



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
SÓLIDAS DE DULOXETINA HCL PARA  
ADMINISTRACIÓN INTRANASAL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**IBQ. JORGE HUMBERTO BETANZOS RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EFRÉN HERNÁNDEZ BALTAZAR**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**JUNIO, 2018**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

**Fecha:** 16 de febrero de 2018

**Asunto:** Jurado

**Medio de notificación:** Impresa/personal

**Folio:** FF/D/SAc/CIP/MF/055/2018

**I.B.Q. JORGE HUMBERTO BETANZOS RODRÍGUEZ  
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 asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "Diseño de Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Duloxetine HCl para administración intranasal"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**DICTAMEN:** Se asignó el siguiente jurado

**PRESIDENTE:** Dra. Dea Herrera Ruiz

**SECRETARIO:** Dr. Sergio Alcalá Alcalá

**VOCAL 1:** M en C Enrique Amador González

**VOCAL 2:** Dr. Julio César Rivera Leyva

**VOCAL3:** Dra. Mariana Ortiz Reynoso

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  
mitv

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 1 de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Efrén Hernández Baltazar. La realización del trabajo contó con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de una beca de tiempo completo.

## AGRADECIMIENTOS

---

- ✓ Al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.
- ✓ A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por brindarme la formación académica.
- ✓ Agradezco al comité tutorial integrado por la Dra. María Josefa Bernad Bernad, M.C Enrique Amador González y el Dr. Efrén Hernández Baltazar por las observaciones y aportaciones que contribuyeron a mejorar este proyecto.
- ✓ Agradezco al comité de evaluación de la tesis conformado por la Dra. Dea Herrera Ruiz, Dr. Sergio Alcalá Alcalá, M.C. Enrique Amador González, Dr. Julio Cesar Rivera Leyva y Dra. Mariana Ortiz Reynoso. .
- ✓ Al Dr. Sergio Alcalá Alcalá por todos los consejos y apoyo brindado a mi persona y al proyecto.
- ✓ A la Dra. Rosario Estrella y al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) por el apoyo brindado y permitir el uso de sus instalaciones y equipos en algunos experimentos.
- ✓ A mis compañeros de maestría, principalmente al M.F Eduardo Casarrubias y al L.F Osmar Machuca por todo su apoyo y consejos durante el periodo de toda mi maestría.
- ✓ Especialmente al Dr. Efrén Hernández Baltazar por todo el apoyo brindado, sus aportaciones al proyecto, y por haber hecho posible la realización de este proyecto.

## DEDICATORIAS

---

- ✓ A Dios, por darme el regalo de la vida, por sus bendiciones incontables e incomparables, por estar conmigo día y noche y ser mi fuerza para seguir adelante.
- ✓ A mi familia, porque son mi motivación y mi apoyo, mis padres y mis hermanos un regalo de Dios que me alientan a ser mejor cada día.
- ✓ Al Doctor Efrén Hernández Baltazar, por darme la oportunidad de integrarme en su grupo de trabajo, por ser mi asesor durante este tiempo en la maestría, y sobre todo por sus consejos que me han formado no solamente como profesional sino también como persona.
- ✓ A todas aquellas personas que han estado orando por mí, para que Dios me fortalezca en todo lo que hago, a mis amigos y familiares.

<b>INDICE</b>		
		<b>PAGINA</b>
INDICE DE FIGURAS.....		I
INDICE DE TABLAS.....		III
LISTA DE ABREVIATURAS.....		IV
RESUMEN.....		V
ABSTRACT.....		VII
<b>1.0INTRODUCCIÓN.....</b>		<b>1</b>
<b>2.0ANTECEDENTES.....</b>		<b>3</b>
2.1 Panorama general de las Nanopartículas.....		3
2.2 Nanopartículas Solidas Lipídicas.....		6
2.2.1 Ventajas de las SLN.....		7
2.2.2 Métodos para preparar SLN.....		8
2.2.2.1 Homogeneización en caliente.....		9
2.2.3 Materiales utilizados en las SLN.....		10
2.2.4 Usos y aplicaciones.....		12
2.2.4.1 SLN para transportar fármacos al sistema nervioso central.....		17
2.3 La ruta intranasal.....		19
2.3.1 Ventajas y limitaciones de la ruta intranasal.....		20
2.3.2 Mecanismos involucrados en la administración intranasal.....		22
2.3.2.1 Factores anatómicos y fisiológicos.....		23
2.3.2.2 Características fisicoquímicas del moco y zona nasal.....		24
2.3.2.2.1 Aclaramiento mucocilar.....		24
2.3.2.3 Propiedades fisicoquímicas de los fármacos.....		25
2.4 Generalidades de duloxetina HCl.....		27
2.4.1 Retos farmacéuticos de duloxetina HCl.....		28
<b>3.0JUSTIFICACIÓN.....</b>		<b>30</b>
<b>4.0OBJETIVOS.....</b>		<b>31</b>
4.1 Objetivo general.....		31
4.2 Objetivos particulares.....		31

<b>5.0 HIPÓTESIS.....</b>		<b>32</b>
<b>6.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>33</b>
6.1 Materiales.....		33
6.1.1 Material para pruebas <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> .....		33
6.2 Equipos e instrumentos.....		34
6.3 Estudios de Preformulación.....		34
6.3.1 Análisis de identidad de materia prima.....		34
6.3.1.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....		35
6.3.1.2 Difracción de Rayos X de polvos.....		35
6.3.1.3 Espectroscopia infrarroja.....		35
6.3.1.4 Espectroscopia UV-VIS.....		35
6.4 Validación de los métodos analíticos.....		36
6.4.1 Linealidad.....		36
6.4.2 Precisión (repetibilidad).....		37
6.4.3 Exactitud (recobro).....		37
6.4.4 Límite de cuantificación y límite de detección.....		37
6.5 Formulación y diseños exploratorios.....		38
6.6 Preparación de las SLN.....		40
6.6.1 Preparación por el método de Homogeneización en caliente.....		40
6.6.2 Caracterización de las SLN (diseños exploratorios).....		40
6.6.2.1 Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (PZ).....		40
6.6.2.2 Evaluación del porcentaje de encapsulación (%EE).....		41
6.7 Formulación y diseño final.....		42
6.7.1 Caracterización de las SLN (diseño final).....		44
6.7.1.1 Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (PZ).....		44
6.7.1.2 Evaluación del porcentaje de encapsulación (%EE).....		44
6.7.2 Liberación <i>in vitro</i> .....		44
6.7.2.1 Liberación en vaso de precipitado.....		44
6.7.2.2 Liberación utilizando celdas de difusión de Franz.....		45
6.7.3 Permeación <i>ex vivo</i> en celdas de Franz.....		45
6.7.3.1 Obtención de la mucosa nasal de cabra.....		45

6.7.3.2 Permeación <i>ex vivo</i> .....		46
6.7.4 Caracterización fisicoquímica de las SLN.....		47
6.7.5 Análisis de resultados.....		47
<b>7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		48
7.1 Análisis de identidad materia prima.....		48
7.1.1 Punto de fusión.....		48
7.1.2 Difracción de Rayos X de polvos.....		52
7.1.3 Espectroscopia infrarroja.....		52
7.1.4 Barrido Espectrofotométrico UV-VIS.....		54
7.2 Validación de los métodos analíticos.....		55
7.2.1 Validación para la determinación de %EE.....		55
7.2.2 Validación para los ensayos <i>in vitro</i> .....		57
7.2.3 Validación para el ensayo <i>ex vivo</i> .....		59
7.3 Caracterización de las SLN (métodos exploratorios).....		60
7.3.1 Diseños exploratorios.....		60
7.4 Diseño final.....		63
7.4.1 Tamaño de partícula.....		63
7.4.2 PDI y PZ.....		64
7.4.3 Porcentaje de eficiencia encapsulación.....		66
7.4.4 Liberación <i>in vitro</i> .....		69
7.4.5 Permeación <i>ex vivo</i> .....		72
7.4.6 Caracterización fisicoquímica de las SLN.....		73
7.4.6.1 Difracción de Rayos X de polvos.....		73
7.4.6.2 Espectroscopia FT-infrarroja.....		74
<b>8.0 CONCLUSIONES.....</b>		76
<b>9.0 PERSPECTIVAS.....</b>		77
<b>10.0 REFERENCIAS.....</b>		78
<b>11.0 ANEXOS.....</b>		85



## ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
1. Algunas nanopartículas y sus tamaños	4
2. Algunos tipos de nanopartículas	5
3. Ilustración de una nanopartícula sólida lipídica	7
4. Equipo de homogeneización Ultra-Turrax T18	10
5. Barrera Hematoencefálica (BBB)	18
6. Representación de las diferentes áreas de la cavidad nasal	23
7. Mecanismos implicados en el cruce del epitelio respiratorio por xenobióticos en función de sus propiedades fisicoquímicas	26
8. Presentación comercial de duloxetina HCl 60 mg, capsulas de liberación retardada	27
9. Difusión en bolsa de diálisis	42
10. Medición de un corte de mucosa nasal	46
11. Permeación <i>ex vivo</i> en celdas de Franz	47
12. DSC y TGA del fármaco duloxetina HCl	50
13. DSC y TGA del lípido monoestearato de glicerilo.	51
14. XRDp de duloxetina HCl y su simulado	52
15. Muestra del espectro de FT-IR de duloxetina (DLX).	53
16. Muestra el espectro de FT-IR del monoestearato de glicerilo (GMS).	54
17. Barrido Espectrofotométrico UV-VIS de duloxetina.	55
18. Curva de calibración del método para determinar %EE.	57
19. Curva de calibración del método para ensayos <i>in vitro</i> .	58
20. Curva de calibración del método para ensayo <i>ex vivo</i> .	59
21. Formulación de SLN.	61
22. Diagrama de Pareto del tamaño de partícula	64
23. Grafica de superficie de respuesta del tamaño de partícula.	64
24. Diagrama de Pareto del PDI.	65
25. Diagrama de Pareto de la %EE.	66
26. Grafica de superficie de respuesta de la %EE	67

27. Perfil de liberación de las nueve formulaciones y su control. Q (ug/cm <sup>2</sup> ) contra el tiempo (t).	70
28. Perfil de liberación de las nueve formulaciones y su control. % liberado contra el tiempo (t).	71
29. Perfil de permeación de la formulación F4 (azul) contra el control (naranja)	73
30. XRDp de GMS (Lípido), DLX (duloxetina), MF (Mezcla física) y SLN (nanopartículas lipídicas sólidas).	74
31. Espectro de FT-IR de las SLN.	75

## ÍNDICE DE TABLAS

---

	PAGINA
1. Lípidos más utilizadas en la preparación de SLN	11
2. Tensoactivos más utilizados en la preparación de SLN	12
3. Aplicaciones biomédicas de nanopartículas lipídicas sólidas	14
4. Nanoacarreadores propuestos para la administración de fármacos	16
5. Fármacos administrados vía intranasal para liberación sistémica	20
6. Ventajas y limitaciones de la administración intranasal de fármacos para la administración sistémica	21
7. Características físico-químicas de duloxetina HCL	29
8. Factores y niveles de los diseños experimentales exploratorio 2 <sup>2</sup> .	38
9. Valores reales en relación y porcentaje del diseño experimental exploratorio.	39
10. Valores reales en miligramos.	39
11. Factores y niveles del diseño experimental final.	43
12. Valores reales en relación, porcentaje y tiempo del diseño experimental final.	43
13. Valores reales del diseño experimental final.	44
14. Validación para calcular %EE.	56
15. Validación para los ensayos <i>in vitro</i> .	58
16. Validación para el ensayo <i>ex vivo</i> .	60
17. Resultados de los Diseños Experimentales 2 <sup>2</sup> .	62
18. Resultados del Diseño Experimental 2 <sup>3</sup> + 1 punto central.	68
19. Valores de la concentración de fármaco Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de todas las formulaciones	69
20. Valores del % de liberación en vaso de precipitado de todas las formulaciones	71
21. Cinética de liberación de las 9 formulaciones.	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
<b>APIs</b>	Active Pharmaceutical Ingredients
<b>BBB</b>	Barrera Hematoencefalica
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro cuadrado
<b>CMC</b>	Concentración Micelar Crítica
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>Da</b>	Dalton
<b>DLX</b>	Duloxetina
<b>DPNP</b>	Dolor Neuropático Periférico Diabético (por sus siglas en ingles)
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencia de barrido
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en ingles)
<b>GAD</b>	Trastorno de ansiedad generalizado (por sus siglas en ingles)
<b>h</b>	Hora
<b>IFAs</b>	Ingredientes Farmacéuticos Activos
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>Da</b>	Dalton
<b>MDD</b>	Trastorno Depresivo mayor (por sus siglas en ingles)
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mV</b>	miliVoltio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PDI</b>	Índice de Poli-dispersión
<b>PLGA</b>	poli(ácido láctico-co-glicólico)
<b>PLA</b>	Acido poli láctico
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PZ</b>	Potencial Zeta
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SLN</b>	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
<b>TGA</b>	Análisis termo gravimétrico
<b>µg</b>	Microgramo
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta-Visible

## RESUMEN

---

El desarrollo farmacéutico en los últimos años ha ocasionado un aumento en el desarrollo de novedosas formas de administrar los fármacos, que tienen el objetivo de lograr una mejor y más fácil administración de estos.

Los sistemas de nanopartículas ofrecen muchas ventajas para ser utilizados con el fin antes mencionado, ya que en su elaboración se utilizan materias primas aprobadas para su uso en humanos y que no generan toxicidad, estos sistemas nanométricos también ofrecen una amplia gama de aplicaciones para ser utilizados como vehículos para fármacos con solubilidades bajas y biodisponibilidad deficiente.

En el presente trabajo se utilizaron nanopartículas lipídicas sólidas como vehículo del fármaco duloxetina, este fármaco se administra normalmente vía oral y presenta una biodisponibilidad de aproximadamente el 50%, también es susceptible a degradación hidrolítica que es más pronunciada a pH ácido, y debido a que en la administración oral e intravenosa, la BBB restringe el acceso de los medicamentos antidepresivos al cerebro. Con este propósito se elaboraron las nanopartículas de duloxetina, para administrarse vía intranasal, como una forma de administración novedosa y más eficiente, éstas se evaluaron *in vitro* y *ex vivo* utilizando un diseño experimental final de  $2^3 + 1$  punto central, el cual nos permitió comparar entre varios tipos de formulaciones y su comportamiento.

Se obtuvieron resultados de tamaños de partícula entre 144 y 535 nm, PDI entre 0.17 y 0.65, PZ entre 11 y 14 mV, Eficiencia de encapsulación entre 41.8 y 64.4 % y tiempos de liberación entre los 11.51 y 22.53  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . La formulación F4 contra el control (blanco) mostró una diferencia de permeación estadísticamente significativa ( $p=0.00561229$ ) en el ensayo *ex vivo*, al permear a las 24 horas 541.94  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , mientras el control tuvo 1822.63  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ .

A partir del ensayo *ex vivo* en mucosa de cabra también se demostró que estas nanopartículas pueden ser administradas vía intranasal, y ofrecen una liberación controlada en comparación a la ausencia de una matriz lipídica. Esto también podría ser una alternativa para otros fármacos deficientes en solubilidad y biodisponibilidad.

## ABSTRACT

---

In the last few years pharmaceutical developments have lead to an increase in the number of novel ways to administer drugs. These new ways are focused on achieving a much better and easier administration of such products.

Nanoparticle systems offer numerous advantages to be used with the purpose previously mentioned since in their elaboration, some raw materials for human beings are used. Materials used for nanoparticle-based products have been approved for human use and do not cause toxicity. These nanoparticle systems also offer a wide range of applications to be used as means of transmission for drugs with low solubilities and lacking bioavailability.

Solid lipid nanoparticles were used for this project as a means of transmission of the drug duloxetine, this drug is normally used orally and presents a bioavailability of approximately fifty percent (50%), it is also susceptible to hydrolytic degradation that is more pronounced at acid pH, and because in oral and intravenous administration, BBB restricts access of antidepressant medications to the brain. With this purpose, the nanoparticles from the duloxetine worked to be administered nasally, as a form of a novel and more efficient administration. This was evaluated in in vitro and ex vivo, using a final experimental design of  $2^3 + 1$  central point, which allowed us to compare between numerous types of formulations and their behavior.

Particle size results were obtained between 144 and 535 nm, PDI between 0.17 and 0.65, PZ between 11 and 14 mV, Encapsulation efficiency between 41.8 and 64.4% and release times between 11.51 and 22.53  $\mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$ . The formulation F4 versus the control (blank) showed a statistically significant difference in permeation ( $p = 0.00561229$ ) in the ex vivo trial, when 24 hours after permeating 541.94  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  versus the control with 1822.63  $\mu\text{g} / \text{cm}^2/\text{h}$ .

It was demonstrated that these nanoparticles can be used to be administered intranasally, also controlling release rate as compared to those administered without a lipid matrix. This can also be an alternative for other low solubility drugs.



## 1.- INTRODUCCIÓN

---

El desarrollo científico y tecnológico enfocado en aumentar la efectividad de los medicamentos ha conducido a nuevos diseños en la tecnología del suministro o de los sistemas de administración de sustancias activas. Los sistemas coloidales como transportadores de sustancias activas pertenecen a un área de rápido desarrollo que ha contribuido significativamente a la administración de medicamentos de manera controlada y localizada (Pople *et al.*, 2006). Entre las diferentes estrategias en este campo, las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) se han convertido en uno de los más prometedores sistemas para la entrega controlada de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs o APIs de sus siglas en inglés) que pueden mejorar la biodisponibilidad del fármaco y su focalización (Arana *et al.*, 2015).

Por ejemplo, el fármaco duloxetina en su forma de clorhidrato que se indica para el tratamiento del trastorno depresivo mayor (MDD, por sus siglas en inglés), dolor neuropático periférico diabético (DPNP, por sus siglas en inglés) en adultos y trastorno de ansiedad generalizado (GAD, por sus siglas en inglés), tiene una biodisponibilidad oral absoluta que varía de 32 a 80% (media de 50%), también es susceptible a la degradación hidrolítica que es más pronunciada a pH ácido (Sinha *et al.*, 2009), y debido a que en la administración oral e intravenosa, la BBB restringe el acceso de los medicamentos antidepresivos al cerebro, focalizar la administración al cerebro puede aumentar la concentración del fármaco en el SNC con la reducción concomitante de la dosis y los efectos secundarios (Misra *et al.*, 2003).

Esto lo hace un candidato para mejorar su biodisponibilidad y su forma de administración. Actualmente se comercializa únicamente para administrarse en forma oral como cápsulas o pellets de liberación retardada.

Los nanotransportadores lipídicos son generalmente de forma esférica con un diámetro de entre 10 y 1000 nm que contienen un núcleo lipídico sólido estabilizado por diversos tipos de emulsionantes, ellos son preferibles a otros portadores coloidales debido a su naturaleza lipofílica y otras propiedades versátiles como alta carga de IFAs, liberación controlada, orientación de IFAs y capacidad para incorporar tanto fármacos hidrófilos y lipófilos (Patel *et al.*, 2011; Kaur and Bhandari, 2013).

Las ventajas del uso de SLN como transportadores incluyen también la utilización de lípidos fisiológicamente aceptables para su preparación, la posibilidad de evitar el uso de solventes orgánicos en su preparación y un espectro de uso amplio ya que se utilizan para la administración sobre la piel y mucosas, por vía oral y por vía intravenosa. Además, se puede considerar que también sea una ventaja el hecho de que existan métodos de fabricación bien establecidos. Las nanopartículas lipídicas presentan una mejor biodisponibilidad, protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, y podrían ser de liberación prolongada para sustancias activas poco solubles en agua incorporadas en la matriz lipídica sólida (Jores *et al.*, 2003).

La administración intranasal ofrece una ruta alternativa y no invasiva al sistema nervioso central (SNC) para la administración de fármacos (Graff y Pollack, 2005). La mucosa nasal es uno de los sitios más permeables y altamente vascularizado por lo que es atractivo para la administración de fármacos, en tanto que garantiza una rápida absorción de ellos y aparición de la acción terapéutica. Las conexiones neuronales entre la mucosa nasal y el cerebro proporcionan una vía única, no invasiva en el suministro de agentes terapéuticos al SNC (Thorne y Frey, 2001; Illum, 2000). En este contexto el presente trabajo se desarrolló. Se prepararon SLN de duloxetina HCl para administración intranasal, asimismo

se hizo la caracterización fisicoquímica de las mismas y la evaluación mediante ensayos *in vitro* y *ex vivo*.

## 2.- ANTECEDENTES

---

### 2.1 Panorama general de las nanopartículas

En los últimos años se ha vuelto evidente que el desarrollo de nuevos medicamentos por sí solo no es suficiente para garantizar el progreso en la terapia farmacológica. Los datos experimentales prometedores obtenidos *in vitro* a menudo son seguidos por resultados decepcionantes *in vivo*. Los motivos principales de la falla de la terapia incluyen (Wolfgang Mehnert y Karsten Mader., 2001):

- 1) Insuficiente concentración de fármaco en la circulación sanguínea debido a absorción deficiente, metabolismo y eliminación rápida (por ejemplo, péptidos, proteínas).
- 2) Distribución de fármacos a otros tejidos asociados a una alta toxicidad (por ejemplo, medicamentos contra el cáncer).
- 3) Baja solubilidad de los medicamentos, lo que excluye la administración i.v. de fármacos en solución acuosa.
- 4) Alta fluctuación de los niveles plasmáticos debido a la impredecible biodisponibilidad después de la administración peroral, incluida la influencia de los alimentos sobre los niveles plasmáticos (por ejemplo, ciclosporina).

Una estrategia prometedora para superar estos problemas implica el desarrollo de sistemas portadores de fármacos adecuados. El destino *in vivo* del fármaco ya no está determinado principalmente por las propiedades del fármaco, sino por el sistema transportador, que debería permitir una liberación controlada y localizada del fármaco de acuerdo con las necesidades específicas de la terapia. El tamaño del acarreador depende de la ruta deseada de la administración y puede ser de tamaño nanométrico (portadores coloidales), hasta el micrométrico (micropartículas) y hasta varios milímetros (implantes) (Mehnert y Mader, 2001).

Las nanopartículas son un tipo de sistema coloidal de administración de fármacos que comprende partículas con un intervalo de tamaño de 10 a 1000 nm de diámetro (Figura 1). Las nanopartículas pueden presentar o no propiedades relacionadas con el tamaño que difieren significativamente de las observadas en partículas finas o materiales a granel (Buzea *et al.*, 2007). Las principales ventajas de las nanopartículas son (1) biodisponibilidad mejorada al aumentar la solubilidad acuosa, (2) aumentan el tiempo de resistencia en el cuerpo (vida media / especificidad para sus receptores afines) y (3) dirigen el medicamento a una ubicación específica en el cuerpo (su sitio de acción). Esto da como resultado la reducción concomitante en la cantidad de fármaco requerida y la toxicidad de la dosificación, lo que permite la administración segura de fármacos terapéuticos tóxicos y la protección de los tejidos y células no diana de los efectos secundarios graves (Irving, 2007).

