaco, así como las MP's sin y con AZT. Puede observarse que la estructura del Gantrez® AN corresponde a una sustancia amorfa.<sup>118</sup> En cuanto al manitol y la azitromicina se observan patrones de difracción intensos y bien definidos, característicos de estructuras cristalinas. Al igual que en las mezclas físicas con y sin fármaco, donde se observan los patrones del manitol con azitromicina y del manitol solo, respectivamente. En las MP's sin fármaco, se observa el efecto del polímero respecto a su fase amorfa y señales poco intensas las cuales corresponden al manitol, indicando la presencia de este en las MP's liofilizadas.

En el caso de las MP's con fármaco se observa que se conservan algunas señales de la AZT y del manitol, lo cual nos da la idea de que en el caso de la AZT no sufre algún cambio relacionado al proceso de desarrollo de las MP's, ya que se sabe que el fármaco presenta 3 fases (fase anhidra, monohidrato y dihidrato), manteniéndose en su fase anhidra original.<sup>103</sup> Por otro lado, se observa que se presenta un ensanchamiento de las señales y disminución en su intensidad, lo cual indica el pequeño tamaño que poseen las MP's, así como una disminución en la cristalización de la AZT. Lo cual sucede en otros casos de partículas, usando Gantrez® AN como polímero, en donde el fármaco es de naturaleza cristalina y al formar la nanopartícula, este sufre una disminución en la estructura cristalina o se amorfiza.<sup>119</sup> Lo observado en el patrón de rayos X nos indica que el fármaco se encuentra disperso en la micropartícula por efecto del polímero. Esto se relaciona con el trabajo de Adeli, E (2017), en donde desarrolló NPs con PVA incorporando AZT, observando el mismo efecto del polímero sobre el fármaco.<sup>120</sup>

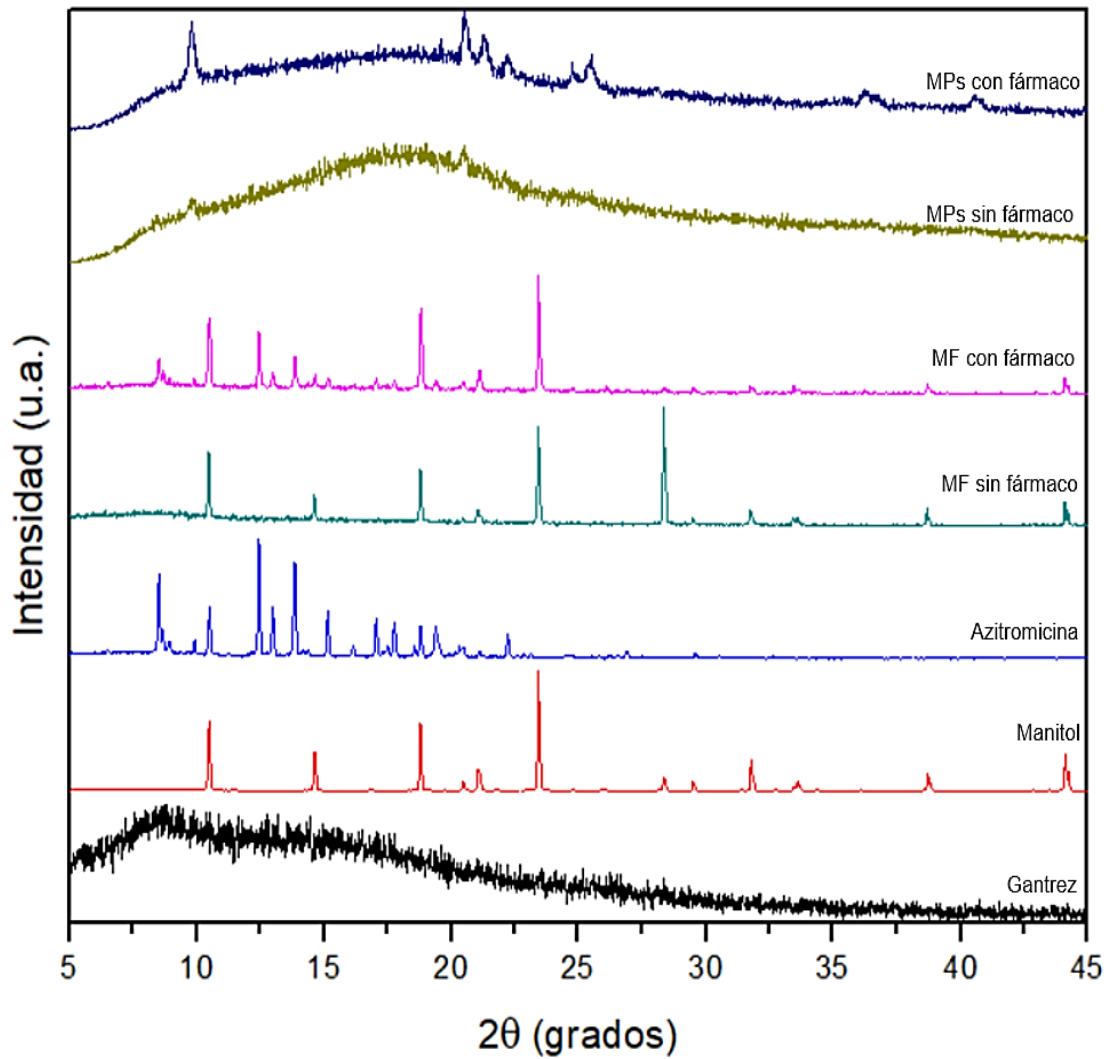
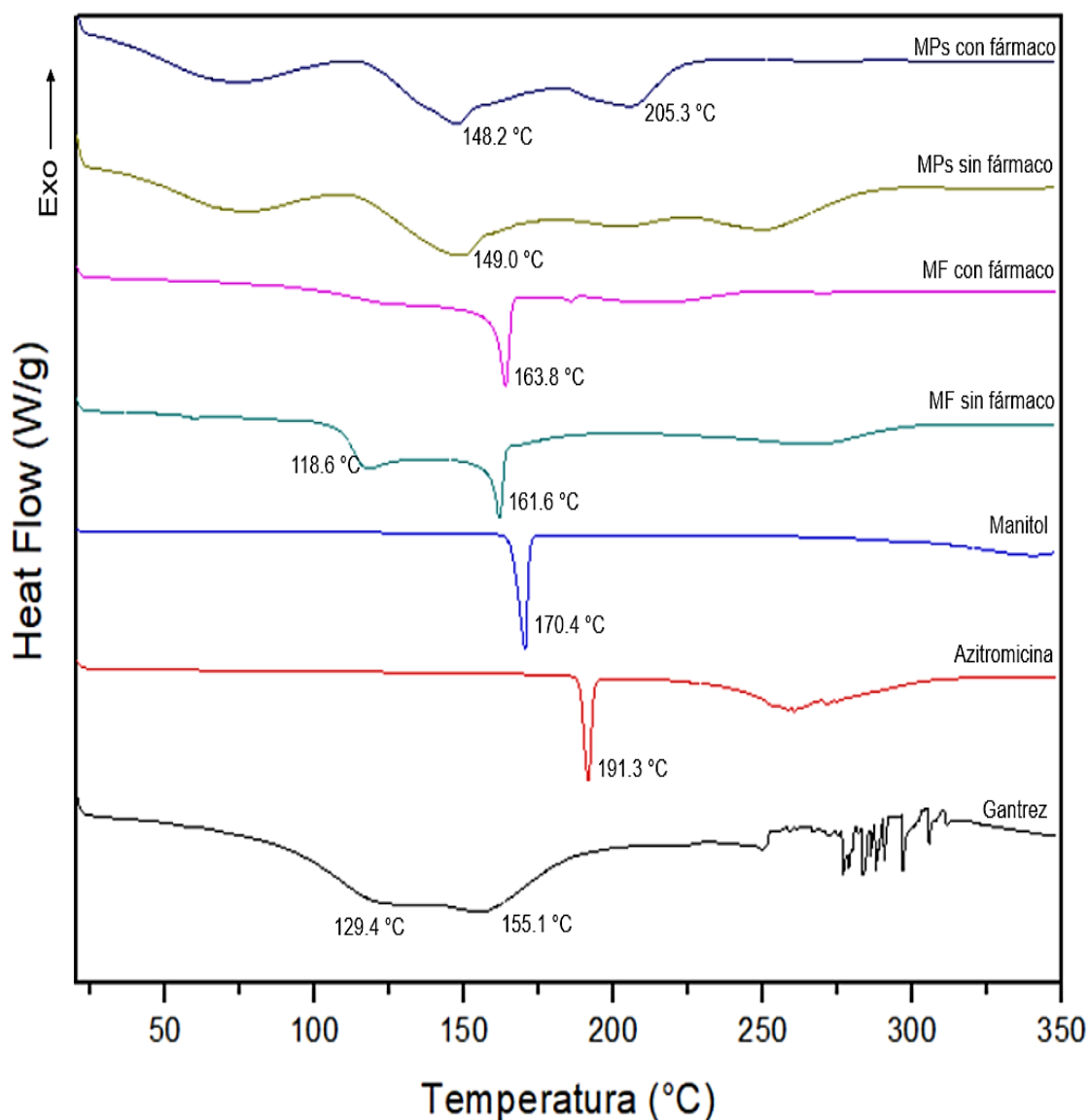


Figura 33. Difractogramas de las materias primas, las mezclas físicas y las MP's con y sin AZT.

### 9.5.5 Compatibilidad e interacción de los componentes por DSC.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica experimental que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, durante un tiempo y rango de temperaturas determinado. Además, nos proporciona información sobre la cristalinidad, la presencia de hidratos, polimorfismo, temperatura de fusión, de ebullición, sublimación, transición vítrea, descomposición e interacciones que puedan ocurrir en mezclas de varias sustancias o materiales, así como para determinar la estabilidad térmica de los mismos.<sup>121,122</sup> En la Figura 34, se muestran los termogramas de las materias primas, mezclas físicas y las MP's con y sin fármaco. En el caso del Gantrez® AN se presenta un evento endotérmico a partir de 75 °C a 137 °C, inmediatamente se presentó la transición vítrea (T<sub>g</sub>) del polímero en 155 °C tal y como lo reporta el proveedor y otros autores que utilizan este polímero, en 249 °C se observa que se comienza a descomponer el polímero.<sup>62,60</sup> En el caso de la azitromicina, presentó un pico endotérmico a 191 °C, el cual corresponde al punto de fusión que va de 188 °C a 189 °C, además de que este pico endotérmico también lo reporta el proveedor a un valor de 187.70 °C<sup>100</sup>, posteriormente se observa la descomposición del fármaco a 260 °C. En el manitol, se observa un pico endotérmico a 170 °C, el cual corresponde a su punto de fusión 168 °C.<sup>123,124</sup> En cuanto a la mezcla física sin fármaco se observa un evento endotérmico a 118 °C correspondiente al Gantrez® AN, mientras que a 161 °C se observa otro pico endotérmico correspondiente al manitol, de modo que las señales de las materias primas no se ven afectadas lo cual nos indica que no interactúan entre sí. En el caso de la mezcla física con fármaco, se observa un pico endotérmico a 163 °C correspondiente al manitol, posteriormente se observa un pico muy pequeño a 185 °C el cual corresponde a la azitromicina, de igual manera que con la mezcla física sin fármaco las señales de las materias primas no se ven afectadas. En el caso de las MP's sin y con AZT, se aprecia un desplazamiento de la T<sub>g</sub> del polímero en 149 y 148.2 °C, respectivamente, debido a la manipulación de este. Además, no se observan eventos endotérmicos correspondientes a la AZT, esto puede deberse a que la proporción del polímero es mayor en comparación con el fármaco de igual manera que se describió en el FTIR. También se reafirma la

conclusión de que el fármaco se encuentra disperso molecularmente en la fase amorfa del polímero, ya que se comporta como si fuera una mezcla sólida donde todos los componentes están homogéneos.<sup>118</sup> El resultado de este comportamiento está relacionado con el trabajo de Ghari, T. et al. (2014), donde incorporó AZT en NPs de PLGA, obteniendo como resultado que el evento endotérmico de la AZT no se detectó cuando se encontraba en las NPs, sugiriendo que puede deberse a una fase amorfa o un estado de solución sólida por parte del fármaco.<sup>38</sup>

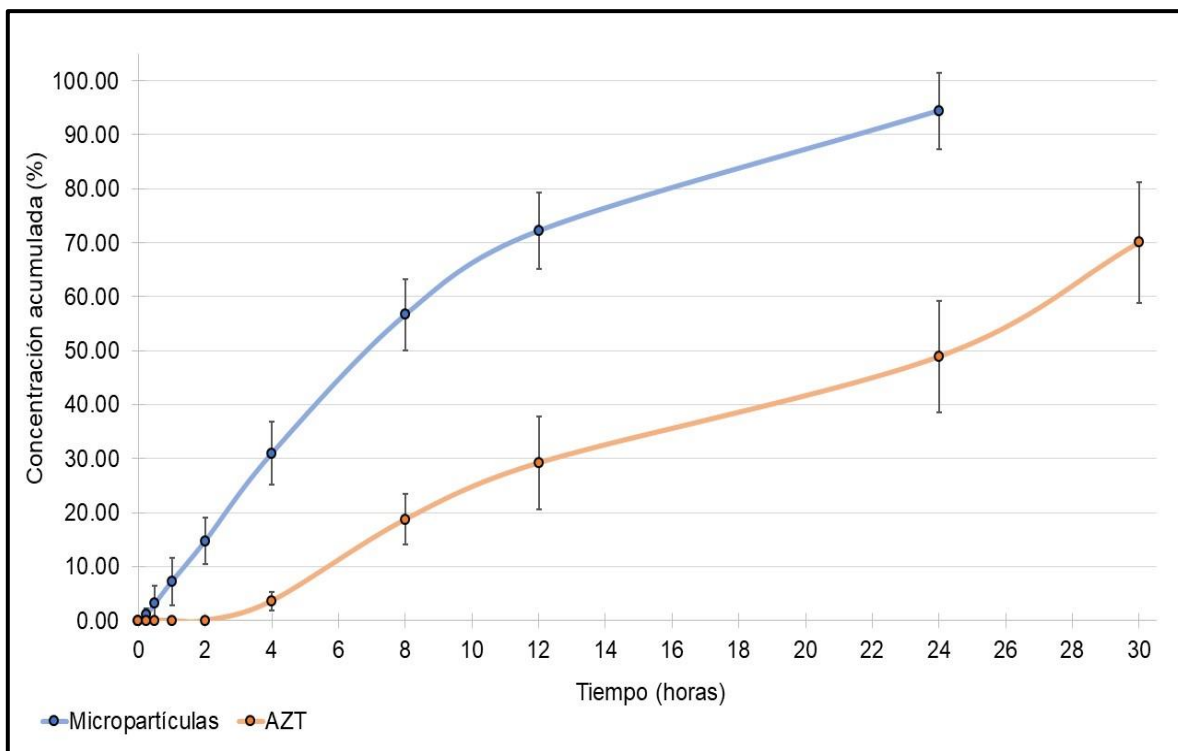


**Figura 34.** Termogramas de las materias primas, mezclas físicas con y sin fármaco y de las MP's con y sin AZT.

## 9.6 Evaluación de la eficiencia *in vitro* de las MP's.

### 9.6.1 Evaluación del perfil de liberación de las MP's.

Se evaluó el perfil de liberación de las MP's cargadas con AZT (lote óptimo; manufacturadas con 100 mg iniciales de AZT). Como control se evaluó la disolución de polvo de AZT. En la Figura 35 se tienen los perfiles correspondientes, se observa que las MP's liberan cerca del 90% del fármaco a las 24 h, mientras que la AZT libre apenas llega a disolver el 70% a las 30 h, esto puede deberse a que el polvo tiene que pasar por el proceso de hidratación en la bolsa de diálisis y su posterior disolución, ya que el fármaco es de baja solubilidad y se encuentra en estado cristalino, su velocidad de disolución es más lenta en comparación con los sistemas, pues como se describió anteriormente en la caracterización de las MP's, el fármaco se encuentra amorfizado dentro de las MP's y se sabe que los fármacos en este estado disuelven más rápido que en su forma cristalina.



