



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

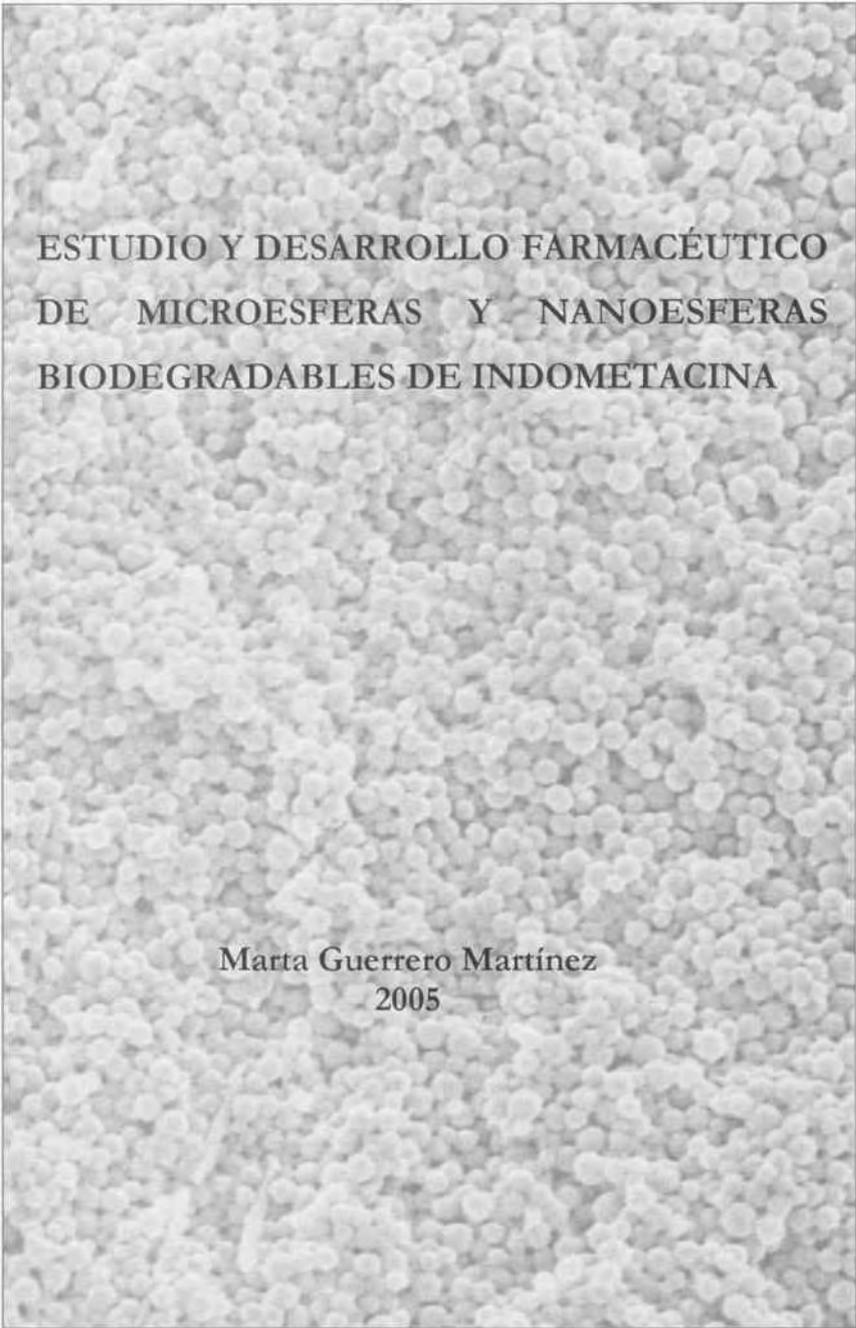
## Estudio y desarrollo farmacéutico de microesferas y nanoesferas biodegradables de indometacina

Marta Guerrero Martínez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**ESTUDIO Y DESARROLLO FARMACÉUTICO  
DE MICROESFERAS Y NANOESFERAS  
BIODEGRADABLES DE INDOMETACINA**

**Marta Guerrero Martínez  
2005**



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA

UNITAT DE TECNOLOGIA FARMACÈUTICA DEPARTAMENT DE  
FARMÀCIA Y TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

ESTUDIO Y DESARROLLO FARMACÉUTICO DE  
MICROESFERAS Y NANOESFERAS BIODEGRADABLES  
DE INDOMETACINA

Programa de doctorat: Ciència i Tecnologia Farmacèutica (Bien 97-99)

Tutor de la tesi: Prof. Dr. Josep Ramon Ticó Grau

Directors de la Tesi:

Prof. Dr. Josep Maria Suñé Negre

Prof. Dr. Josep Ramon Ticó Grau

Prof. Dra. Montserrat Miñarro Carmona

Memòria presentada per a optar al títol de Doctor en Farmacia

que presenta Marta Guerrero Martínez

Barcelona, Juliol del 2005

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701216139



El trabajo realizado ha generado las siguientes publicaciones:

- Guerrero M, Miñarro M, Suñé-Negre JM, Ticó JR. Influencia de los parámetros de proceso en la fabricación de nanopartículas de PLGA. Libro de comunicaciones del III Congreso Hispano-Luso de Liberación Controlada de Medicamentos. 6-9 de Septiembre 1998, Lisboa (Portugal).
- Guerrero M, Orriols A, Miñarro M, Roig A, Ticó JR, Suñé-Negre JM. Microencapsulación: Aplicaciones en la Industria Alimentaria. *Ibérica* (1999) 415, 49-53.
- Guerrero M, Miñarro M, Suñé-Negre JM, Ticó JR. Optimization of microsphere formulation by means of a factorial design. *Proceedings of the 26<sup>th</sup> Int. Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*. 20-23 de Junio 1999, Boston (EUA).
- Guerrero M, Miñarro M, Suñé-Negre JM, Ticó JR. Preparation, optimization and characterization of PLGA microspheres. *Proceedings of the 28<sup>th</sup> Int. Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*. 24-27 de Junio 2001, San Diego (EUA).
- Guerrero M, Oliva M, Pérez P, Miñarro M, Suñé-Negre JM, Ticó JR. New cost-effective environmentally benign preparation of nanoparticles. *Proceedings of the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*. 18-22 de Junio 2005, Miami (EUA).

## Agraïments

Aquests treball es va iniciar el març del 1997, tot just acabar la tesina al Departament de Química Orgànica i gràcies a en JR Ticó, qui em va parlar de les microcàpsules i em va obrir una curiositat que m'ha portat fins aquí. Et vull agrair que m'oferissis la oportunitat de formar part del grup de treball format juntament per en Josep M<sup>a</sup> Suñé i la Montse Miñarro. Gràcies a tots tres per "ensenyar-me el camí".

També vull agrair-vos la oportunitat de permetre'm realitzar la tesi malgrat no hagi estat a temps complert, perquè vosaltres feu possible que els que estem treballant puguem fer un doctorat sense haver, per això, de renunciar a una trajectòria laboral fora de l'àmbit acadèmic.

Vull agrair també a tots els companys i amics del departament i SDM per les bones estones compartides, molt especialment a l'Encarna i a la Rosa, que faríem sense vosaltres dues!

També agrair a tots els que han participat "en pròpia pell" de l'experiència de l'encapsulació: la Laura, Marià i Mauren.

Unes GRÀCIES en majúscules per l'Anna Orriols. Segur que si te la llegeixes podràs recitar parts de memòria! Gràcies perquè sense tú no l'hauria acabat!!

Gràcies també a la Mireia, per la paciència que has tingut amb mi, per tot el què he après al teu costat i per les hores que has dedicat a aquest treball.

També vull agrair a en Toni Boix i en Benjamín Santos, pel seu ajut farmacocinètic. Gràcies també a tots els meus companys del CIDF de Ferrer Internacional, als membres del DRDC per les bones -textualment- estones compartides, a la meva "sòcia" Eva pel teu suport i amiatat, i molt especialment a l'Alfons Romero i Antonio Guglietta, perquè sense la seva empenta no hauria pogut acabar.

Aquest treball el dedico als meus pares Carme i Marià, al Jordi i la Lina, Trini i Jeroni, a l' Albert i Sue, i per últim al Carles, per introduir-me junt amb en Paul en el món de la Green Chemistry, però sobretot per la teva santa paciència i per ser el meu amic i marit.

**Gràcies a tots... *for being here!***

---

## ÍNDICE

---

GLOSARIO	i
PRÓLOGO	1
OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Introducción	5
1.1. Sistemas nanoparticulares	5
1.1.1. Aplicaciones	6
1.1.2. Ventajas e inconvenientes	8
1.1.3. Métodos de elaboración de nanopartículas	9
1.1.3.1. Emulsificación espontánea-difusión de disolvente	10
1.1.3.2. Salificación o <i>Salting out</i>	15
1.2. Polímeros biodegradables	16
1.2.1. Copolímeros biodegradables de ácido láctico y glicólico	17
1.3. Caracterización de nanopartículas	19
1.3.1. Tamaño y morfología	20
1.3.1.1. Microscopía óptica	20
1.3.1.2. Microscopía electrónica	20
1.3.1.3. Difracción láser	21
1.3.1.4. Espectroscopía de correlación fotónica	22
1.3.2. Liberación <i>in vitro</i>	22
1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido	27
1.3.4. Espectroscopía de infrarrojos	28

1.3.5. <sup>1</sup> H-Resonancia magnética nuclear	29
1.3.6. Difracción de rayos X	31
1.3.7. Microscopía de fuerza atómica	32
1.3.8. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X	34
1.3.9. Potencial zeta	36
1.4. Disolventes alternativos	37
1.5. Terapia antiinflamatoria	39
1.5.1. Mecanismo de acción	39
1.5.2. Principales grupos de AINE	41
1.5.3. Efectos adversos de los AINE	41
1.5.4. Indometacina	43
1.5.4.1. Caracterización físico-química	43
1.5.4.2. Acción farmacológica	47
1.5.4.3. Reacciones adversas	48
1.5.4.4. Formas farmacéuticas comercializadas	48

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>2. Materiales</b>	<b>49</b>
2.1. Principio activo	49
2.2. Excipientes y materiales auxiliares	49
2.3. Equipos	50
2.4. Software específico	52
<b>3. Métodos</b>	<b>53</b>
3.1. Cálculos de evaluación de procesos	53
3.1.1. Contenido teórico en principio activo	53
3.1.2. Cantidad de principio activo encapsulado	53
3.1.3. Contenido en principio activo en las nanoesferas	53
3.1.4. Eficacia de encapsulación	54
3.1.5. Rendimiento total del proceso de encapsulación	54
3.2. Características morfométricas	54
3.2.1. Microscopía óptica	54
3.2.2. Difracción láser	54
3.2.3. Microscopía electrónica de barrido	55
3.3. Calorimetría diferencial de barrido	55