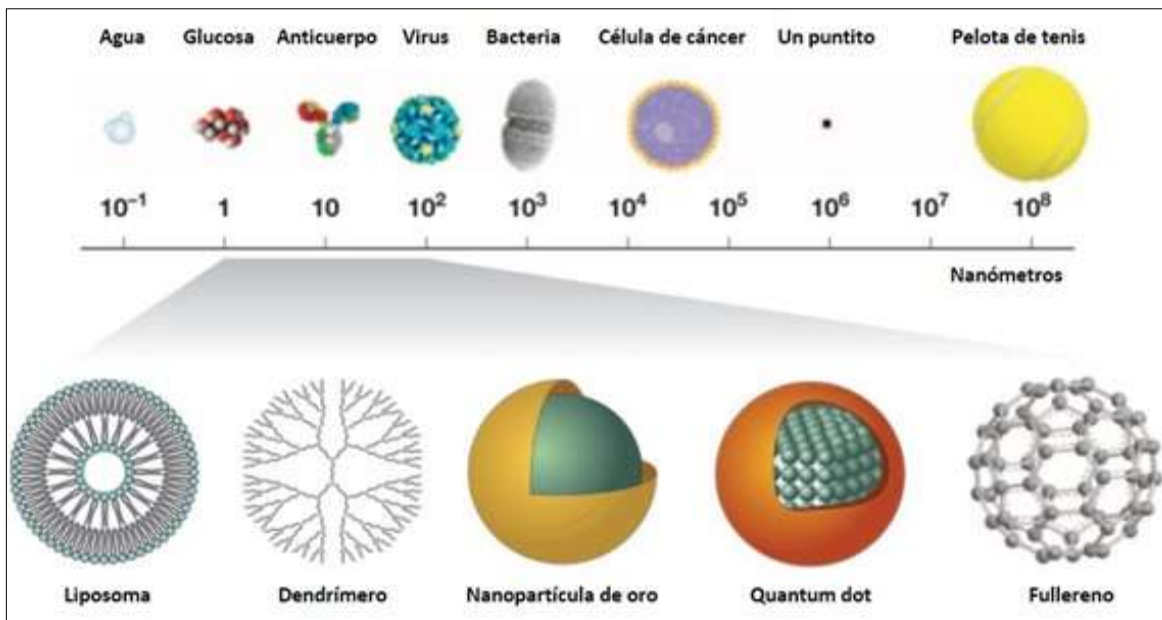


Figura 1. Algunas nanopartículas y sus tamaños (Candice Felippi., 2015)

En estas nanopartículas el fármaco bien se puede integrar en la matriz o unirse a la superficie de la partícula submicrónica que posee una superficie muy grande en relación

de volumen (Figura 2). Como consecuencia, la tasa de disolución aumenta de acuerdo con la ecuación de Noyes Whitney y Kelvin (que describe la velocidad del proceso de disolución de una sustancia, normalmente aplicada a fármacos en medio líquido). Por ejemplo, compuestos poco solubles como Paclitaxel, Ciclosporina o Anfotericina B muestran un aumento en la tasa de disolución y absorción en el tracto gastrointestinal cuando se formulan como una nano-suspensión. Dependiendo de la carga de la partícula, propiedades de superficie e hidrofobicidad relativa, las nanopartículas pueden diseñarse para absorberse preferentemente en órganos o tejidos.

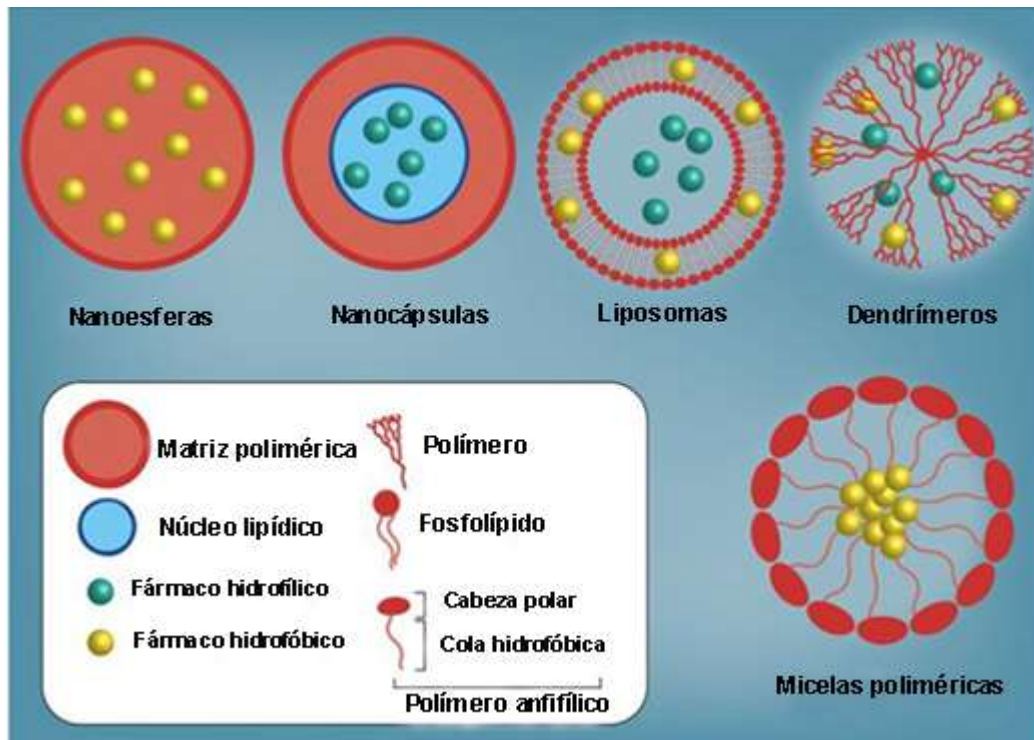


Figura 2. Algunos tipos de nanopartículas, fármaco (verde-hidrofílico y amarillo-hidrofóbico) integrado a la matriz de una Nanoesfera o en la superficie de un Liposoma o Dendrimeros.

Una de las principales ventajas de las nanopartículas es su capacidad para cruzar barreras de membrana, particularmente en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal.

El estudio de estas barreras proporciona una comprensión más profunda de la aplicación fisiológica y normal, como la inmovilización enzimática y la transformación del ADN. En la era de la manipulación genética y la terapia génica somática, los sistemas de transfección que utilizan partículas de nanoescala se adaptan a las necesidades mediante el uso de polímeros diseñados para aplicaciones específicas (Kumar y Randhawa, 2013).

## 2.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

A principios de los años 90, el profesor R. H. Müller (Alemania) y el profesor M. Gasco (Italia) comenzaron a investigar el potencial de una nueva formulación basada en nanopartículas: las llamaron nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (Müller RH *et al.*, 2000; Müller RH *et al.*, 2011). Su formulación se basó en el uso de sustancias lipídicas y presentó, entre otras, la ventaja de poder evitar usar un disolvente orgánico durante el método de preparación, al contrario que las nanopartículas orgánicas existentes (por ejemplo, las nanopartículas de PLGA), y presentaron una alta estabilidad en ensayos *in vivo* ya que permanecieron sólidas a temperatura corporal. Esta última característica los convirtió en una alternativa, no sólo a las nanopartículas orgánicas sino también a las anteriores basadas también en lípidos (por ejemplo, liposomas).

Los SLN se componen principalmente de lípidos que están en fase sólida a temperatura ambiente y tensoactivos (Figura 3), cuyos diámetros medios oscilan entre 50 nm y 1000 nm para aplicaciones de administración de fármacos coloidales (zur Muhelen *et al.*, 1998). Las SLN ofrecen propiedades únicas tales como: tamaño pequeño, gran área superficial relativa y alta carga de fármaco, que son atractivas por su potencial para mejorar el rendimiento de productos farmacéuticos, nutracéuticos y otros materiales (Cavalli *et al.*, 1993). Los lípidos sólidos utilizados en las formulaciones de las SLN incluyen ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido decanoico y ácido behénico), triglicéridos (por ejemplo,

trilaurina, trimiristina y tripalmitina), esteroides (por ejemplo, colesterol), glicéridos parciales (por ejemplo, monoestearato de glicerilo y behenato de glicerilo) ceras (por ejemplo, palmitato de cetilo). Varios tipos de tensoactivos se usan comúnmente como emulsionantes para estabilizar la dispersión de los lípidos, que incluyen lecitina de soya, fosfatidilcolina, poloxámero 188, colato de sodio y glicocolato de sodio (Zhang *et al.*, 2010).

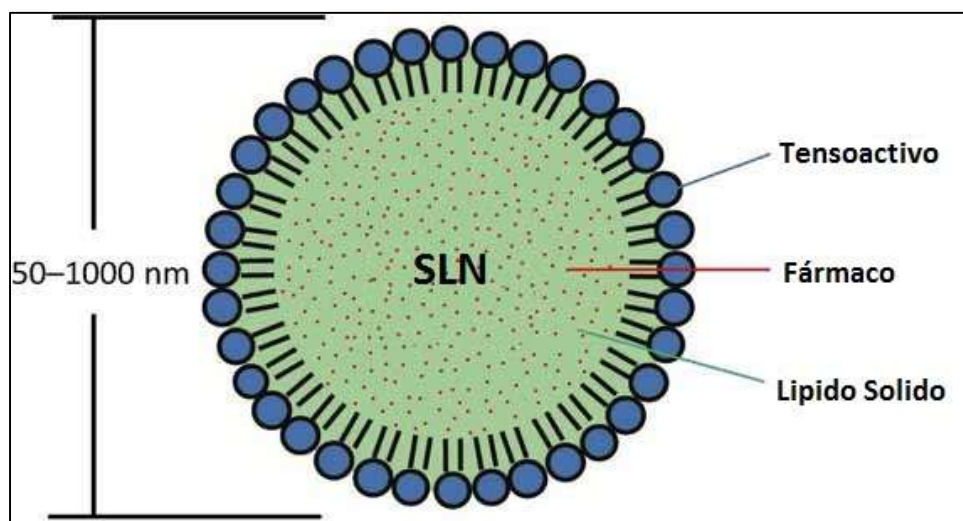


Figura 3. Ilustración de una nanopartícula lipídica sólida y sus componentes fármaco, lípido sólido y tensoactivo (Shyh-Dar Li, 2000).

### 2.2.1 Ventajas de las SLN

Las ventajas de estas SLN son el uso de lípidos fisiológicos que evitan el uso de disolventes orgánicos en el proceso de preparación y tienen un amplio espectro de aplicaciones potenciales (dérmicas, orales, intravenosas). Otras ventajas como, la biodisponibilidad es mejorada, la protección de las moléculas de fármacos sensibles al medio ambiente (agua, luz), la liberación controlada y/o específica del fármaco (Mehnert y Mader, 2001; Müller y otros, 2002; Mulleret *et al.*, 2000), la estabilidad mejorada, la posibilidad de llevar fármacos tanto lipofílicos como hidrófilos y la mayoría de los lípidos son biodegradables (Muérler y



Runge, 1998; Jennings *et al.*, 2000) atraen la atención de los investigadores en estos sistemas.

Las SLN poseen una mejor estabilidad y facilidad de producirse a escala de producción mayor en comparación con los liposomas. Esta propiedad puede ser muy importante para muchos casos y necesidades. También forman la base de los sistemas de administración de fármacos coloidales, que son biodegradables y pueden almacenarse durante al menos un año. Algunas de las desventajas de las SLN convencionales son la baja carga útil del fármaco, la fuga del fármaco al enfriar o durante la cristalización y el cambio polimórfico de la matriz lipídica que provoca cambios en la cinética de liberación del fármaco a partir de la matriz lipídica (Kumar y Randhawa, 2013).

Se ha afirmado que las SLN combinan las ventajas y evitan las desventajas de otros soportes coloidales (R.H. Muller y S.A. Runge., 1998). Se puede decir entonces de manera general que el objetivo y mayores ventajas de estos sistemas son:

1. Posibilidad de liberación controlada de fármacos.
2. Aumento de la estabilidad del medicamento.
3. Alta posibilidad de carga de fármacos.
4. Factibilidad de incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos.
5. Ausencia de biotoxicidad del portador.
6. Evitan usar solventes orgánicos.
7. No tienen problemas con respecto a la producción a gran escala y la esterilización.

### 2.2.2 Métodos para preparar SLN

Los métodos y técnicas para preparar SLN más usuales son: la homogeneización de alta presión (HPH), microemulsión de aceite en agua (o / w) por ruptura, emulsificación-difusión solvente, inyección de solvente, agua en aceite en agua (w / o / w) método de doble

emulsión, ultra-sonicación, técnica de fluidos supercríticos y electro-espray. Todas estas técnicas presentan sus propias ventajas y desventajas, y se debe considerar que en el área de la Tecnología Farmacéutica se busca en la mayoría de los casos escalar los procesos con el menor costo y lo más fácilmente posible; es conveniente entonces echar mano de técnicas que sean relativamente fáciles de escalar y que puedan ser también reproducibles. Un método que cumple las características mencionadas anteriormente es el método de homogeneización en caliente, descrito enseguida.

#### 2.2.2.1 Homogeneización en caliente.

Se pueden destacar algunas ventajas de este método:

1. Fácil de montar (algunos minutos).
2. No requiere equipo sofisticado o muy caro (únicamente el equipo de homogeneización).
3. Se pueden desarrollar formulaciones con volúmenes de trabajo de hasta 1 mL.
4. Las condiciones de trabajo se pueden controlar (por ejemplo la temperatura).

El método de homogeneización en caliente se lleva a cabo a temperaturas superiores al punto de fusión del lípido a utilizar (de 5 a 10 °C por encima de su punto de fusión) y, por lo tanto, se puede considerar como la homogeneización de una emulsión. Se obtiene una pre-emulsión de la masa fundida del lípido cargada con el fármaco y la fase emulsionante acuosa (el tensoactivo a la misma temperatura) mediante un dispositivo de mezcla de alta cizalla (Ultra-Turrax por ejemplo) (Vobalaboina y Kopparam, 2004).



Figura 4. Equipo de Homogeneización Ultra-Turrax T18.

### 2.2.3 Materiales utilizados en las SLN

El desarrollo del proceso de elaboración de las nanopartículas lipídicas comienza con la selección de un lípido que forme una matriz apropiada, con una temperatura de fusión que no afecte la estabilidad del principio activo y que lo disuelva en proporción adecuada, propiedad que va a determinar su perfil de liberación posteriormente. Las SLN contienen lípidos que permanecen sólidos a temperatura ambiente y temperatura corporal, los lípidos pueden ser: triglicéridos puros (triestearina, tripalmitina, trimiristina, tricaprina, trilaurina), alcoholes de cadena larga (alcohol cetílico), ceras (cera de abejas, palmitato de cetilo), calixarenos y esteroides (colesterol).

Los tensoactivos usados generalmente son poloxámero 188, poloxámero 182, poloxámero 407, sales biliares, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), lecitina de soya, fosfatidilcolina, polietilenglicoles, poli (alcoholes vinílicos), Tween 80, Tween 60, brij 30, brij 98, brij 76, entre otros. Algunas veces las combinaciones de surfactantes también se usan para estabilizar el sistema. Como ya se mencionó los solventes orgánicos no son esenciales para ser utilizados en la formulación de las SLN, los excipientes utilizados para preparar

las SLN son seguros y generalmente están reconocidos como seguros y aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Kumar y Randhawa, 2013).

La naturaleza química y nombre comercial de las materias primas más utilizadas en la elaboración de las SLN son mostradas en la Tabla 1y 2 (Garzón *et al.*, 2009).

Tabla 1. Lípidos más utilizados en la preparación de SLN.

NOMBRE COMERCIAL / FABRICANTE		COMPOSICIÓN QUIMICA	PUNTO DE FUSIÓN (°C)
Compritrol 888 ATO / Gattefossé		Mono, di y triglicéridos del ácido behénico	70 °C
Dynasan 112 Dynasan 114 Dynasan 116 Dynasan 118	Sasol	Trilaurato de glicerol, Trimiristina Tripalmitato de glicerilo Triestearina	45 °C 55-58 °C 61-65°C 70-74°C
Gelucire 44/14 / Gatefossé		Mono, di y triglicéridos del ácido behémico	74-78 °C
Imwitor 900 / Sasol		Monoestearato de glicerilo (40-50%)	61 °C
Lipoid S100 Lipoid GMBH	Gattefossé	Lípido solido a base de lecitina de soya	---
Miglyol 812 / Eingeman de Veronelli		Trigliceridos Caprico-Caprilicos	---
Precirol ATO5 / Gattefossé		Palmitato-estearato de glicerol (22% mono-,40-60% di- y 25-35% triglicéridos de ácidos grasos C16-C18)	52-55 °C
Precifac ATO / Fluka, Henkel		Palmitato de cetilo	43-53 °C
Softisan 100,142,154 / Condea		Triacilgliceroles sólidos	55-60 °C
Witepsol W35,H35, H42, E85 / Sasol		Glicérido hidrogenado de coco	33-35 °C 33-35 °C 41-43 °C 42-44 °C

Tabla 2. Tensoactivos más utilizados en la preparación de SLN.

NOMBRE COMERCIAL / FABRICANTE		COMPOSICIÓN QUIMICA	CMC (mM)
Cremofor EL / BASF		Aceite de ricino	---
Epikuron 200 / Lucas Meyer, Sigma		Lecitina de soya con 95% de fosfatidilcolina	---
Lutrol F68 (Poloxamero188, Pluronic F68)	BASF	Copolímero de unidades de polioxietileno (POE) y polioxipropileno (POP)	0.49 mM
Miranol Ultra C32 / Rhodia		Cocoamfoacetato de sodio, tensoactivo anfotérico	---
Oramix CG110 / SEPPIC Latinoamérica		Glucósido de caprilo y caprilo (tensoactivo)	---
Pemulen TR-1 / Novcon		Emulsificante polimérico. Polímero cruzado de alquil acrilatos	---
Phospholipon 90G / Nattermann		Lecitina de soya con más de 90% de fosfatidilcolina (P90G)	---
Taurocolato de Sodio / Sigma Aldrich		Taurocolato de sodio	---
TegoCare 450 / Goldschmidt		Diestearato de poliglicerol metilglucosa	---
Tyloxapol / Rhodia		Tensoactivo no-iónico	---

#### 2.2.4 Usos y aplicaciones

Las SLN pueden ser utilizadas en un amplio espectro de posibilidades, éstas se usan como se ha mencionado anteriormente más comúnmente para incorporar fármacos lipófilos que no son fáciles de administrar mediante formas de dosificación usadas comúnmente. Las SLN también se han utilizado en la administración de péptidos como calcitonina, ciclosporina A (R.H. Muller *et al.*, 2006), insulina (B. Sarmento *et al.*, 2007), hormona

liberadora de hormona luteinizante (F.Q. Hu Y *et al.*, 2004), somatostatina (H. Reithmeier *et al.*, 2001) y proteínas como la BSA, lisozima (A.J. Almeida *et al.*, 1997) (Tabla 3).

Los polímeros biodegradables, los liposomas, las nanoemulsiones, los nanocristales y las nanopartículas lipídicas sólidas son sistemas de administración de fármacos basados en “nanovehículos” que tienen la tendencia a cumplir los requisitos ideales para el sistema de administración del fármaco. Las moléculas de fármaco cargadas en diferentes nanopartículas que actúan como vehículos para la administración de fármacos se muestran en la Tabla 4 (Kumar y Randhawa, 2013); entre ellas es interesante ver que las nanopartículas lipídicas como los otros sistemas o nanovehículos aparte de ser buenos vehículos para diversos fármacos también son biodegradables en su mayoría.

Tabla 3. Aplicaciones biomédicas de Nanopartículas Lipídicas Solidas

COMPOSICIÓN DE LAS SLN	FÁRMACO	APLICACIÓN	REFERENCIAS
Acido esteárico	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<a href="#">Pandey and Khuller (2005)</a>
Acido esteárico, Soya, Fosfatidilcolina y Taurocolato de Sodio	Clorhidrato de Ciprofloxacino, Tobramicina	Bacteria gram-negativa, bacteria gram-positiva	<a href="#">Jain and Banerjee (2008)</a>
Tripalmitato de glicerol y Tiloxapol	Clotrimazol	Hongos (levaduras, aspergilli, dermatofitos)	<a href="#">Souto et al., (2004)</a>
Behenato de glicerilo y Desoxicolato de sodio	Ketoconazol	Hongos	<a href="#">Souto and Muller (2005)</a>
Behenato de glicerilo, Propilenglicol, tween 80 y monoestearato de glicerilo	Nitrato de Miconazol	Hongos	<a href="#">Bhalekar et al., (2009)</a>
Palmitoestearato de glicerol	Nitrato de econazol	Hongos	<a href="#">Sanna et al., (2007)</a>
Cetil palmitato	Insulina	Hipoglucemiante. Diabetes tipo 1	<a href="#">Sarmiento et al., 2007</a>
Lecitina, Taurocolato de sodio,	Nimesulida	Inflamatorio	<a href="#">Jain et al., (2009)</a>
Ácido oleico	Ibuprofeno	Inflamación	<a href="#">Panga et al., 2009</a>
PLA, PLGA (poli-caprolactona) PCL poli (orto-esteres)	Antígenos virales y bacterias	Inmunidad	<a href="#">Tamber et al., (2005)</a> , <a href="#">Storni et al., (2005)</a> and <a href="#">Yuki and Kiyono (2003)</a>

Continuación.

COMPOSICIÓN DE LAS SLN	FÁRMACO	APLICACIÓN	REFERENCIAS
Acido esteárico, soya, fosfatidilcolina y taurocolato de sodio	Tobramicina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<a href="#">Cavalli et al., 2002</a>
Aceite de soya	Doxorrubicina	Cáncer de mama	<a href="#">Wong et al., (2006)</a>
Ácido hialurónico	Oxaliplatina	Cáncer colorectal	<a href="#">Jain et al., 2009</a>
Butirato de colesterol	Doxorrubicina, paclitaxel	Cáncer colorectal	<a href="#">Serpe et al., (2004)</a>



Tabla 4. Nanoacarreadores propuestos para la administración de fármacos

VEHÍCULO	DEGRADABLE	FÁRMACO	REFERENCIAS
Liposomas	Biodegradable	Doxorubicina, Daunorubicina, Anfotericina B, Econazole, Progesterona, Betametasona dipropionato, Dexametasona, 5-fluorocitosina, Tetracaine, Triancinolona acetona, Ciclosporina-A	<a href="#">Chaszczewska et al., 2008</a>
Nanopartículas lipídicas sólidas	Biodegradable	Azidotimidina palmitato, Camptotecina, Acyclovir, Piribedil, Vitamina A, Prednisolona, Tetracaina, Etomidato, Ciclosporina, Diazepam, Doxorubicina, Paclitaxel, Vitamina E, Resveratrol, Idebenona, Ergocalciferol, Ketoconazol, Ubiquinona	<a href="#">Heiati et al., 1998</a>
Nanopartículas poliméricas	Biodegradable o no biodegradable	Doxorubicina, Risperidona, Paclitaxel, Olanzapina, Estradiol, Claritromicina, Insulina, Estreptomina, Clofazimina, Celecoxib, Docetaxel, Budesonida, Tamoxifeno, Ketoprofeno,	<a href="#">Betancourt et al., 2007</a>
Nanotubos de carbono	No biodegradable	Paclitaxel, Doxorubicina, Cisplatino, Metotrexato, Dexametasona, Dapsona, Teofilina, Anfotericina B, Vitamina E, 10-hidroxicamptotecina (HCPT), Hexametilmelamina, $\beta$ caroteno,	<a href="#">Liu et al., 2008</a>
Algunos polímeros	Biodegradable o no biodegradable	Pravastatina, Calceína, Bleomicina, Paclitaxel, Doxorubicina	<a href="#">Broz et al., 2008</a>
Niosomas	Biodegradable	Insulina, Paclitaxel, Cafeína, Acetazolamida, Nistatina, Ganciclovir, Capsaicina, Minoxidil, Hidroxycamptotecina, Naltrexona, Flurbiprofeno, Tenofovir, Tretinoína, Diclofenaco	<a href="#">Pardakhty et al., 2007</a>
Nanopartículas de sílica	No biodegradable	Insulina, Camptotecina, Paclitaxel,	<a href="#">Zhao et al., 2009</a>

Para la administración oral de fármacos psicotrópicos como algunos mostrados en la Tabla 4, las SLN han mostrado un potencial significativo, y por lo tanto, han sido el enfoque de la nanomedicina más comúnmente explorado hasta la fecha. En este contexto Venkateswarlu y Manjunath desarrollaron nanopartículas lipídicas sólidas para aumentar la biodisponibilidad oral asociada con altos efectos del metabolismo de primer paso para el fármaco antipsicótico Clozapina (Venkateswarlu y Manjunath., 2005). Las SLN (que incluyen la carga encapsulada de fármaco) pueden absorberse a través de las vías de transporte linfático tras la administración oral, evitando así el metabolismo hepático presistémico y aumentando la biodisponibilidad oral de algunos fármacos.