**Figura 35.** Perfiles de liberación. Se muestra valor promedio  $\pm$  EE: MP's n = 5 y AZT libre n = 3.

Una vez obtenidos los perfiles de liberación, estos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos con la finalidad de dilucidar cuál es el mecanismo de liberación del fármaco a partir de las MP's.<sup>125</sup> En la Tabla 18 se muestra el valor de  $r^2$  obtenido para cada modelo ajustado, así como la respectiva constante, observándose que el que tiene mejor ajuste es el modelo de Korsmeyer-Peppas, por lo que se calculó el exponente de liberación "n", obteniendo un valor de 1.07, lo que indica que el mecanismo de liberación del fármaco es por un transporte de super caso II, donde la liberación del fármaco es controlada por la combinación entre el hinchamiento y la erosión del polímero,<sup>126</sup> además de que las cadenas del polímero se relajan para permitir la difusión del fármaco, involucrando también la velocidad con la que estas se relajan, por lo que, la velocidad de difusión aumenta conforme aumente la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas.<sup>127</sup>

**Tabla 18.** Diferentes modelos matemáticos ajustados al perfil de liberación.

Modelo matemático	$r^2$	Constante
Orden cero	0.9131	$K_0 = 4.2073 h^{-1}$
Primer orden	0.5986	$K_1 = 0.1709 h^{-1}$
Higuchi	0.9863	$K_H = 22.928 h^{-1/2}$
Korsmeyer-Peppas	0.9882	$K_{KP} = 66.772 h^{-n}$ $n = 1.07$
Hixson-Crowell	0.9861	$K_{HC} = 0.1848 h^{-1/3}$

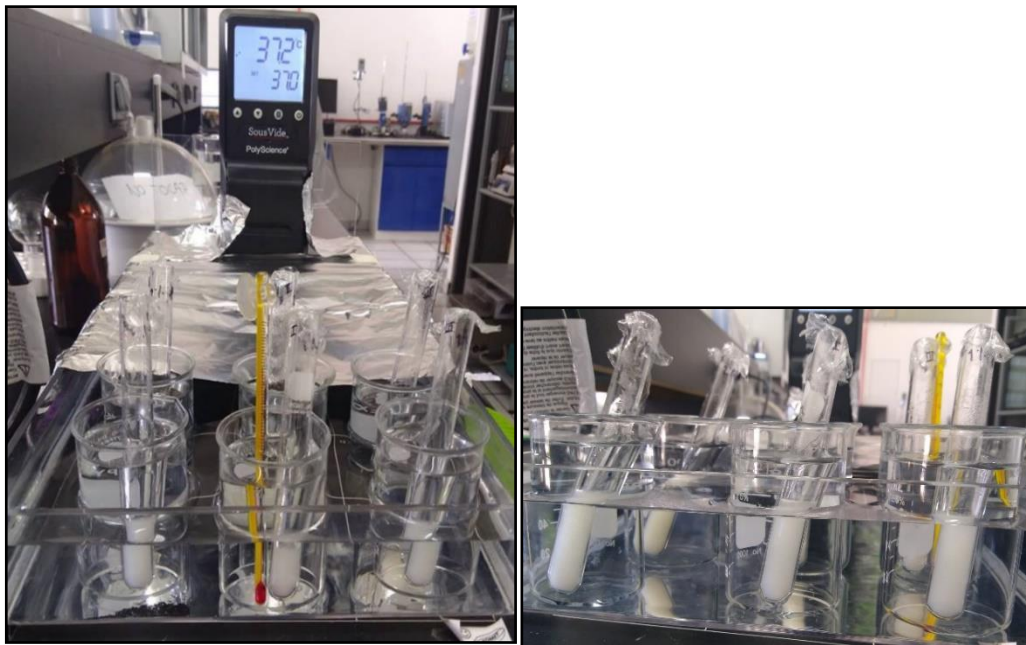


## 9.6.2 Evaluación de la bioadhesión de los sistemas.

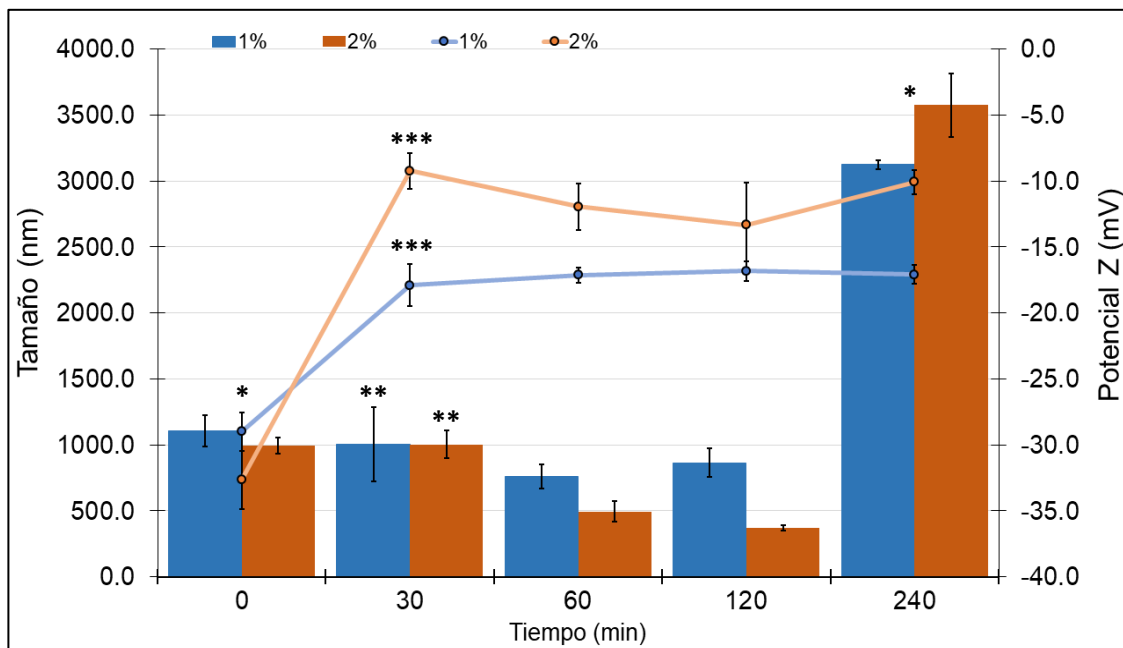
### 9.6.2.1 Por interacción con mucina.

Un método para evaluar la bioadhesión de las MP's es por medio de interacción con mucina. La mucina es una glicoproteína que se encuentra en la capa de moco, estas glicoproteínas se asocian entre sí por medio de enlaces no covalentes, formando así la compleja red que le da estructura al moco.<sup>57</sup> Actualmente se han identificado 21 genes que codifican a varios tipos de mucinas, de las cuales 14 se encuentran en la vía respiratoria. Una de las principales mucinas que se encargan de formar el gel de moco es la mucina II, la cual es secretada por las células caliciformes que se encuentran en el epitelio de las vías respiratorias.<sup>6</sup> En la Figura 36, se muestra cómo es que se montó el experimento y en la Figura 37, se observa el comportamiento de las MP's al interactuar con la mucina en un periodo de 4 h. Se puede apreciar que durante los primeros 30 min la talla de las partículas se mantuvo constante, a partir de la hora hay una disminución de la talla y al finalizar el periodo la talla de las MP's aumenta considerablemente, mientras que el potencial Z tiende hacia la neutralidad de manera de constante desde los 30 hasta los 240 min. La disminución de la talla se debe a que las MP's comienzan a degradarse y posteriormente interaccionan con las mucinas, estas se adsorben a las MP's, obteniendo así un aumento de tamaño significativo al final del ensayo. Mientras que el cambio en el potencial Z puede deberse a que, las MP's al estar hechas con un polímero hidrofóbico interaccionan con las partes hidrofóbicas de las mucinas (dominios ricos en cisteína), lo cual provoca que al momento de agregarse, las partes hidrofílicas de la mucina que están cargadas negativamente se escondan, dejando expuestas sólo las regiones hidrófobas que carecen de carga, por lo que se presenta solo lectura de las regiones que todavía muestran alguna carga negativa de los aglomerados entre las MP's y las mucinas, confirmando así la interacción entre estas.<sup>128,129,130</sup> Se analizaron estos valores por ANOVA de dos vías y se obtuvo un p-valor menor al 0.05, lo cual indica que hay diferencia significativa entre el tamaño y potencial Z conforme pasa el tiempo, respectivamente. Por otro lado, con las concentraciones de mucina evaluadas (1 y 2%), de igual manera se analizaron los datos por ANOVA

de dos vías, obteniendo como resultado que no hay diferencia significativa de una concentración a otra, tomando en cuenta el tamaño. En el caso del potencial Z, si hay diferencia significativa entre las dos concentraciones, ya que, se observa que, al aumentar la concentración de mucina el potencial Z se desplaza más hacia la neutralidad que usando una concentración menor.



**Figura 36.** Sistema montado para evaluar la interacción mucina-MP's.



**Figura 37.** Tamaño promedio y potencial Z de las MP's al interactuar con mucinas. Se muestra el valor promedio ( $n = 2$ )  $\pm$  D.E.

\* p-valor  $< 0.05$ , con diferencia significativa respecto al tamaño y potencial Z considerando el tiempo (ANOVA de 2 factores).

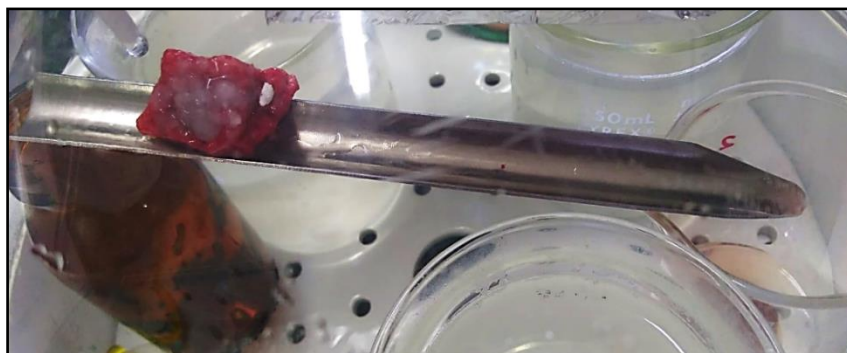
\*\* p-valor  $> 0.05$ , sin diferencia significativa respecto al tamaño considerando la concentración de mucina (ANOVA de 2 factores).

\*\*\* p-valor  $< 0.05$ , con diferencia significativa respecto al potencial Z considerando la concentración de mucina (ANOVA de 2 factores).

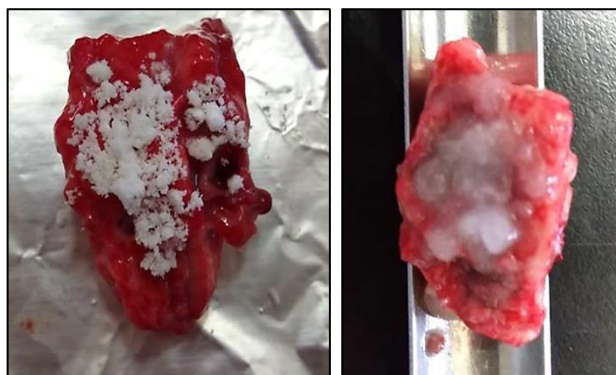
### 9.6.2.2 Por flujo continuo en tejido de pulmón.

Un método para evaluar la bioadhesión de las MP's es por medio de flujo continuo, el cual consiste en colocar cortes de tejido sobre una rampa inclinada, en la cual se coloca las partículas a evaluar y se hacer pasar un medio para lavar el tejido, todo esto en condiciones controladas de temperatura y humedad.<sup>85</sup> De los 6 experimentos de las MP's sobre el tejido de pulmón, se obtuvo un porcentaje de bioadhesión del  $54.9 \pm 4.5\%$ . En la Figura 38, se muestra una imagen de cómo se montó el sistema para realizar el experimento. Por otro lado, en la Figura 39, se muestran las MP's liofilizadas sobre el pulmón antes del experimento (lado izquierdo) y las MP's que quedaron sobre el tejido después del experimento.

Claramente puede observarse el hinchamiento que presentan las MP's al estar en contacto con el medio. Como ya se ha explicado en la introducción, el Gantrez® AN posee un grupo anhídrido que al estar en un medio acuoso, se hidroliza y da lugar a la formación de ácidos carboxílicos, los cuales interaccionan con la mucosa por adsorción, por medio de interacciones por puentes de hidrógeno, tal como lo describe la teoría del mismo nombre (Teoría de adsorción).<sup>65,67</sup>



**Figura 38.** Sistema montado para el experimento de bioadhesión con tejido de pulmón de cerdo.



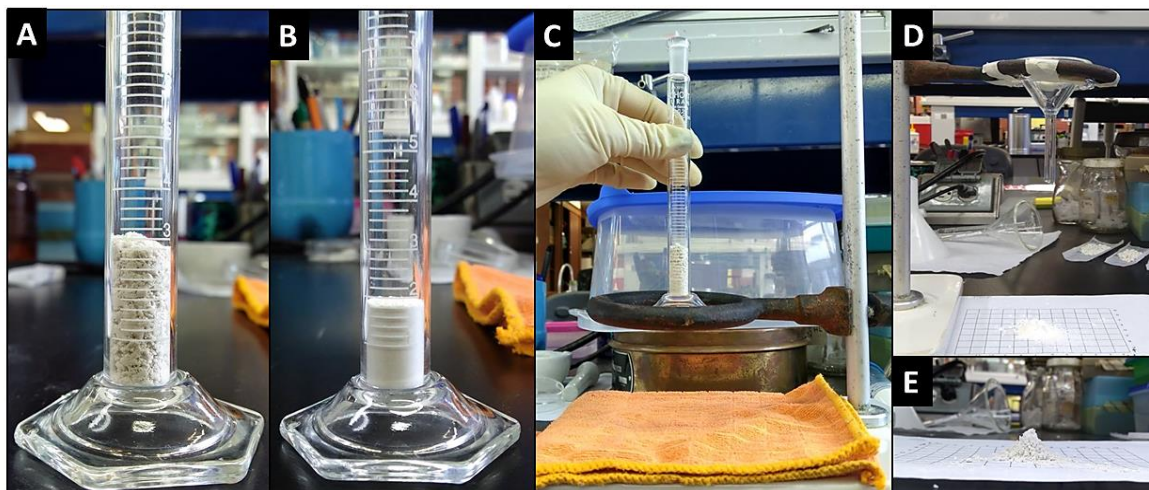
**Figura 39.** Tejido de pulmón de cerdo con MP's antes del ensayo (izquierda) y después del ensayo (derecha).

### 9.6.3 Formulación y evaluación de las propiedades aerolizables de las MP's.

Se emplearon dos métodos para evaluar las propiedades aerolizables de las MP's, unas por medio de una formulación en polvo seco para inhalación y otra como suspensión para nebulización por aerosol.

#### 9.6.3.1 Como polvo seco para inhalación.

Regularmente cuando se desarrolla una formulación como polvo seco para inhalación, las MP's del fármaco presentan propiedades de flujo pobres, debido las fuerzas cohesivas por el pequeño tamaño que poseen. Por lo que se recurre a la incorporación de poblaciones de partículas gruesas (de 50 a 100  $\mu\text{m}$ ), esto para mejorar la dispersión del flujo y disminuir esa cohesión, regularmente se emplea como acarreador la lactosa monohidratada.<sup>131</sup> Para el proyecto se empleó la lactosa como acarreador. Para tener una mezcla homogénea de la lactosa y las MP's, ambos materiales se tamizaron por una malla del número 200, lo cual da un tamaño de partícula de 75  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Posteriormente se realizaron mezclas de MP's-lactosa a diferentes proporciones, evaluando las propiedades de flujo de los polvos (ver Figura 40).



**Figura 40.** Ejemplos de evaluaciones de las propiedades de flujo de los polvos. A) Densidad aparente de la formulación. B y C) Densidad compactada. D y E) Evaluación del ángulo de reposo y velocidad de flujo.

Para las formulaciones que consisten en polvos secos es de suma importancia evaluar sus propiedades reológicas, ya que esto nos dará una idea de la fluidez que presentarán los polvos al momento del llenado en el dispositivo, así como en la dispersión de este hacia los pulmones. Las propiedades reológicas que se evalúan son: la densidad aparente y compactada, el índice de compresibilidad, el índice de Hausner, el ángulo de reposo y la velocidad de flujo. Todos en conjunto nos dan una idea de la fluidez que presentan los polvos.<sup>87</sup> En la Tabla 19, se muestran los resultados obtenidos de las propiedades de flujo de la lactosa, las MP's y las mezclas preparadas.

**Tabla 19.** Parámetros evaluados para determinar las propiedades reológicas de los polvos.

Muestra/Parámetro	Densidad aparente (g/mL) *	Densidad compactada (g/mL) *	Índice de Carr **	Índice de Hausner **	Ángulo de reposo (°) **	Velocidad de flujo (g/seg) ***
Lactosa	0.42 ± 0.02	0.58 ± 0.02	27.75 ± 1.55	1.38 ± 0.03	48.33 ± 4.24	0.03 ± 0.01
Micropartículas	0.24 ± 0.00	0.39 ± 0.00	39.31 ± 1.19	1.65 ± 0.03	48.81 ± 4.12	0.01 ± 0.00
a (1:0.5)	0.26 ± 0.02	0.36 ± 0.02	26.98 ± 9.62	1.39 ± 0.18	49.44 ± 4.42	0.02 ± 0.00
b (1:1)	0.29 ± 0.00	0.40 ± 0.00	28.57 ± 0.00	1.40 ± 0.00	50.10 ± 2.92	0.02 ± 0.00
c (1:1.5)	0.30 ± 0.03	0.43 ± 0.03	29.76 ± 5.46	1.43 ± 0.11	51.98 ± 2.80	0.02 ± 0.00
d (1:2)	0.36 ± 0.03	0.54 ± 0.06	31.48 ± 11.23	1.49 ± 0.27	47.53 ± 3.03	0.03 ± 0.01
e (1:2.5)	0.41 ± 0.03	0.58 ± 0.03	29.17 ± 8.05	1.42 ± 0.16	49.53 ± 3.52	0.02 ± 0.00

Se muestra el valor promedio ± DE; Densidad aparente, compactada, índice de Carr e índice de Hausner para todas las muestras (n = 3); velocidad de flujo y ángulo de reposo para lactosa y MP's (n = 9); velocidad de flujo y ángulo de reposo para las muestras a, b, c, d y e (n = 6).