---

3.4. Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	56
3.4.1. Preparación del medio de disolución	56
3.4.2. Preparación de los sacos de diálisis	56
3.4.3. Cálculos para el ensayo de liberación <i>in vitro</i>	57
3.4.4. Cálculos de MDT y ajustes de los datos de liberación <i>in vitro</i>	57
3.5. Liofilización	58
3.5.1. Preparación de las muestras	58
3.5.2. Condiciones de liofilización	58
3.6. Difracción de Rayos X	59
3.7. Microscopía de Fuerza Atómica	60
3.7.1. Preparación de las muestras	60
3.7.2. Medidas de tamaño de partícula	61
3.8. Espectroscopía de fotoelectrones X	62
3.9. Potencial Zeta	64

## RESULTADOS

<b>4. Puesta a punto de los métodos de elaboración de nanoesferas</b>	<b>65</b>
4.1. Estudio del efecto de la concentración de fármaco sobre el tamaño de partícula	65
4.2. Estudio del efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño de partícula	67
4.3. Estudio de la influencia de la concentración de coadyuvante en el tamaño de partícula	69
4.4. Estudio de la influencia de la velocidad de agitación en el tamaño de partícula	72
4.5. Estudio del efecto de la relación de volumen de las fases sobre el tamaño de partícula	73
4.6. Estudio de la influencia del tipo de disolvente en el tamaño de partícula	75
4.7. Estudio del efecto de la concentración de sal en la viscosidad	77

---

4.8. Lavado de las nanoesferas: método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente	79
4.9. Lavado de las nanoesferas: método de salificación	80
4.10. Separación de las nanoesferas	81
4.11. Determinación de la cantidad de principio activo encapsulado	82
4.12. Estudio del cambio de coadyuvante en la técnica de emulsificación espontánea-difusión de disolvente	86
4.12.1. Hidroxipropilmetilcelulosa	87
4.12.2. Poloxámero 188	90
4.12.3. Quitosano	94
4.13. Puesta a punto de los parámetros de proceso para el diseño factorial de la serie "F": comparación de métodos	96
4.13.1. Selección de los parámetros de proceso y condiciones experimentales	96
4.13.2. Ajuste de los parámetros de proceso para evitar la formación de cristales	100
4.14. Puesta a punto del proceso de liofilización	106
4.14.1. Caracterización morfométrica	106
4.14.2. Efecto de la liofilización sobre el valor de pH	109
4.14.3. Agregación y resuspensión de los liofilizados	110
<b>5. Validación del método analítico</b>	<b>113</b>
5.1. Control de disolventes	114
5.2. Selectividad	115
5.3. Precisión	116
5.3.1. Repetibilidad del sistema instrumental	116
5.3.2. Repetibilidad del método	117
5.3.2.1. Repetibilidad de la solución patrón	117
5.3.2.2. Repetibilidad de la solución problema	118
5.3.3. Precisión intermedia	118
5.4. Exactitud	120
5.4.1. Exactitud de la solución patrón	120
5.4.2. Exactitud de la solución problema	121
5.5. Linealidad	122
5.6. Límite de detección y de cuantificación	129

---

5.7. Robustez	131
5.8. Estabilidad de la solución	135
<b>6. Diseño factorial serie "D"</b>	<b>139</b>
6.1. Eficacias de encapsulación	143
6.2. Características morfométricas	144
6.3. Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	150
6.4. Análisis estadístico del diseño factorial serie "D"	155
6.4.1. Matriz de respuesta del tamaño medio de las nanoesferas	155
6.4.2. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tamaño medio de partícula	158
6.4.3. Respuesta óptima para el tamaño medio de las nanoesferas	160
6.4.4. Matriz de respuesta de la eficacia de encapsulación de las nanoesferas	161
6.4.5. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre la eficacia de encapsulación	164
6.4.6. Respuesta óptima para la eficacia de encapsulación	165
6.4.7. Matriz de respuesta para el tiempo medio de disolución de las nanoesferas	166
6.4.8. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tiempo medio de disolución	169
6.4.9. Respuesta óptima para el tiempo medio de disolución	170
6.5. Análisis estadístico de la robustez del diseño factorial serie "D"	171
6.5.1. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tamaño medio de las nanoesferas	172
6.5.2. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos de la eficacia de encapsulación	174
6.5.3. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tiempo medio de disolución	176
<b>7. Diseño factorial serie "S"</b>	<b>179</b>
7.1. Eficacias de encapsulación	183
7.2. Viscosidad	184

---

7.3. Características morfométricas	185
7.4. Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	190
7.5. Análisis estadístico del diseño factorial serie "S"	194
7.5.1. Matriz de respuesta del tamaño medio de las nanoesferas	194
7.5.2. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tamaño medio de partícula	197
7.5.3. Respuesta óptima para el tamaño medio de las nanoesferas	198
7.5.4. Matriz de respuesta de la eficacia de encapsulación de las nanoesferas	199
7.5.5. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre la eficacia de encapsulación	201
7.5.6. Respuesta óptima para la eficacia de encapsulación	203
7.5.7. Matriz de respuesta para el tiempo medio de disolución de las nanoesferas	204
7.5.8. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tiempo medio de disolución	208
7.5.9. Respuesta óptima para el tiempo medio de disolución	207
7.6. Análisis estadístico de la robustez del diseño factorial serie "S"	208
7.6.1. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tamaño medio de las nanoesferas	209
7.6.2. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos de la eficacia de encapsulación	211
7.6.3. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tiempo medio de disolución	214
<b>8. Diseño factorial serie "F"</b>	<b>217</b>
8.1. Elección de las condiciones y factores del diseño factorial serie "F"	217
8.2. Realización experimental del diseño factorial serie "F"	218
8.3. Eficacias de encapsulación	223
8.4. Características morfométricas	224
8.5. Ensayo de liberación <i>in vitro</i>	229
8.6. Viscosidad	232