#### 2.2.4.1 SLN utilizados para transportar fármacos al sistema nervioso central.

La barrera hematoencefálica (Figura 5), actúa como una barrera física, que regula el paso de moléculas a través del torrente sanguíneo al cerebro, y restringiendo así los tipos de fármacos que pueden alcanzar el cerebro tras la administración sistémica: más del 98% de las potenciales nuevas moléculas terapéuticas son incapaces de cruzar esta barrera (W.M. Pardridg., 2002). Algunos fármacos cruzan la barrera hematoencefálica hasta cierto punto, pero sufren una eliminación rápida desde el torrente sanguíneo, en este caso el transporte en SLN puede mejorar la biodisponibilidad del fármaco y además ayudar a cruzar la barrera hematoencefálica. Algunos ejemplos de esto se muestran a continuación:

1. SLN utilizados para mejorar la biodisponibilidad de fármacos que atraviesan la barrera hematoencefálica:

Manjunath y Venkateswarlu, demostraron que es posible mejorar la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica de los fármacos lipófilicos mediante la incorporación adecuada de ellos en las SLN. Utilizaron la Clozapina, un antipsicótico

eficaz de tipo lipofílico con una pobre biodisponibilidad y mejoraron su biodisponibilidad del fármaco (Manjunath y Venkateswarlu, 2005).

2. SLN utilizados para liberar fármacos al cerebro a través de la administración intranasal:

Mohd y Udai, utilizaron la vía intranasal para evitar la barrera hematoencefálica, ya que esto proporciona una nueva ruta, práctica, sencilla y como un método no invasivo que reduce la exposición sistémica y por lo tanto efectos adversos sistémicos. Utilizaron las SLN con Haloperidol para mejorar la captación de este fármaco por el cerebro utilizando la vía intranasal (Mohd y Udai, 2014).

Otros autores desarrollaron y optimizaron una formulación de SLN y Rivastagmina (un fármaco hidrófilico), usaron el método de Homogenización y Ultrasonido utilizando: Compritol 888, Tween 80 y poloxamero 188 (Brijesh Shah *et al.*, 2015).

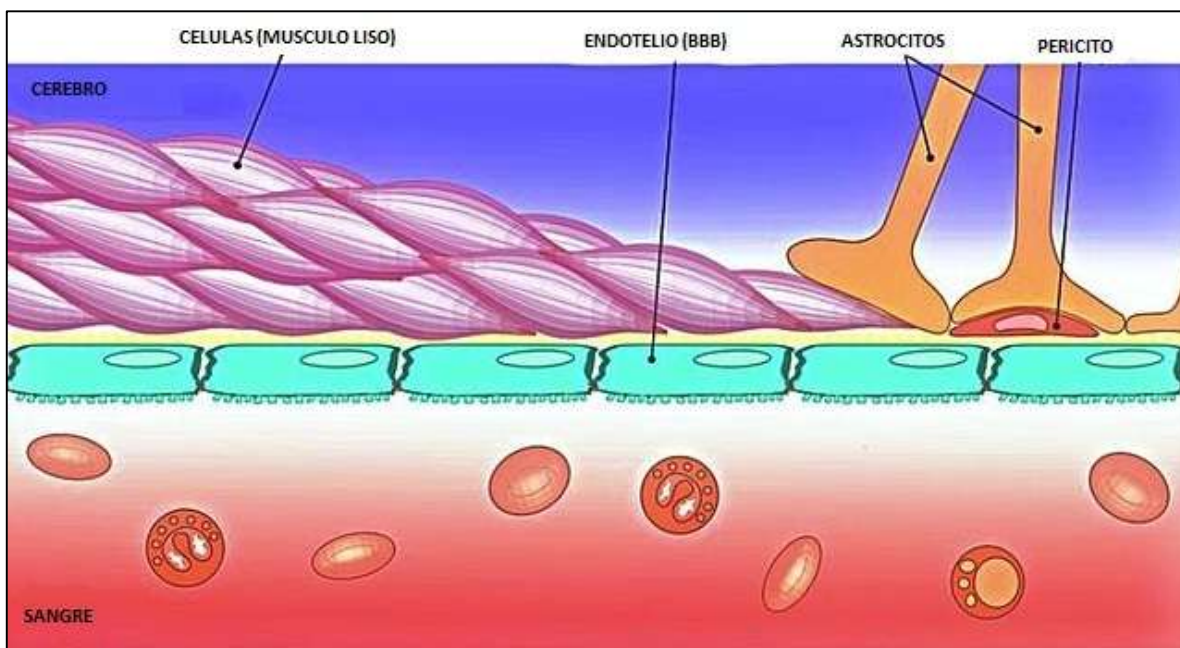


Figura 5. Barrera Hematoencefálica (BBB), el paso de moléculas al cerebro se da a través de la Barrera Hematoencefálica (Armin Kübelbeck, 2009).

La forma en que las nanopartículas lipídicas sólidas pasan a través de la BBB se explica a continuación con más a detalle.

### 2.3 La ruta intranasal

La administración intranasal es ampliamente utilizada como la opción lógica para el tratamiento tópico de enfermedades locales en la nariz y en los senos paranasales, incluyendo la rinitis alérgica o infecciosa, la poliposis nasal y la sinusitis. Sin embargo, dada la alta vascularización de la mucosa nasal, su área de absorción bastante amplia, membrana basal endotelial porosa y delgada del epitelio nasal, la administración intranasal también se ha convertido en un portal para la administración sistémica de fármacos (Grassin-Delyle *et al.*, 2012; Jadhay *et al.*, 2007). De hecho, hoy en día se considera como una ruta potencial para la administración sistémica de fármacos pequeños que se administran por las rutas convencionales o que experimentan un amplio metabolismo de primer paso después de la administración oral (Bitter *et al.*, 2011; Illum, 2012).

El interés en la administración intranasal de moléculas más grandes que no se absorben por vía oral, como fármacos peptídicos y vacunas, se está convirtiendo en una realidad notable a pesar de que la absorción nasal de estos compuestos disminuye a medida que su peso molecular aumenta (Ozsoy *et al.*, 2009). La ruta nasal es menos adecuada para los medicamentos crónicos que se deben administrar diariamente, así como para los medicamentos que requieren niveles sostenidos en sangre, a menos que sean formas de dosificación de liberación sostenida.

Las formulaciones de fármacos para vía intranasal se han desarrollado para una amplia gama de indicaciones, que incluyen terapia de reemplazo hormonal, osteoporosis, migraña, cáncer de próstata e incluso la vacuna contra la influenza (Tabla 5) (Pires *et al.*, 2009).

Tabla 5. Fármacos administrados vía intranasal para liberación sistémica (Pires *et al.*, 2009).

FÁRMACO	MARCA	DOSIS	INDICACIONES
Buserelina	Suprefact nasal®	1, 6.3 y 9.45 mg	Cáncer de próstata
Nafarelina	Synarel®	2 mg	Endometriosis
Desmopresina	Minirin®	1 y 2 mg	Prevención y control de polidipsia, poliurea y deshidratación en pacientes con diabetes insípida
Calcitonina	Miacalcin®	100, 200 [iU]/.09mL	Osteoporosis post-menopáusica
Dihidroergotamina	Diergo-spray®	1 y 4 mg	Migraña y dolor de cabeza
Sumatriptan	Imigran®	De 4 a 100 mg	Migraña y dolor de cabeza
Butorfanol	Stadol NS®	1, 2 y 10 mg	Manejo del dolor, como dolor de migraña
Fentanilo	Instanyl, PecFent®	100 a 800 µg	Dolor en pacientes con cáncer
Estradiol	Aerodiol®	0.05 a 5 mg	Terapia de reemplazo para dejar de fumar
Nicotina	Nicotrol NS®	De 2 a 25 mg	Dejar de fumar
Oxitocina	Syntocinon®	De 5 a 10 UI	Inducción del parto y estimulación de la lactancia
Cianocobalamina	Nascobal®	100 µg	Deficiencia de vitamina B12
Vacuna de influenza	FluMist®	0.25 a 0.5 mL	Prevención de la gripe estacional o H1N1

### 2.3.1 Ventajas y limitaciones de la ruta intranasal

Las principales ventajas (Tabla 6) de la administración intranasal son la facilidad de administración, un inicio de acción rápido y que evita los efectos del primer paso gastrointestinal y hepático; en consecuencia, la nariz constituye una ruta muy valiosa para la administración de principios activos con baja biodisponibilidad oral. Las limitaciones de la administración de intranasal (Tabla 6) están relacionadas con la necesidad de cruzar la mucosa nasal, cuyas propiedades fisiológicas (incluidas algunas alteraciones relacionadas con la enfermedad) influyen en la absorción del fármaco (Grassin-Delyle *et al.*, 2012).

Varias revisiones generales sobre la liberación de fármacos intranasales han sido publicadas (Behl *et al.*, 1998; Illum, 2003; Graff & Pollack, 2005; Costantino *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2009) pero ninguna ha cubierto todos los parámetros fisicoquímicos, farmacéuticos y fisiopatológicos determinantes en la absorción de los fármacos a través de esta ruta, sus consecuencias farmacocinéticas en el ser humano y los métodos que pueden usarse para modular la exposición sistémica.

Tabla 6. Ventajas y limitaciones de la administración intranasal de fármacos para la administración sistémica (Grassin-Delyle *et al.*, 2012).

VENTAJAS	LIMITACIONES
Alta absorción de fármacos lipófilos con peso molecular menor a 1 kDa	Baja permeabilidad de fármacos hidrófilos con peso molecular mayor a 1 kDa (péptidos, proteínas...)
Evita el efecto del primer paso gastrointestinal y hepático	Tiempo de absorción limitado por el aclaramiento mucociliar
Perfil plasmático similar a la vía intravenosa: Inicio rápido de acción	Baja superficie de absorción en comparación con la mucosa intestinal
Facilidad de administración, no invasiva	Actividad enzimática de la mucosa nasal, especialmente con enzimas que degradan proteínas y péptidos

Facilidad de uso en pacientes con náuseas y vómitos	Variabilidad en la absorción en caso de alteraciones crónicas de la mucosa nasal o con administración simultánea de fármacos vasoconstrictores
Dispositivos para la administración del medicamento de bajo costo	Intolerancia local a la mucosa nasal

La absorción sistémica rápida y directa de los compuestos que evitan el metabolismo del primer paso gastrointestinal y hepático, lo que permite una reducción de la dosis administrada, al obtener niveles terapéuticos en sangre rápidamente, un inicio más rápido de la acción farmacológica, y menos efectos secundarios que otras rutas de administración. Todo ello subyace al amplio enfoque de explotar la cavidad nasal para la administración sistémica de fármacos. Sin embargo, el éxito de la administración sistémica de fármacos en la cavidad nasal está limitado principalmente por el aclaramiento mucociliar que rápidamente elimina el medicamento del sitio de absorción, reduciendo considerablemente el tiempo disponible para su transporte directo al flujo sanguíneo sistémico.

El pobre contacto de formulaciones de fármacos con la mucosa nasal y particularmente su baja absorción cuando se administran como soluciones acuosas simples tienen implicaciones en el desarrollo de estrategias alternativas para mejorar el biodisponibilidad nasal (Jadhav *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Mecanismos involucrados en la administración intranasal

Los cuatro pasos farmacocinéticos que influyen en el destino de los fármacos en el cuerpo son la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación. Las características específicas y valiosas de la administración intranasal están relacionadas principalmente con la etapa de absorción del fármaco y dependen de factores anatómicos, fisiológicos y relacionados con el compuesto.

### 2.3.2.1 Factores anatómicos y fisiológicos

Cada fosa nasal se divide en tres segmentos: el vestíbulo, la aurícula y el cornete (o también llamado turbina, que a su vez se divide en superior, medio e inferior) (Figura 6). La zona respiratoria (alrededor del cornete o turbina inferior) es el sitio principal para la entrada sistémica de fármacos debido a su gran área superficial (120 a 150 cm<sup>2</sup>) y su corion altamente vascularizado y permeable. Este último contiene muchas glándulas responsables de secretar la mayor parte del moco nasal. El epitelio que cubre la fosa nasal está constituido principalmente por células basales, células ciliadas y células caliciformes secretoras de mucus. Las células epiteliales se mantienen juntas por uniones intercelulares estrechas. Los cilios que golpean transportan el moco hacia la unión orofaríngea, donde se traga.

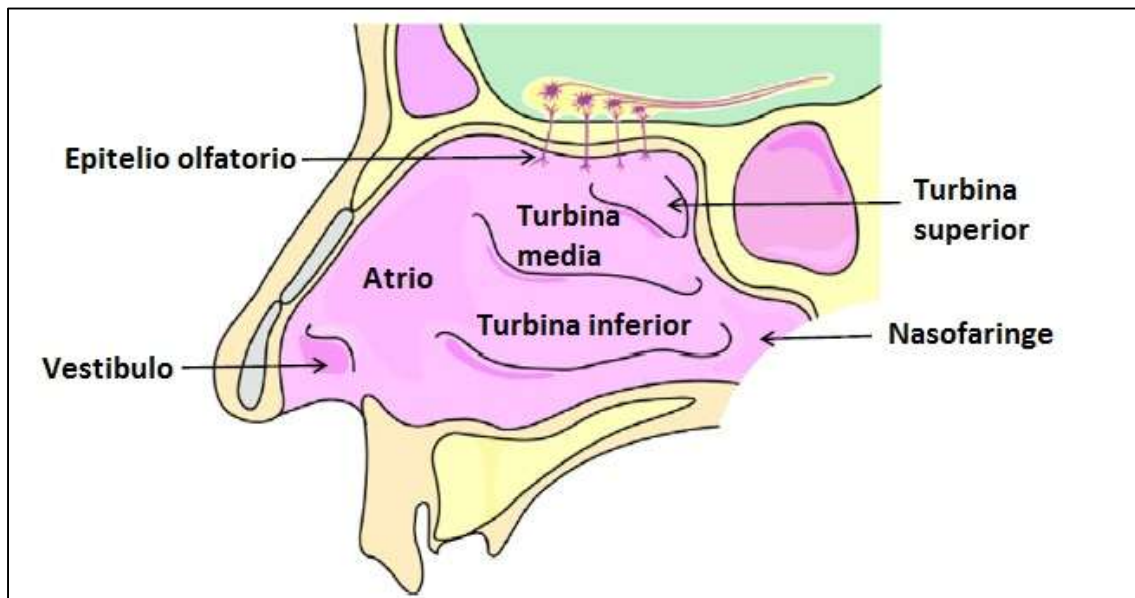


Figura 6. Representación de las diferentes áreas de la cavidad nasal (Morrison & Costanzo, 1990).

El epitelio olfatorio (Figura 6) tiene una pequeña área superficial (1 a 5 cm<sup>2</sup>, que representa sólo del 3 al 5% de la superficie total de la cavidad nasal (Morrison & Costanzo, 1990) y no



está significativamente involucrado en la absorción sistémica. Sin embargo, puede permitir el acceso directo al sistema nervioso central (SNC) evitando la barrera hematoencefálica (Illum, 2004). Aunque los mecanismos y las propiedades fisicoquímicas que gobiernan la deposición de los fármacos en la zona olfativa son los mismos que en la zona respiratoria, la primera tiene una superficie más baja en los seres humanos que en el animal; por lo tanto, los estudios en modelos animales son menos relevantes (Illum, 1996, 2004).

Algunos estudios clínicos y farmacodinámicos sugieren que los fármacos del SNC se pueden absorber directamente a través de esta zona (Born *et al.*, 2002; Illum, 2003). Sin embargo, los resultados de un reciente estudio mostraron que los aerosoles alcanzaron el epitelio olfativo en sólo 1 de cada 15 pacientes (Scheibe *et al.*, 2008). La obstrucción parcial de la fosa nasal por los cornetes impide la deposición de fármacos sobre el epitelio olfatorio y la nasofaringe. Una revisión general sobre los esteroides concluyó que la mayor parte de la pulverización se deposita en el segmento anterior de la cavidad nasal (el piso nasal y la zona preturbinada) y el segmento medio (la zona del cornete) (Benninger *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.2 Características fisicoquímicas del moco y zona nasal

El moco es una sustancia inmunológicamente activa compuesta de agua en un 95%, proteínas y péptidos en 2 a 3%, sales 1%, y partículas diversas 1%. Con un pH entre 5.5 y 6.5. Este fluido contiene concentraciones variables de exudados del plasma, secreciones de las células caliciformes y submucosas, lágrimas y secreciones glandulares lagrimales, así como secreciones serosas de las glándulas olfatorias de Bowman. Se produce de 600 a 1800 µl, de moco nasosinusal en 24 horas (Morrison & Costanzo, 1990).

##### 2.3.2.2.1 Aclaramiento mucociliar

El aclaramiento mucociliar limita el tiempo de contacto fármaco-mucosa asegurando un drenaje efectivo y, por lo tanto, puede constituir un factor limitante en la absorción de los

principios activos. Por lo tanto, las partículas inhaladas que se depositan en los conductos se eliminan por este mecanismo en 15 a 30 minutos (Marttin *et al.*, 1998; Illum, 2003). Más exactamente, es posible distinguir una fase inicial, de 15 a 20 minutos (durante el cual aproximadamente el 50% de la dosis administrada se elimina de la mucosa respiratoria) y una segunda, fase más lenta que permite la eliminación de moléculas de fármaco depositado sobre el epitelio no ciliado del vestíbulo y en el segmento anterior de la cavidad nasal (Marttin *et al.*, 1998). Se pueden observar variaciones importantes, ya que más del 55% de la dosis total todavía puede estar presente en el sitio de aplicación inicial 30 minutos después de la administración (Newman *et al.*, 1987).

Las características del fármaco y sus componentes juegan un papel importante al tratar de disminuir el efecto del aclaramiento mucociliar, por ejemplo, la presencia de un principio activo en el tejido nasal 24 horas después de la administración de una dosis única ya se ha documentado con un corticosteroide en solución acuosa, quizás debido a la lenta disolución de este compuesto y a la alta unión del tejido (Bonsmann *et al.*, 2001).

#### 2.3.2.3 Propiedades fisicoquímicas de los fármacos.

Las tres principales propiedades fisicoquímicas implicados en el paso epitelial de los principios activos son: el peso molecular (PM), la hidrofiliidad / lipofilia y el grado de ionización, que afectan las rutas y los mecanismos del paso transepitelial. La tasa de solubilización también está implicada, pero también depende (al menos en parte) de las propiedades fisicoquímicas mencionadas anteriormente. Esquemáticamente, las moléculas lipofílicas toman la ruta transcelular, mientras que las moléculas hidrófilas pueden tomar las rutas transcelular o paracelular (dependiendo de su peso molecular) (Figura 7).

El alto PM es el factor limitante para el paso paracelular a través de las uniones estrechas. Para fármacos con un PM por debajo de 300 Da, la absorción nasal es rápida y apenas

influenciada por las otras propiedades fisicoquímicas, mientras que las moléculas con un PM por encima de 1 kDa absorben muy lentamente (con una biodisponibilidad de entre 0,5% y 5%) (McMartin *et al.*, 1987; Arora *et al.*, 2002; Illum, 2003; Costantino *et al.*, 2007).

Para las moléculas con un PM de entre 300 Da y 1 kDa (que es el caso para la gran mayoría de principios activos), la liposolubilidad es una propiedad importante para la resorción (Arora *et al.*, 2002; Labiris & Dolovich, 2003; Costantino *et al.*, 2007) porque influye en la difusión pasiva a través del epitelio. Las moléculas lipofílicas pueden difundirse libremente, mientras que las moléculas hidrófilas tienen que usar la ruta paracelular para cruzar el epitelio. Por lo tanto, existe una relación fuerte y positiva entre la lipofilidad y la tasa de transporte transepitelial en modelos *in vitro* basados en células epiteliales humanas o porcinas cultivadas (Lin *et al.*, 2005).

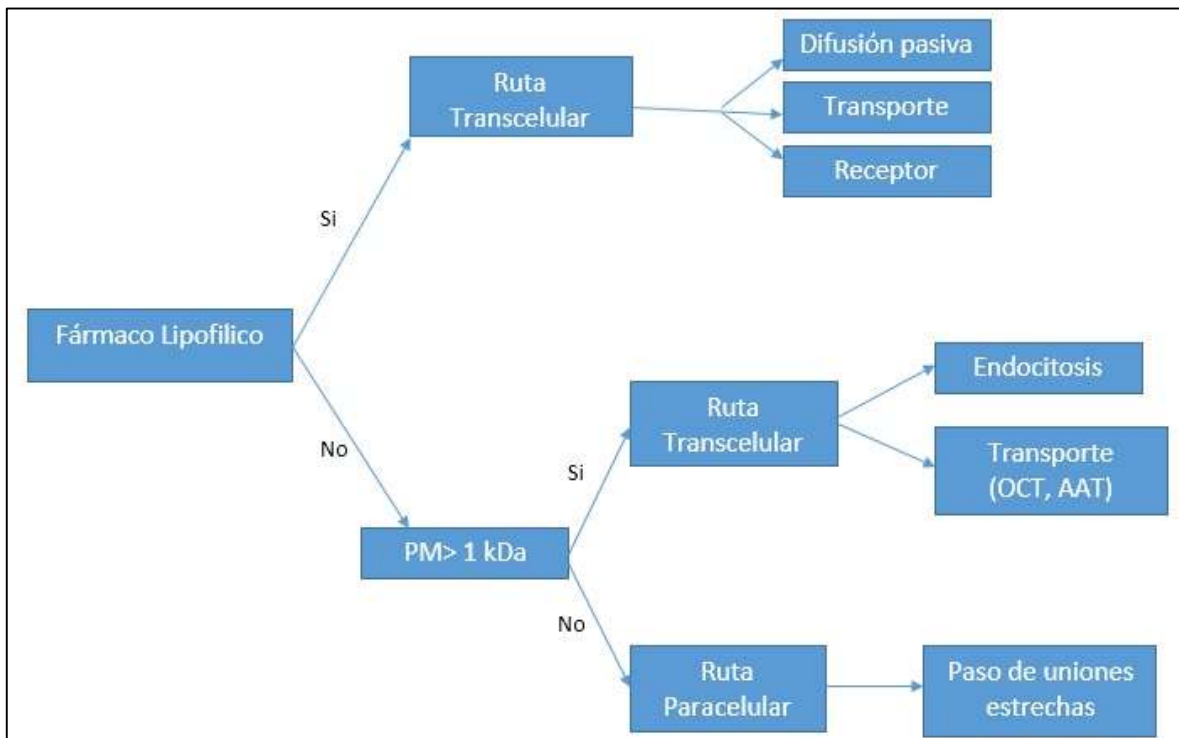
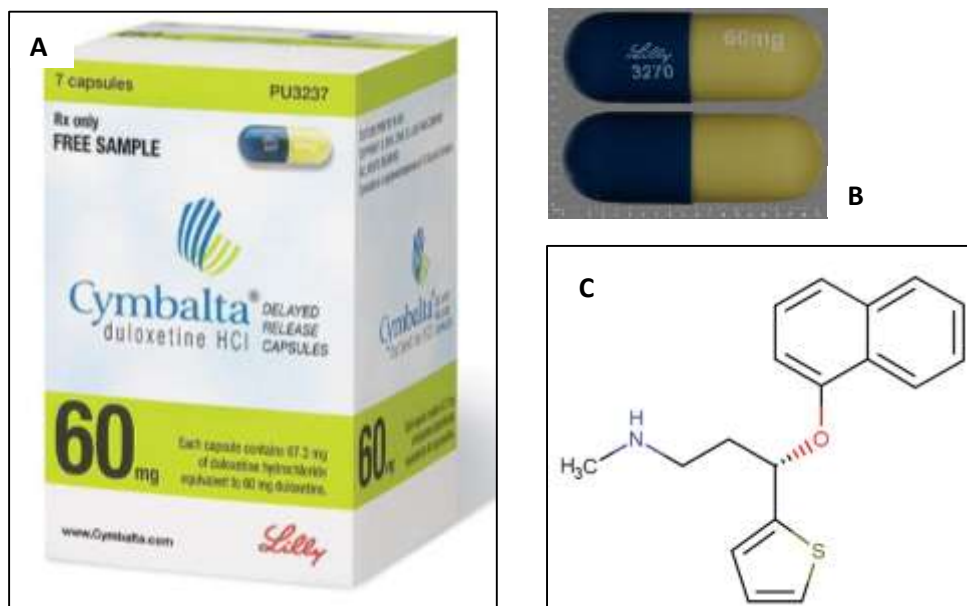


Figura 7. Mecanismos implicados en el cruce del epitelio respiratorio por xenobióticos, en función de sus propiedades fisicoquímicas. OCT = transportadores de cationes orgánicos, AAT = transportadores de aminoácidos.