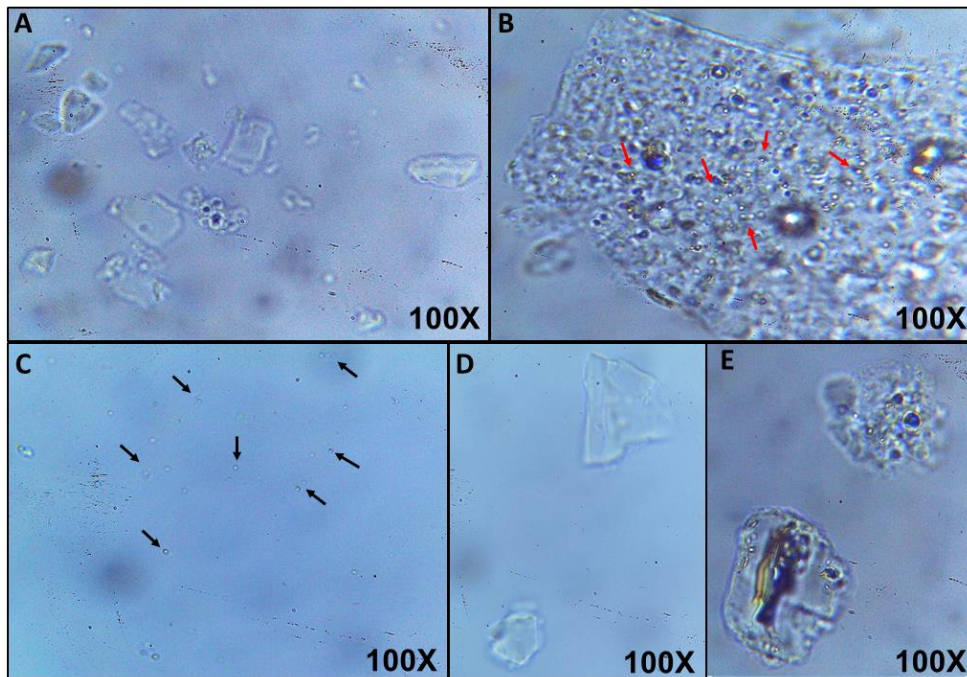
\* p-valor < 0.05, diferencia significativa entre lactosa, MPs y muestras a, b y c. No hay diferencia entre lactosa y las muestras d y e.

\*\* p-valor > 0.05, no hay diferencia significativa.

\*\*\* p-valor < 0.05, hay diferencia significativa entre la lactosa, MPs y muestras a y c. No hay diferencia significativa entre muestras a, b, c, d, y e.

En las mezclas se observa que, al aumentar la cantidad de lactosa las propiedades reológicas van aumentando. De acuerdo con la FEUM, los valores obtenidos de índice de compresibilidad e índice de Hausner para las mezclas de las MP's con lactosa indican que se tienen propiedades de flujo pobres y extremadamente malas, respectivamente. Para el caso del ángulo de reposo, de igual manera en todas las mezclas se obtienen valores que indican que la capacidad de flujo de los polvos es pobre.<sup>132,133</sup> La falta de mejora en las propiedades de flujo al agregar la lactosa, puede deberse a la alta fuerza de cohesión de las MP's. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía junto con una prueba post-hoc de Tukey para determinar si había diferencias significativas entre las mezclas y los materiales. Finalmente se optó por seleccionar como mezcla óptima la muestra "a", con la relación 1:0.5 (MP's:lactosa), claramente puede observarse que al incorporar la lactosa a las MP's, sus propiedades de flujo mejoran, ya que presenta los valores más bajos de las mezclas, además de que se sabe que las partículas con una densidad menor que 0.4 g/mL pueden ser depositadas exitosamente en el interior de los pulmones.<sup>134</sup>

Una vez seleccionada la formulación óptima, se evaluaron sus propiedades de dispersión. Primero se observó la lactosa, las MP's y la mezcla óptima en microscopio óptico, las imágenes se incluyen en la Figura 41. Claramente pueden observarse las MP's incrustadas en la matriz de manitol, el cual cumple la función de protección contra el estrés de la formación de los cristales de hielo y prevenir la agregación de las partículas durante el proceso de liofilización (Figura 41-B).<sup>135</sup>

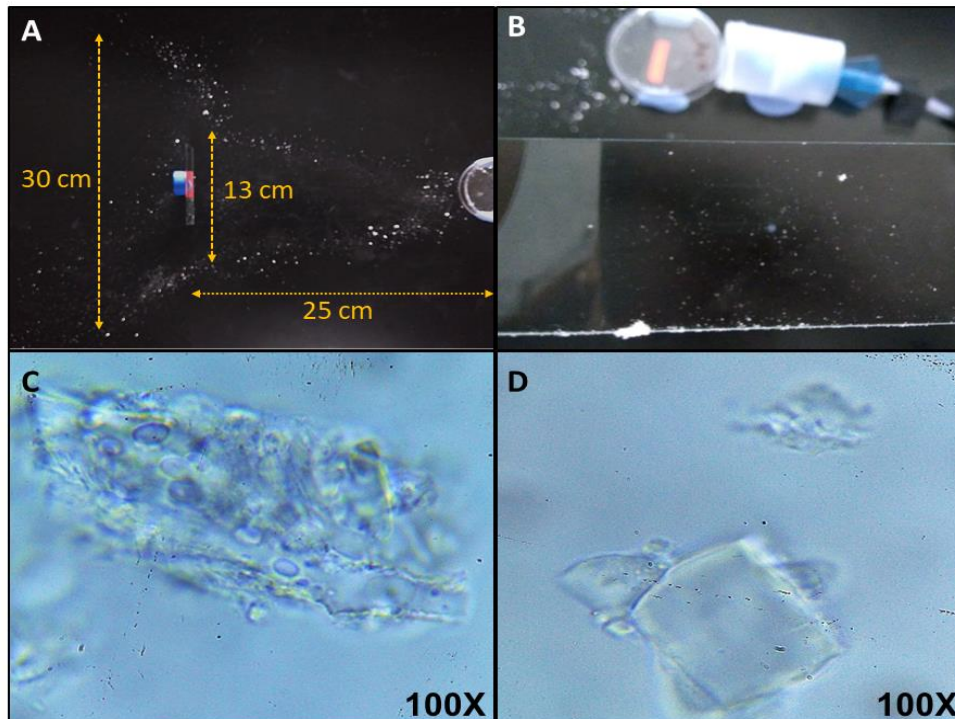


**Figura 41.** Muestras de polvos vistas en microscopio óptico en un aumento de 100X. A) Cristales de lactosa sola, B) MP's en matriz de manitol sin lactosa, C) MP's dispersas de la mezcla con lactosa (mezcla óptima), D) Cristales de lactosa de la mezcla de MP's con lactosa (mezcla óptima) y E) MP's en matriz de manitol de la mezcla con lactosa (mezcla óptima). Las flechas indican la presencia de MP's.

Posteriormente se colocaron 50 mg de la mezcla óptima a una distancia conocida de un portaobjetos, como se describió anteriormente en la metodología. Se escogió la distancia de 25 cm del polvo al portaobjetos porque es la distancia que hay desde los dientes hasta la carina, donde comienza la división de la tráquea a los bronquios.<sup>136</sup> Finalizado el experimento se midió la distancia de la mezcla dispersada, obteniendo un valor de 30 cm (Figura 42-A), claramente puede observarse que el polvo se dispersa fácilmente hacia los lados, lo cual sirve para predecir el comportamiento del polvo al chocar en las paredes de la tráquea y dispersarse hacia los bronquios en ambos lados. También se observó en microscopio óptico el polvo disperso que quedó en el portaobjetos (Figura 42). Se puede ver que en la matriz de manitol donde se encontraban incrustadas las MP's,



sólo quedaron los huecos que éstas ocupaban, no pudo observarse alguna zona con MP's dispersas.



**Figura 42.** A) Dispersión de la formulación óptima por aerolización, B) Formulación adherida al portaobjetos, C) Cristal de manitol sin MP's de la mezcla dispersada (aumento de 100x) y D) Cristal de lactosa de la formulación dispersada (aumento de 100x).

### 9.6.3.2 Como suspensión para nebulización en aerosol.

Las formulaciones de soluciones para nebulización, también conocidas como soluciones de inhalación están compuestas por varios excipientes, en nuestro caso sólo usamos el cloruro de sodio, que es el encargado de ajustar la tonicidad de la formulación, este se encuentra a una concentración de 0.9% y el tensoactivo lauril sulfato de sodio, el cual sirve para dar estabilidad a la suspensión.<sup>90</sup> Una manera de caracterizar las formulaciones basadas en aerosol es por medio de impactación inercial, esta técnica *in vitro* se emplea para predecir la deposición de los aerosoles

dentro de los pulmones. El método más empleado es por medio del Impactador de Cascada de Andersen, este consiste en que se hace pasar el aerosol a través de unas placas (con la ayuda de una corriente de aire, por medio de una bomba de vacío), las cuales tienen diferente diámetro de poro, simulando las partes que componen los pulmones, la deposición de las partículas en las placas se presenta en función del diámetro aerodinámico que estas poseen, por ejemplo, si las partículas tienen un tamaño muy grande, impactarán en las placas más cercanas a la boquilla del aparato, por otro lado si presentan un tamaño pequeño, terminarán impactando en las placas inferiores del aparato. Una vez terminada la prueba, cada placa se analiza para cuantificar la dosis administrada, el diámetro de masa media aerodinámica y la desviación estándar geométrica.<sup>19</sup> En nuestro caso, se adaptó un tubo de PVC, colocando en su interior varias membranas de diferente tamaño de poro. Una vez obtenido el peso de cada membrana se calculó el MMAD y el GSD, estos valores nos ayudan a determinar el lugar donde se depositarán las partículas en el tracto respiratorio.<sup>137</sup> El cálculo se realizó de 3 maneras diferentes. La primera por medio del porcentaje en peso retenido en cada membrana, la segunda por el log del diámetro vs el porcentaje acumulado (como se sugiere en la USP)<sup>138</sup> y la tercera por medio de la siguiente fórmula:  $MMAD_t = d \left( \frac{\rho}{\rho_0 X} \right)^{1/2}$ , donde  $d$  es el diámetro medio geométrico obtenido por SEM,  $\rho$  es la densidad compactada,  $\rho_0$  es la densidad aparente y  $X$  es el factor de superficie, el cual por ser esferas el valor es igual a 1.<sup>91</sup>

En la Tabla 20 se tienen los resultados obtenidos por cada método. Se observa que para los tres métodos se obtuvo un MMAD entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$ , lo cual es idóneo, ya que así las partículas se depositarán principalmente por sedimentación en la región de los bronquiolos y alveolos.<sup>137</sup> Por otro lado, para el GSD se obtuvieron valores pequeños, Ibrahim, M. et al. (2015) menciona que los aerosoles con valores de GSD menores a 2 son los ideales, ya que el tamaño de partícula se encuentra monodisperso y así se aumenta la deposición pulmonar,<sup>137</sup> lo que nos indica junto con el valor del MMAD que la distribución de tamaño es estrecha y está centrada en un tamaño de partícula fino, con la cual se podrá lograr un suministro de partículas eficiente en los pulmones.<sup>87</sup>

**Tabla 20.** MMAD y GSD de la formulación como suspensión para nebulización.

Método	MMAD ( $\mu\text{m}$ )	GSD ( $\mu\text{m}$ )
Diámetro en peso	2.54 $\pm$ 0.79	0.44 $\pm$ 0.00
Log del diámetro	1.62 $\pm$ 0.47	0.23 $\pm$ 0.01
Fórmula con base en densidades	1.39 $\pm$ 0.01	N/A

Se muestra el valor promedio  $\pm$  DE (n = 3).

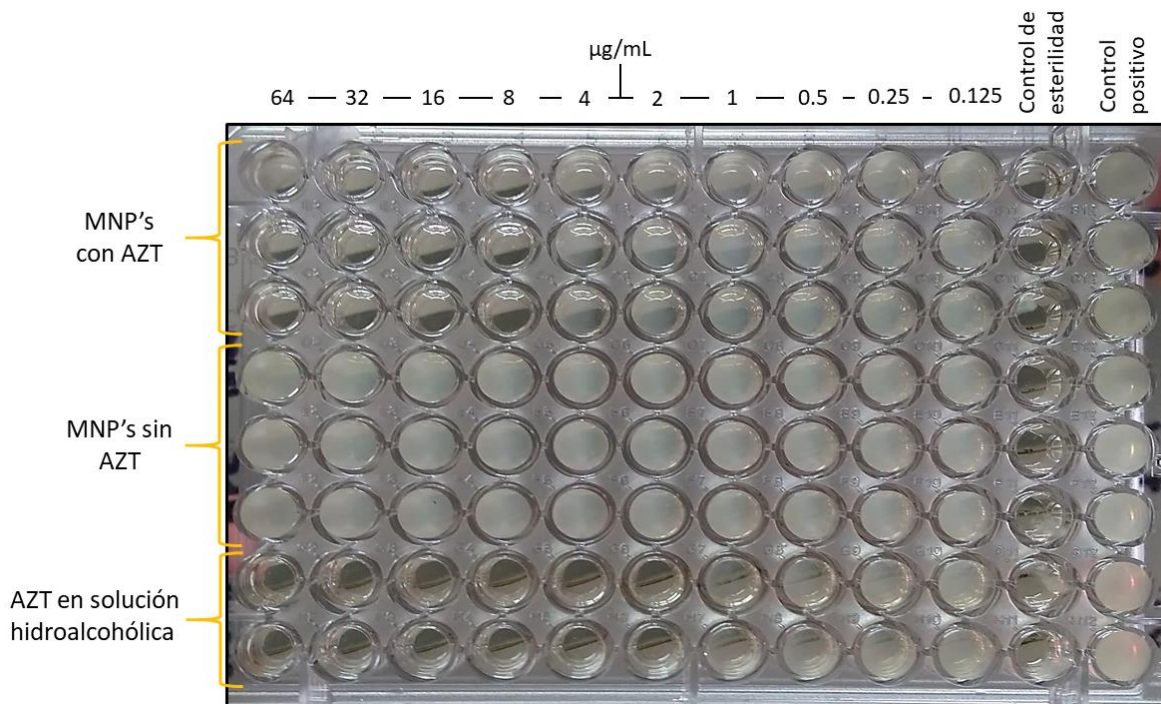
#### 9.6.4 Estudio de eficacia en un modelo *in vitro*.

Se evaluó la eficacia de las MP's cargadas con fármaco en reto contra 5 bacterias, dos bacterias gram positivas: *S. aureus* y *B. subtilis* y tres bacterias gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Se esperaba evaluar también la cepa de *S. pneumoniae*, pero esta no crecía en el caldo Müller-Hinton sin suplemento, al agregar el suplemento de extracto de levadura, el caldo se volvía de coloración oscura lo cual podía provocar interferencia al momento de medir las absorbancias durante el ensayo. Por ello se usó la cepa de *K. pneumoniae*. Las bacterias provienen de aislados clínicos de hemocultivo. En la Tabla 21 se muestran las CMI para cada bacteria derivado del reto con el fármaco en la solución hidroalcohólica y contra las MP's. En la Figura 43, se muestra un ejemplo de la actividad antimicrobiana de la AZT en las MP's, las MP's sin fármaco y la solución hidroalcohólica sobre la bacteria *E. coli* después de incubarse durante 48 h.

**Tabla 21.** Concentraciones mínimas inhibitorias de AZT sola y encapsulada en las MP's.

Bacteria	Punto de corte, CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	AZT	MPs con AZT	MPs sin AZT
<i>B. subtilis</i>	1	8	N/A
<i>S. aureus</i>	0.5	4	N/A
<i>E. coli</i>	2	8	N/A
<i>P. aeruginosa</i>	>64	>64	N/A
<i>K. pneumoniae</i>	8	32	N/A

N/A: No aplica, no hay actividad antimicrobiana.



**Figura 43.** Placa de 96 pozos de *E. coli* expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.

Primero, se puede observar que cuando el fármaco se encuentra cargado en las MP's, el punto de corte es a una mayor concentración que con el fármaco cuando se encuentra solo en solución. Esto podría deberse al hecho de que las MP's presentan el fenómeno de hidratación en el medio de cultivo, así como los procesos de erosión e hinchamiento que retardan la difusión del fármaco para comenzar su liberación: la concentración obtenida en el tiempo es menor que el fármaco completamente dispuesto para llevar a cabo su actividad antibacteriana, pues el fármaco solo se encuentra disponible desde el inicio y ejerce su actividad de forma casi inmediata. Adicionalmente, las MP's desarrolladas tienen un tamaño promedio alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , por lo que no pueden penetrar en las bacterias como se observa en otros estudios con nanopartículas encapsulando azitromicina, por ejemplo, Azhdarzadeh M, et al. (2012), desarrollaron nanopartículas de PLGA con AZT, obteniendo como resultado que estas nanopartículas son más eficaces que el fármaco solo, lo cual se justifica por mejoría asociada a que las partículas que tienen tamaños de 212 a 252 nm penetran en las células bacterianas.<sup>37,39</sup> De igual manera al evaluar otros fármacos pertenecientes a los macrólidos, se ha observado la misma mejoría del fármaco en nanopartículas (el tamaño de la nanopartícula es menor a 300 nm), porque la nanopartícula se fusiona con la membrana celular de la bacteria y el fármaco se libera continuamente.<sup>139</sup> Por otro lado, para la bacteria *P. aeruginosa* se obtuvo una CMI alta en ambos tratamientos (fármaco solo y contenido en las MP's), lo cual, de acuerdo al manual del CLSI (2017) nos indica que la bacteria es resistente, es decir, no se inhibe con dosis que se administran con normalidad, probablemente porque presenta mecanismos específicos de resistencia microbiana.<sup>95</sup> Esta reportado que *P. aeruginosa* presenta los siguientes mecanismos de resistencia: 1) cambios estructurales del lugar de unión del fármaco al ribosoma, 2) existencia de bombas de expulsión activas y 3) presencia de enzimas inactivantes, son los que se desarrollan comúnmente para los macrólidos.<sup>140</sup> De los anteriores, el más probable es las bombas de eflujo, ya que esta bacteria presenta una membrana externa adicional que contiene porinas, las cuales pueden ser alteradas para reducir la permeabilidad de la membrana, presentando una mayor expresión de bombas de eflujo, lo cual facilita la expulsión

de los antibióticos.<sup>141</sup> Por otro lado, Parnham, M J. (2014), menciona que a pesar de que AZT no presenta eficacia contra *P. aeruginosa* en estudios *in vitro*, ya a nivel *in vivo* muestra eficacia para inhibir los compuestos que estimulan el crecimiento del biofilm que protege a la bacteria contra la acción de otros antibióticos. Por lo que aun así, el uso del fármaco en combinación con otros antibióticos puede ayudar a lograr un efecto terapéutico eficiente.<sup>142</sup> En el caso de las MP's sin el fármaco no hay ninguna interpretación, ya que como se esperaba, hubo crecimiento normal de las bacterias.