---

8.7. Análisis estadístico del diseño factorial "serie F"	233
8.7.1. Matriz de respuesta del tamaño medio de las nanoesferas	234
8.7.2. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tamaño medio de partícula	236
8.7.3. Respuesta óptima para el tamaño medio de las nanoesferas	238
8.7.4. Matriz de respuesta de la eficacia de encapsulación de las nanoesferas	239
8.7.5. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre la eficacia de encapsulación	241
8.7.6. Respuesta óptima para la eficacia de encapsulación	242
8.7.7. Matriz de respuesta de la viscosidad	243
8.7.8. Respuesta óptima para la viscosidad	246
<b>9. Proceso de fabricación verde aplicado a la obtención de nanoesferas</b>	<b>247</b>
9.1. Optimización del método de elaboración de nanoesferas en la serie F / acetato de etilo	250
9.2. Eficacias de encapsulación	252
9.3. Características morfométricas	255
9.4. Potencial zeta	257
9.5. Calorimetría diferencial de barrido	259
9.6. Difracción de rayos X	263
9.7. Espectroscopía de infrarrojo	267
9.8. <sup>1</sup> H-Resonancia magnética nuclear	273
9.9. Ensayos de liberación <i>in vitro</i> y ajuste a modelos matemáticos	279
9.10. Microscopía de fuerza atómica	290
9.11. Espectroscopía de fotoelectrones X	297
9.11.1. Cuantificación del material de cubierta por XPS	304
9.12. Liofilización de las muestras	309
9.13. Osmolalidad de las formulaciones	312
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>315</b>

---

**CONCLUSIONES**

325

**BIBLIOGRAFÍA**

329

---

## GLOSARIO

---

AAPS	American Association of Pharmaceutical Sciences
AcOEt	Acetato de etilo
AFM	Atomic force microscopy
AIC	Akaike information criterion
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ANOVA	Análisis de la varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BE	Binding Energy
CV	Coeficiente de variación
DS	Desviación estándar
DSC	Differential scanning calorimetry
DW	Durvin-Watson
EE	Eficacia de encapsulación
ESCA	Electron spectroscopy for chemical analysis
F	Valor de la distribución de Snedecor- Fisher
FDA:	Food and Drug Administration
F.Eur	Farmacopea Europea
FTIR:	Fourier transformed infrared spectroscopy
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
HOPG	Highly oriented pyrolytic graphite
HPLC	High performance liquid chromatography
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HR	Humedad relativa
ICH	Internacional Conference Harmonization
IR	Infrared spectroscopy
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry

---

LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MeOH	Metanol
MRT	Mean residence time
PCS	Photon correlation spectroscopy
PGA	Poly-glycolic acid
PLA	Poly-lactic acid
PLGA	Poly-lactide-co-glycolide acid
PVA	Polyvinyl alcohol
r	Coeficiente de correlación
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinación
RX	Rayos X
S <sub>n-1</sub>	Desviación estándar para n-1 elementos
SBC	Schwartz Bayesian criterion
SD	Standard deviation
SEM	Scanning electron microscopy
SESDM	Spontaneous emulsification solvent diffusion method
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
TEM	Transmission electron microscopy
THF	Tetrahidrofurano
UHV	Ultra high vacuum
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
ζ	Potencial zeta

## *Prólogo*

---

La investigación y el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación modificada están experimentando en los últimos años un gran interés por parte de la comunidad científica. Este interés se ha intensificado en la última década debido a que los recortes en los gastos de la sanidad pública exigen costes más bajos y una mayor eficacia de los medicamentos. Para cubrir esta demanda e intentar optimizar su actividad, algunos de los principios activos más empleados se están reformulando en forma de sistemas de liberación modificada. Aparte del sector farmacéutico, este campo también ha despertado interés en el sector de la cosmética, agricultura, alimentación y químico, donde la gran competencia del mercado exige la aparición de nuevas técnicas de recubrimiento que permitan aumentar la efectividad de principios activos al menor coste posible.

Es un hecho conocido que la administración de un fármaco puede producir efectos indeseados en otras zonas del organismo. En cambio, el transporte a un lugar específico permite lograr que una concentración adecuada de principio activo se mantenga por periodos prolongados de tiempo en el lugar diana y esto conlleva la disminución de efectos adversos asociados a los bajos niveles plasmáticos en sangre periférica. Por este motivo, el principal objetivo del transporte de sustancias activas es el de reducir la cantidad total de principio activo administrado, así como el de optimizar su actividad.

Estas aproximaciones implican la modificación del perfil farmacocinético de los principios activos a través de su incorporación



en sistemas coloidales microparticulares (microcápsulas y microesferas) y nanoparticulares, tales como los liposomas, las nanocápsulas y las nanoesferas (Edman 1985, Suñé-Negre 2004).