## 2.4 Generalidades de Duloxetina HCl

Los medicamentos con duloxetina se comercializan en varios nombres y marcas. Algunos ejemplos son Cymbalta y Yentreve en América principalmente y en algunas partes de Europa conocidos como, Xeristar o Ariclaim. Son medicamentos que principalmente están indicados en los siguientes blancos terapéuticos: trastorno depresivo mayor (TDM), trastorno de ansiedad generalizada (TAG), dolor relacionado con la neuropatía periférica diabética y en algunos países el estrés por incontinencia urinario (SUI). Son fabricados y comercializados por Eli Lilly and Company. Fue aprobado para su comercialización en agosto de 2004, por esta farmacéutica, a través de la marca Cymbalta® (Figura 8A).



La presentación de la duloxetina es en cápsulas orales de liberación retardada (que liberan el medicamento en el intestino para evitar que los ácidos del estómago degraden el medicamento). Cuando se usa duloxetina para tratar la depresión, está indicada la toma una o dos veces al día, con o sin alimentos. Cuando la duloxetina se usa para tratar

trastornos de ansiedad generalizados, el dolor causado por la neuropatía diabética o fibromialgia, se recomienda la toma una vez al día con o sin alimentos.

Este fármaco pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como naftalenos, que consisten en dos anillos de benceno fusionados (Figura 8C).

#### 2.4.1 Retos farmacéuticos de duloxetina HCl

La duloxetina (DLX), es un SNRI selectivo (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina-norepinefrina) es el primero de la clase de antidepresivos que asegura una eficacia rápida y sostenida en el tratamiento de los síntomas emocionales y físicos de la depresión (Detke *et al.*, 2002). DLX promete el tratamiento de los síntomas físicos que acompañan al trastorno depresivo mayor (TDM), como dolores, y trastornos gastrointestinales. En la administración oral DLX se somete al metabolismo hepático de primer paso y tiene una biodisponibilidad sistémica del 50% (Lantz *et al.*, 2003). Además, el fármaco es ácido lábil a pH gástrico (Tabla 7), razón por la cual no se fabrica como una forma de liberación inmediata por vía oral.

La administración oral del medicamento causa efectos secundarios que incluyen náuseas, sequedad de boca, dolor de cabeza, mareos, hipotensión ortostática y fatiga. La eficacia de los antidepresivos depende de su presencia continua en el sitio de acción (cerebro) durante un período prolongado de tiempo (Kilts, 2003). En la administración oral e intravenosa, la barrera hematoencefálica (BBB) restringe el acceso de los medicamentos antidepresivos al cerebro (Misra *et al.*, 2003).

Tabla 7. Características físico-químicas de duloxetina HCl

CARACTERISTICA	VALOR
Peso molecular	297.415 g/mol
Formula química	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NOS
Nombre IUPAC	(+)-(S)-N-Metil-3-(naftalen-1-yloxy)-3-(tiofen-2-il)propan-1-amina
Solubilidad en agua	0.00296 mg/mL
log P	4.72
pKa	9.7 (básico fuerte)

En la tabla 7 se muestra que duloxetina tiene un log P de 4.72, de acuerdo a la literatura, el coeficiente de reparto o coeficiente de partición (P) es un parámetro fisicoquímico que permite determinar de modo cuantitativo, el grado de lipofilia (también denominada hidrofobicidad) de una molécula, permitiendo inferir cómo se comportará en el entorno de los fluidos biológicos del organismo y cómo será su paso mediante difusión pasiva a través de las membranas biológicas.

Por lo tanto, a un mayor valor de P o Log P, se puede afirmar que el fármaco presenta mayor afinidad por la fase orgánica (como las membranas biológicas) y por consiguiente su carácter lipofílico es mayor, como en el caso de duloxetina. Esto representa un problema para este fármaco, pero también ofrece una oportunidad para nuevas formas y vías de administración del mismo.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

---

- Debido a la baja y variable biodisponibilidad promedio reportada para la duloxetina HCl y el efecto de primer paso que ésta sufre al ser administrada en forma entérica, es necesario explorar otras formas de administración que ayuden a que su aprovechamiento sea mayor y que se garantice su entrega y liberación a nivel del sistema nervioso central (SNC). El desarrollo de SLN ofrece una opción innovadora al ser éstos transportadores de fármacos que evitan que sean degradadas fácilmente en el metabolismo humano y haciendo de éstas un sistema de liberación controlada que puede reducir la dosis de administración. Aunado a esto se propone la vía de administración intranasal, puesto que evita el metabolismo de primer paso, su efecto es más rápido (pues duloxetina HCl atraviesa la BBB sin dificultad por sus características fisicoquímicas), y la administración es fácil y no invasiva.

#### 4.- OBJETIVOS

---

Objetivo general:

- Desarrollar nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con duloxetina HCl, y evaluar su potencial para administrarse vía intranasal, mediante ensayos de liberación y permeabilidad *in vitro* y *ex vivo* respectivamente.

Objetivos específicos:

- Realizar estudios de pre-formulación (materias primas y fármaco).
- Elegir un método adecuado para la fabricación de las SLN.
- Establecer las condiciones de proceso (temperatura, velocidad de homogeneización en revoluciones por minuto (rpm), concentraciones de materia prima, etc.) óptimas para la fabricación de SLN a través de dos diseños experimentales  $2^2$  exploratorios.
- Realizar un diseño experimental final con base en los parámetros siguientes: tamaño de partícula deseado (entre 200 y 300 nm), PDI menor a 0.7, y mayor eficiencia de encapsulación.
- Producir las SLN con las condiciones de proceso óptimas (obtenidas de los diseños experimentales  $2^2$  exploratorios), a través de un diseño experimental final  $2^3 + 1$  punto central.
- Cuantificar el fármaco encapsulado en las SLN mediante espectroscopia UV-VIS.
- Caracterizar fisicoquímicamente las SLN.
- Realizar ensayos de liberación *in vitro* y elegir la mejor formulación, tomando en cuenta los parámetros mencionado anteriormente.
- Realizar pruebas *ex vivo* de la mejor formulación.



## 5.- HIPOTESIS

---

El uso de nanopartículas lipídicas sólidas como sistemas nanoacarreadores permitirá que el fármaco duloxetina sea liberado de manera controlada, lo cual se verá reflejado en los ensayos *in vitro* y *ex vivo* y de igual manera estas nanopartículas serán una forma innovadora para poder ser administradas por vía intranasal.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 6.1 Materiales

Materiales	Marca	Lote
Duloxetina HCl	ANTVOL	20160425
Monoestearato de glicerilo	---	---
Polisorbato 80 (Tween 80)	Sigma Aldrich	MBZ5126V
Poloxamero 188 (Pluronic F68)	Sigma Aldrich	073K0155
Cloruro de sodio	Meyer	J0616333
Cloruro de potasio	Merck	TA108636
Fosfato disódico	Meyer	M0216115
Fosfato dipotásico	Merck	906219
Hidróxido de Sodio	Sigma Aldrich	SJBM7637V
Ácido clorhídrico	J.T Baker	9535-02
Agua destilada tipo I y II (destilada y desionizada)	---	---

#### 6.1.1 Material para pruebas *in vitro* y *ex vivo*

Material	Marca o procedencia
Membrana sintética (bolsa de diálisis)	Sigma (43 mm (1.7 in), 12,000 Da)
Mucosa de cabra	Rastro municipal

## 6.2 Equipos e instrumentos.

Equipo e instrumentos	Marca	Modelo
Ultra-Turrax T18	IKA	T18 digital
Baño María	IKA	HB10D
Balanza Analítica	OHAUS	E12140
Potenciómetro	JENCO	pH6175
Espectrofotómetro UV/VIS	Agilent Technologies	Cary60
Zetasizer nano	Malvern	Nano-ZS90
Parrilla de agitación y calentamiento	IKA	C-MAG-H57
Parrilla de agitación y calentamiento	Biomega	H4000
Vortex	Science MED	MX-S
Termocirculador	Polyscience	SVC-AC1B
Agitador multipuntos	VARIOMAG	HP15
Liofilizadora	SP SCIENTIFIC	Virtis Benchtop Pro
Equipo de Termogravimetría acoplado a Calorimetría TA	Instruments	SDT Q600
Difractómetro de Rayos X de polvos	BRUKER	AXS
Espectrómetro FT-IR	Spectrum Two	PerkinElmer
Destilador de agua tipo I y II	ELGA PURELAB	R7BP
Vernier	General Ultratech	---

## 6.3 Estudios de Preformulación

### 6.3.1. Análisis de identidad de materia prima.

Previamente a ser utilizados, se realizaron pruebas de identificación del fármaco y del lípido (duloxetina HCl y monoestearato de glicerilo respectivamente), se realizaron análisis como: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X de polvos y

Espectroscopia infrarroja (IR). También se realizó un barrido del fármaco (mediante espectroscopia UV/VIS) para determinar su espectro de absorción y longitud de onda de máxima absorción, todos estos análisis fueron necesarios para realizar nuestras formulaciones y métodos analíticos mencionados a continuación.

#### 6.3.1.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Las muestras de 3 mg aproximadamente se cargaron en un crisol de aluminio y se sellaron herméticamente. Se utilizó un crisol de aluminio vacío como referencia. Las muestras se analizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °C / min en un intervalo de temperatura de 25 a 450 °C.

#### 6.3.1.2 Difracción de Rayos X de polvos.

Para las muestras de 3 mg aproximadamente, el análisis se realizó en modo continuo con un tamaño de paso de 0.016° en un intervalo angular ( $2\theta$ ) de 5 a 45°, las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente.

#### 6.3.1.3 Espectroscopia infrarroja.

Se utilizó para observar la estructura de los materiales utilizados y también para identificar cualquier cambio significativo en los espectros obtenidos de las SLN, después de la encapsulación del fármaco. La prueba se realizó en un intervalo de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  con un scan de 8 barridos. Para el análisis la medición fue directa (sin pastilla de KBr), y se utilizaron aproximadamente 3 mg de muestra de cada material.

#### 6.3.1.4 Espectroscopia UV-VIS.

Se realizó un barrido espectrofotométrico del fármaco de 200 a 500 nm, para seleccionar la longitud de onda a la cual se presenta la mejor absorbancia. La muestra se preparó a una concentración de 50 µg/mL, en agua desionizada y en buffer fosfatos pH 6.5.

#### **6.4 Validación de los métodos analíticos.**

Los parámetros para validar los métodos se basaron conforme a la FEUM 11va edición volumen II, ICH Q2 R1 y la USP 2007. Primeramente se realizó un barrido espectrofotométrico en el quipo UV-VIS a una concentración de 50 µg/mL (conforme al numeral 6.3.1.4), y se seleccionó la longitud de onda a la cual se presentó la mejor absorbancia. Los parámetros a evaluar fueron: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

##### **6.4.1 Linealidad.**

Se prepararon 3 curvas de calibración en tres diferentes medios.

- En agua doblemente destilada para la determinación de la eficiencia de encapsulación (%EE).
- En buffer PBS pH 6.5 para los ensayos *in vitro*.
- En buffer PBS pH 6.5 + residuos de mucosa de cabra para los ensayos *ex vivo*. Los residuos de mucosa se obtuvieron al dejar la misma mucosa inmersa en el PBS por 2 horas en agitación continua, después se filtró el medio utilizando un filtro de 0.45 µm.

1. Para cada medio se preparó una solución stock a 2000 µg/mL.
2. Se tomaron 6 matraces aforados de 10 mL y a partir de cada solución stock se prepararon en cada matraz las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/mL.

3. Se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 290 nm en el espectrofotómetro UV-VIS y se verificó el % coeficiente variación (%CV) de cada punto de la curva.
4. Se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) a partir de un análisis de regresión.
5. Todo se realizó por triplicado.

#### 6.4.2 Precisión (repetibilidad).

Para los 3 medios se prepararon 6 soluciones de la concentración más alta de la curva de calibración, se registraron las absorbancias y se determinó el %CV. Se realizó por triplicado en días diferentes.

#### 6.4.3 Exactitud (recobro).

Para los 3 medios se prepararon 6 soluciones con una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ , se registraron las absorbancias y se determinó el %CV y el % de recobro. Se realizó por triplicado en días diferentes.

#### 6.4.4 Límite de cuantificación y límite de detección.

El límite de cuantificación (LC) determina aquella cantidad del analito cuya señal sea similar o mayor a la muestra blanco en una proporción de 10 a 1.

El límite de detección (LD) es aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos 3 a 1.

El cálculo de ambos parámetros se realizó utilizando las siguientes formulas:

El límite de detección puede ser expresado como:

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

El límite de cuantificación puede ser expresado como:

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

Donde:

$\sigma$ = desviación estándar de la respuesta.

S= pendiente de la curva de calibración.

Se procedió a realizar los cálculos y sustituir en la ecuación de la recta, obteniendo las concentraciones de analito para cada límite.

### **6.5 Formulación y diseños exploratorios.**

Con base en trabajos publicados sobre la elaboración de SLN y varias pruebas experimentales realizadas en el laboratorio, se propusieron dos diseños exploratorios (Tabla 8a y b). Se realizaron dos diseños experimentales  $2^2$  donde los factores a evaluar fueron:

1) relación Fármaco:Lípido, 2) Concentración de tensoactivo: (a) Pluronic F68 para el primer diseño experimental y (b) Tween 80 para el segundo, niveles alto (+1) y bajo (-1) para cada factor. Los factores que se mantuvieron constantes fueron: Tiempo de homogeneización (20 minutos), velocidad de agitación (15,000 rpm) y cantidad de fármaco (2 mg/mL).

Tabla 8 a y b. Factores y niveles de los dos diseños experimentales exploratorios 2<sup>2</sup>.

a)

EXPERIMENTOS	Factores	
	Relación	Concentración de Tensoactivo
	Fármaco:Lípido	Pluronic F-68
1	-1	1
2	1	-1
3	1	1
4	-1	-1

b)

EXPERIMENTOS	Factores	
	Relación	Concentración de Tensoactivo
	Fármaco: Lípido	Tween 80
1	-1	1
2	1	-1
3	1	1
4	-1	-1

2. Posteriormente con los valores de la Tabla 8 a y b, se obtuvieron los valores reales utilizados para las formulaciones.

Tabla 9. Valores reales en relación y porcentaje de los diseños exploratorios.

Factor	Variabes	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)
Fármaco:Lípido	X1	1:10	1:20
Pluronic F-68	X2	1%	3%
Tween 80	X3	1%	3%



Tabla 10. Valores reales en miligramos.

Formulaciones	Factores		
	Farmaco:Lipido (mg)	Pluronic F-68 (mg)	Tween 80 (mg)
1	100:1000	1000	-
2	100:2000	500	-
3	100:2000	1000	-
4	100:1000	500	-
1	100:1000	-	1000
2	100:2000	-	500
3	100:2000	-	1000
4	100:1000	-	500

## 6.6 Preparación de las SLN.

### 6.6.1 Preparación por el método de Homogeneización en caliente.

1. Se fundió el lípido sólido (monoestearato de glicerilo) 5°C por encima de su punto de fusión y se agregó el fármaco (duloxetina HCl) en el lípido fundido (fase oleosa).
2. Se adicionó a la fase oleosa anterior la fase acuosa compuesta de tensoactivo (Tween 80 o Pluronic F-68) a la misma temperatura (para el diseño experimental final sólo se utilizó el tensoactivo Tween 80).
3. Se homogeneizó en el equipo Ultra Turrax T18, a las rpm y tiempo de homogeneización propuesto para cada diseño (exploratorios y final), y se mantuvo la temperatura por encima del punto de fusión de lípido durante todo el proceso.
4. Se dejaron enfriar las formulaciones a temperatura ambiente.
5. Se recuperaron las SLN mediante la técnica de difusión en bolsa de diálisis.
6. Se liofilizaron las SLN y posteriormente se analizaron.

## **6.6.2 Caracterización de las SLN (diseños exploratorios).**

### **6.6.2.1 Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (PZ).**

Las mediciones de tamaño de partícula, PDI y potencial zeta se realizaron por espectroscopia de correlación de fotones, utilizando un equipo Zetasizer. Antes de medir el tamaño, PDI y el potencial zeta, las formulaciones se diluyeron adecuadamente con agua doblemente destilada. El tamaño de partícula y las mediciones de PDI se realizaron tomando 1 ml de formulación diluida en celdas de poliestireno.

Las mediciones de dispersión de luz dinámica fueron tomadas a la longitud de onda de 633 nm utilizando un láser de helio-neón como fuente de luz en un ángulo de dispersión de 90°, donde la difusión de partículas debido al movimiento browniano se convierte en tamaño de partícula. En el caso del potencial zeta, debido a la aplicación de un campo eléctrico, las partículas al moverse se relacionan con una velocidad relacionada con su potencial zeta que es medido utilizando una técnica llamada análisis de fase de la dispersión de luz y se convierte al potencial zeta mediante un software incorporado.

### **6.6.2.2 Evaluación del porcentaje de encapsulación (%EE).**

Para determinar el grado de la encapsulación del fármaco dentro de las SLN, se utilizaron dos técnicas:

1. La técnica de difusión en bolsa de diálisis (Figura 9), en la que se tomaron de cada lote de formulación 10 mL los cuales fueron incorporados a las bolsas de diálisis (de 12,000 Da, tamaño de poro de 2-4 nm), las bolsas se suspendieron en vasos de precipitado con 200 mL de agua doblemente destilada, a temperatura ambiente y 100 rpm por 2 horas. La

fracción sobrenadante (lo que se liberó en el vaso) se analizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 290 nm, para la determinación del fármaco no encapsulado.



Figura 9. Difusión en bolsa de diálisis.

2. También se determinó la eficiencia de encapsulación por el método de ultra-centrifugación, cada formulación se colocó en tubos especiales para ultra-centrifuga y se centrifugaron a 45,000 rpm a 4°C por 1 hora, el sobrenadante fue recolectado y se analizó por espectroscopia UV a 290 nm para determinar el fármaco libre.

La eficiencia de encapsulación del fármaco (%EE) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad total de fármaco} - \text{Cantidad libre de fármaco}}{\text{Cantidad total de fármaco}}$$

### 6.7 Formulación y diseño final.

Dado que se pretende obtener una mejor formulación que tenga un tamaño de partícula entre 200 y 300 nm, un PDI menor a 0.7 y un mayor porcentaje de encapsulación (%EE), se optó por seguir trabajando con el tensoactivo que nos dé como resultado lo anterior, en

este caso fue con el Tween 80 y se elaboró un diseño experimental final  $2^3$  más un punto central.

Los factores fueron: 1) relación Fármaco-Lípido, 2) concentración tensoactivo (Tween 80), y 3) tiempo de homogeneización (minutos) niveles alto (+1), medio (0) y bajo (-1) para cada factor. Los factores que se mantuvieron constantes fueron: rpm (15,000) y cantidad de fármaco (2 mg/mL).

Tabla 11. Factores y niveles del diseño experimental final.

Formulaciones	Factores		
	Fármaco:Lípido	Tween 80	Tiempo de Homogeneización
1	-1	1	1
2	1	1	-1
3	1	1	1
4	-1	1	-1
5	-1	-1	-1
6	0	0	0
7	1	-1	-1
8	-1	-1	1
9	1	-1	1

Tabla 12. Valores reales en relación, porcentaje y tiempo del diseño experimental final.

Factor	Variables	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (+1)
Fármaco:Lípido	X1	1:10	1:15	1:20
Tween 80	X2	1%	2%	3%
Tiempo de homogeneización	X3	10 minutos	15 minutos	20 minutos

Tabla 13. Valores reales del diseño experimental final.

Formulaciones	Factores		
	Farmaco:Lipido (mg)	Tween 80 (mg)	Tiempo de homogeneización (minutos)
1	100:1000	3	20
2	100:2000	3	10
3	100:2000	3	20
4	100:1000	3	10
5	100:1000	1	10
6	100:1500	2	15
7	100:2000	1	10
8	100:1000	1	20
9	100:2000	1	20

### 6.7.1 Caracterización de las SLN (diseño final).

6.7.1.1 Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (PZ).

Se realizó conforme al numeral 6.3.5.1.

6.7.1.2 Evaluación del porcentaje de encapsulación (%EE).

Se realizó conforme al numeral 6.3.5.2.

### 6.7.2 Liberación *in vitro*.

El ensayo de liberación *in vitro*, se realizó de dos maneras diferentes, en ambas utilizando membrana sintética.

6.7.2.1 Liberación en vaso de precipitado: La liberación del fármaco de las SLN se determinó usando la técnica de difusión de bolsa de diálisis usando una membrana de diálisis (de 12,000 Da, tamaño de poro de 2-4 nm). Se transfirió una cantidad de formulación que contenía el fármaco equivalente a 10 mg (previamente dializada, libre de tensoactivo y fármaco libre) a una bolsa de diálisis y se selló. La bolsa sellada se suspendió después en un vaso de precipitados que contenía 200 mL de PBS a pH 6.5 y se agitó a una velocidad de 100 rpm a 37°C. Se extrajeron alícuotas a intervalos de tiempo predeterminados hasta las 24 h desde el compartimento receptor (vaso de precipitados) y se sustituyeron por un volumen igual de medio fresco para mantener condiciones "sink". Las muestras se analizaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 290 nm.

6.7.2.2 Liberación utilizando celdas de difusión de Franz: Para realizar la difusión *in vitro* de las SLN se utilizó también membrana sintética (de 12,000 Da, tamaño de poro de 2-4 nm) y PBS pH 6.5 como medio dializador. Las membranas se dejaron en PBS durante toda la noche y se montaron entre el compartimento receptor y el compartimento donador de la celda (Figura 11). Se transfirió una cantidad de formulación que contenía el fármaco equivalente a 5 mg (previamente dializada, libre de tensoactivo y fármaco libre) al compartimento donador de la celda, el compartimento receptor se llenó previamente con PBS y se mantuvo continuamente en agitación con un agitador magnético a una velocidad de 100 rpm de manera que el PBS tocara la superficie de la membrana (entre el donador y el receptor) a una temperatura de 37°C. Se extrajeron alícuotas a intervalos de tiempo predeterminados hasta las 24 h desde el compartimento receptor y se sustituyeron por un volumen igual de medio fresco para mantener condiciones "sink". Las muestras se analizaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 290 nm.