Finalmente, se sabe que al administrarse AZT, esta se distribuye ampliamente hacia todos los órganos, incluyendo los pulmones. Por lo que ya se ha reportado que cuando se administran dosis por vía oral de 500 mg de AZT diariamente durante 3 días (como se indica el régimen para el tratamiento de enfermedades respiratorias) se ha encontrado una  $C_{m\acute{a}x}$  de  $0.72 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$  y  $9.13 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$  en el lavado bronquial y tejido de pulmón, respectivamente, comparado con la  $C_{m\acute{a}x}$  plasmática que fue de  $0.26 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ . Estas concentraciones aumentan cuando se incrementa la dosis a 1000 mg diariamente durante 3 días.<sup>143</sup> Otros autores reportan que después 48 h de administrarse una dosis oral única de 500 mg de AZT, se obtuvieron  $C_{m\acute{a}x}$  más altas en: el líquido de revestimiento epitelial ( $2.18 \mu\text{g/mL}$ ), en los macrófagos alveolares ( $23 \mu\text{g/mL}$ ), la mucosa bronquial ( $3.89 \mu\text{g/mL}$ ) y el esputo ( $1.56 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con la  $C_{m\acute{a}x}$  plasmática que fue de  $0.13 \mu\text{g/mL}$  a las 12 h.<sup>144</sup> Por lo que las concentraciones que llegan a los pulmones son mayores incluso que las CMI evaluadas *in vitro* para las bacterias que causan neumonía. Así que, a pesar de que se requiera una mayor cantidad de fármaco en las MP's, estas podrán ser administradas de manera local, no sufrirán procesos de absorción, distribución y metabolismo, se garantiza que llegarán al sitio diana y se podrán administrar cantidades de fármaco en mg directamente en los pulmones en lugar de que llegue el fármaco en  $\mu\text{g}$  después de administrarse por la vía oral y con la formulación convencional (tabletas orales).

## 10. CONCLUSIÓN GENERAL.

Se desarrollaron, caracterizaron y evaluaron micropartículas biodegradables y bioadhesivas de Gantrez® AN encapsulando azitromicina bajo condiciones óptimas, con un tamaño adecuado y propiedades tecnológicas aerolizables para administrarse por vía pulmonar, con una eficiencia de encapsulación suficiente para administrar dosis terapéuticas del fármaco para ser administradas en el tratamiento de neumonía.

### 10.1 CONCLUSIONES PARTICULARES.

- Se prepararon nanopartículas y micropartículas de Gantrez® AN, por el método de emulsión/evaporación del disolvente, y bajo condiciones optimizadas (8 mL de fase acuosa, 1% de estabilizante, 6 000 rpm, 5 min y 0.5% de porógeno) por MSR se obtuvieron MP's.
- Las partículas presentaron un rango de tamaño que va desde 1104 a 1479 nm, con potencial Z negativo de -19 a -23 mV, con una eficiencia de encapsulación de 28% a 42% y un rendimiento que va de 63% a 83%.
- Se seleccionaron como partículas óptimas las MP's con una eficiencia de encapsulación del  $42.17 \pm 8.36\%$ .
- Las MP's óptimas se caracterizaron teniendo una talla promedio de  $1.85 \pm 0.07 \mu\text{m}$ , donde el fármaco se encuentra disperso molecularmente en la matriz polimérica en una fase amorfa, sin interacciones significativas entre el fármaco y el polímero.

- Se desarrolló y validó un método para cuantificar la azitromicina mediante un método colorimétrico con permanganato de potasio; en las siguientes concentraciones: 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL a una longitud de onda de 547 nm, el cual cumplió con todos los parámetros de desempeño establecidos.
- Las MP's liberan alrededor del 90% de azitromicina al cabo de 24 h, en un ambiente ácido característico de la neumonía (pH 6.6).
- Las MP's mostraron una bioadhesión del  $54.9 \pm 4.5\%$  mediante el uso de tejido de pulmón e interaccionando con mucinas.
- De acuerdo con las propiedades reológicas, las MP's formuladas como polvo seco no presentaron buenas propiedades de flujo, sin embargo, cuando se coloca presión sobre el polvo, éste se dispersa fácil y ampliamente. Por su parte al formularse como suspensión para nebulización presentaron un diámetro de masa media aerodinámico y una desviación estándar geométrica adecuados para lograr una deposición pulmonar eficaz, a nivel de bronquiolos y alveolos.
- Los estudios de reto contra cepas bacterianas pudieron evidenciar que la actividad antimicrobiana de la azitromicina no se pierde cuando se incorpora en las MP's, con una CMI 4 y 8 veces más alta (dependiendo la bacteria) que el fármaco solo.



## 11. PERSPECTIVAS

- Emplear mayor cantidad de porógeno para producir partículas porosas.
- Probar esta metodología para formular fármacos con propiedades fisicoquímicas parecidas a la azitromicina y evaluarse para la vía pulmonar.
- Emplear diferentes excipientes para formulaciones de polvo seco para inhalación, para mejorar las propiedades de flujo de las micropartículas.
- Desarrollar partículas de menor tamaño que puedan internalizar en las bacterias.
- Evaluar la AZT en polvo directamente en las cepas bacterianas.
- Evaluar las MP's en cepas bacterianas que presenten perfiles de resistencia.
- Evaluar la distribución y eficacia de las MP's en un modelo *in vivo*.

## 12. REFERENCIAS

1. Fernández Tena A, Casan Clarà P. Depósito pulmonar de partículas inhaladas. *Arch Bronconeumol*. 2012. doi:10.1016/j.arbres.2012.02.003.
2. Paranjpe M, Müller-Goymann CC. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: A review. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):5852-5873. doi:10.3390/ijms15045852.
3. Levitzky MG. Function and Structure of the Respiratory System. In: *Pulmonary Physiology*. Seventh. New Orleans: Mc Graw Hill Medical; 2007:4.
4. Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of Acid and Base Secretion by the Airway Epithelium. *J Membr Biol*. 2006;211(3):139-150. doi:10.1007/s00232-006-0861-0.Mechanisms.
5. Rytting E, Nguyen J, Wang X, Kissel T. Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(6):629-639. doi:10.1517/17425247.5.6.629.
6. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *CHEST J*. 2017;154(1):1-8. doi:10.1016/j.chest.2017.11.008.
7. Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(2):158-171. doi:10.1016/j.addr.2008.11.002.
8. Murgia X, Loretz B, Hartwig O, Hittinger M, Lehr C. The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes ☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;124:82-97. doi:10.1016/j.addr.2017.10.009.
9. Oca J, Teresa Ruiz M, Cacicedo R, Gutiérrez I, Amparán M, Pérez E. Evaluación de la utilización de la administración de fármacos mediante la técnica de inhalación. *Enfermería Clínica*. 2004;14(4):187-193. doi:10.1016/S1130-8621(04)73884-X.
10. Rojas Cortés MG, Margarita B, Díaz V, Jairo Y, Perilla E. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Rev Ing e Investig*. 2008;28(1):57-71.
11. Fernández Tena A, Casan Clarà P. Depósito pulmonar de partículas inhaladas. *Arch Bronconeumol*. 2012;48(7):240-246. doi:10.1016/j.arbres.2012.02.003.
12. Nelson HS. Inhalation devices , delivery systems , and patient technique. *Am Coll Allergy, Asthma Immunol*. 2016;117:606-612.
13. Williams SD. Drug Inhalation Devices and Delivery Systems. *J Nurse Pract*. 2015;11(6):663-664.
14. Gardenhire DS, Burnett D, Strickland S, Myers TR. Inhalers. In: *A Guide To Aerosol Delivery Devices for Respiratory Therapists*. 4th ed. American Association for Respiratory Care; 2017:22.
15. Williams RO, Carvalho TC, Peters JI. Influence of particle size on regional lung

- deposition - What evidence is there? *Int J Pharm.* 2011;406(1-2):1-10. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.040.
16. Kaur G, Narang RK, Rath G, Goyal AK. Advances in Pulmonary Delivery of Nanoparticles. *Artif Cells, Blood Substitutes Biotechnol.* 2012;40(March):75-96. doi:10.3109/10731199.2011.592494.
  17. Fröhlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *Int J Mol Sci.* 2014;15(March):4795-4822. doi:10.3390/ijms15034795.
  18. Yang W, Peters JI, Williams RO. Inhaled nanoparticles-A current review. *Int J Pharm.* 2008;356(1-2):239-247. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.02.011.
  19. Zhang J, Wu L, Chan HK, Watanabe W. Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):441-455. doi:10.1016/j.addr.2010.11.002.
  20. Bailey MM, Berkland CJ. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. *Med Res Rev.* 2009;29(1):196-212. doi:10.1002/med.20140.
  21. Verma RK, Ibrahim M, Garcia-contreras L. Lung Anatomy and Physiology and Their Implications for Pulmonary drug Delivery. In: Nokhodchi A, Martin GP, eds. *Pulmonary Drug Delivery: Advances and Challenges*. First. John Wiley & Sons, Inc; 2015:1-18.
  22. Báez-Saldaña R, Gómez-Zamora C, López-Elizondo C, et al. Neumonía adquirida en la comunidad. Revisión y actualización con una perspectiva orientada a la calidad de la atención médica. *Neumol Cir Torax.* 2013;72(72):6-43.
  23. Insituto Mexicano del Seguro Social. *Prevección, Diagnóstico y Tratamiento de Neumonía Adquirida En La Comunidad. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica*. Ciudad de México; 2017. <http://www.imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>.
  24. (INEGI) IN de E y G. *Características de Las Defunciones Registradas En México Durante 2017*. Ciudad de México; 2018. <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>.
  25. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica SÚ de I. *Boletín Epidemiológico. Semana 51, Del 16 Al 22 de Diciembre de 2018*. Ciudad de México; 2018.
  26. Weinberger SE, Cockrill BA, Mandel J. Pneumonia. In: *Principles of Pulmonary Medicine*. 7th ed. Elsevier; 2019:297-313. doi:10.1016/B978-0-323-52371-4.00026-X.
  27. Resano Barrio P. Neumonías adquiridas en la comunidad. *Medicine (Baltimore)*. 2018;12(64):3751-3762. doi:10.1016/j.med.2018.10.002.
  28. López del Castillo Sánchez D, Sabag Ruiz E, Díaz Verduzco M de J, Monzón Vega MA. Neumonía adquirida en la comunidad. Enfoque de riesgo y funcionalidad familiar. *Rev Medica del IMSS*. 2006;44(1):35-38.

29. Falguera M, Ramírez MF. Neumonía adquirida en la comunidad. *Rev Clin Esp*. 2015;215(8):458-467. doi:10.1016/j.rce.2015.06.002.
30. Girón Ortega JA, Pérez Galera S, Girón González JA. Protocolo diagnóstico y terapéutico de la neumonía adquirida en la comunidad. *Medicine (Baltimore)*. 2018;12(53):3162-3167. doi:10.1016/j.med.2018.03.026.
31. Bakheit HHA, Al-Hadiya MH, Abd-Elgalil AA. Azithromycin. In: Brittain HG, ed. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. First. EUA: Elsevier; 2014:1-34.
32. DrugBank. Azithromycin. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00207>. Published 2018.
33. TSRL inc. Sistema de Clasificación Biofarmaceútica. <http://www.tsrlinc.net/search.cfm>.
34. Tripathi KD. *Farmacología En Odontología: Fundamentos*. Médica Panamericana; 2008. <https://books.google.com.mx/books?id=9631OEbYetUC>.
35. Labs P. *Zithromax*. New York, EUA; 2013. doi:2897185.
36. Li X, Chang S, Du G, et al. Encapsulation of azithromycin into polymeric microspheres by reduced pressure-solvent evaporation method. *Int J Pharm*. 2012;433(1-2):79-88. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.081.
37. Azhdarzadeh M, Lotfipour F, Zakeri-Milani P, Mohammadi G, Valizadeh H. Anti-bacterial performance of azithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system against different gram-negative and gram-positive bacteria. *Adv Pharm Bull*. 2012;2(1):17-24. doi:10.5681/apb.2012.003.
38. Ghari T, Mortazavi SA, Khoshayand MR, Kobarfard F, Gilani K. Preparation, optimization, and in vitro evaluation of azithromycin encapsulated nanoparticles by using response surface methodology. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2014;24(4):352-360. doi:10.1016/S1773-2247(14)50073-1.
39. Mohammadi G, Valizadeh H, Barzegar-Jalali M, et al. Development of azithromycin-PLGA nanoparticles: Physicochemical characterization and antibacterial effect against *Salmonella typhi*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;80(1):34-39. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.05.027.
40. Wang H, Xu Y, Zhou X. Docetaxel-Loaded Chitosan Microspheres as a Lung Targeted Drug Delivery System: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Int J Mol Sci*. 2014;15:3519-3532. doi:10.3390/ijms15033519.
41. Esmaeili F, Hosseini-nasr M, Rad-malekshahi M, Samadi N, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation and Antibacterial Activity Evaluation of Rifampicin-Loaded Poly Lactide-co-Glycolide Nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2007;3:161-167. doi:10.1016/j.nano.2007.03.003.
42. Chen A, Tang N, Wang S, Kang Y, Song H. Insulin-loaded poly-l-lactide porous microspheres prepared in supercritical CO<sub>2</sub> for pulmonary drug delivery. *J Supercrit Fluids*. 2015;101:117-123. doi:10.1016/j.supflu.2015.03.010.

43. Sharma G, Jasuja ND, Ali MI, Joshi SC. A Review on Nanomedicinal and Nanosensing Potential of Nanoparticles. *Int J Biol Chem*. 2014;8(2):58-84.
44. Campos E, Branquinho J, Carreira AS, et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *Eur Polym J*. 2013;49:2005-2021.
45. Xiong MH, Bao Y, Yang XZ, Zhu YH, Wang J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;78:63-76. doi:10.1016/j.addr.2014.02.002.
46. Garcia-Corvillo MP. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Central Nervous System Via Nasal Route. *Ars Pharm*. 2016;57(1):27-35.
47. Moreno Raja M, Lim PQ, Wong YS, et al. Polymeric Nanomaterials: Methods of Preparation and Characterization. In: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Kumar Mishra R, Thomas S, eds. *Nanocarriers for Drug Delivery*. Elsevier Inc.; 2019:557-653. doi:10.1016/B978-0-12-814033-8.00018-7.
48. Nimesh S. Methods of nanoparticle preparation. In: Nimesh S, ed. *Gene Therapy, Potential Application of Nanotechnology*. First. UK and USA: Woodhead Publishing Limited; 2013:13-35. doi:10.1533/9781908818645.13.
49. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2006;2:8-21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003.
50. Prasad Rao J, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci*. 2011;36(7):887-913. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
51. Soo-ling B, Hamid ZA, Mariatti M, et al. Approaches to Improve Therapeutic Efficacy of Biodegradable PLA/PLGA Microspheres : A Review. *Polym Rev*. 2018;0(April):1-42. doi:10.1080/15583724.2018.1437547.
52. Ramos Picos D, Gómez Carril M, Fernández Mena D. Métodos De Obtención De Microesferas Biodegradables. *Rev Cuba Farm*. 2001;35(2):126-135.
53. Gómez-gaete C. Nanopartículas Poliméricas: Tecnología y Aplicaciones Farmacéuticas. *Rev Farmacol Chile*. 2014;7(2):7-16.
54. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res*. 2009;26(5):1025-1058. doi:10.1007/s11095-008-9800-3.
55. Crucho CIC, Barros MT. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C*. 2017;80:771-784. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.
56. Rodríguez IC. Sistemas de liberación Bioadhesivos. *Ars Pharm*. 2000;41(1):115-128.
57. Kumar L, Verma S, Vaidya B, Gupta V. Bioadhesive Polymers for Targeted Drug Delivery. In: *NANotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*. ; 2017:322-362.