Actualmente, las técnicas de microencapsulación y nanoencapsulación son las más empleadas en el desarrollo y producción de principios activos de liberación modificada. Sin embargo, estos métodos poseen unas limitaciones, que es lo que ha frenado su aplicación a nivel industrial. Uno de los principales problemas es que la mayoría de estas técnicas precisan de disolventes orgánicos para disolver los polímeros formadores de cubierta. Estos disolventes, una vez ha finalizado la encapsulación del activo, deben eliminarse mediante un proceso de evaporación. Esto supone que los disolventes de elección sean los que presentan un punto de ebullición más bajo, es decir, la familia de los organoclorados.

La idoneidad de esta familia de disolventes por su eficiencia en cuanto a su capacidad de solubilizar principios activos y polímeros y su facilidad de evaporación contrasta con su peligrosidad para el medio ambiente y la salud humana. El descubrimiento de estas propiedades indeseables, intrínsecas a la mayoría de los disolventes pertenecientes a la familia de los organoclorados, han resultado en la elaboración de numerosas recomendaciones, normas y proyectos de directivas (p. ej. ICH Q3C) para limitar su uso o sustituirlos por otros disolventes alternativos. En el sector farmacéutico, en el que el registro de nuevos medicamentos pasa por el cumplimiento de todas las regulaciones internacionales en materia de seguridad de fármacos, medio ambiente, calidad, etc., se hace absolutamente necesario adoptar estrategias que eviten el uso de disolventes organoclorados.

El diseño de procesos químicos que eliminan o reducen el uso o la generación de sustancias peligrosas (*Química Verde*) se ha venido aplicando con excelentes resultados en síntesis de principios activos desde 1990 (Anastas y Warner 1998).

En el presente trabajo se han introducido los principios de la *química verde* para el desarrollo de un método de formulación de nanoesferas que evita el uso de disolventes organoclorados.

## *Objetivos*

---

El objetivo del presente trabajo se basa en el desarrollo de una formulación con un principio activo muy potente, pero de limitado uso en la praxis clínica habitual debido a sus graves efectos secundarios.

Se ha escogido como fármaco la indometacina con indicación en las afecciones reumáticas y artrosis, con la finalidad de intentar modificar las características de biodisponibilidad y conseguir una acción modificada tras la administración de un inyectable intraarticular. Esta mejora se pretende abordar a través de la administración de un inyectable de liberación modificada que contenga la indometacina en forma de nanoesferas biodegradables.

Para ello se han fijado 5 objetivos concretos:

- 1- Investigación y puesta a punto de dos métodos de nanoencapsulación de indometacina.
- 2- Nanoencapsulación de la indometacina.
- 3- Optimización del método de nanoencapsulación: aplicación de un proceso de *fabricación verde*.
- 4- Caracterización de las nanoesferas, incluyendo la aplicación de técnicas instrumentales de alta resolución ampliamente difundidas en el campo de la caracterización de materiales y de novedosa aplicación en tecnología farmacéutica.
- 5- Formulación de un inyectable liofilizado.

Para el cumplimiento de los objetivos preestablecidos, el trabajo experimental se ha realizado en distintas etapas.

En primer lugar, se han puesto a punto dos métodos de nanoencapsulación: emulsificación espontánea-difusión de disolvente y el método de salificación. A continuación se realiza un diseño factorial con cada uno de los métodos y con la información obtenida se realiza un último tercer diseño factorial para comparar ambos métodos entre sí. Con las mejores referencias de cada diseño (que corresponden a las que proporcionan tamaños de partícula más pequeños y homogéneos, cinéticas de liberación más lentas, con poco efecto estallido y eficacias de encapsulación más altas) se fabrican nuevamente, pero sustituyendo los disolventes originales por acetato de etilo, disolvente más respetuoso con el medio ambiente y con menor impacto en la salud humana.

Las nanoesferas se caracterizan mediante el empleo de las técnicas más habituales, así como con técnicas más novedosas y de reciente aplicación en el campo de la tecnología farmacéutica, como son el AFM (microscopía de fuerza atómica) y XPS (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X).

Finalmente, se elige la mejor de las referencias elaboradas con acetato de etilo y se elabora la formulación final, que consiste en un inyectable liofilizado de nanoesferas de indometacina.

En cada capítulo se exponen y discuten los resultados experimentales y finalmente se realiza una discusión general que valora todos los resultados en su globalidad.

# ***INTRODUCCIÓN***

---

## 1.1. Sistemas nanoparticulares

Se denominan sistemas microparticulares de administración de fármacos los que incluyen los microgránulos (*pellets*), microcápsulas, microesferas, lipoesferas, emulsiones y las emulsiones múltiples (Kondo 1979, Thies 1983, Arshary 1989). Los sistemas de liberación nanoparticulares incluyen las nanopartículas lipídicas o poliméricas (nanocápsulas o nanoesferas), microemulsiones, liposomas y los niosomas. De todos ellos, los vehículos que más se han estudiado han sido los liposomas. Sin embargo, los liposomas presentan algunas desventajas como es su poca estabilidad, reproducibilidad y problemas de transposición de escala (Beck y Pope 1984, Alonso y cols. 1985, Benoit y cols. 1986).

Las nanopartículas son unos sistemas sólidos coloidales, cuyo tamaño de partícula varía entre los 10 y 1000 nm. El principio activo se puede encontrar disuelto, atrapado, encapsulado o adsorbido en la matriz polimérica de las nanopartículas. Dependiendo del método de fabricación se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas (Arshady 1989, De Jaeghere y cols. 1999).

- Las **nanocápsulas** son sistemas vesiculares en cuyo interior se encuentra disuelto el principio activo, confinado en el interior de la cavidad, rodeado por una membrana polimérica.
- Las **nanoesferas** son sistemas matriciales en los que el principio activo se encuentra física y uniformemente disuelto.