### 6.7.3 Permeación *ex vivo* en celdas de Franz.

#### 6.7.3.1 Obtención de la mucosa nasal de cabra.

Para realizar la permeación *ex vivo* de las SLN se utilizó como membrana limitante mucosa nasal de cabra. Los cortes de la mucosa nasal de cabra se extirparon de cabras recién sacrificadas y se limpiaron para eliminar los tejidos adheridos (Anexo 1). Se enjuagó completamente con PBS pH 6.5 y se dejó equilibrar en el mismo durante 15-20 min, se obtuvieron cortes de mucosa nasal de aproximadamente 0.2 – 0.3 mm de espesor, cortados con micrótopo y medidos con un vernier General Ultratech digital (Figura 10).



Figura 10. Medición de un corte de mucosa nasal.

#### 6.7.3.2 Permeación *ex vivo*.

Las cortes de la mucosa nasal de cabra se montaron entre el compartimento receptor y el compartimento donador de la celda de Franz, y se transfirió una cantidad de formulación (previamente dializada, libre de tensoactivo y fármaco libre) que contenía el fármaco equivalente a 2.5 mg al compartimento donador de la celda, el procedimiento realizado fue similar el descrito en el numeral 6.7.2.2 (Figura 11).



Figura 11. Permeación *ex vivo* en celdas de Franz.

La cantidad acumulada de principio activo medida en el compartimento receptor  $Q$  ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) se representará gráficamente como una función del tiempo. Se determinó el  $J_{ss}$  a partir de la porción lineal de los datos de concentración  $Q$  ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) contra el tiempo ( $t$ ), empleando el análisis de regresión, donde la pendiente ( $m$ ) representa el  $J_{ss}$ . De esta misma manera se realizó el cálculo de liberación para el ensayo *in vitro* del numeral 6.7.2.2.

#### **6.7.4 Caracterización fisicoquímica de las SLN.**

Las SLN fueron liofilizadas para ser caracterizadas fisicoquímicamente, esto se realizó utilizando las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de rayos X de polvos y Espectroscopia infrarroja (descritas en los numerales 6.3.1.1 al 6.3.1.3).



### **6.7.5 Análisis de resultados.**

Los datos obtenidos de las pruebas de liberación *in vitro* y permeación *ex vivo*, se analizaron utilizando el software Microsoft Excel 2007, los espectros de rayos X de polvos fueron realizados a través del programa Origin Pro 2016 y los diseños experimentales fueron analizados con el software Statgraphics versión 16.2.04.

## 7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

---

### 7.1 Análisis de identidad de materia prima.

#### 7.1.1 Punto de fusión.

El análisis térmico para el fármaco, muestra resultados parecidos a los reportados en bibliografía (Ketan Patel *et al.*, 2012, reportaron un punto de fusión de duloxetina de 171.48°C, la FDA, 2009 reportó que según su análisis termogravimétrico la descomposición y la fusión no ocurren hasta 160°C), el punto de fusión del fármaco fue de 166.63 °C debido a que en el termograma de DSC (Figura 12A) se observa un evento endotérmico a esa temperatura, esto se puede comprobar en su termograma de TGA (Figura 12B) en donde precisamente la descomposición (pérdida de masa) empieza a esta temperatura (166.63 °C).

Para el lípido monoestearato de glicerilo, su punto de fusión fue de 58.70 °C por el evento térmico mostrado en su termograma en DSC (Figura 13A), a esa misma temperatura comienza la descomposición en TGA (Figura 13B). Esto es parecido con lo reportado en bibliografía por Mohd Yasir y Udai Vir Singh Sara., 2014 quienes obtuvieron un punto de fusión para el monoestearato de glicerilo de 60.3°C. A partir del punto de fusión del lípido (58.70 °C) es que se establecieron las condiciones de trabajo, según el método de Homogeneización en caliente que a 5°C por encima del punto de fusión del lípido tenía que ser, en este caso a 63.70 °C se realizaron los experimentos.

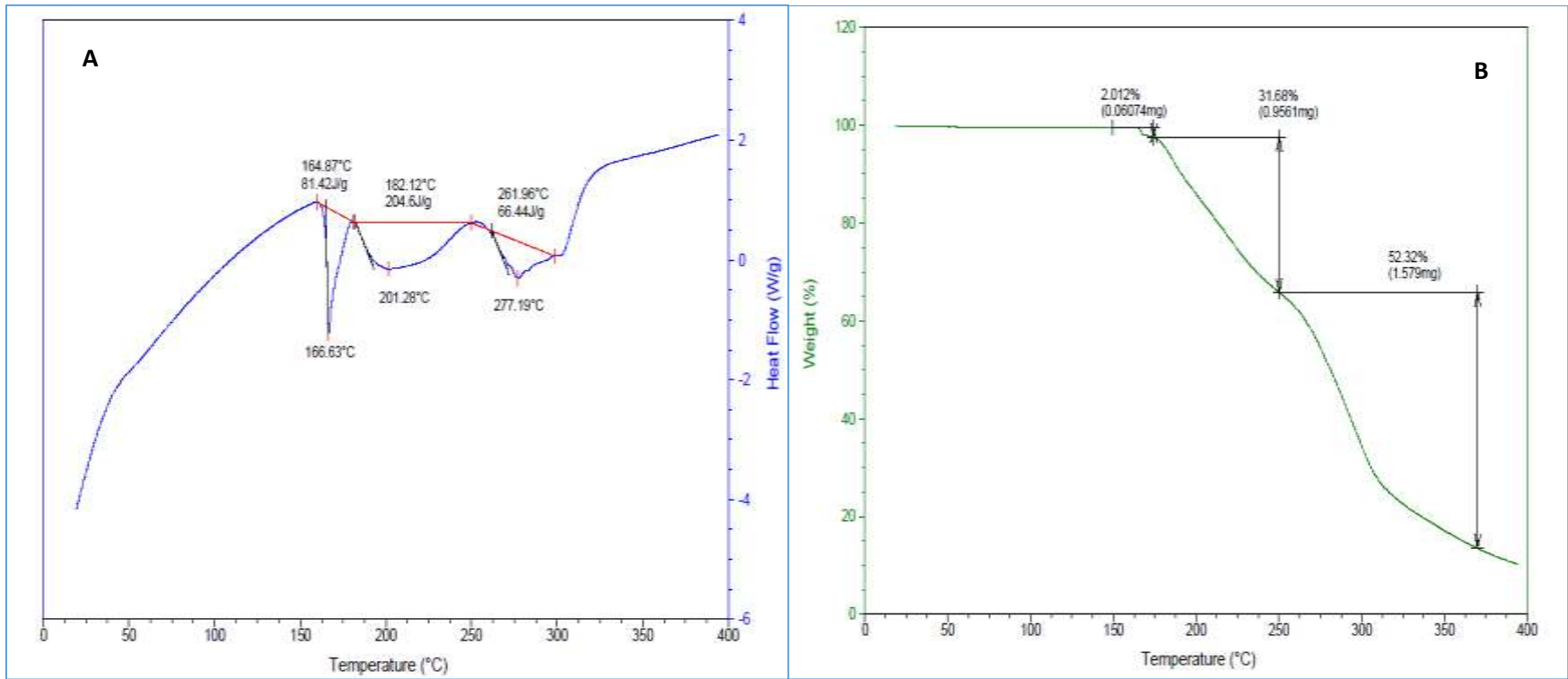


Figura 12. A) DSC y B) TGA del fármaco duloxetina HCl

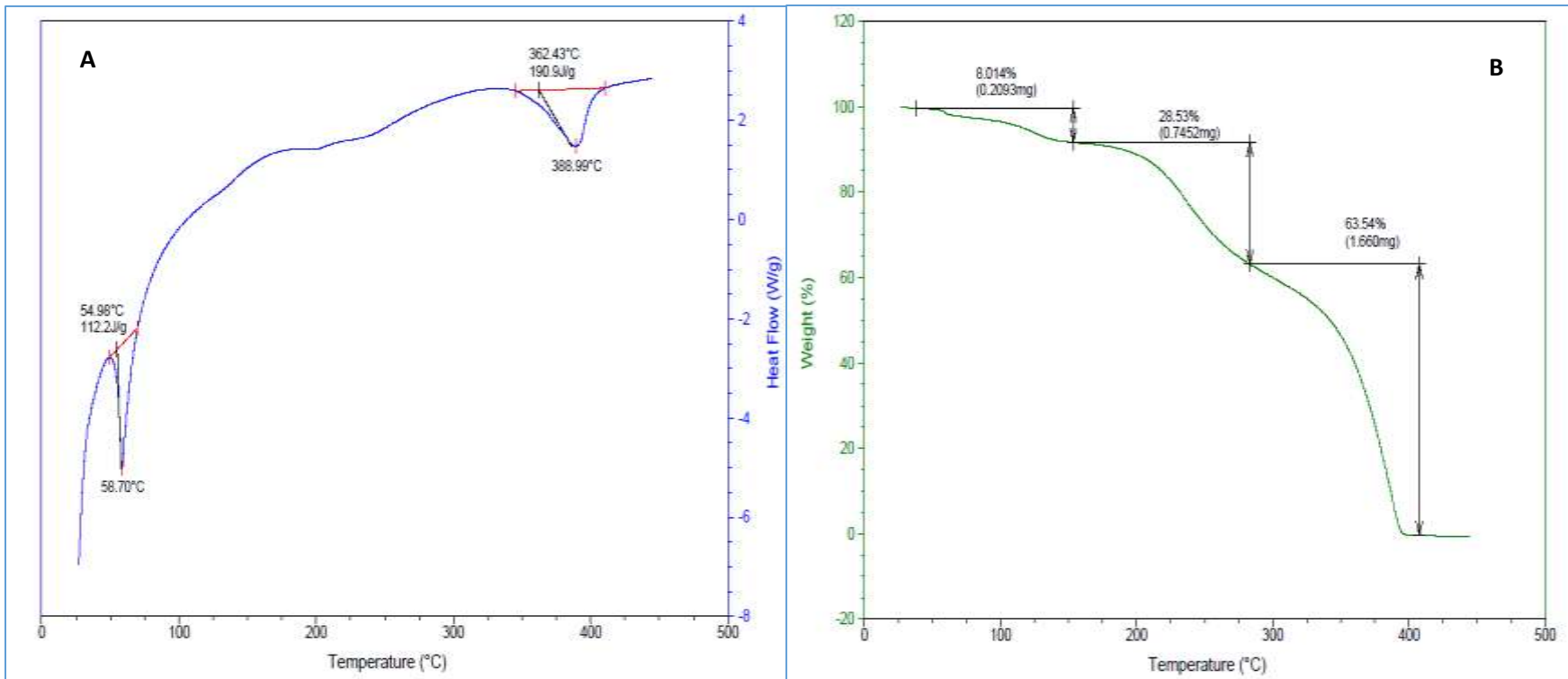


Figura 13. A) DSC y B) TGA del lípido monoestearato de glicerilo.

### 7.1.2 Difracción de Rayos X de polvos.

El análisis se realizó de 5-40° en el caso de nuestro fármaco duloxetine HCl, este se comparó con un simulado (también de duloxetine HCl) obtenido de la base de datos del software Mercury 3.6, los asteriscos (\*) representan los picos que se empalman del fármaco con el simulado, al comparar ambos espectros, se puede notar que debajo de los 10° el espectro simulado (rojo) presenta un pico más que el fármaco analizado (negro), esto debido a que duloxetine HCl presenta polimorfismo (la forma A y la forma T), lo que observamos es que se analizó la forma A, con la cual se estará trabajando, por ello no se observa el otro pico característico de la forma T.

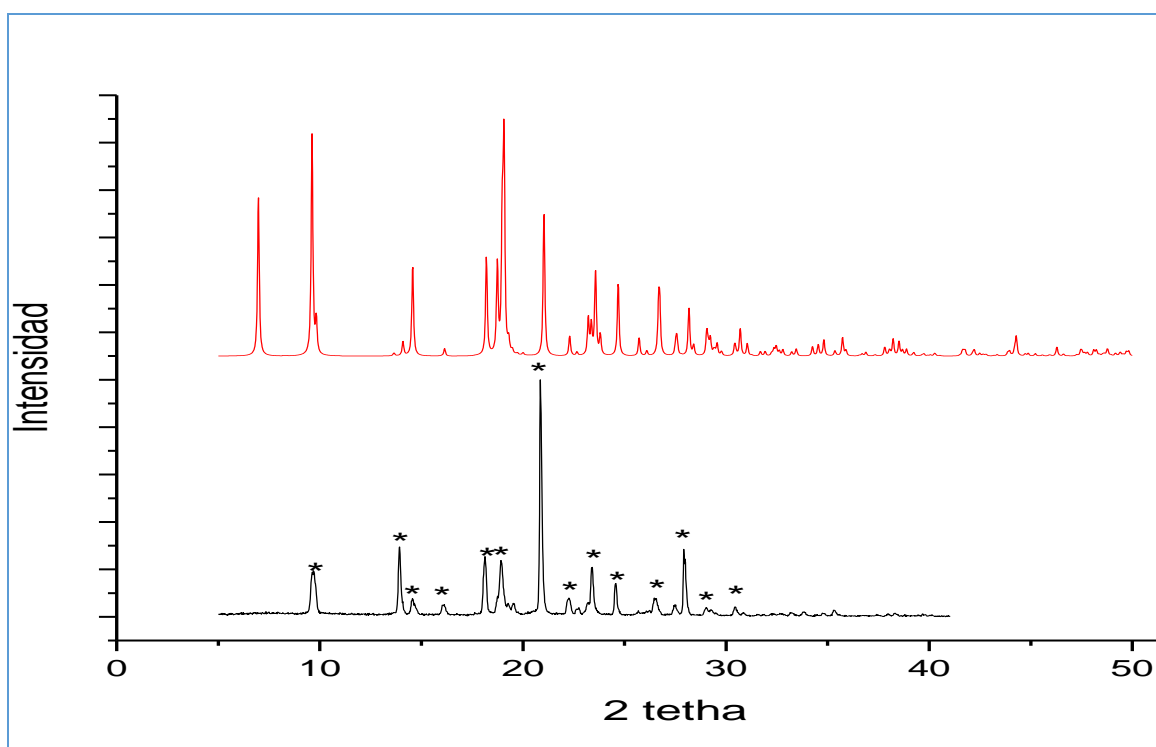


Figura 14. XRDp de duloxetine HCl ( — ) y su simulado ( — ).

### 7.1.3 Espectroscopia infrarroja.

Se utilizó para observar la estructura de los materiales utilizados. Su principal aplicación es la detección de grupos funcionales en un compuesto o muestra. La Figura 15 muestra el espectro de FT-IR del compuesto duloxetina HCl (DLX). En él se pueden observar señales características de los grupos funcionales que se encuentran presentes en la estructura del compuesto, por ejemplo a  $3060\text{ cm}^{-1}$  se observa la vibración característica del grupo amino, además de observar la banda de tensión C-N en  $1240\text{ cm}^{-1}$ . Además, por arriba de  $3000\text{ cm}^{-1}$  aparece la banda de tensión =C-H con hibridación  $\text{sp}^2$  ( $2973\text{ cm}^{-1}$ ), mientras que a  $2757\text{ cm}^{-1}$  se observa la vibración que corresponde a C-H con hibridación  $\text{sp}^3$ . La banda que aparece a  $712\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la tensión C-S del anillo tiofénico.

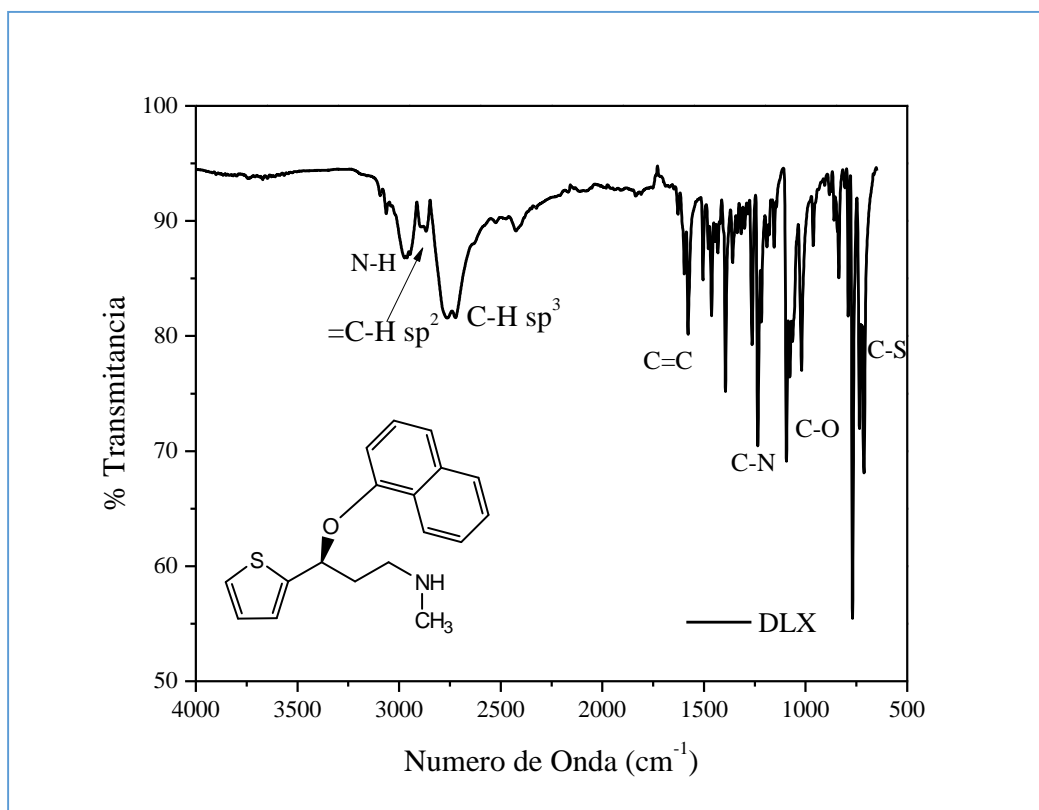


Figura 15. Muestra del espectro de FT-IR de duloxetina (DLX).

Por otro lado el espectro FT-IR del monoestearato de glicerilo (Figura 16) muestra la señal ancha que es característica del grupo O-H a  $3331\text{ cm}^{-1}$ , la banda del grupo carbonilo derivado del éster (C=O) aparece a  $1737\text{ cm}^{-1}$ , mientras que la señal en  $2914\text{ cm}^{-1}$  que

corresponde a la absorción C-H con hibridación  $sp^3$ , en particular esta señal muestra mayor intensidad debido a el número relativamente grande de grupos metilenos ( $-CH_2-$ ) presentes en la estructura del monoestearato.

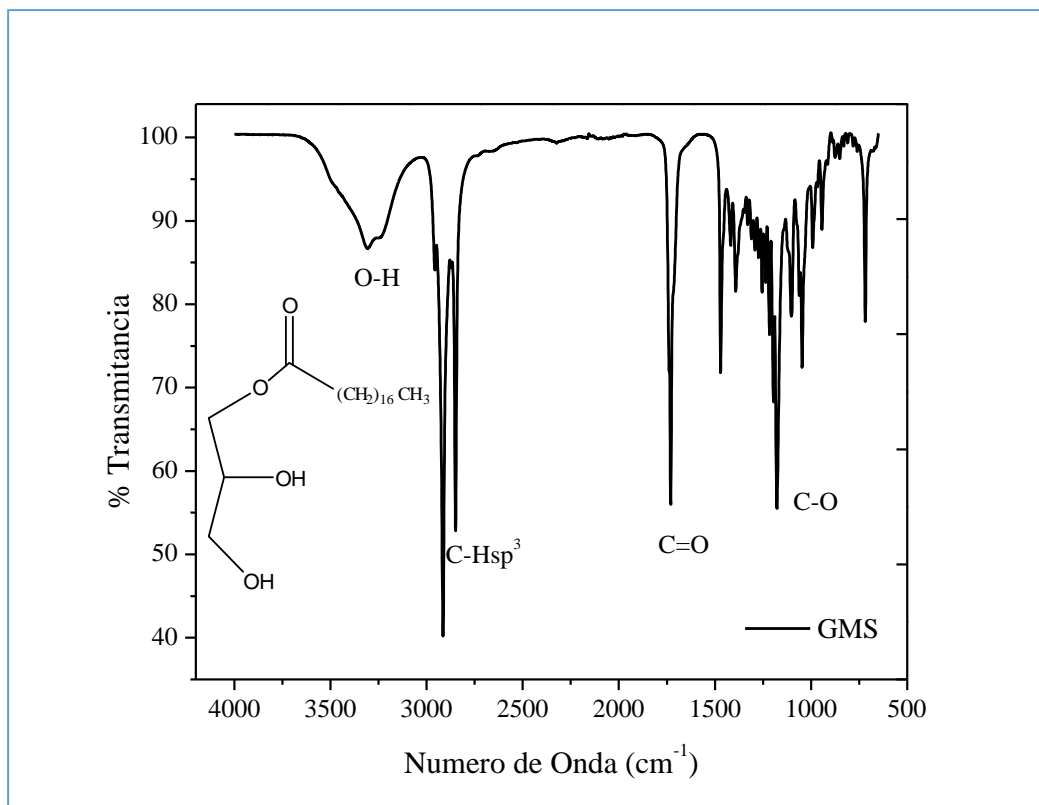


Figura 16. Muestra el espectro de FT-IR del monoestearato de glicerilo (GMS).

#### 7.1.4 Barrido Espectrofotométrico UV-VIS

La Figura 17 muestra el espectro de absorción de duloxetina HCl, que consiste en una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida a diferentes valores de longitud de onda. Para la detección de duloxetina por UV-VIS se tenía la referencia de Ketan Patel *et al.*, 2011, que reportaron una longitud de onda de 288 nm. En el barrido se registró que la mayor absorbancia fue de 290 nm. Las pequeñas diferencias con la referencia pueden ser debidas a las condiciones de trabajo, inclusive los desplazamientos de los espectros puede ser generados por el disolvente utilizado. A partir de esta longitud

de onda se realizó la validación de los métodos analíticos y los estudios de liberación y permeación en membranas sintéticas y mucosa nasal de cabra.

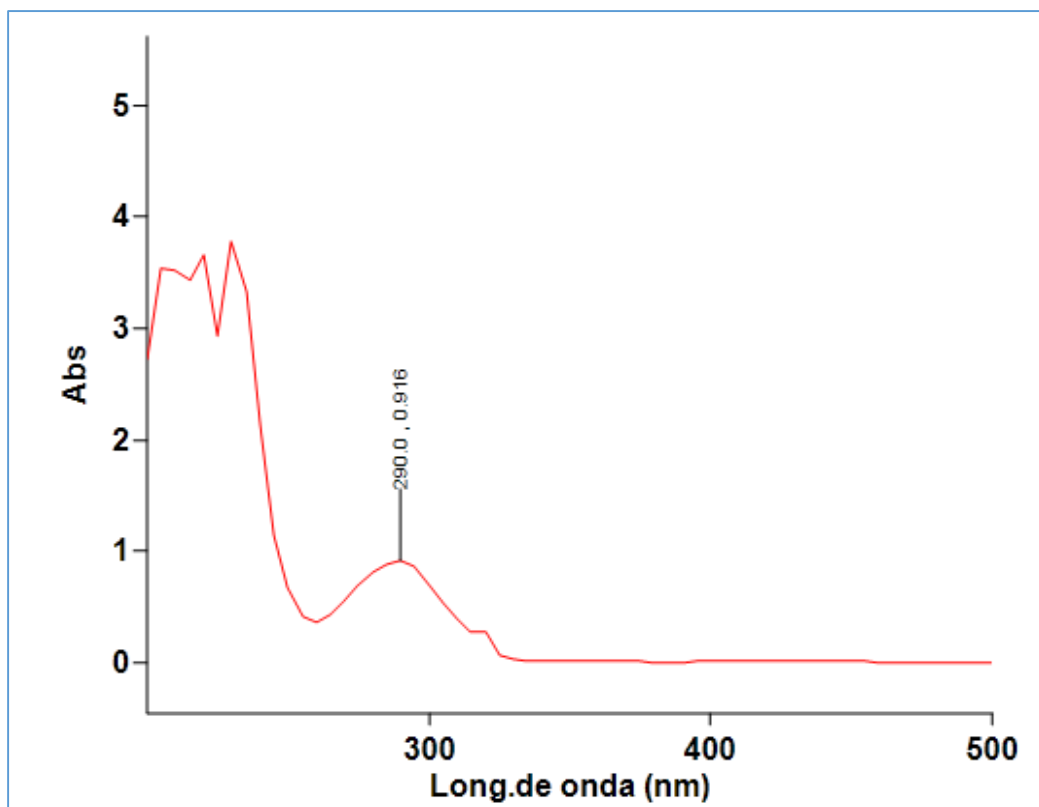


Figura 17. Barrido Espectrofotométrico UV-VIS de duloxetina.