58. Kumar K, Dhawan N, Sharma H, Vaidya S, Vaidya B. Bioadhesive polymers: Novel tool for drug delivery. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2014;42(4):274-283. doi:10.3109/21691401.2013.815194.
59. Camacho AI, Da Costa Martins R, Tamayo I, et al. Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as innate immune system activators. *Vaccine.* 2011;29(41):7130-7135. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.072.
60. Ashland™. *Gantrez™ AN-119;* 2019. <http://www.ashland.com/industries/personal-and-home-care/oral-care/gantrez-an-polymers>.
61. Cerchiara T, Luppi B, Chidichimo G, Bigucci F, Zecchi V. Chitosan and poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) microparticles as nasal sustained delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;61(3):195-200. doi:10.1016/j.ejpb.2005.05.005.
62. Elizondo E, Sala S, Imbuluzqueta E, et al. High loading of gentamicin in bioadhesive PVM/MA nanostructured microparticles using compressed carbon-dioxide. *Pharm Res.* 2011;28(2):309-321. doi:10.1007/s11095-010-0248-x.
63. Salman HHA, Azcarate Goni I. Nanoparticles Comprising Esters of Poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) and uses thereof. 2014;1(19):41.
64. Andrews GP, Jones DS. Poly(methyl vinyl ether/maleic anhydride). In: Rose RC, Sheskey PJ, Owen SC, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Fifth. London and Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association; 2006:561.
65. Irache JM, Huici M, Konecny M, Espuelas S, Campanero MA, Arbos P. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules.* 2005;10(1):126-145. doi:10.3390/10010126.
66. Blanco-García E, Otero-Espinar FJ, Blanco-Méndez J, Leiro-Vidal JM, Luzardo-Álvarez A. Development and characterization of anti-inflammatory activity of curcumin-loaded biodegradable microspheres with potential use in intestinal inflammatory disorders. *Int J Pharm.* 2017;518(1-2):86-104. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.12.057.
67. Patel MD, Date P V., Gaikwad R V., Samad A, Malshe VC, Devarajan P V. Comparative evaluation of polymeric nanoparticles of rifampicin comprising gantrez and poly(ethylene sebacate) on pharmacokinetics, biodistribution and lung uptake following oral administration. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(4):687-694. doi:10.1166/jbn.2014.1739.
68. Zabaleta V, Ponchel G, Salman H, Agüeros M, Vauthier C, Irache JM. Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles: Permeability and pharmacokinetic study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(3):514-523. doi:10.1016/j.ejpb.2012.04.001.
69. Pecchio M, Salman H, Irache JM, Renedo MJ, Dios-Viéitez MC. Development and validation of a HPLC method for the determination of cyclosporine A in new bioadhesive nanoparticles for oral administration. *Indian J Pharm Sci.*

- 2014;76(2):132-137.
70. Vandamme K, Melkebeek V, Cox E, et al. Influence of reaction medium during synthesis of Gantrez AN 119 nanoparticles for oral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;74(2):202-208. doi:10.1016/j.ejpb.2009.10.001.
  71. Iglesias T, López de Cerain A, Irache JM, et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *Int J Pharm.* 2017;517(1-2):67-79. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.059.
  72. Yoncheva K, Lizarraga E, Irache JM. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): Preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(5):411-419. doi:10.1016/j.ejps.2004.12.002.
  73. Hao JS, Chan LW, Shen ZX, Heng PWS. Complexation between PVP and Gantrez polymer and its effect on release and bioadhesive properties of the composite PVP/Gantrez films. *Pharm Dev Technol.* 2004;9(4):379-386. doi:10.1081/PDT-200033004.
  74. Larrañeta E, Donnelly RF. Bioadhesive Polymers for Drug Delivery. In: Scholdz C, ed. *Polymers for Biomedicine: Synthesis, Characterization, and Applications.* First. John Wiley & Sons, Inc; 2017:559-601.
  75. Cook SL, Bull SP, Methven L, Parker JK, Khutoryanskiy V V. Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocoll.* 2017;72:281-296. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.05.043.
  76. Alcalá-Alcalá S, Benítez-Cardoza CG, Lima-Muñoz EJ, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D. Evaluation of a combined drug-delivery system for proteins assembled with polymeric nanoparticles and porous microspheres; Characterization and protein integrity studies. *Int J Pharm.* 2015;489(1-2):139-147. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.04.074.
  77. Venkateswaramurthy N, Perumal P, Sambathkumar R. Design and evaluation of controlled release mucoadhesive microspheres of amoxicillin for anti Helicobacter pylori therapy. *Asian J Pharm.* 2011;5(4):238. doi:10.4103/0973-8398.97125.
  78. Jayanna B, Nagendrappa G, Arunkumar, Gowda N. Spectrophotometric estimation of azithromycin in tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74(4):365. doi:10.4103/0250-474X.107076.
  79. Li H, Dong WF, Zhou JY, Xu XM, Li FQ. Triggering effect of N-acetylglucosamine on retarded drug release from a lectin-anchored chitosan nanoparticles-in-microparticles system. *Int J Pharm.* 2013;449(1-2):37-43. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.008.
  80. Smyth H, Hickey A. *Controlled Pulmonary Drug Delivery.*; 2011. doi:10.1007/978-1-4419-9745-6.
  81. Ungaro F, D'Angelo I, Coletta C, et al. Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency,

- release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *J Control Release*. 2012;157(1):149-159. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.010.
82. Trapani A, Di Gioia S, Ditaranto N, et al. Systemic heparin delivery by the pulmonary route using chitosan and glycol chitosan nanoparticles. *Int J Pharm*. 2013;447(1-2):115-123. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.035.
  83. Beck-Broichsitter M, Schmehl T, Gessler T, Seeger W, Kissel T. Development of a biodegradable nanoparticle platform for sildenafil: Formulation optimization by factorial design analysis combined with application of charge-modified branched polyesters. *J Control Release*. 2012;157(3):469-477. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.058.
  84. Rajinikanth PS, Karunagaran LN, Balasubramaniam J, Mishra B. Formulation and Evaluation of Clarithromycin Microspheres for Eradication of Helicobacter pylori. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008;56(12):1658-1664.
  85. Rao Ranga K V, Buri P. A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion \*. *Int J Pharm*. 1989;52:265-270.
  86. Mishra M, Mishra B. Mucoadhesive microparticles as potential carriers in inhalation delivery of doxycycline hyclate: a comparative study. *Acta Pharm Sin B*. 2012;2(5):518-526. doi:10.1016/j.apsb.2012.05.001.
  87. Debnath Kumar S, Saisivam S, Debnath M, Omri A. Development and evaluation of Chitosan nanoparticles based dry powder inhalation formulations of Prothionamide. *PLoS One*. 2018;13(1):1-12. doi:10.1089/jamp.2014.1187.
  88. Hou S, Wu J, Li X, Shu H. Practical, regulatory and clinical considerations for development of inhalation drug products. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10:490-500. doi:10.1016/j.ajps.2015.08.008.
  89. Tisch Environmental I. *Model 20-800 Ambient Cascade Impacor (Non-Viable) Operations Manual*. Village of Cleves, Ohio; 1999.
  90. Thorat S. Formulation and Product Development of Nebuliser Inhaler: An Overview. *Int J Pharm Sci Res*. 2016;1(5):30-35.
  91. Rawat A, Majumder QH, Ahsan F. Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2008;128(3):224-232. doi:10.1016/j.jconrel.2008.03.013.
  92. Beck-broichsitter M, Knuedeler M, Oesterheld N, Seeger W, Schmehl T. Boosting the aerodynamic properties of vibrating-mesh nebulized polymeric nanosuspensions. *Int J Pharm*. 2014;459:23-29.
  93. Yu H, Teo J, Chew JW, Hadinoto K. Dry powder inhaler formulation of high-payload antibiotic nanoparticle complex intended for bronchiectasis therapy: Spray drying versus spray freeze drying preparation. *Int J Pharm*. 2016;499(1-2):38-46. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.072.
  94. Malbrán G carlos. Metodo De Determinacion De Sensibilidad Antimicrobiana Por Difusion. *Serv antimicroano*. 2012:9-12.



95. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Ed. CLSI Supplement M100.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.; 2017.
96. Gennaro AR. *Remington Farmacia.* 20a. (Panamericana M, ed.); 2003.
97. CLYNA S.A. P.R. Vademécum. <http://mx.prvademecum.com>.
98. General SSAC de MGI para farmacias y público en. Azitromicina. [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Azitromicina.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Azitromicina.htm). Published 2007.
99. Consejo CDEL, General DES. Cuadro básico y catálogo de medicamentos. 2016.
100. De la Torre García JA, Franco Andrade F, Lara Ochoa JMF. Single-Step Process for Preparing 7,16-Deoxy-2-Aza-10-0-Cladinosil-12-0-Desosaminil-4,5-Dihydroxy-6-Ethyl-3,5,9,11,13,15-Hexamethylbicycle (11.2.1) Hexadeca-1(2)-En-Ona and Obtaining A New Form of 9-Deoxo-9A-Methyl-9A-Aza-9A-Homoerythromycin A. 2003;1:13.
101. The Cambridge Crystallographic Data Centre. 1165343. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/>.
102. Nyola N, Jeyabalan GS. Simultaneous estimation of Azithromycin and Cefixime in Active Pharmaceutical Ingredients and Pharmaceutical dosage forms form by Spectrophotometry. 2013;4(March):27-32.
103. Pouretedal HR. Preparation and characterization of azithromycin nanodrug using solvent/antisolvent method. *Int Nano Lett.* 2014;4(1):103. doi:10.1007/s40089-014-0103-x.
104. Zubata P, Ceresole R, Rosasco MA, Pizzorno MT. A new HPLC method for azithromycin quantitation. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;27(5):833-836. doi:10.1016/S0731-7085(01)00554-4.
105. Kishore L, Kumar A, Nair A, Kaur N. Kinetic Spectrophotometric Method for the Estimation of Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. *J Mex Chem Soc.* 2012;56(4):355-361. doi:10.1208/pt060368.
106. Dinesh CB, Kulkarni RM, Nandibewoor ST. Kinetics and mechanistic study of the ruthenium (III) catalyzed oxidative deamination and decarboxylation of L-valine by alkaline permanganate. *Can J Chem.* 2001;79:1926-1933. doi:10.1139/cjc-79-12-1926.
107. Dash S, Patel S, Mishra BK. Oxidation by permanganate: synthetic and mechanistic aspects. *Tetrahedron.* 2009;65(4):707-739. doi:10.1016/j.tet.2008.10.038.
108. Kolb D. Oxidation states of manganese. *J Chem Educ.* 1988;65(11):1004. doi:10.1021/ed065p1004.2.
109. Gauger AM, Hallen RT. Individual reactions of permanganate and various reductants. *Student Rep to DOE ERULF Progr Work Conduct May to July 2000 PNNL-21728.* 2012;U.S. Depar(July 2000).

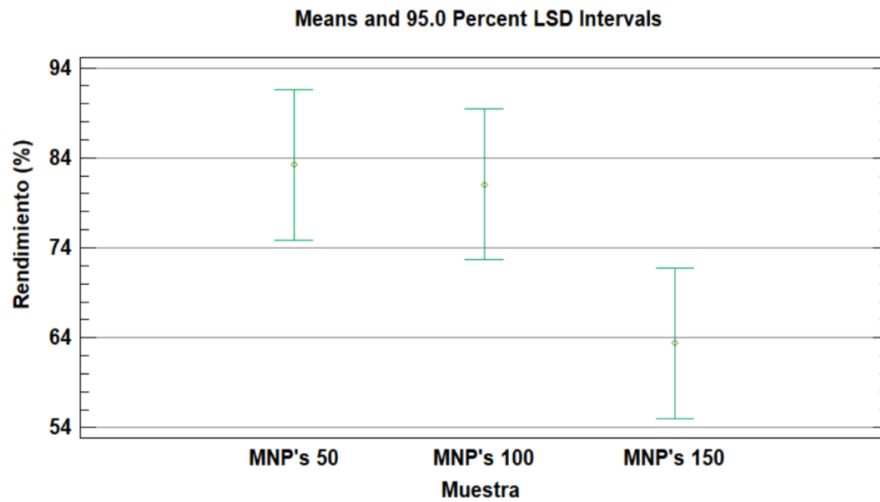
110. A.C. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. *Guía de Validación de Métodos Analíticos.*; 2002.
111. Porfire AS, Tomuța I, Irache JM, Leucuța SE. The influence of the formulation factors on physico-chemical properties of dextran associated Gantrez® an nanoparticles. *Farmacia.* 2009;57(4):463-472.
112. Ipohorski M, Bozzano PB. Microscopía Electrónica de Barrido en la Caracterización de Materiales. *Cienc Invest.* 2013;63(3):43-53. doi:10.1093/nq/s10-IV.96.358-a.
113. Sobrado Vallcillo JM. *Espectrometría Infrarroja.* Madrid, España; 2019. <http://www.uhv.es/sites/pecas/index.htm>.
114. Bruni G, Berbenni V, Milanese C, et al. Physico-chemical characterization of anhydrous d-mannitol. *J Therm Anal Calorim.* 2009;95(3):871-876. doi:10.1007/s10973-008-9384-5.
115. Asadullah JM, MA S, Shabad MS, Abdul M, Shakir S. Formulation and Evaluation of Novel floating In Situ Gelling System of Macrolide Antibiotic Using different Gelling Polymers. *J Drug Deliv Ther.* 2015;5(5):48-55. doi:10.22270/jddt.v5i5.1134.
116. Kotecha RK, Bhadra S, Rajesh KS. Formulation & process development of azithromycin ophthalmic nanosuspension. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013;5(4):490-497.
117. Dutrow BL, Clark CM. X-ray Powder Diffraction (XRD). Enero 2. doi:10.1017/S1047951107001187.
118. Date P V., Samad A, Devarajan P V. Freeze Thaw: A Simple Approach for Prediction of Optimal Cryoprotectant for Freeze Drying. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11(1):304-313. doi:10.1208/s12249-010-9382-3.
119. Pranatharthiharan S, Patel MD, Malshe VC, Devarajan P V. Polyethylene sebacate doxorubicin nanoparticles: role of carbohydrate anchoring on in vitro and in vivo anticancer efficacy. *Drug Deliv.* 2016;23(8):2980-2989. doi:10.3109/10717544.2015.1135488.
120. Adeli E. The use of spray freeze drying for dissolution and oral bioavailability improvement of Azithromycin. *Powder Technol.* 2017;319:323-331. doi:10.1016/j.powtec.2017.06.043.
121. Suriñach S, Baro MD, Bordas S, Clavaguera N, Clavaguera-Mora MT. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Bol Soc Esp Ceram Vidr.* 1992;31(1):11-17. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282%2802%2904394-7.
122. Severino P, Andreo-Filho N, Souto EB, Vinicius Chaud M. Gastro-Retentive Floating Systems Produced By Ionotropic Gelation For Enhanced Oral Drug Bioavailability. *Eur J Biomed Pharm Sci.* 2016;3(1):354-363.
123. Al-khattawi A, Alyami H, Townsend B, Ma X, Mohammed AR. Evidence-based nanoscopic and molecular framework for excipient functionality in compressed

- orally disintegrating tablets. *PLoS One*. 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0101369.
124. DrugBank. Mannitol. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00742>. Published 2018.
  125. Peppas NA, Narasimhan B. Mathematical models in drug delivery : How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *J Control Release*. 2014;190:75-81. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.041.
  126. Holowka EP, Bhatia SK. Controlled-Release Systems. In: Holowka E, Bhatia SK, eds. *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*. 1st ed. Nueva York: Springer-Verlag New York; 2014:12. doi:10.1007/978-1-4939-1998-7.
  127. Chiappetta DA, Gergic EP, Legaspi J, Cantarelli GN, Garcia F, Bregni C. Comprimidos Bioadhesivos Formulados con Excipientes Hidrofilicos para Uso Bucofaríngeo. *Acta Farm Bonaer*. 2006;25(3):360-365.
  128. Yang X, Forier K, Steukers L, et al. Immobilization of Pseudorabies Virus in Porcine Tracheal Respiratory Mucus Revealed by Single Particle Tracking. *PLoS One*. 2012;7(12):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0051054.
  129. Lu Y, Park K. Drug Delivery Systems: H, mucosal Drug Delivery. In: *Biomaterials Science*. Third Edit. Elsevier; 2013:1510-1518. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00156-X.
  130. Pereira De Sousa I, Steiner C, Schmutzler M, et al. Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;97(January):273-279. doi:10.1016/j.ejpb.2014.12.024.
  131. Healy AM, Amaro MI, Paluch KJ, Tajber L. Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;75:32-52. doi:10.1016/j.addr.2014.04.005.
  132. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. MGA 1031. Densidad aparente y densidad compactada de polvos. In: Salud S de, ed. *I*. Undécima. Ciudad de México; 2014:518-520.
  133. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. MGA 1061. Velocidad de flujo y ángulo de reposo, determinación de. In: Salud S de, ed. *FEUM*. Undécima. Ciudad de México; 2014:522-523.
  134. Vanbever R, Mintzes JD, Wang J, et al. Formulation and Physical Characterization of Large Porous Particles for Inhalation. *Pharm Res*. 1999;16(11):1735-1742. doi:10.1023/A.
  135. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation , process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58:1688-1713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017.
  136. Rancont C. El manejo de la vía aérea. <http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/joserra.html>. Published 1998.
  137. Ibrahim M, Verma R, Garcia-contreras L. Inhalation drug delivery devices: technology update. *Med Devices Evid Res*. 2015;8:131-139.

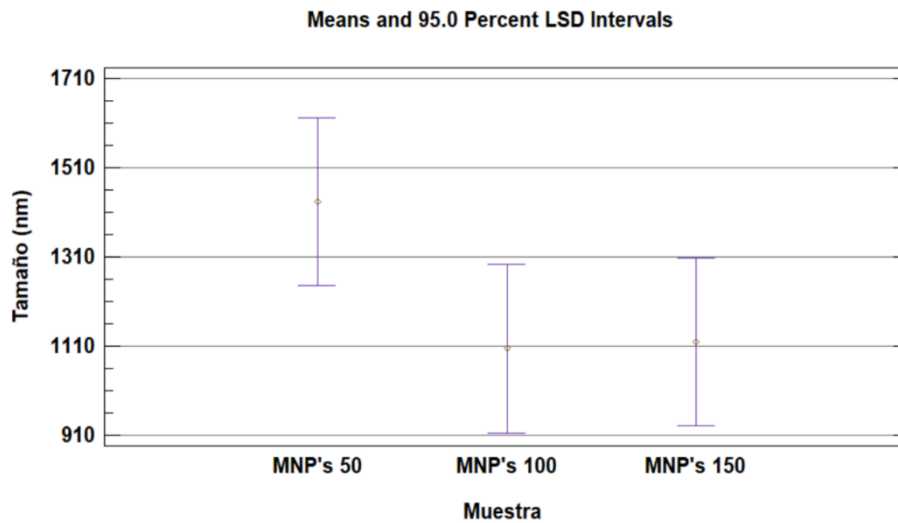
138. USP. 601 Aerosols, Nasal sprays, metered-dose inhalers, and dry powder inhalers. In: *U. S. Pharmacopeia and National Formulary 25*. 30th ed. ; 2007.
139. Valizadeh H, Mohammadi G, Ehyaei R, Milani M, Azhdarzadeh M, Lotfipour F. Antibacterial activity of clarithromycin loaded PLGA nanoparticles. 2012;63-68. doi:10.1691/ph.2012.1052.
140. Mensa J, García-vázquez E, Vila J. Macrólidos, Cetólidos y Estreptograminas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21(4):200-208.
141. Guitor AK, Wright GD. Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections. *Chest*. 2018;154(5):1202-1212. doi:10.1016/j.chest.2018.06.019.
142. Parnham MJ, Erakovic H, Aber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2014;143(2):225-245. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.03.003.
143. Di Paolo A, Barbara C, Chella A, Angeletti CA, Del Tacca M. Pharmacokinetics of azithromycin in lung tissue, bronchial washing, and plasma in patients given multiple oral doses of 500 and 1000 mg daily. *Pharmacol Res*. 2002;46(6):545-550. doi:10.1016/S1043661802002384.
144. Baldwin DR, Wise R, Andrews JM, Ashby J, Honeybourne D. Azithromycin concentrations at the sites of pulmonary infection. *Eur Respir J*. 1990;3(8):886-890.