Los sistemas de liberación modificada a base de nanopartículas son unos vehículos coloidales que han atraído mucho interés en las

últimas décadas, puesto que se ha visto que son capaces de incrementar la eficacia y disminuir la toxicidad de muchos fármacos.

La reducción en el tamaño de las nanopartículas es un tema que centra muchos estudios, ya que será uno de los factores determinantes en la idoneidad de administración de la formulación *in vivo*. No sólo en la vía intravenosa, donde los capilares más pequeños miden 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, sino también en la vía sistémica el tamaño de las nanopartículas condicionará que puedan llegar a su órgano diana. Es bien conocido que los sistemas más pequeños, por debajo de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño, son rápidamente fagocitados en las células del sistema retículoendotelial, principalmente en las células de Kupffer del hígado, lo que supone una barrera efectiva a la hora de llegar a otros órganos diana (Illum y cols. 1982, Poste 1983). Una de las estrategias para evitar el secuestro de las nanopartículas en el hígado es la modificación de las propiedades de superficie de los coloides, como se ha comprobado con las nanopartículas de poliestireno modificado con copolímeros (Muir y cols. 1981) o con liposomas que contienen gangliósidos (Allen y cols. 1985) y polietilenglicol (Senior y cols. 1981), con tamaños entre 250-300 nm.

Para facilitar la lectura del presente trabajo, se denominan a todas las partículas "nanoesferas" a pesar de que en algunos casos sus tamaños puedan superar los 1000 nm.

### 1.1.1. Aplicaciones

Los primeros trabajos de investigación en el campo de la microencapsulación fueron iniciados por Burgenberg de Jong en 1929, si bien las primeras nanopartículas no fueron desarrolladas hasta a finales de los años 70 (Birrenbach y Speiser 1976, Couvreur y cols. 1979). Desde entonces han aparecido muchos procesos de micro y nanoencapsulación, así como muchas patentes, lo que demuestra la amplia aceptación de este tipo de sistemas, que encuentra aplicación en muchos campos:

- En el campo farmacéutico, el primer producto microencapsulado fue el ácido acetilsalicílico, que se utilizó en

pacientes con tratamientos prolongados con el fin de reducir el número de dosis así como los daños gastrointestinales.

- En la industria de perfumes y esencias se encapsulan aceites esenciales que pueden aplicarse sobre un papel que actúa de soporte.
- En cosmética se incorporan a las formas farmacéuticas tradicionales microcápsulas con vitaminas, aceites esenciales, etc. (Magill 1990).
- En la industria alimentaria la microencapsulación consigue distintos beneficios como son la reducción de la sensibilidad de las vitaminas a los factores externos, evitar la evaporación de los aromas, mejora de la textura de los productos cárnicos, etc. (Guerrero y cols. 1999).
- En la agricultura se han microencapsulado distintos pesticidas, así como feromonas, con el fin de reducir las plagas ocasionadas por determinados insectos (Bakan 1980).
- En veterinaria hay microencapsulados gran variedad de analgésicos, antihelmínticos y antimicrobianos (Bakan 1980).

Las nanopartículas debido a su pequeño tamaño presentan unas aplicaciones adicionales, además de las anteriormente referenciadas:

- Vehículos de agentes anticancerígenos: por motivos desconocidos, las nanopartículas presentan una tendencia a acumularse en ciertos tumores (Kreuter 1994, Leroux 1994).
- Vehículos de antibióticos, agentes antiparasitarios o antivirales (Kreuter 1994, Löbenberg y cols. 1996).
- Aumentan la absorción de péptidos o proteínas con baja biodisponibilidad. Este hecho se explica porque las nanopartículas pueden proteger los principios activos de la gran degradación enzimática del tracto gastrointestinal, así como aumentar su absorción por transporte directo a través de la mucosa intestinal a la circulación sistémica (Lenaerts y cols. 1990, Florence 1997).

- Vehiculización de vacunas (Florence 1997).
- Administración oftálmica de fármacos: debido a la capacidad de adhesión de algunos polímeros empleados en la obtención de nanopartículas, el tiempo de adhesión a la superficie del epitelio ocular aumenta considerablemente. Este constituye una ventaja en tratamiento de enfermedades crónicas como el glaucoma (Le Burlais y cols. 1995, Alonso y Sánchez 2003).

### 1.1.2. Ventajas e inconvenientes

El creciente interés despertado por la nanoencapsulación y las nanotecnologías en el campo farmacéutico se explica al considerar sus múltiples posibilidades y aplicaciones (Calanchi 1980, Sjövall y cols. 1984, Tice y cols. 1986, Rivera y cols. 1987, Ike y cols. 1991).

- Fácil penetración a zonas corporales de difícil acceso como son las barreras tisulares y neoplasias. Esto implica que para conseguir el efecto farmacológico deseado se administra menor dosis de fármaco, lo que conlleva una disminución de los efectos secundarios (Benoit y cols. 1986).
- Gran especificidad para dirigir el fármaco al órgano diana.
- Gran capacidad de penetración intracelular y paso de barreras biológicas como el epitelio intestinal o la barrera hematoencefálica (Couvreux y cols. 1978).