## 7.2 Validación de los métodos analíticos.

### 7.2.1 Validación para la determinación de %EE.

La longitud de onda se escogió a partir del barrido espectrofotométrico realizado en las pruebas de identificación (numeral 7.1.4) y fue a 290 nm (Figura 17). A continuación, se muestran los resultados de los parámetros utilizados como base para establecer que los métodos son lineales, precisos (repetibilidad) y exactos (recobro). En el primer método validado (Tabla 14), para evaluar linealidad se realizó el análisis de regresión y se calculó el C.V % (Anexo 2), el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).



El valor  $r$  indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración, mientras que  $r^2$  indica la bondad de ajuste del modelo a los datos.

En la tabla 14 se observa que el coeficiente de correlación tiene un valor de 0.9998, lo cual muestra que existe un alto grado de correlación entre la variable de concentración (x) y la variable de respuesta (y) (Figura 18). También tuvo un C.V % menor al 2%. Por lo cual se puede decir que el método es lineal ya que ambos resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 14. Validación para calcular %EE.

Conc. $\mu\text{g/mL}$	Día 1	Día 2	Día 3	Media	D.E	Repetibilidad ( $\mu\text{g/mL}$ )		% Recobro	
10	0.1892	0.1854	0.1881	0.188	0.0020	60.31		102.58	
20	0.3544	0.3594	0.3568	0.357	0.0025	60.29		99.22	
30	0.5572	0.5448	0.5517	0.551	0.0062	60.25		97.87	
40	0.7257	0.7278	0.7263	0.727	0.0011	59.72		98.57	
50	0.9005	0.9016	0.9085	0.904	0.0043	60.17		98.00	
60	1.0754	1.0835	1.0827	1.081	0.0045	60.13		96.99	
$r$	0.9998					Media	60.14	Media	98.87
$r^2$	0.9996					D.E	0.2193	D.E	1.9623
LC ( $\mu\text{g/mL}$ )	3.5754					% C.V	0.3647	% C.V	1.9847
LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.1798								

D.E = Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación.

Para la repetibilidad, se puede observar en la tabla 14 que el C.V % fue de 0.3647, el cual es menor al 2%, por lo tanto cumple los criterios de aceptación establecidos. Y para la evaluación de la exactitud, también se obtuvo que la media del % de recobro es de 98.87, la cual de acuerdo a los parámetros de validación cumple con los criterios de aceptación, ya que el promedio aritmético del % de recobro se debe encontrar entre 97-100 % para

métodos espectrofotométricos. También tuvo un C.V % de 1.9847 por lo cual también cumplió este criterio, el cual dice que debe ser menor al 3%.

El LC y el LD se encuentran por debajo de 10 µg/mL por lo tanto se puede utilizar este valor como la concentración más baja de la curva de calibración.

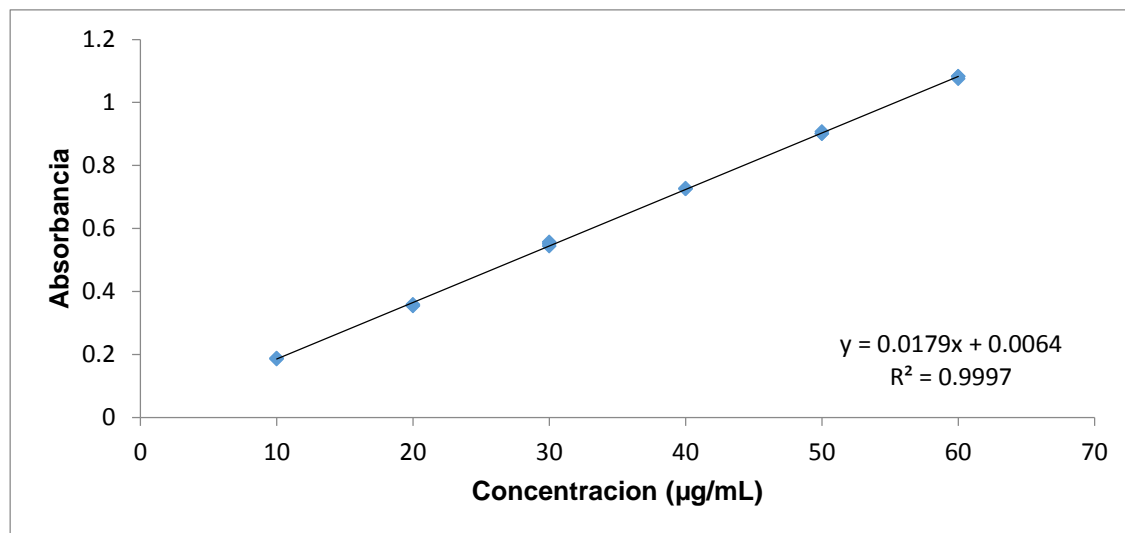


Figura 18. Curva de calibración del método para determinar %EE.

#### 7.2.2 Validación para los ensayos *in vitro*.

En la tabla 15 se observa que el coeficiente de correlación tiene un valor de 0.9996, lo cual dice que existe un alto grado de correlación entre la variable de concentración (x) y la variable de respuesta (y) (Figura 19). También tuvo un C.V % menor al 2%, por lo cual se puede decir que el método es lineal ya que ambos resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

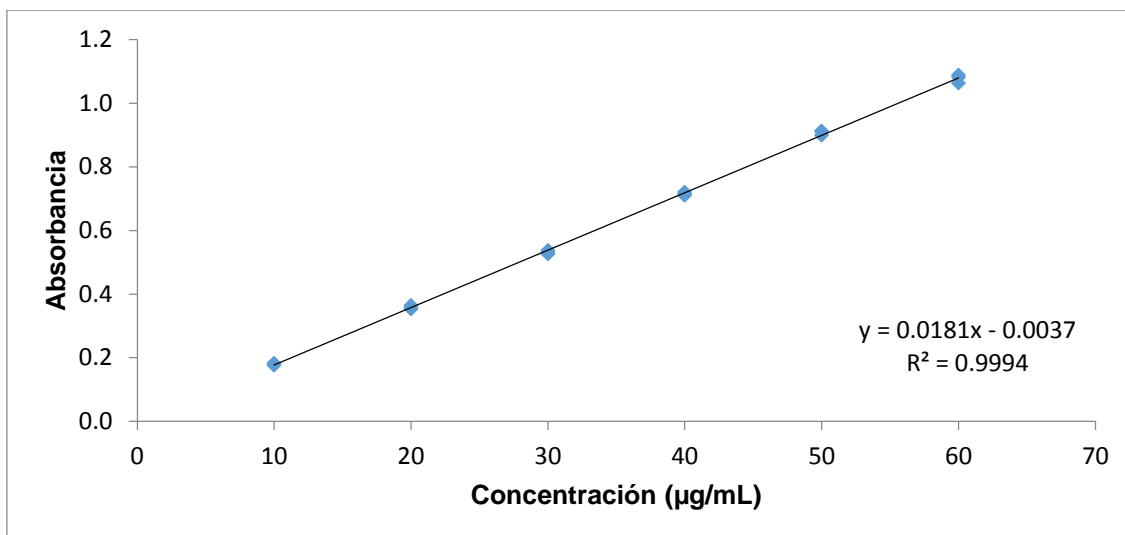


Figura 19. Curva de calibración del método para ensayos *in vitro*.

Tabla 15. Validación para los ensayos *in vitro*.

Conc. µg/mL	Día 1	Día 2	Día 3	Media	D.E	Repetibilidad		% Recobro		
10	0.176	0.182	0.181	0.180	0.0033	60.09		100.61		
20	0.354	0.365	0.357	0.358	0.0055	58.96		99.56		
30	0.526	0.531	0.538	0.532	0.0057	59.75		100.81		
40	0.711	0.715	0.721	0.715	0.0052	60.35		97.71		
50	0.913	0.912	0.899	0.908	0.0074	59.85		101.26		
60	1.064	1.088	1.082	1.078	0.0126	60.22		100.36		
r	0.9996					Media	59.87	Media	99.95	
r <sup>2</sup>	0.9993					D.E	0.5015	D.E	1.2792	
LC (µg/mL)	2.0441					% C.V	0.8376	% C.V	1.2785	
LD (µg/mL)	0.6745									

D.E = Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación

Para la repetibilidad, se observa en la tabla 15 que el C.V % fue de 0.8376, el cual es menor al 2%, por lo tanto cumple los criterios de aceptación establecidos. Y para la evaluación de la exactitud, se muestra que la media del % de recobro es de 99.95, la cual de acuerdo a los valores de validación establecidos cumple con los criterios de aceptación, ya que de acuerdo a esta guía, el promedio aritmético del % de recobro se debe encontrar entre

97-100 % para métodos espectrofotométricos. También tuvo un C.V % de 1.2785 por lo cual también cumplió este criterio, el cual dice que debe ser menor al 3%.

El LC y el LD se encuentran por debajo de 10 µg/mL por lo tanto se puede utilizar este valor como la concentración más baja de la curva de calibración.

### 7.2.3 Validación para el ensayo *ex vivo*.

En la tabla 16 se muestra que para la linealidad el coeficiente de correlación tiene un valor de 0.9996, y un C.V % menor al 2%, por lo cual también se puede decir que el método es lineal ya que ambos resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos (Figura 20).

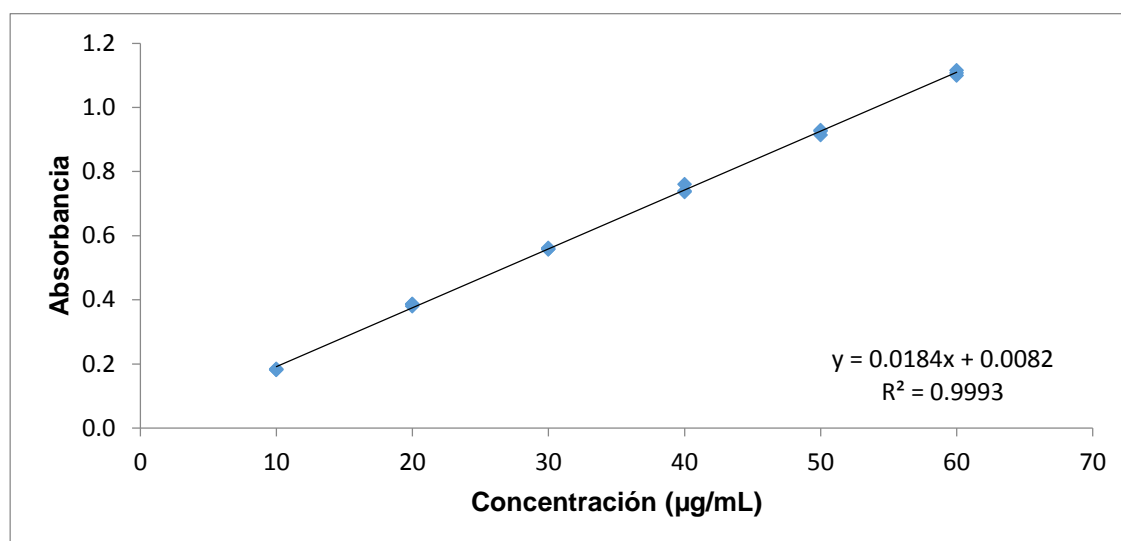


Figura 20. Curva de calibración del método para ensayo *ex vivo*.

Para la repetibilidad, el C.V % fue de 0.4876, el cual es menor al 2%, por lo tanto cumple los criterios de aceptación establecidos. Y para la evaluación de la exactitud, se puede notar que la media del % de recobro es de 97.93, también tuvo un C.V % de 1.1030 por lo cual también cumplió este criterio, y el LC y el LD se encuentran por debajo de 10 µg/mL por lo tanto se puede utilizar este valor como la concentración más baja de la curva de calibración.

Tabla 16. Validación para el ensayo *ex vivo*.

Conc. $\mu\text{g/mL}$	Día 1	Día 2	Día 3	Media	D.E	Repetibilidad		% Recobro		
10	0.182	0.185	0.183	0.183	0.0015	59.73		97.33		
20	0.386	0.387	0.380	0.385	0.0038	60.19		97.10		
30	0.556	0.558	0.562	0.559	0.0022	59.34		98.90		
40	0.740	0.760	0.737	0.746	0.0128	59.91		98.82		
50	0.929	0.926	0.914	0.923	0.0081	60.02		96.51		
60	1.107	1.116	1.100	1.108	0.0079	59.89		98.95		
r	0.9996					Media	59.84	Media	97.9343	
r <sup>2</sup>	0.9993					D.E	0.2918	D.E	1.0802	
LC ( $\mu\text{g/mL}$ )	4.4565					% C.V	0.4876	% C.V	1.1030	
LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.4706									

D.E = Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación.

### 7.3 Caracterización de las SLN (métodos exploratorios).

#### 7.3.1 Diseños exploratorios.

Los factores a evaluar fueron: 1) relación Fármaco:Lípido, 2) concentración de tensoactivo (Pluronic F68 y Tween 80) y los factores que se mantuvieron constantes fueron: Tiempo de homogeneización (20 minutos), velocidad de agitación en rpm (15,000) y cantidad de fármaco (2 mg/mL). De estos diseños exploratorios se observó (Tabla 17) que con el Pluronic F68 se obtuvieron tamaños de partícula  $>325$  nm y %EE $>32$  y solo hasta el 50%. Con el tensoactivo Tween 80 se obtuvieron tamaños de partícula aproximados a 200 nm (de la formulación 6 a la 8) y porcentajes de encapsulación %EE $>44\%$  hasta 60%. Cabe destacar que el PZ no fue muy alto (ya que de acuerdo a la bibliografía los valores óptimos de PZ son de +30 y -30) en las formulaciones que se utilizó cada tensoactivo, aunque según reportes indican que a pesar del menor valor del potencial zeta, se encontró que las SLN eran estables debido a la presencia de tensoactivos no iónicos que imparten estabilidad al sistema mediante estabilización estérica. La absorción de estos estabilizadores estéricos

disminuye el valor del potencial zeta y produce una fuerte repulsión entre las partículas, impidiendo así la agregación durante el almacenamiento (Singh *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2000), como en este caso al utilizar Pluronic F68 y Tween 80. Destacar también que los mejores índices de poli-dispersión fueron obtenidos cuando se utilizó Pluronic F68 (de 0.32 a 0.55), con el Tween 80 se obtuvo un PDI desde 0.53 hasta 0.67, aunque la bibliografía indica que los valores de PDI para poder ser aceptables deben ser menores a 0.7 como es el caso de todas las formulaciones.

Se decidió seguir trabajando con el tensoactivo Tween 80, ya que con éste se obtuvieron tamaños de partícula deseados entre 200 y 300 nm, PDI por debajo de 0.7 y mayor porcentaje de encapsulación.



Figura 21. Formulación de SLN.

Tabla 17. Resultados de los diseños experimentales exploratorios 2<sup>2</sup>.

Formulación	Fármaco:Lípido (mg)	Pluronic F68 (% w/w)	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)	%EE
1	100:1000	3	403 ± 41	0.35 ± 0.02	4.8 ± 0.07	39.44 ±0.94
2	100:2000	1	513 ± 6.3	0.32 ± 0.06	6.8 ± 0.13	38.41 ±8.45
3	100:2000	3	583 ± 0.35	0.35 ± 0.08	4.2 ± 0.07	50.91 ±7.28
4	100:1000	1	325 ±13.43	0.55 ±0.004	6.6 ± 0.30	32.96 ±7.03

Formulación	Fármaco:Lípido (mg)	Tween 80 (% w/w)	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)	%EE
1	100:1000	3	531 ± 1.76	0.67 ± 0.10	11 ± 0	58.09 ±0.29
2	100:2000	1	198 ± 1.27	0.60 ± 0.01	11.9 ± 0.63	44.18 ±3.61
3	100:2000	3	218 ± 4.45	0.64 ±0.002	11.1 ± 0.28	60.64 ±4.26
4	100:1000	1	200 ±12.23	0.53 ± 0.01	13 ± 0.35	47.32 ±0.86

Diseños exploratorios (los datos representan el promedio ±SD, n=3).

## 7.4 Diseño final.

### 7.4.1 Tamaño de partícula.

Los factores de este diseño fueron: 1) relación Fármaco-Lípido, 2) cantidad de tensoactivo (Tween 80), y se anexó a este diseño final: 3) el tiempo de homogeneización en minutos (esto para disminuir el tiempo de trabajo del equipo de homogeneización, ya que en los diseños exploratorios este se mantuvo constante en 20 minutos). Los factores que se mantuvieron constantes fueron: rpm (15,000) y cantidad de fármaco (2 mg/mL).

Se obtuvieron tamaños de partícula entre 160 y 535 nm (Tabla 18), de acuerdo al diagrama de Pareto (Figura 22) los factores mencionados afectan positiva o negativamente el tamaño de partícula, el factor que más influye es la relación Fármaco:Lípido (factor A), ya que al aumentar su relación se observa que disminuye el tamaño de partícula, también se nota que al aumentar la concentración de estabilizante (tensoactivo) (factor B) aumenta el tamaño de partícula, ambos factores A y B en conjunto afectan negativamente o reducen el tamaño de partícula, esto debido posiblemente a que el tensoactivo reduce la tensión interfacial entre el lípido y la fase acuosa que puede controlar la agregación de partículas lipídicas facilitando la partición de las partículas, lo que da como resultado un tamaño y PDI más bajos.

Mehnert y Mäder, 2012 también reportaron que a medida que la concentración de Tween 80 aumentó de 2% a 3% w/w, el tamaño de partícula y PDI disminuyeron, pero aumentó también el %EE. Una mayor concentración de surfactante estabiliza la matriz de lípidos de manera efectiva al formar una barrera estérica en su superficie, evitando así la agregación (Reddy y Murthy, 2005).

En la Figura 23 de superficie de respuesta se pueden observar las concentraciones en las que se puede trabajar para obtener tamaños de partículas deseados entre 200 y 300 nm,



se nota en la gráfica que a concentraciones de fármaco: lípido bajas y concentraciones de tensoactivo altas, aumenta el tamaño de partícula (zona naranja), el área verde representa tamaños de partícula entre 180 y 240 nm, que se pueden obtener utilizando concentraciones bajas de tensoactivo y fármaco: lípido.

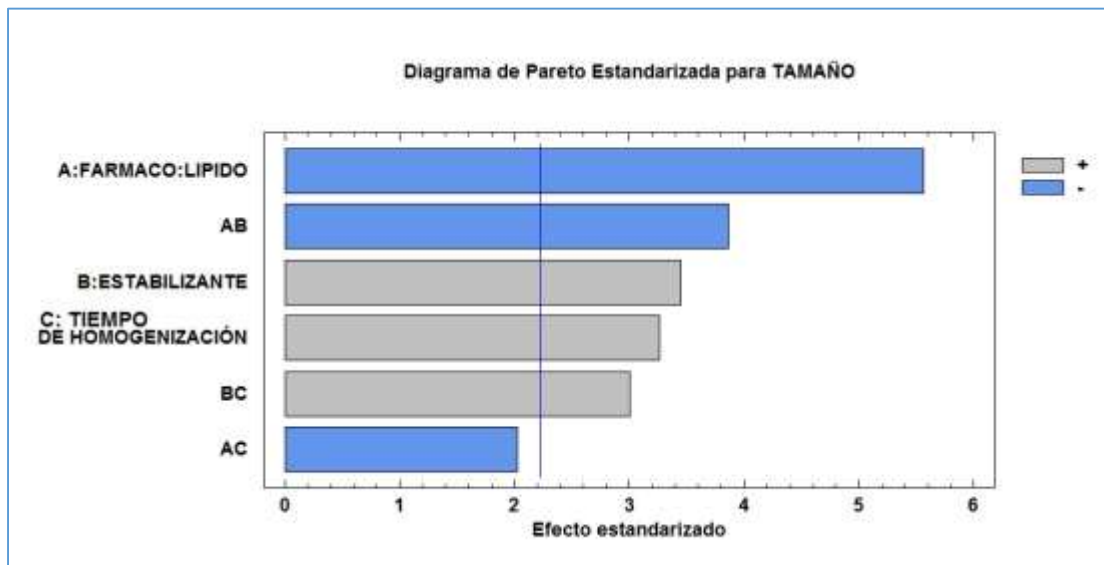


Figura 22. Diagrama de Pareto del tamaño de partícula.

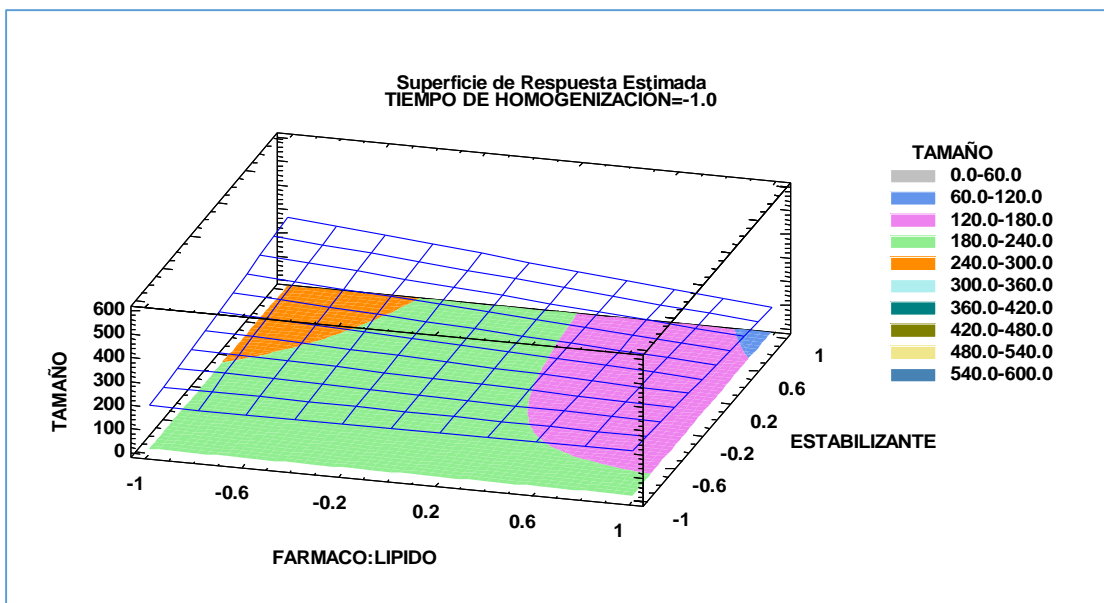


Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta del tamaño de partícula.