### 13. ANEXOS.

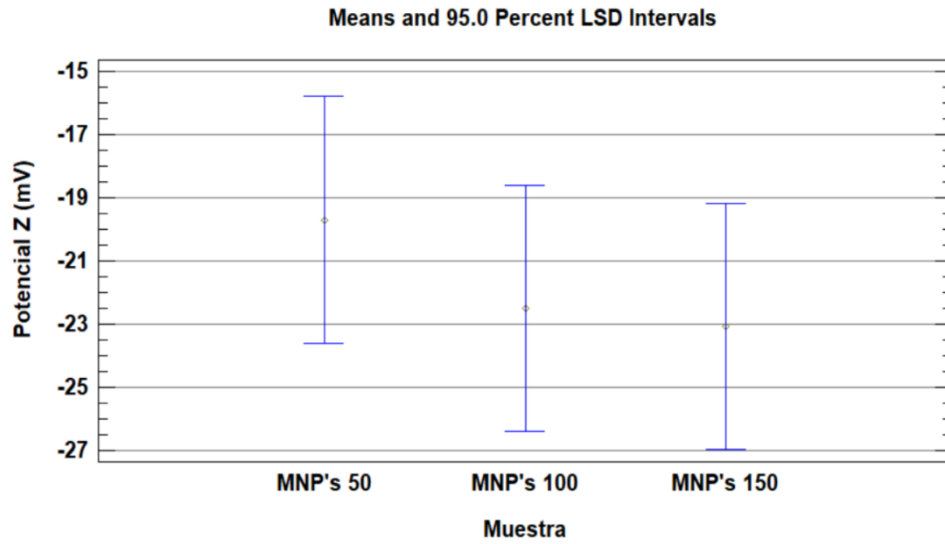
#### 13.1 Análisis de varianza de rendimiento, talla, potencial Z y eficiencia de encapsulación.



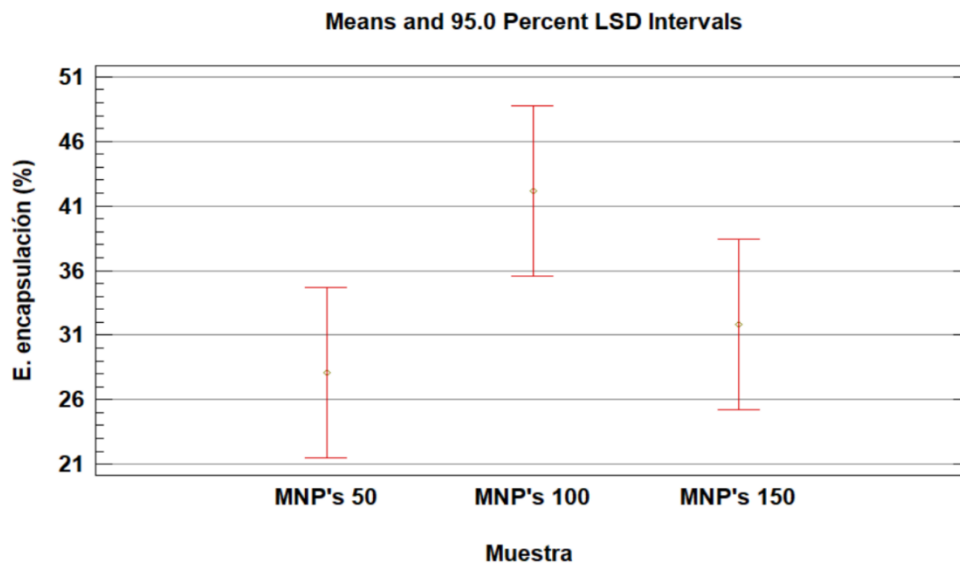
**Figura 44.** Gráfico del rendimiento de manufactura de las diferentes partículas obtenidas. Se muestra el valor promedio  $\pm$  D.E. ( $n = 3$ )



**Figura 45.** Gráfico del tamaño promedio de las diferentes partículas obtenidas. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey ( $n = 3$ ).



**Figura 46.** Gráfico de Potencial Z de las diferentes partículas obtenidas. Se muestra el valor promedio con intervalos de LSD ( $n = 3$ ).



**Figura 47.** Gráfico de la eficiencia de encapsulación. Se muestra el valor promedio con intervalos de LSD ( $n = 3$ ).

### 13.2 Gráficos de modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación.

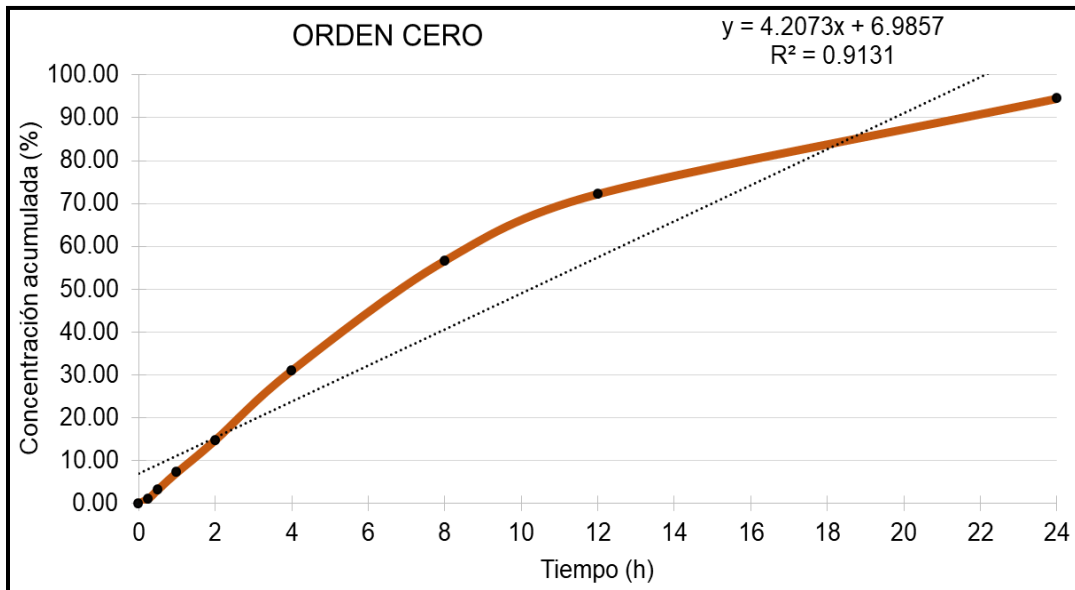


Figura 48. Gráfico de modelo de orden cero.

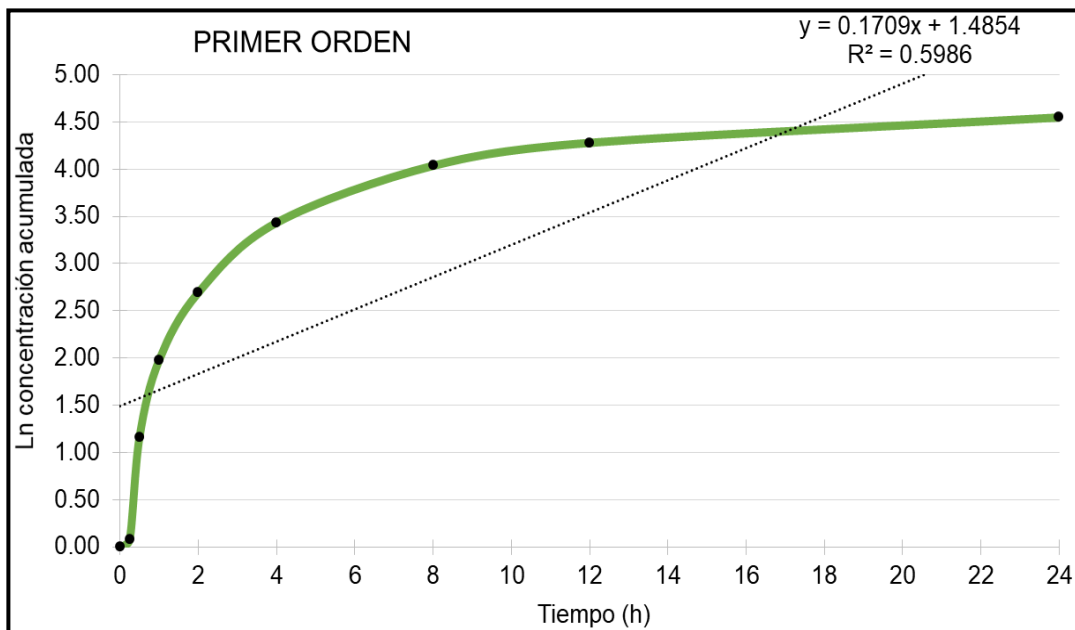
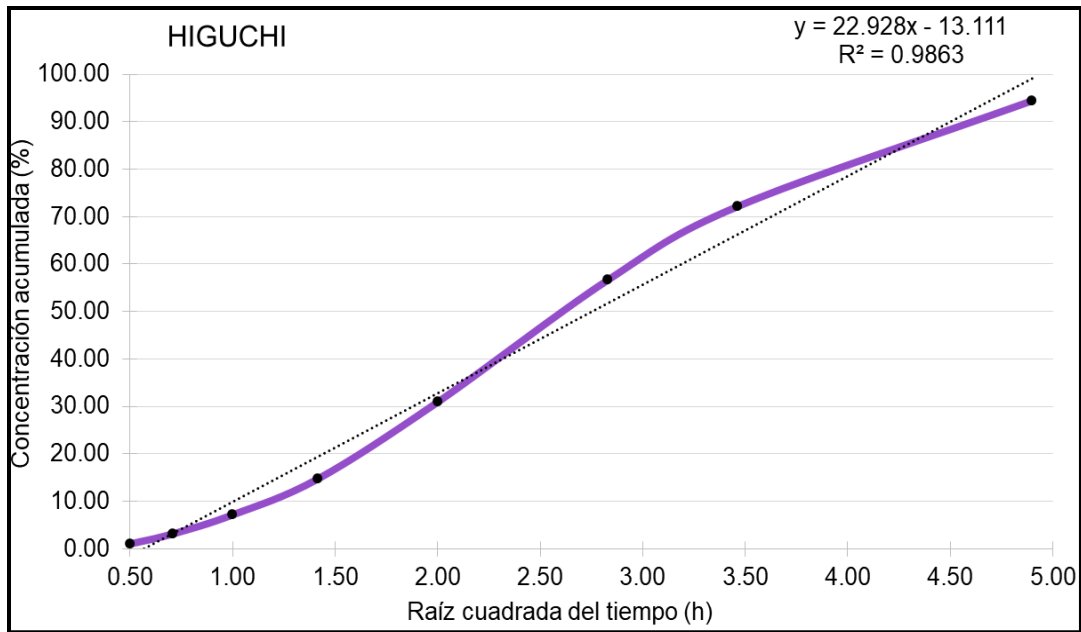
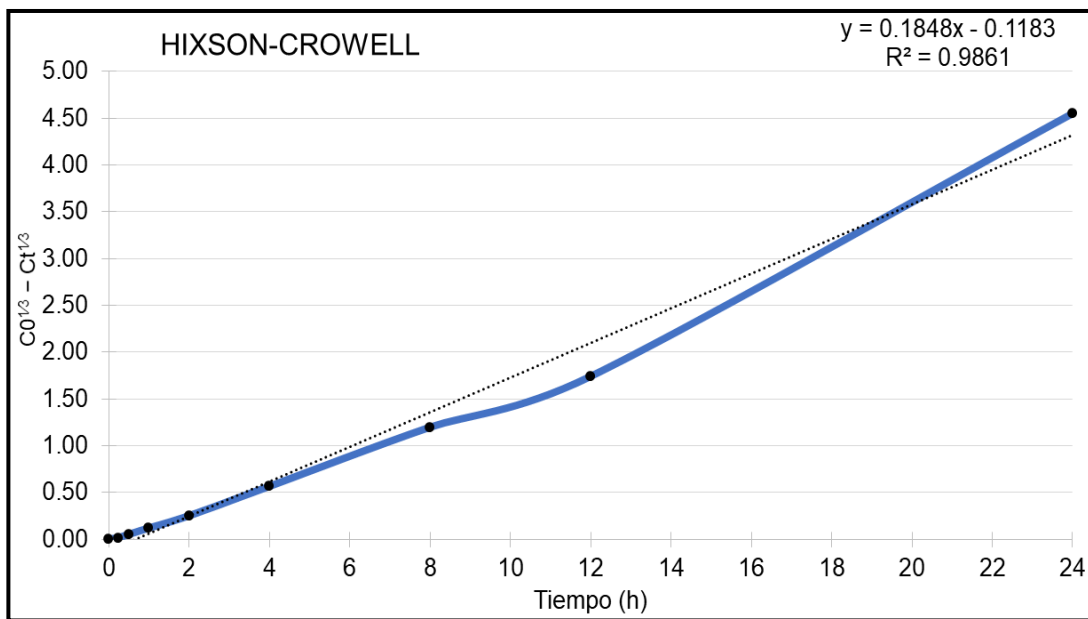


Figura 49. Gráfico de modelo primer orden.



**Figura 50.** Gráfico de modelo de Higuchi.



**Figura 51.** Gráfico de modelo de Hixson-Crowell.



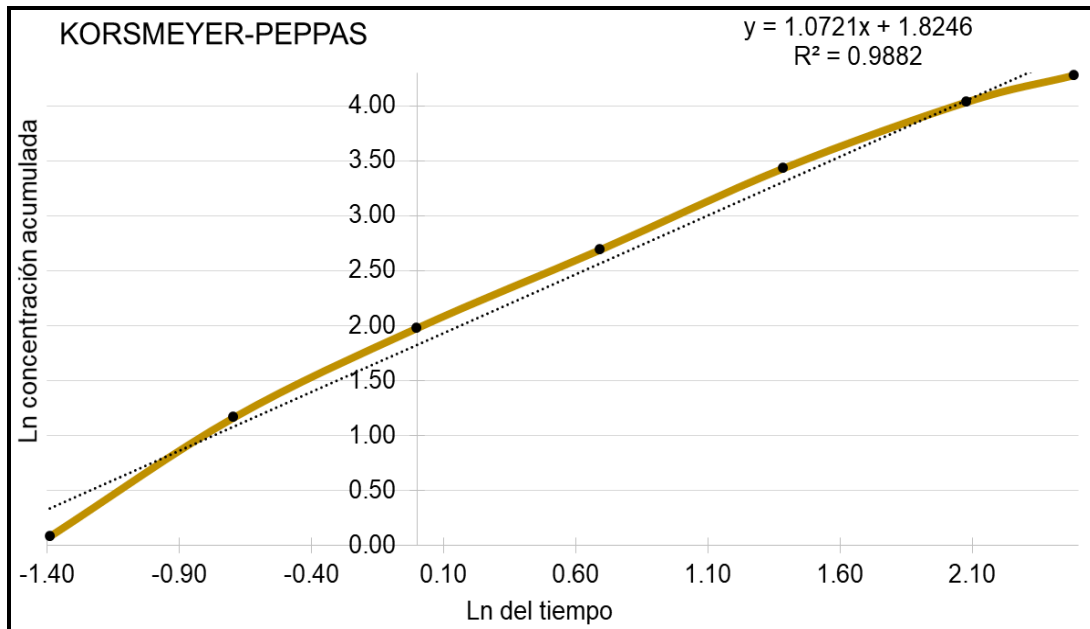


Figura 52. Gráfico de modelo de Korsmeyer-Peppas.

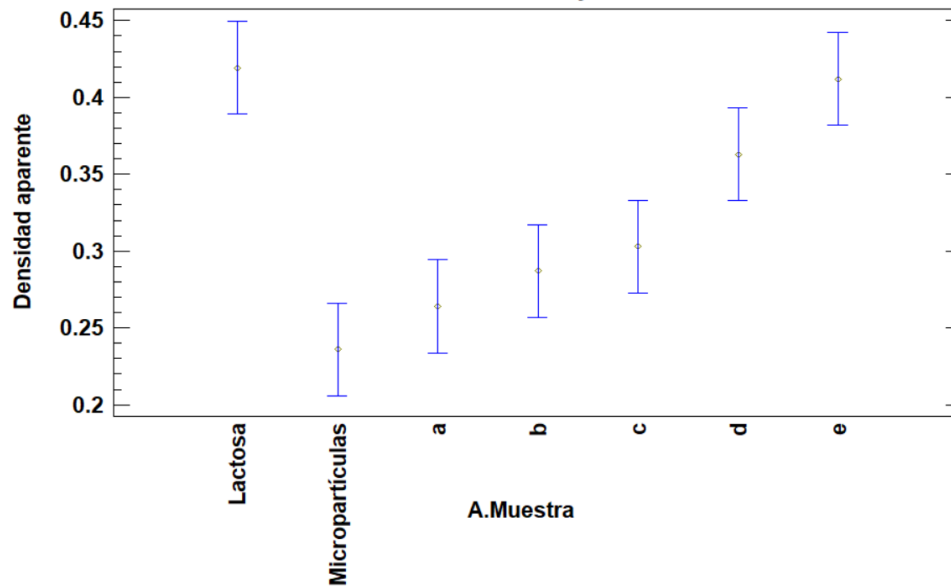
### 13.3 Tabla de la interacción de las MP's con soluciones de mucina al 1 y 2%.