También presentan algunas desventajas, que pueden ser originadas por:

- Que el recubrimiento sea incompleto.
- Que exista incompatibilidad entre la cubierta y el núcleo.
- Que las características de liberación no sean reproducibles.
- Bajos rendimientos de nanoencapsulación.
- Imposibilidad de retirar el medicamento una vez administrado.
- Debido a su pequeño tamaño presentan una gran superficie por unidad de volumen. Esto provoca bajos porcentajes de carga y una rápida degradación del polímero. Además, las

partículas más pequeñas son difíciles de recuperar y tienden a agregarse.

- Limitaciones económicas.

Además de estos inconvenientes, hay que tener presente que no todas las sustancias son susceptibles de ser nanoencapsuladas, por ejemplo, no se podrán encapsular principios activos con niveles terapéuticos muy estrechos, debido al peligro de sobredosificación si el mecanismo de liberación fallara.

### 1.1.3. Métodos de elaboración de nanopartículas

Los métodos de elaboración de las nanopartículas se dividen en dos categorías en función de si la formación de la nanopartícula requiere una reacción de polimerización o si se obtienen directamente de una macromolécula o polímero preformado (Couvreur y cols. 1995, Quintanar-Guerrero 1998, De Jaegere y cols. 1999).

- **Por polimerización de monómeros "in situ"**

En este método se emplean monómeros que polimerizan en el propio medio de reacción, gracias a una irradiación energética y a la presencia de catalizadores.

Con este método se obtienen las nanopartículas de polialquilmacrilatos, polimetilmetaacrilatos y poliacrilamidas (Kreuter y cols. 1976, Couvreur y cols. 1982, Al Khouri-Fallouh y cols. 1986, Krause y cols. 1986).

- **A partir de polímeros preformados**

Las distintas técnicas de este grupo tienen en común que hay una solución orgánica (formada por los componentes de las nanopartículas que constituyen la fase interna) y una solución acuosa (que contiene los estabilizantes que constituyen la fase dispersa).

Con todos los métodos es posible conseguir la formación de nanoesferas, si bien sólo con la evaporación de disolvente y con la emulsificación-difusión se pueden conseguir nanocápsulas (Fessi y cols. 1987, Quintanar-Guerrero y cols. 1997).

- ✓ **Emulsificación-evaporación:** hay una emulsificación de la fase orgánica con la acuosa, seguida de una evaporación del disolvente orgánico (Gurny y cols. 1981, Krause y cols. 1985, Tice y cols. 1985).
- ✓ **Desplazamiento del disolvente:** se basa en la precipitación del polímero en solución tras la adición de un no-solvente del polímero. Este método permite la obtención de nanoesferas sin pasar previamente por la emulsificación (Fessy y cols. 1986).
- ✓ **Salificación:** este método consiste en la preparación de una emulsión de fase externa acuosa donde hay acetona en la fase orgánica y una solución saturada de sal constituye la fase acuosa. Tras la emulsificación, se añade suficiente cantidad de agua para permitir la difusión de la acetona a la fase acuosa, induciendo la formación de las nanoesferas (Allémann y cols. 1992, Ibrahim y cols. 1992).
- ✓ **Emulsificación-difusión:** es una modificación del método de salificación en el que no intervienen sales. Se emplean disolventes orgánicos parcialmente solubles en agua, que previamente se saturan en agua para asegurar el equilibrio termodinámico inicial entre los dos líquidos (Quintanar-Guerrero y cols. 1997).
- ✓ **Emulsificación espontánea- difusión de disolvente:** modificación del método de evaporación de disolvente, que incorpora como cosolvente acetona (Niwa y cols. 1993).

A continuación se detallan los métodos de emulsificación espontánea -difusión de disolvente y el de salificación, por ser los que son objeto de estudio en el presente trabajo.

#### 1.1.3.1. Emulsificación espontánea- difusión de disolvente

Con el método convencional de evaporación de disolvente es muy difícil obtener partículas de tamaño inferior a 1,2-1,5  $\mu\text{m}$  de promedio (Bodmeier y Chen 1990). Sin embargo, en algunos trabajos se han podido elaborar partículas de PLA con un tamaño medio de 100 a

200 nm (Fessi y cols. 1988). Otros autores han conseguido con la técnica de evaporación de disolvente tamaños de 500 nm o incluso inferior, pero en todos los casos hay una gran polidispersión de tamaños y resultan ser métodos de difícil transposición de escala (Krause y cols. 1985, Acholes y cols. 1993).

La emulsificación espontánea-difusión de disolvente (conocida como SESDM de "spontaneous emulsification solvent diffusion method") es una versión modificada del método de evaporación de disolvente cuya principal ventaja es la obtención de nanoesferas de tamaño inferior a  $1\mu\text{m}$ , es decir, obtención de nanoesferas de forma sencilla, reproducible y fácilmente escalable (Kawashima y cols. 1989, Niwa y cols. 1993, Wehrle y cols. 1995).

Para la obtención de las nanoesferas (proceso esquematizado en figura 1.1) se utiliza un disolvente soluble en agua como la acetona o el metanol, y como disolvente insoluble en agua se utiliza el diclorometano o el cloroformo, que actúan de fase oleosa. Debido a la difusión espontánea del disolvente soluble en agua (acetona o metanol) se crea una turbulencia interfacial entre las dos fases que conlleva a la formación de partículas de tamaño muy pequeño. Al añadir acetona en la fase orgánica se produce una reducción de la tensión interfacial entre el disolvente orgánico y la fase acuosa. Si las dos fases no están en equilibrio, existe un gradiente de concentración de acetona en la interfase, incluso a bajas concentraciones de acetona en la fase orgánica. Dependiendo de la concentración de acetona se pueden producir variaciones longitudinales en la tensión interfacial en la interfase. Estas variaciones inducen turbulencias interfaciales o agitación espontánea de la interfase entre las dos fases líquidas que no están en equilibrio, que serán gobernadas por el llamado efecto Marangoni o turbulencias interfaciales (Sternling y Scriven 1959).