#### 7.4.2 PZ y PDI.

Los valores de potencial Z fueron similares para todas las formulaciones, no variando con alguno de los factores. El PDI y su diagrama de Pareto (Figura 24), muestra que a medida que aumenta la relación Fármaco: Lípido aumenta también el PDI, esto posiblemente a la mayor cantidad de lípido que puede generar mayor número de agregados o micelas o aumento de la viscosidad en la fase dispersa. Es interesante notar que esto no contradice el análisis anterior sobre el tamaño de partícula, pero si nos dice que a una cantidad determinada de fármaco: lípido debe haber una cantidad de tensoactivo suficiente para disminuir la tensión superficial y evitar la agregación, lo que también nos da índices de PDI bajos, tal es el caso de la formulación 4, que tiene una relación fármaco: lípido de 1:10 y una concentración de tensoactivo del 3% dando tamaños de partícula de 260 nm y un PDI bajo de 0.17.

De manera similar Shah y Pathak, 2010 y Subedi *et al.*, 2009, observaron que a medida que aumenta la concentración de lípidos, también aumenta la viscosidad de la fase dispersa, lo que da como resultado la aglomeración de partículas con mayor tamaño y PDI y menor eficiencia de homogeneización.

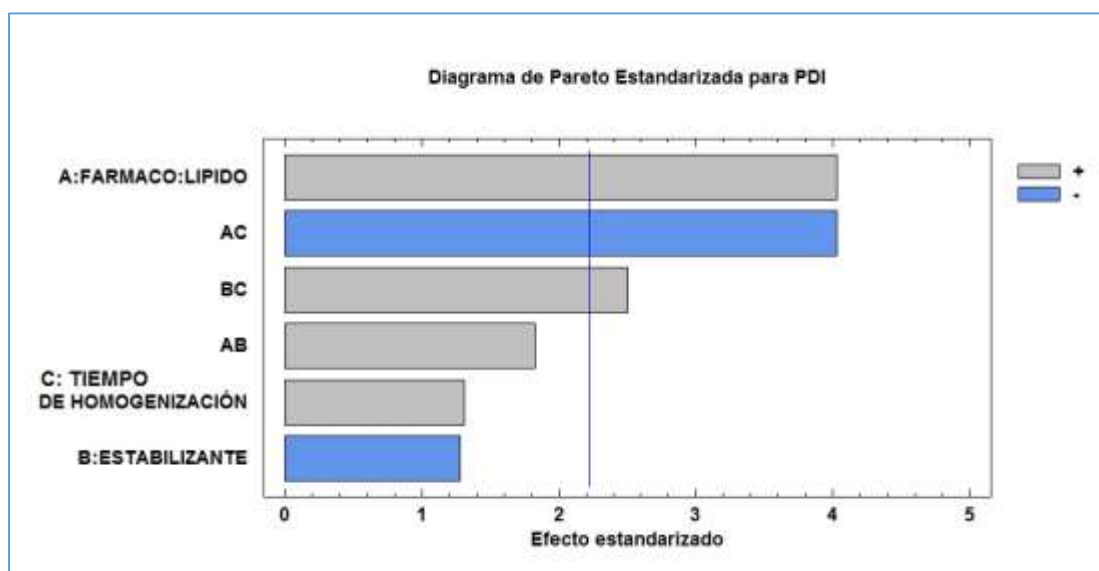


Figura 24. Diagrama de Pareto del PDI.

#### 7.4.3 Porcentaje de eficiencia de encapsulación.

En la eficiencia de encapsulación, medida como el %EE se vio notablemente el efecto del estabilizante, como lo indica el diagrama de Pareto en la figura 25, a mayor concentración de estabilizante, mayor será el porcentaje de eficiencia de encapsulación, esto debido a que el efecto que precisamente hace el tensoactivo es reducir la tensión superficial entre el lípido y la fase acuosa, haciendo que el fármaco que fue internalizado dentro de la matriz lipídica ahí permanezca. Es notable que las formulaciones que presentaron mayor eficiencia de encapsulación (formulaciones 1 a 4) fueron las que tenían precisamente mayor concentración de tensoactivo (3%).

Lo similar fue observado por Surajit Das *et al.*, 2011 al reportar que el %EE se incrementó al aumentar la concentración de estabilizante. Esta observación fue apoyada también por J. Liu, *et al.*, 2007. Esto podría deberse a la presencia de estabilizante suficiente que ayudó al fármaco a permanecer dentro de las partículas lipídicas y o en la superficie de las partículas como ya se mencionó.

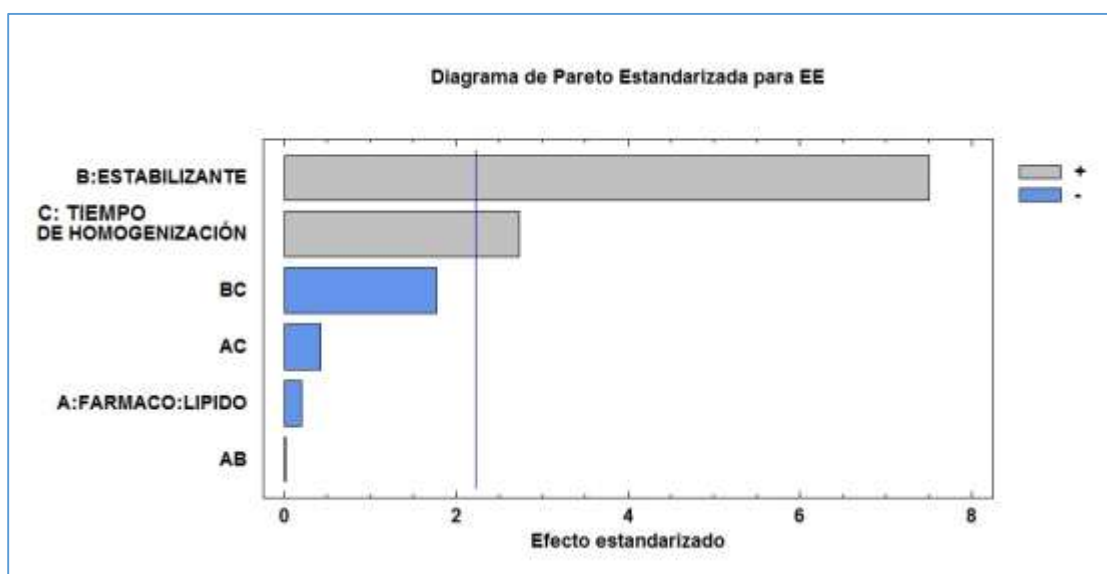


Figura 25. Diagrama de Pareto de la %EE.

En la Figura 26 se muestra la tendencia de aumentar o disminuir la %EE, la gráfica de superficie de respuesta tiende a disminuir en su eje de EE a medida que disminuye la concentración de tensoactivo, el tiempo de homogenización en el Pareto indica un efecto positivo a medida que aumenta este, pero no es tan representativo como el tensoactivo.

El color azul turquesa muestra una zona en la que se puede trabajar y obtener niveles altos de encapsulación, ya que la cantidad de estabilizante no es la máxima a utilizar y proporciona %EE de 57 a 60, algo similar a la zona verde que representa la concentración mayor de estabilizante (3%) y que daría %EE de 60 a 63.

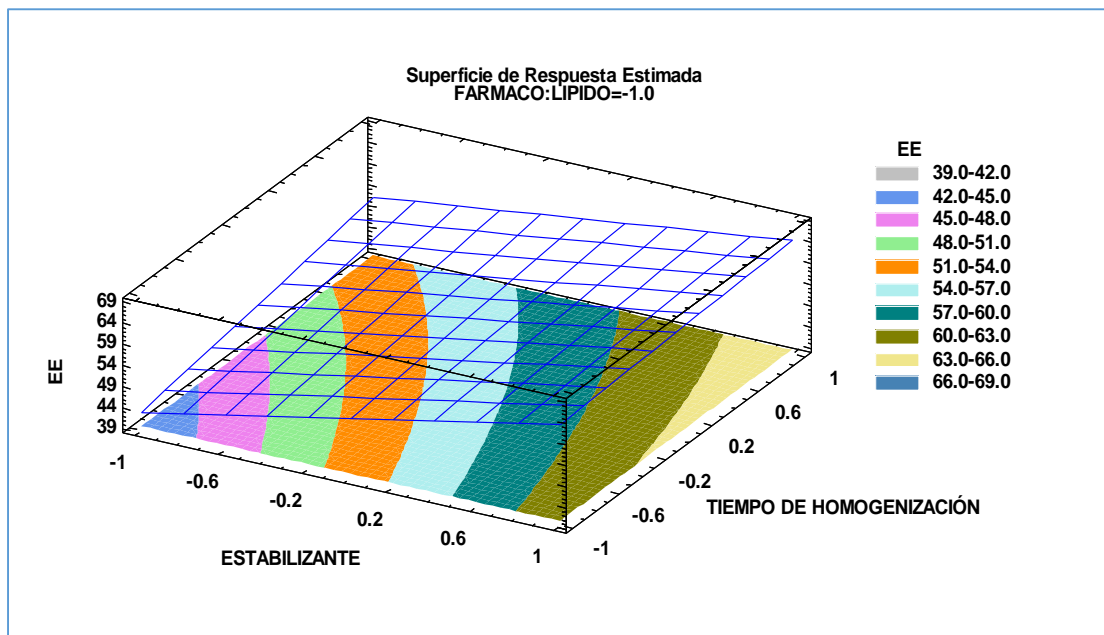


Figura 26. Gráfica de superficie de respuesta de la %EE.

Tabla 18. Resultados del Diseño Experimental 2<sup>3</sup> + 1 punto central.

Formulación	Fármaco:Lípido (mg)	Tween 80 (% w/w)	Tiempo de Homogeneización (min)	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)	%EE	Liberación (µg/cm <sup>2</sup> /h)
1	100:1000	3	20	535 ±3.04	0.57 ±0.02	12 ±0.28	64.4 ±0.63	20.11
2	100:2000	3	10	144 ±5.8	0.65 ±0.00	11 ±0.50	62.0 ±0.84	20.11
3	100:2000	3	20	181 ±12.4	0.55 ±0.03	11 ±0.14	63.6 ±5.0	19.05
4	100:1000	3	10	260 ± 22.6	0.17 ±0.01	12 ±0.14	61.9 ±3.99	21.11
5	100:1000	1	10	221 ±33	0.49 ±0.02	14 ±0.14	41.8 ±1.91	11.61
6	100:1500	2	15	206 ±34.8	0.59 ±0.05	13 ±0.14	58.3 ±10.3	18.19
7	100:2000	1	10	160 ±17.8	0.63 ±0.04	12 ±0	42.7 ±4.30	11.51
8	100:1000	1	20	209 ±3.6	0.50 ±0.02	14 ±0.14	52.7 ±3.41	22.53
9	100:2000	1	20	185 ±12.6	0.53 ±0.04	13 ±0.07	50.9 ±5.64	14.87

Diseño final (los datos representan el promedio ±SD, n=3).

#### 7.4.4 Liberación *in vitro*.

En la tabla 19 se muestra la liberación *in vitro* en celdas de Franz de todas las formulaciones contra su control (blanco).

Tabla 19. Valores de la concentración de fármaco Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de todas las formulaciones (n=3).

Liberación de duloxetina ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )										
Tiempo (h)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	Control
0.5	46.33	46.33	47.96	50.27	45.65	35.73	37.63	38.45	37.36	259.76
1	66.48	74.14	65.42	71.62	73.97	52.24	71.49	65.85	62.96	609.92
2	99.59	99.91	91.81	96.14	113.00	86.75	89.64	94.68	95.37	755.71
4	175.84	176.17	158.65	151.24	159.24	86.88	100.07	112.29	105.20	1108.68
8	299.24	299.57	274.82	301.94	171.63	172.85	159.74	252.37	191.77	1704.24
12	350.90	351.23	328.07	326.41	236.22	213.52	170.13	324.15	233.18	1961.57
24	561.63	561.95	526.46	574.76	375.71	476.14	342.60	581.17	416.51	2134.88

En la Tabla 19 también se puede observar los valores de concentración de fármaco en el medio receptor durante las horas del estudio (24 horas), con estos valores se realizó un gráfico de la concentración Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) contra el tiempo (t) (Figura 27), el cual permitió obtener un perfil de liberación del fármaco (control) y de las formulaciones de SLN. Con estos valores se puede observar la diferencia de liberación, por ejemplo, entre todas las formulaciones y el control se observa una diferencia significativa de liberación de hasta casi 4 veces más por el control a diferencia de todas las formulaciones de SLN (por ejemplo, a las 24 horas la F4 liberó  $574.76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mientras que el control liberó  $2134 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Entre las 9 formulaciones de SLN no se encontró diferencia estadística significativa, pero sí de todas respecto al control. Esto muestra que la matriz lipídica sí está ocasionando una liberación más retardada del fármaco hacia el medio.

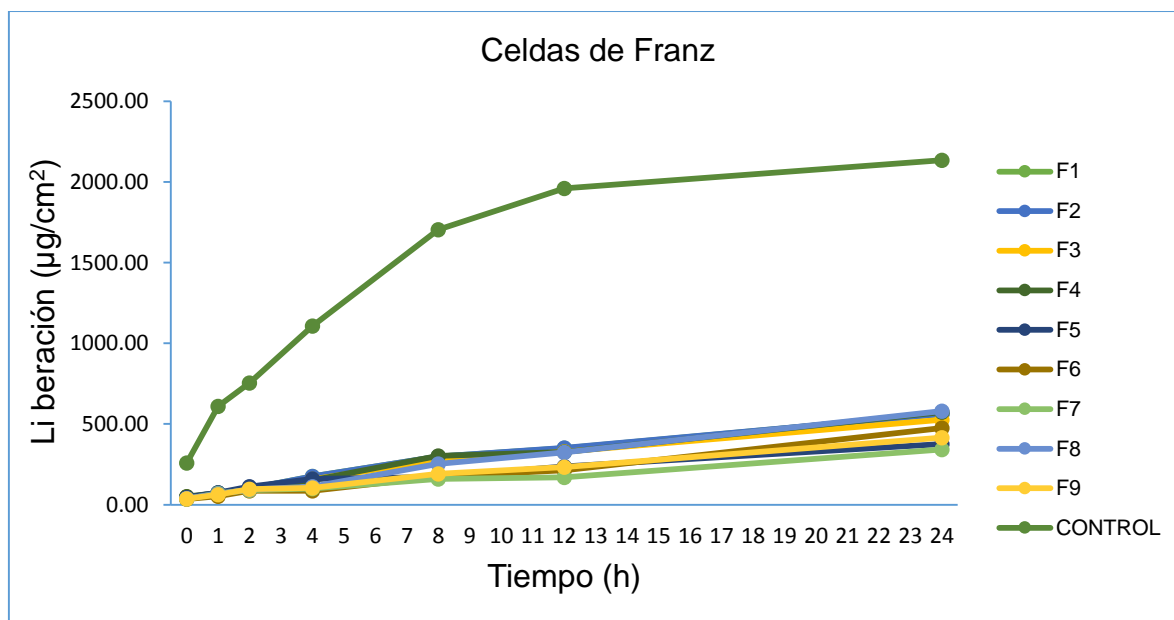


Figura 27. Perfil de liberación de las nueve formulaciones y su control. Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) contra el tiempo (t).

También se realizó el estudio de liberación *in vitro* en vasos de precipitado, los resultados fueron similares a los obtenidos en las celdas de Franz, habiendo una diferencia significativa de todas las formulaciones con respecto al control (línea azul rey), por ejemplo, se puede observar en la tabla 20 que para el control su liberación fue de aproximadamente el 80% (4096.66  $\mu\text{g}$ ) en solo la primer hora del ensayo (este resultado es similar al reportado por Ketan Patel *et al.*, 2012, en donde obtuvieron una liberación para duloxetina también del 80% durante la primer hora de liberación, como control), mientras que las formulaciones a la primer hora habían liberado del 15 al 47%, todas las formulaciones llegaron al 80% liberado a las 24 hrs, esto se hace más visible al ver el gráfico de % de liberación contra el tiempo (t) (Figura 28).

Tabla 20. Valores del % de liberación en vaso de precipitado de todas las formulaciones (n=3).

% Liberación de duloxetine										
Tiempo (hr)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	Control
0.5	7.09	11.47	9.81	10.32	19.47	17.72	22.03	37.10	35.78	70.92
1	14.85	19.65	17.64	18.96	29.97	28.21	33.61	47.74	45.69	81.93
2	25.22	30.06	27.86	29.78	41.22	39.54	44.17	60.23	57.70	90.42
4	39.83	39.68	41.50	44.75	53.10	54.31	55.38	66.14	61.97	96.18
8	59.73	53.67	58.80	65.57	66.90	68.68	68.51	78.56	73.49	
12	67.57	58.44	65.27	76.13	73.84	76.32	72.73	82.41	76.92	
24	86.07	74.11	85.88	86.27	86.75	86.77	83.33	87.57	81.82	

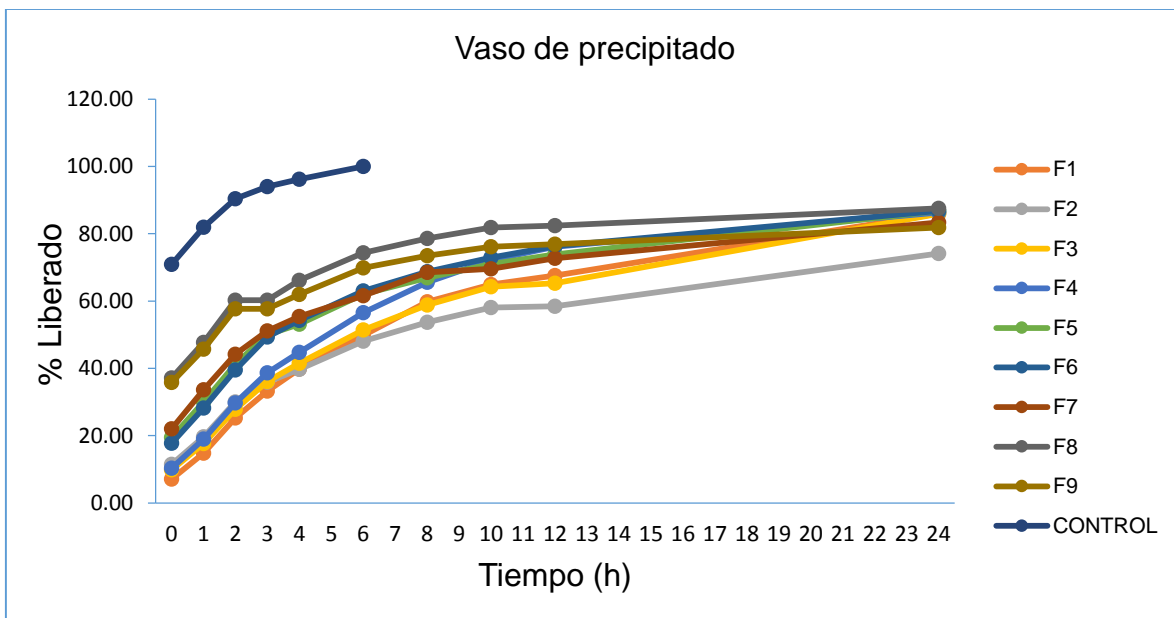


Figura 28. Perfil de liberación de las nueve formulaciones y su control. % liberado contra el tiempo (t).



En la tabla 21 se muestra la cinética de liberación de la formulación 4, se calculó su  $R^2$  en base a 3 modelos distintos, la mayoría de las formulaciones se ajustó mayormente a la cinética tipo Higuchi. Ya que la formulación F4 de SLN tuvo el mayor valor de  $R^2$  (0,9442) para el modelo de Higuchi, el mecanismo para la liberación del fármaco podría ser la difusión del fármaco desde la matriz lipídica y la degradación de lípidos a través de la erosión.

Tabla 21. Cinética de liberación de la formulación 4.

<b>Cinéticas de Liberación</b>			
	<b>Higuchi</b>	<b>Orden 0</b>	<b>Orden 1</b>
<b>m</b>	95. 224	75.683	1.7336
<b>b</b>	3.9314	27. 682	3.2321
<b><math>R^2</math></b>	<b>0.9442</b>	0.7668	0.5653

#### 7.4.5 Permeación *ex vivo*.

En el ensayo de permeación *ex vivo* se utilizó la formulación F4 tomando en cuenta que su tamaño (260 nm) se encontró dentro de los parámetros deseados de entre 200 y 300 nm, tuvo el PDI más bajo de todas las formulaciones (0.17) y presentó una de las más altas eficiencias de encapsulación (61.9 %). Entre la formulación F4 de SLN y su control (Figura 29) se observó una diferencia significativa en la permeación, así lo comprobó también el análisis estadístico, el cual arrojó que entre las dos muestras hay diferencias estadísticamente significativas con un ( $p=0.0056$ ) (Anexo 5). La formulación F4 mostro una permeación más lenta respecto al control durante el tiempo del ensayo (24 horas).

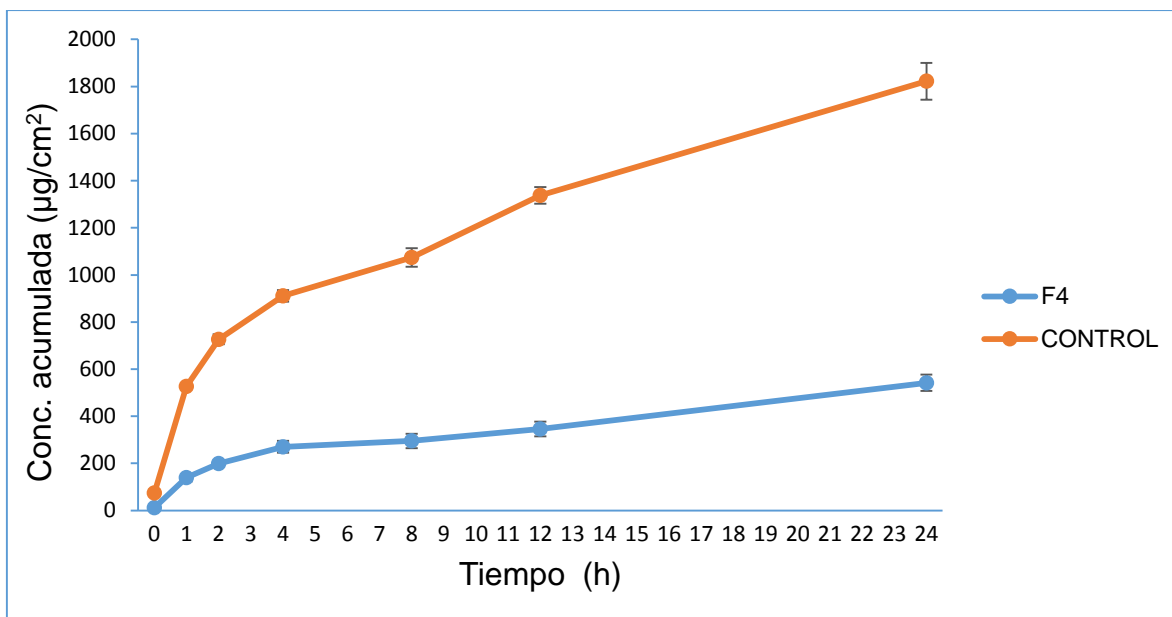


Figura 29. Perfil de permeación de la formulación F4 (azul) contra el control (naranja). Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) contra el tiempo (t).

#### 7.4.6 Caracterización fisicoquímica de las SLN.

##### 7.4.6.1 Difracción de Rayos X de polvos.

A continuación se muestra el espectro de patrón de difracción de las SLN (Figura 30), se comparó con el espectro del Lípido solo, en mezcla con la duloxetina y también se obtuvo un espectro solo del fármaco, esto para determinar y observar la internalización del fármaco dentro de la matriz lipídica, lo cual fue así, ya que al observar el espectro de las SLN (formulación 4) en negro, no se ve ninguna señal característica del fármaco (azul), la cual si está presente en la mezcla física (rojo), esto nos indica que el fármaco se encuentra dentro de la matriz lipídica.