Tabla 22. Tamaño promedio y potencial Z de las MP's al interactuar con mucinas.

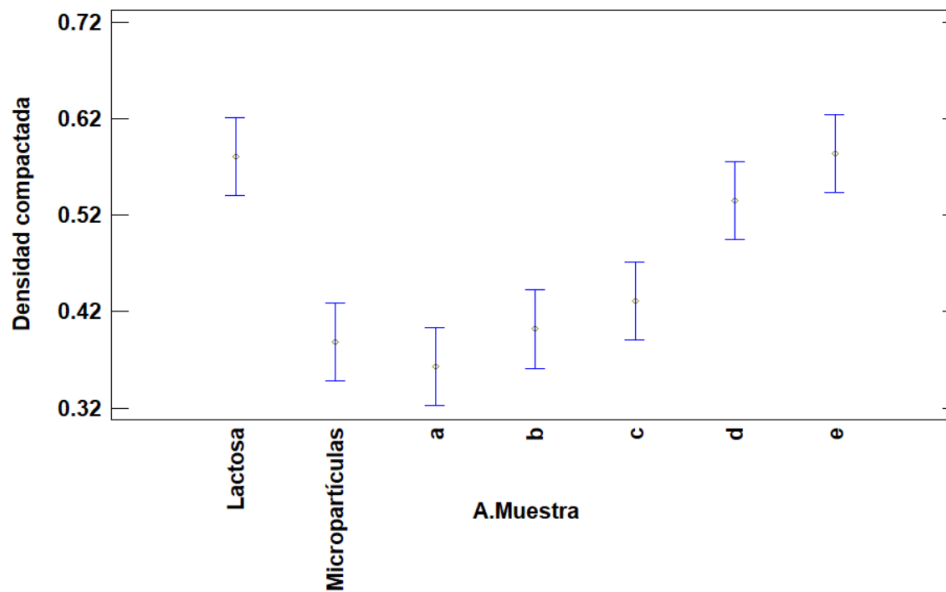
Tiempo (min)/ Concentración de mucina	Tamaño (nm)		Potencial Z (mV)	
	1%	2%	1%	2%
0	1105.8 ± 165.7	994.6 ± 86.9	-29.0 ± 1.5	-32.6 ± 2.2
30	1003.8 ± 400.4	1002.7 ± 147.4	-17.9 ± 1.6	-9.2 ± 1.4
60	760.6 ± 125.8	493.1 ± 110.5	-17.1 ± 0.6	-11.9 ± 1.8
120	864.2 ± 152.5	367.8 ± 30.1	-16.8 ± 0.8	-13.3 ± 3.2
240	3124.5 ± 47.4	3575.5 ± 342.9	-17.1 ± 0.7	-10.0 ± 0.9

Se muestra el valor promedio (n = 2) ± D.E.

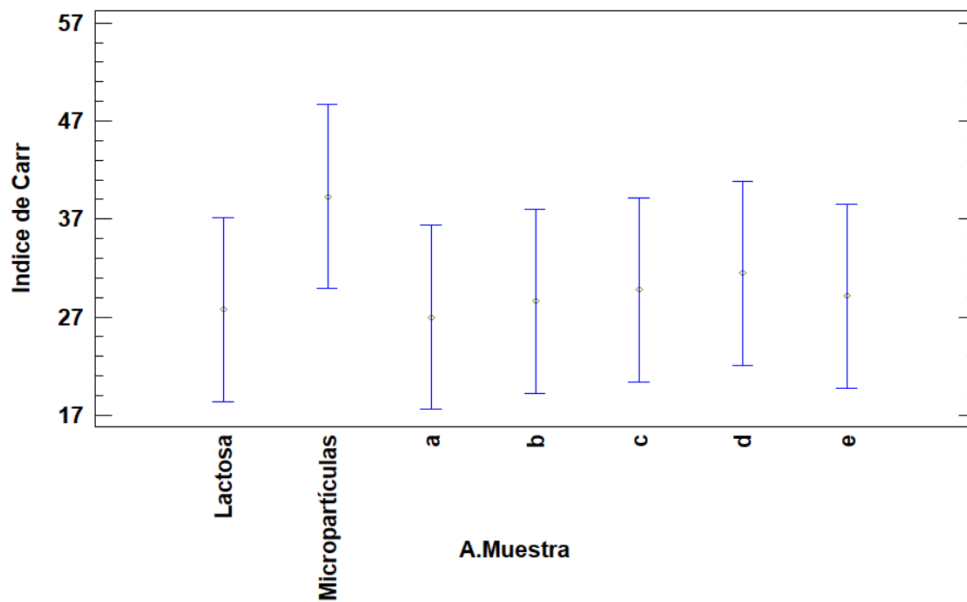
### 13.4 Análisis de varianza para las formulaciones como polvo seco para inhalación.



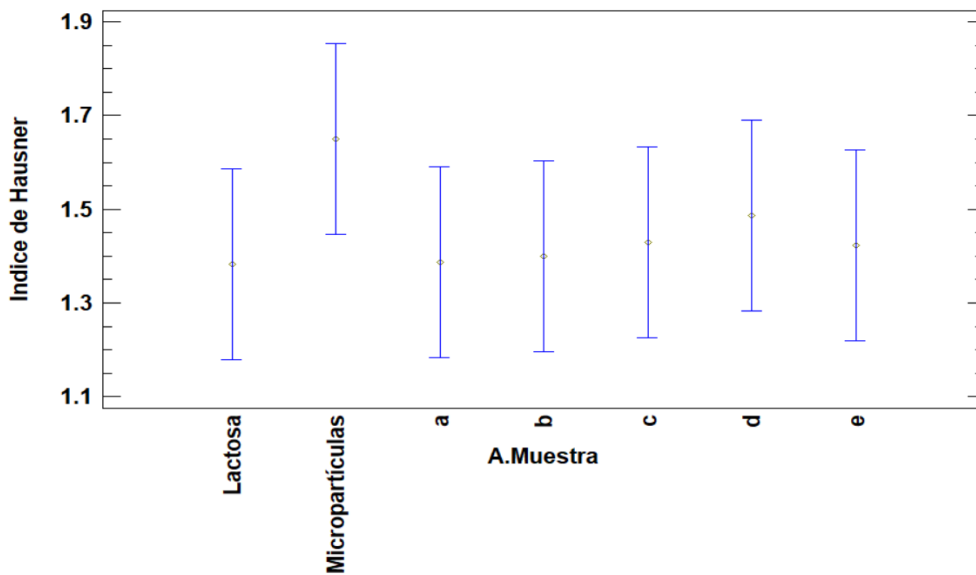
**Figura 53.** Gráfico de la densidad aparente. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey ( $n = 3$ ).



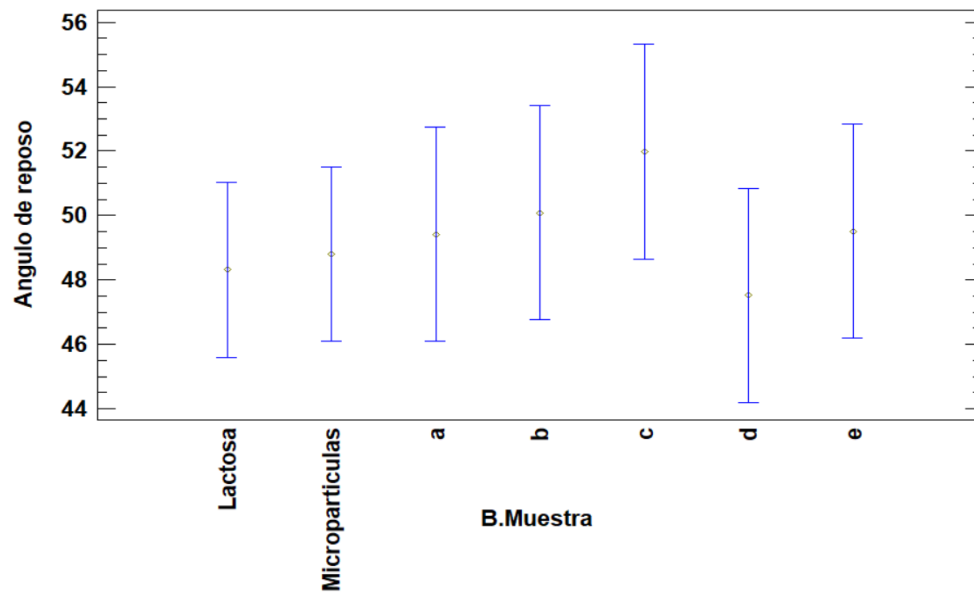
**Figura 54.** Gráfico de densidad compactada. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey ( $n = 3$ ).



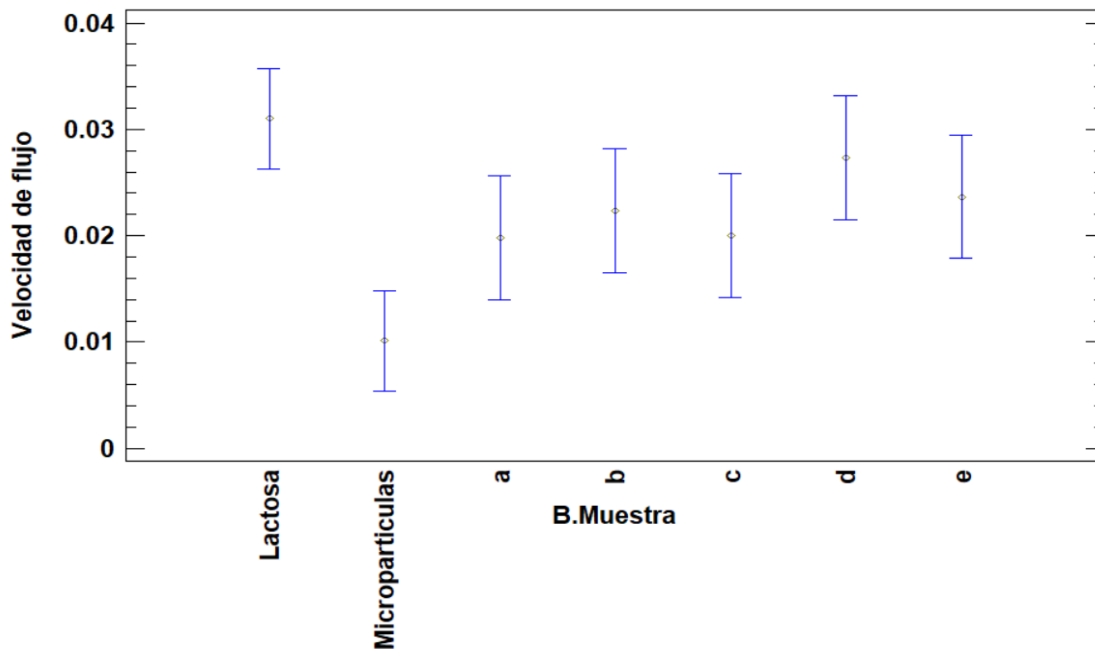
**Figura 55.** Gráfico de índice de Carr. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey ( $n = 3$ ).



**Figura 56.** Gráfico del índice de Hausner. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey ( $n = 3$ ).



**Figura 57.** Gráfico del ángulo de reposo. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey: para lactosa y micropartículas ( $n = 9$ ), para mezclas ( $n = 6$ ).



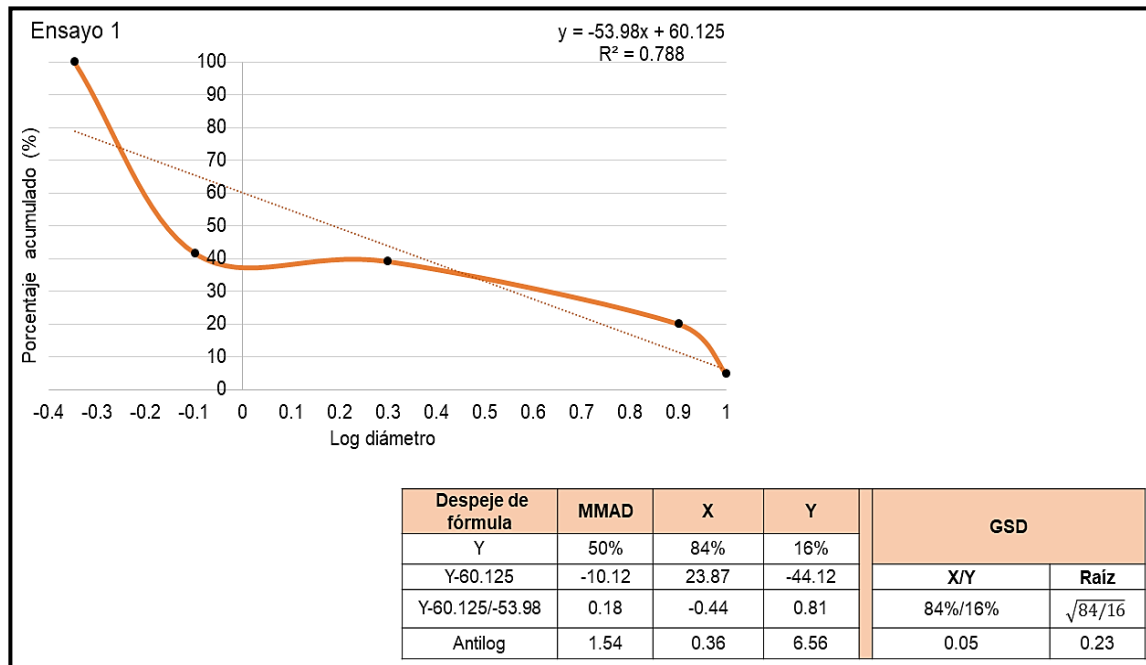
**Figura 58.** Gráfico de velocidad de flujo. Se muestra el valor promedio con intervalos de Tukey: para lactosa y micropartículas ( $n = 9$ ), para mezclas ( $n = 6$ ).

**13.5 Gráficos y tablas de la determinación del diámetro de masa media aerodinámica.**

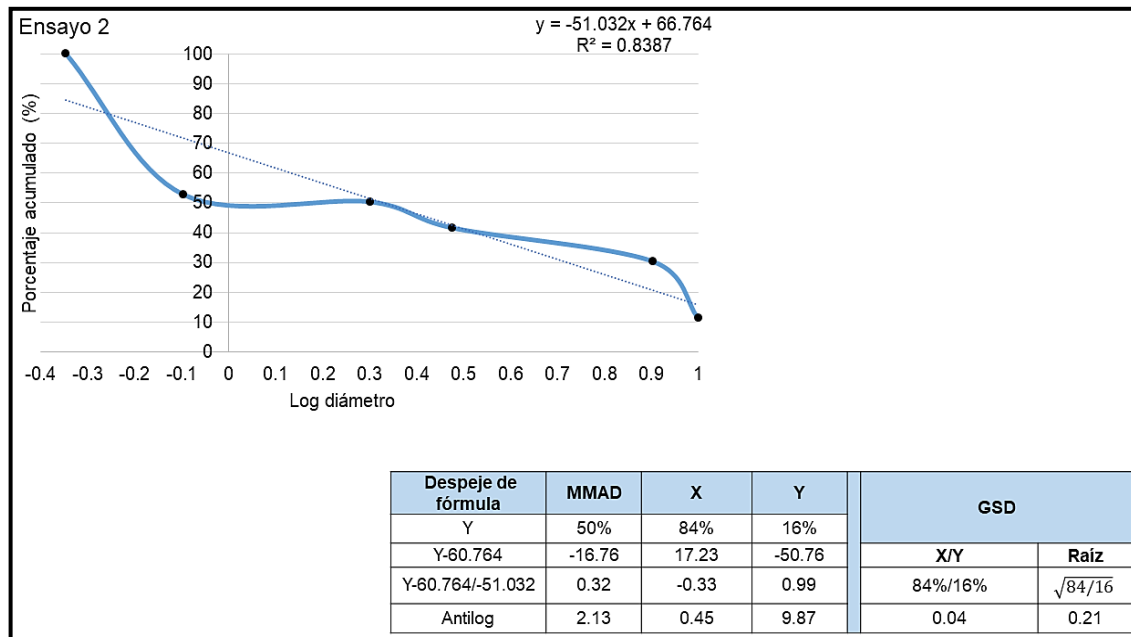
**Tabla 23.** MMAD y GSD calculados por porcentaje en peso.