La internalización del fármaco dentro de la matriz lipídica y la consecuente desaparición de sus picos representativos debido a su inclusión dentro de la misma, es algo que señala también Surajit Das *et al.*, 2011, quienes al trabajar con SLN de tretinoína y al realizar sus respectivos patrones de difracción de las SLN, observaron que los picos representativos

del fármaco no se pudieron detectar en el difractograma de las SLN cargados con el fármaco, lo que indica que la tretinoína se solubilizó dentro de la matriz lipídica de SLN.

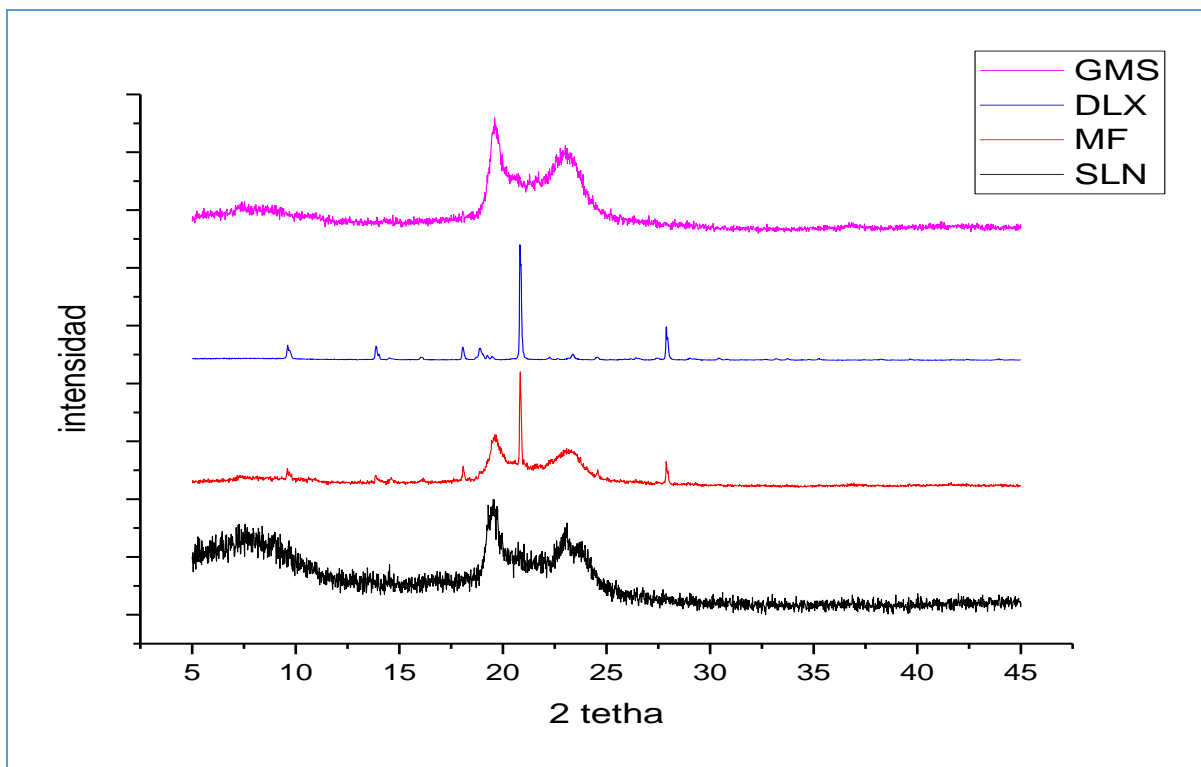


Figura 30. XRDp de GMS (Lípido), DLX (duloxetina), MF (Mezcla física) y SLN (nanopartículas lipídicas sólidas).

#### 7.4.6.2 Espectroscopia FT-infrarroja.

La figura 31 muestra el espectro FT-IR de las nanopartículas lipídicas sólidas. Inicialmente se tomaron diferentes bandas de diagnóstico que permitieran establecer la incorporación del fármaco en las SLN, las bandas que se utilizaron fueron, el grupo  $\text{NH}_2$ , O-H, C=O y C-S que son características de ambos compuestos (Figura 15 y 16). En este sentido el espectro muestra las siguientes señales: FT-IR ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ): 3400 (N-H), 3300 (O-H), 2917 (C-Hsp<sup>2</sup>), 2850 (C-Hsp<sup>3</sup>), 1736 (C=O), 716(C-S). El hecho de que los picos representativos de DLX (Figura 15) se encuentren presentes en el de las SLN, indica la incorporación del fármaco en la matriz lipídica.

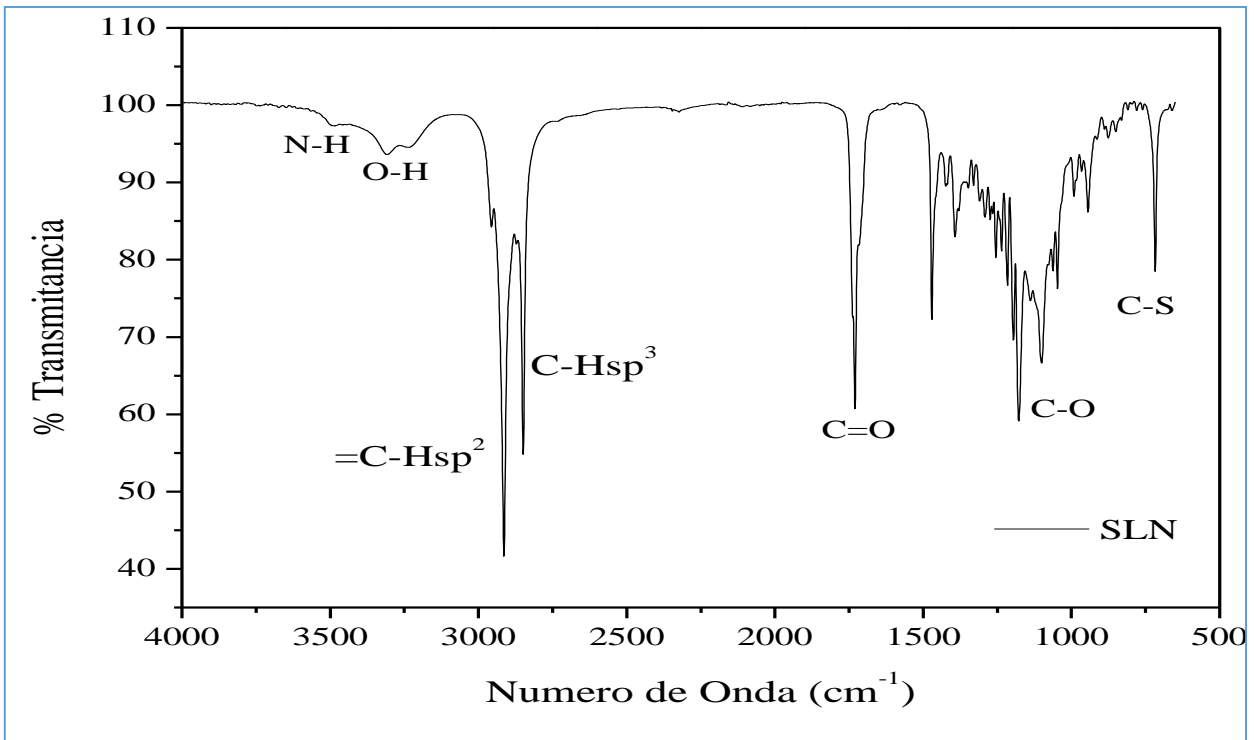


Figura 31. Espectro de FT-IR de las SLN.

## 8.- CONCLUSIONES.

A partir de los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

- ✓ Se hizo un diseño experimental  $2^3$  para obtener y formular SLN y se obtuvieron nanopartículas lipídicas sólidas para ser evaluadas de manera *in vitro* y *ex vivo*.
- ✓ Las nanopartículas obtenidas mostraron tamaños de partícula deseados, entre 200 y 300 nm, buen PDI de 0.17, potencial Z entre 11 y 14 mV y una buena eficiencia de encapsulación.
- ✓ El proceso de fabricación de las nanopartículas lipídicas sólidas de duloxetina HCl fue sencillo.
- ✓ Se validaron los métodos analíticos necesarios para la cuantificación de las muestras obtenidas en las pruebas de liberación *in vitro* y permeación *ex vivo*.
- ✓ Se realizaron estudios de liberación *in vitro* mediante la técnica de Celdas de Franz y con vaso de precipitado. La liberación del blanco (control) contra todas las formulaciones en ambas técnicas fue aproximadamente 4 veces mayor.
- ✓ Se realizó un estudio de permeación *ex vivo* utilizando mucosa nasal de cabra y se comparó con su control, obteniendo diferencias significativas en la permeación y mostrando una liberación controlada por parte de la formulación de nanopartículas lipídicas sólidas.
- ✓ El método de producción de estas nanopartículas lipídicas sólidas probablemente también se puede utilizar para producir nanopartículas con otros fármacos de características similares a la duloxetina HCl.

## 9.- PERSPECTIVAS.

- ✓ El uso de SLN puede ayudar a elevar el potencial de duloxetina HCl en el tratamiento de trastornos de ansiedad generalizados, el dolor causado por la neuropatía diabética o fibromialgia que es para lo que se prescribe, ensayos a nivel *in vivo* serían necesarios para comprobarlo.
- ✓ El uso de fármacos con peso moleculares menores a 1 kDa, con elevada potencia y de carácter hidrofóbico, serian candidatos ideales para ser formulados en SLN, con el mismo método de homogenización en caliente y con las mismas condiciones de operación.
- ✓ Como en el caso de duloxetina HCl que por sus características físico-químicas atraviesa BBB, así mismo podemos formular SLN utilizando fármacos que actúen a nivel del SNC.

## 10.0 REFERENCIAS.

1. Arora, P., Sharma, S., & Garg, S. 2002. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today*. 7:967–975.
2. A.J. Almeida, S. Runge, R.H. Müller. 1997. *Int. J. Pharm.* 149:255–265.
3. Behl, C. R., Pimplaskar, H. K., Sileno, A. P., deMeireles, J., & Romeo, V. D. 1998. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 29:89–116.
4. Benninger, M. S., Hadley, J. A., Osguthorpe, J. D., Marple, B. F., Leopold, D. A., Derebery, M. J., et al. 2004. Techniques of intranasal steroid use. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 130:5–24.
5. Bitter, K. Suter-Zimmermann, C. Surber. 2011. Nasal drug delivery in humans, *Curr. Probl. Dermatol.* 40: 20–35.
6. B. Sarmiento, S. Martins, D. Ferreira, E.B. Souto. 2007. *Int. J. Nanomedicine.* 2:743–749.
7. Brijesh Shah, Dignesh Khunt, Himanshu Bhatt, Manju Misra, Harish Padh. 2015. Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 78:54–66.
8. Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2:17– 71.
9. Bhalekar, M.R., Pokharkar, V., Madgulkar, A., Patil, N., Patil, N. 2009. Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 10:289–296.
10. Cavalli, R., Caputo, O., Gasco, M.R. 1993. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *Int. J. Pharm.* 89: 9–12.
11. Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S., Saettone, M.F. 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.* 238:241–245.
12. Costantino, H. R., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P. H., & Quay, S. C. 2007. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm.* 337:1–24.
13. F.Q. Hu, Y. Hong, H. Yuan. 2004. *Int. J. Pharm.* 273:29–35.

14. Fontana, G., Maniscalco, L., Schillaci, D., Cavallaro, G., Giammona, G. 2005. Solid lipid nanoparticles containing tamoxifen characterization and in vitro antitumoral activity. *Drug Deliv.* 12:385–392.
15. Garzón S., María de Lourdes; Vázquez R., María Luisa; Villafuerte R., Leopoldo; García F., Beatriz; Hernández L., Alejandra. 2009. Efecto de los componentes de la formulación en las propiedades de las nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 40:26-40.
16. Graff, C. L., & Pollack, G. M. 2005. Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharm Sci.* 94:1187–1195.
17. H. Heiati, R. Tawashi, N.C. Phillips. 1998. *J. Microencapsul.* 15:173–184.
18. H. Reithmeier, J. Herrmann, A. Göpferich. 2001. *Int. J. Pharm.* 218:133–143.
19. Irving, B. 2007. Nanoparticle drug delivery systems. *Inno. Pharm. Biotechnol.* 24:58–62.
20. Illum, L., 2000. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:1–18.
21. Illum, L. 2003. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *J Control Release.* 87:187–198.
22. Illum, L. 2004. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol.* 56:3–17.
23. Illum, L. 1996. Nasal delivery. The use of animal models to predict performance in man. *J Drug Target.* 3:427–442.
24. Illum, L. 2012. Nasal drug delivery – recent developments and future prospects, *J Control. Release.* 161:254–263.
25. Jain, D., Banerjee, R. 2008. Comparison of ciprofloxacin hydrochloride loaded protein, lipid, and chitosan nanoparticles for drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 86:105–112.
26. Jain, A., Jain, S.K., Ganesh, N., Barve, J., Beg, A.M. 2009. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomed.* 6:179–190.
27. Jennings, V., Gysler, A., Schafer-Korting, M., Gohla, S. 2000. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49:211–218.
28. J. Liu, W. Hu, H. Chen, Q. Ni, H. Xu, X. Yang. 2007. *Int. J. Pharm.* 328:191.



29. Jores K, Mehnert W., Bunjes H., Drechsler M., Mäder K. 2003. From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons. Visions and reality of colloidal lipid dispersions. Controlled release Society, 30th *Annual Meeting proceedings*.
30. Kaur, I.P., Bhandari, R. 2013. Solid lipid nanoparticles entrapping hydrophilic/amphiphilic drug and a process for preparing the same. WO 2013/105101 A1.
31. K. Manjunath, V. Venkateswarlu. 2005. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration, *J. Control. Release*. 107:215–228.
32. K. Jadhav, M. Gambhire, I. Shaikh, V.J. Kadam, S.S. Pisal. 2007. Nasal drug delivery system-factors affecting and applications. *Curr. Drug Ther*. 2:27–38.
33. Kilts, C.D. 2003. Potential new drug delivery system for antidepressants: an overview. *J. Clin. Psychiatry*. 64:31–33.
34. Labiris, N. R., & Dolovich, M. B. 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol*. 56:588–599.
35. Lantz, R.J., Gillespie, T.A., Rash, T.J., Kuo, F., Skinner, M., Kuan, H.Y., Knadler, M.P. 2003. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects. *Drug Metab. Dispos*. 31:1142–1150.
36. Lide Arana, Clarisa Salado, Sandra Vega, Oier Aizpurua-Olaizola, Igor de la Arada, Tatiana Suarez, Aresatz Usobiaga, José Luis R. Arrondo, Alicia Alonso, Félix M. Goñi, Itziar Alkorta. 2015. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.135: 18-26.
37. Lin, H., Yoo, J. W., Roh, H. J., Lee, M. K., Chung, S. J., Shim, C. K., et al. 2005. Transport of anti-allergic drugs across the passage cultured human nasal epithelial cell monolayer. *Eur J Pharm Sci*. 26:203–210.
38. M. Chaszczewska-Markowska, K. Stebelska, A. Sikorski, J. Madej, A. Opolski, M. Ugorski, *Cancer Lett*. 2008. 262:164–172.
39. McMartin, C., Hutchinson, L. E., Hyde, R., & Peters, G. E. 1987. Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J Pharm Sci*. 76:535–540.
40. Mehnert, W., Mäder, K. 2012. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 47:165–196.

41. Mehnert, W., Mader, K. 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliver Rev.* 47:165–196.
42. Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., Shah, S.P. 2003. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6:252–273.
43. Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. 1990. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* 297:1–13.
44. Müller RH, Mäde K, Gohla S. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 50:161-77.
45. Müller RH, Shegokar R, Keck CM. 2011. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol.* 8:207-27.
46. Muller, R.H., Runge, S.A. 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. In: Benita, S. (Ed.), *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery.* Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 219–234.
47. Panga, X., Cui, F., Tian, J., Chen, J., Zhou, J., Zhou, W. 2009. Preparation and characterization of magnetic solid lipid nanoparticles loaded with ibuprofen. *Asian J. Pharm. Sci.* 4:132–137.
48. Pardakhty, J. Varshosaz, A. Rouholamini. 2007. *Int. J. Pharm.* 328:130–141.
49. P. Broz, N. Ben-Haim, M. Grzelakowski, S. Marsch, W. Meier, P. Hunziker. 2008. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51:246–252.
50. Patel, S., Chavhan, S., Soni, H., Babbar, A.K., Mathur, R., Mishra, A.K., Sawant, K.K. 2011. Brain targeting of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles by intranasal route. *J. Drug Target.* 19:468–474.
51. Pandey, R., Khuller, G.K. 2005. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 85:227–234.
52. Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcao, A. 2009. Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J Pharm Pharm Sci.* 12:288–311.
53. Pople P. V., Singh K. K. 2006. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech.* 7 (4) artículo 91.
54. Reddy, L.H., Murthy, R.S.R. 2005. Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: formulation, characterization, in vitro drug release, and stability evaluation. *AAPs PharmSciTech.* 6:158–166.

55. R.H. Müller, S. Runge, V. Ravelli, W. Mehnert, A.F. Thünemann, E.B. Souto. 2006. *Int. J. Pharm.* 317:82–89.
56. R.H. Muller, S.A. Runge, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery, in: S. Benita (Ed.), *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*. 1998. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 219–234.
57. Ruckmani, K., Sivakumar, M., Ganeshkumar, P.A. 2006. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6:2991–2995.
58. Sacheen Kumar, Jaspreet Kaur Randhawa. 2013. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles *Materials Science and Engineering C* 33:1842–1852.
59. S. Grassin-Delyle, A. Buenestado, E. Naline, C. Faisy, S. Blouquit-Laye, L. Couderc, M. Le Guen, M. Fischler, P. Devillier. 2012. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids, *Pharmacol. Ther.* 134:366–379.
60. Sanna, V., Gavini, E., Cossu, M., Rassu, G., Giunchedi, P. 2007. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 59:1057–1064.
61. Sarmiento, B., Martins, S., Ferreira, D., Souto, E.B. 2007. Oral insulin delivery by means of solid lipid Nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2:743–749.
62. Scheibe, M., Bethge, C., Witt, M., & Hummel, T. 2008. Intranasal administration of drugs. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 134:643–646.
63. Serpe, L., Catalano, M.G., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R., Muntoni, E., Frairia, R., Gasco, M.R., Eandi, M., Zara, G.P. 2004. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58:673–680.
64. Shah, M., Pathak, K. 2010. Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 23 full-factorial design. *AAPS PharmSciTech.* 11:489–496.
65. Singh, S., Dobhal, A.K., Jain, A., Pandit, J.K., Chakraborty, S. 2010. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: zidovudine. *Chem. Pharm. Bull.* 58:650–655.
66. Sinha VR, Kumria R, Bhinge JR. Stress degradation studies on duloxetine hydrochloride and development of an RP-HPLC method for its determination in capsule formulation. 2009. *J Chromatogr Sci.* 47:589–93.
67. Souto, E.B., Muller, R.H. 2005. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *J. Microencapsul.* 22:501–510.

68. Souto, E.B., Wissing, S.A., Barbosa, C.M., Muller, R.H. 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278:71–77.
69. Storni, T., Kundig, T.M., Senti, G., Johansen, P. 2005. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:333–355.
70. Subedi, R.K., Kang, K.W., Choi, H.K. 2009. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 37:508–513.
71. Surajit Dasa, Wai Kiong Nga, Parijat Kanaujiaa, Sanggu Kima, Reginald B.H. Tana,b. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. 2011. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 88:483– 489.
72. Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H.P., Gander, B. 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:357–376.
73. T. Betancourt, B. Brown, L. Brannon-Peppas. 2007. *Nanomedicine.* 2:219–232.
74. Thorne, R.G., Frey, W.H. 2001. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system. *Clin. Pharmacokin.* 40:907-946.
75. Vobalaboina V, Koppam M. 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release.* 95:627–638.
76. Wolfgang Mehnert, Karsten Mader. 2001. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications *Advanced Drug Delivery Reviews.* 47:165–196.
77. Wong, H.L., Rauth, A.M., Bendayan, R.A., Manias, J.L., Ramaswamy, M., Liu, Z., Erhan, S.Z., Wu, X.Y. 2006. New polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.* 23:1574–1585.
78. Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W., Yang, C.Z. 1999. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Contr. Rel.* 59:299–307.
79. Y. Ozsoy, S. Gungor, E. Cevher. 2009. Nasal delivery of high molecular weight drugs, *Molecules.* 14:3754–3779.
80. Y. Zhao, B.G. Trewyn, I.I. Slowing, V.S.Y. Lin, J. Am. 2009. *Chem. Soc.* 131:8398–8400.
81. Zhang, L., Pornpattananankul, D., Hu, C.M.J., Huang, C.M. 2010. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr. Med. Chem.* 17: 585–594.

82. Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai. 2008. *Cancer Res.* 68:6652–6660.
83. zur Muhlen, A., Mehnert, W. 1998. Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles. *Pharmazie.* 53:552–555.

## 11.0 ANEXOS.

### ANEXO 1.

Obtención de la mucosa nasal de cabra.

A continuación se muestran imágenes de donde se obtuvo la mucosa nasal de la cabra.



ANEXO 2.

Datos del C.V % en la validación del método para determinación del %EE.

Conc. ug/mL	Mediciones	D.E	Media	%C.V
10	0.1892			
10	0.1854	0.0020	0.188	1.042
10	0.1881			
20	0.3544			
20	0.3594	0.0025	0.357	0.701
20	0.3568			
30	0.5572			
30	0.5448	0.0062	0.551	1.127
30	0.5517			
40	0.7257			
40	0.7278	0.0011	0.727	0.149
40	0.7263			
50	0.9005			
50	0.9016	0.0043	0.904	0.480
50	0.9085			
60	1.0754			
60	1.0835	0.0045	1.081	0.413
60	1.0827			

D.E = Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación

ANEXO 3.

Datos del C.V % en la validación para los ensayos *in vitro*.

Conc. ug/mL	Mediciones	D.E	Media	%C.V
10	0.176			
10	0.182	0.0033	0.180	1.8503
10	0.181			
20	0.354			
20	0.365	0.0055	0.358	1.5323
20	0.357			
30	0.526			
30	0.531	0.0057	0.532	1.0644
30	0.538			
40	0.711			
40	0.715	0.0052	0.715	0.7313
40	0.721			
50	0.913			
50	0.912	0.0074	0.908	0.8187
50	0.899			
60	1.064			
60	1.088	0.0126	1.078	1.1734
60	1.082			

D.E = Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación



ANEXO 4.

Datos del C.V % en la validación del ensayo *ex vivo*.

Conc. ug/mL	Mediciones	D.E	Media	%C.V
10	0.182			
10	0.185	0.0015	0.0015	0.183
10	0.183			
20	0.386			
20	0.387	0.0038	0.0038	0.385
20	0.380			
30	0.558			
30	0.558	0.0022	0.0022	0.559
30	0.562			
40	0.740			
40	0.760	0.0128	0.0128	0.746
40	0.737			
50	0.929			
50	0.926	0.0081	0.0081	0.923
50	0.914			
60	1.107			
60	1.116	0.0079	0.0079	1.108
60	1.100			

D.E = Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación

ANEXO 5.

Prueba de permeación *ex vivo*.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>F4</i>	<i>CONTROL</i>
Media	257.533844	924.7735458
Varianza	28069.361	319970.5876
Observaciones	7	7
Varianza agrupada	174019.974	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-2.9923773	
P(T<=t) una cola	0.00561229	
Valor crítico de t (una cola)	1.78228756	
P(T<=t) dos colas	0.01122458	
Valor crítico de t (dos colas)	2.17881283	

Como podemos observar, el ensayo de permeación *ex vivo* entre la formulación F4 y el control fue estadísticamente significativo ( $p=0.00561229$ ).