Diámetro (µm)	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	% peso	Diámetro · % peso	% peso	Diámetro · % peso	% peso	Diámetro · % peso
10	4.80	48.00	11.20	112.00	4.00	40.00
8	15.20	121.60	19.20	153.60	8.80	70.40
3	n/a	n/a	11.20	33.60	10.40	31.20
2	19.20	38.40	8.80	17.60	3.20	6.40
0.8	2.40	1.92	2.40	1.92	9.60	7.68
0.45	58.40	26.28	47.20	21.24	64.00	28.80
<b>Suma</b>		236.20	<b>Suma</b>	339.96	<b>Suma</b>	184.48
<b>MMAD</b>		2.36	<b>MMAD</b>	3.40	<b>MMAD</b>	1.84
<b>GSD</b>		0.44	<b>GSD</b>	0.44	<b>GSD</b>	0.44

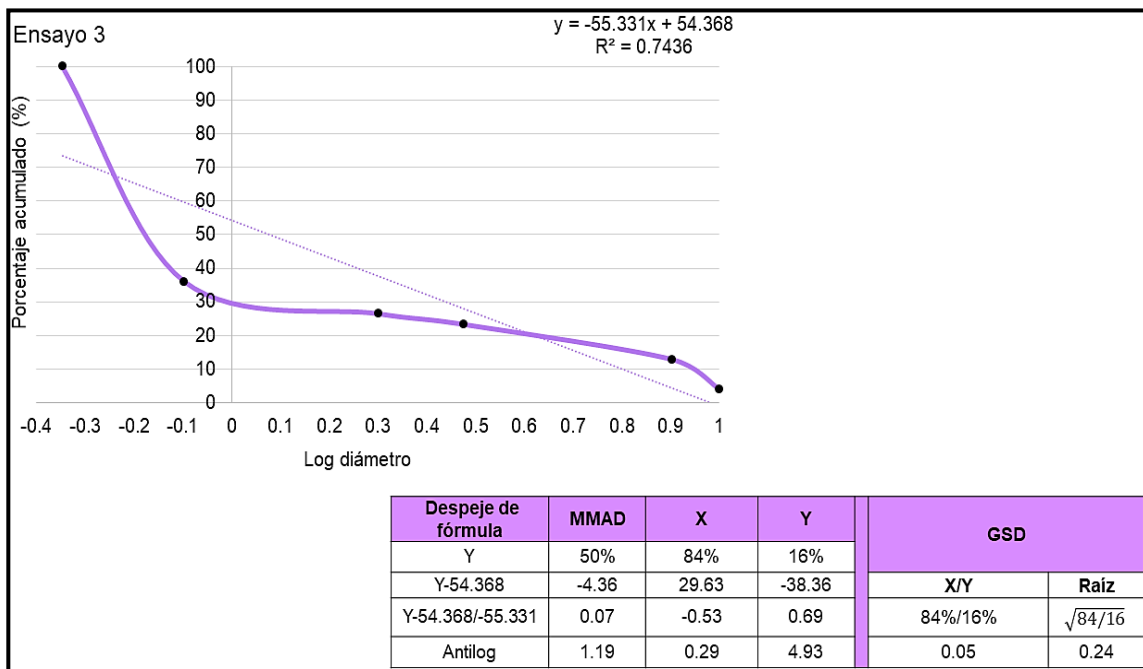
n/a: No aplica.



**Figura 59.** Gráfico de porcentaje acumulado (%) vs el logaritmo del diámetro de membrana, con su respectiva tabla para calcular el MMAD y el GSD a partir de la ecuación. Ensayo 1.



**Figura 60.** Gráfico de porcentaje acumulado (%) vs el logaritmo del diámetro de membrana, con su respectiva tabla para calcular el MMAD y el GSD a partir de la ecuación. Ensayo 2.

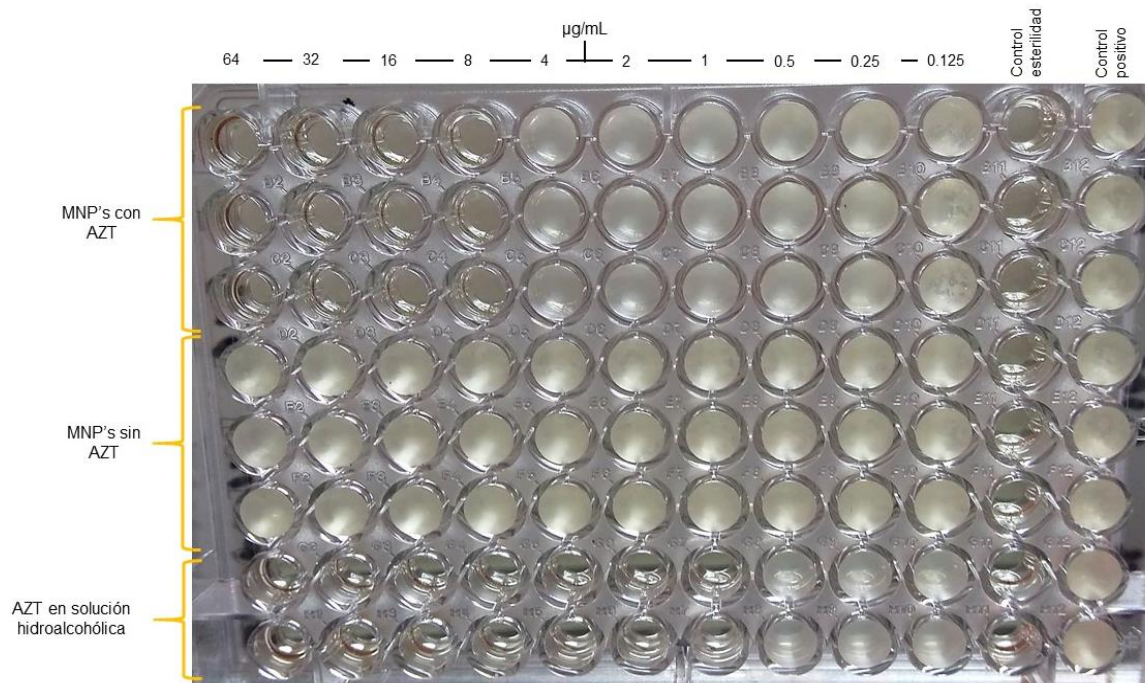


**Figura 61.** Gráfico de porcentaje acumulado (%) vs el logaritmo del diámetro de membrana, con su respectiva tabla para calcular el MMAD y el GSD a partir de la ecuación. Ensayo 3.

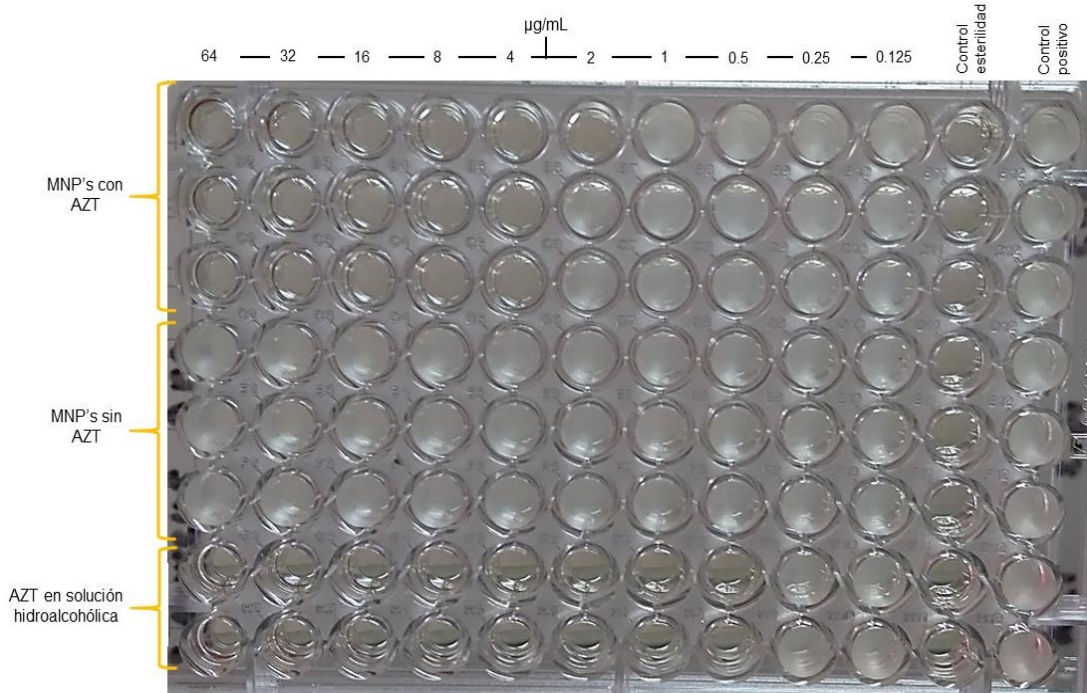
**Tabla 24.** Cálculo del MMAD a partir de la fórmula.

Muestra	Diámetro geométrico [d] (um)	Densidad compactada [P] (g/mL)	Densidad aparente [P0] (g/mL)	X	p/p0*X	(p/p0*X)^1/2	MMAD		
							d(p/p0*X)^1/2	Promedio	D.E.
1	1.083	0.389	0.242	1	1.611	1.269	1.375	1.390	0.014
2	1.083	0.389	0.233	1	1.667	1.291	1.398		
3	1.083	0.389	0.233	1	1.667	1.291	1.398		

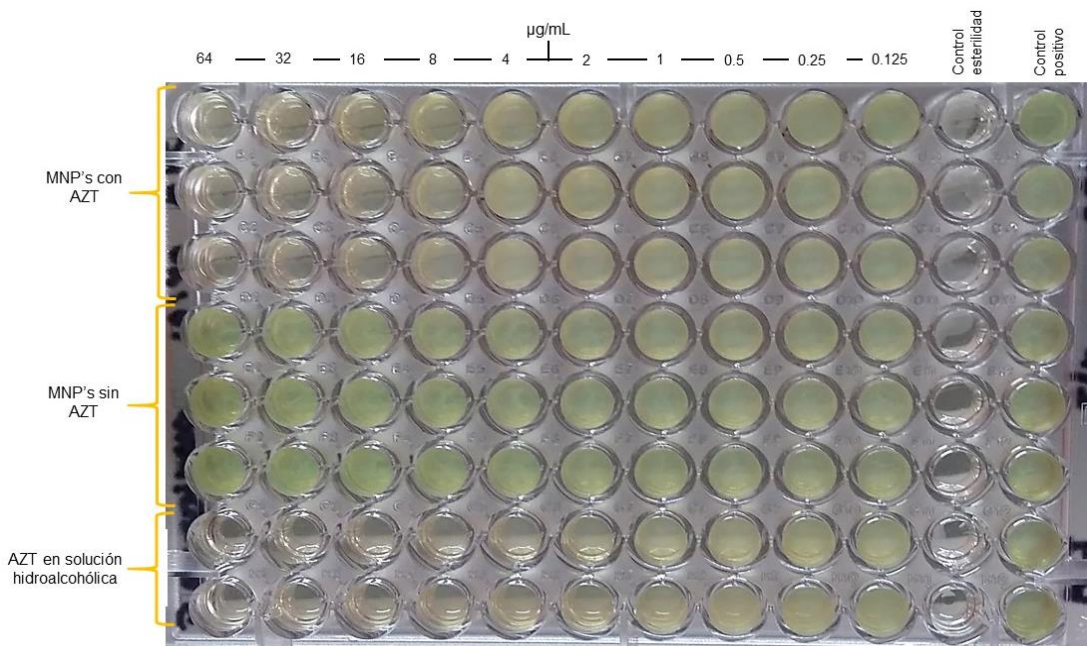
**13.6 Ensayos de microdilución en placas de 96 pozos.**



**Figura 62.** Placa de 96 pozos de *B. subtilis* expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.

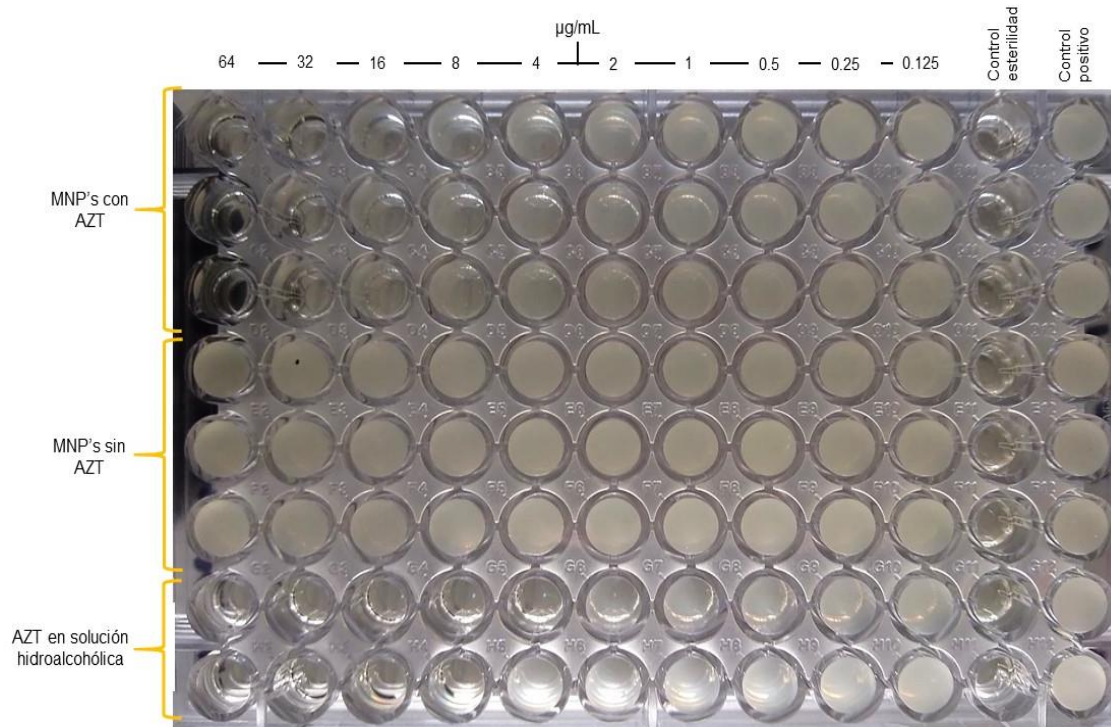


**Figura 63.** Placa de 96 pozos de *S. aureus* expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.



**Figura 64.** Placa de 96 pozos de *P. aeruginosa* expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.





**Figura 65.** Placa de 96 pozos de *K. pneumoniae* expuesta a los 3 tratamientos después de 48 h.

**13.7 Constancias de participación en congresos.**

Los resultados obtenidos se presentaron en los siguientes congresos participando en modo cartel.





## El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

### y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Otorgan la presente

# CONSTANCIA

a: L.F. Mastache-Juárez, Areli; Dr. Alcalá-Alcalá, Sergio.

Por su participación como PONENTES del trabajo titulado: « OBTENCIÓN DE MICRO-NANOPARTÍCULAS BIODHESIVAS Y BIODEGRADABLES PARA LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE FÁRMACOS », en el XXVI Congreso Nacional de Educación Química Farmacéutica Biológica y XXII Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia.

*Cuernavaca, Morelos, a 07, 08 y 09 de febrero de 2018.*

**DESS Rodolfo Cruz Rodríguez**  
Presidente del Colegio Nacional de  
Químicos Farmacéuticos Biólogos  
México, A.C.

**M. en C. Kenneth Rubio Carrasco**  
Presidenta de la Comisión de Reunión  
Nacional de Estudiantes de Farmacia del  
CNQFBM, A.C.

**Dra. María Estela Meléndez Camargo**  
Presidenta de la Comisión de Educación  
del CNQFBM, A.C.

**Dr. Efrén Hernández Baltazar**  
Director de la Facultad de Farmacia de la  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

TEF0007



"INNOVACIÓN Y DESARROLLO FARMACÉUTICO  
CON IMPACTO EN LA SALUD Y BIENESTAR DE LA POBLACIÓN"

## LI Congreso Nacional de CIENCIAS FARMACÉUTICAS



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

# RECONOCIMIENTO a:

Areli Mastache Juarez, Sergio Alcalá Alcalá, Oscar Torres Angeles, Jesús  
Rivera Islas

**Por la presentación del trabajo:  
Desarrollo de micro-nanopartículas biodegradables de gantrez para la  
administración pulmonar de azitromicina**

Dr. Efrén Hernández Baltazar  
Presidencia de la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.

Septiembre 2018, Puerto Vallarta, Jalisco.

Dra. Verónica Rodríguez López  
Dirección de Ciencia y Tecnología de la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.

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

**Nombre del alumno:** L. F. Areli Mastache Juárez

**Título de la tesis:** Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema  
biodegradable y bioadhesivo para administración pulmonar en el tratamiento  
de la neumonía

**Grado por obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Jesús Rivera Islas

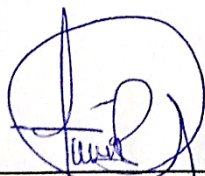
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

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

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



Firma del miembro del jurado

22/Febrero/2019

Fecha

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

Nombre del alumno: L. F. Areli Mastache Juárez

Título de la tesis: Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema  
biodegradable y bioadhesivo para administración pulmonar en el tratamiento  
de la neumonía

Grado por obtener:

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Dea Herrera Ruiz

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

La tesis:

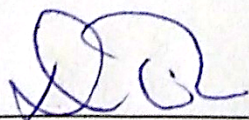
- Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

---

---

---



Firma del miembro del jurado

8 - Marzo - 2019

Fecha

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

Nombre del alumno: L. F. Areli Mastache Juárez

Título de la tesis: Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema  
biodegradable y bioadhesivo para administración pulmonar en el tratamiento  
de la neumonía

Grado por obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Elizabeth Piñón Segundo

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

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

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



Firma del miembro del jurado

11 Marzo 2019.

Fecha

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

Nombre del alumno: L. F. Areli Mastache Juárez

Título de la tesis: Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema  
biodegradable y bioadhesivo para administración pulmonar en el tratamiento  
de la neumonía

Grado por obtener:

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Gerardo Leyva Gómez

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

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

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



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

15-Marzo-2019

Fecha



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

**Nombre del alumno:** L. F. Areli Mastache Juárez

**Título de la tesis:** Desarrollo y evaluación de un micro-nanosistema  
biodegradable y bioadhesivo para administración pulmonar en el tratamiento  
de la neumonía

**Grado por obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia


**Miembro del jurado:** Dr. Efrén Hernández Baltazar

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

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

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

  
Firma del miembro del jurado

21-Mar-19  
Fecha