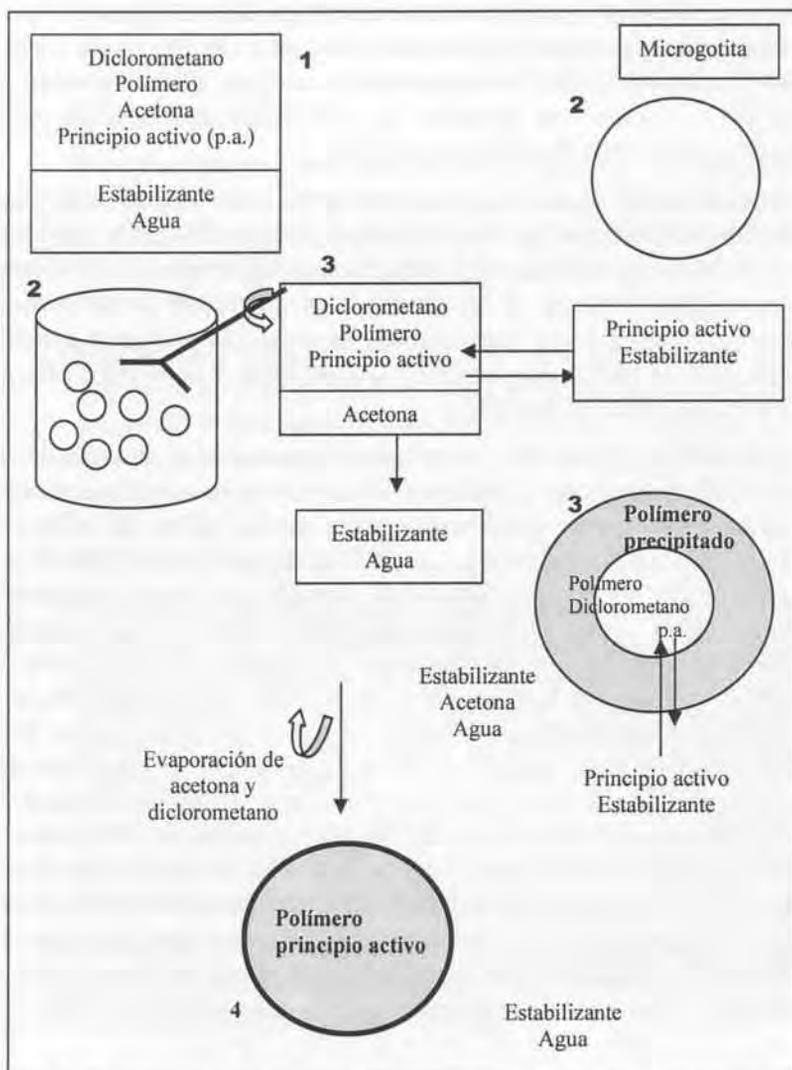


Fig. 1.1. Representación esquemática del mecanismo de formación de las nanoesferas. (1) Composición de las dos fases. (2) Aparición de las turbulencias en la interfase y formación de las microgotitas. (3) Precipitación del polímero que ha pasado junto con la acetona a la fase acuosa. (4) Evaporación de la acetona y del disolvente orgánico y consiguiente formación de las nanoesferas.

La intensidad del efecto variará dependiendo de la composición de cada sistema. Normalmente, el efecto es mayor para transferencias de soluto de la fase orgánica a la acuosa que no para la transferencia en sentido inverso. También depende del tipo de disolvente, de soluto y de su concentración. La máxima intensidad del efecto se observa cuando hay una reacción rápida y exotérmica entre dos solutos cerca de la interfase, especialmente en sistemas con baja tensión interfacial.

En la preparación de nanoesferas el soluto es la acetona presente en el sistema y las turbulencias son provocadas al estar en contacto las dos fases, por la rápida difusión de la acetona de la fase orgánica a la acuosa. Espontáneamente se forma un área interfacial mucho mayor que conduce a la formación de pequeñas gotitas y de aquí el nombre de la técnica, ya que hay una emulsificación espontánea como consecuencia de la difusión del disolvente.

El polímero es arrastrado junto con la acetona hacia la fase acuosa, donde precipita debido a su insolubilidad en agua, formándose unas gotitas de tamaño nanométrico. Una parte del polímero continúa disuelta en el disolvente orgánico. La difusión y posterior evaporación de los disolventes orgánicos de las nanogotas y la difusión del agua en las nanogotas reduce la solubilidad del polímero y provoca su precipitación, lo que da lugar a la formación de la matriz de las nanoesferas, en el interior de las cuales se encuentra el principio activo retenido.

La deposición de la delgada capa inicial de polímero sobre las nanogotas de fase orgánica emulsionada previene la difusión del principio activo hacia la fase acuosa. Por este motivo, cantidades mayores de polímero o de acetona conllevan una más rápida precipitación del polímero y mayor eficiencia de encapsulación.

Como resumen, se puede concluir:

- Tamaño de las nanoesferas: depende de la cantidad de acetona. A más cantidad de acetona, menor tamaño. La mayor cantidad de acetona aumenta el gradiente de concentración de la acetona y acelera su migración hacia la fase acuosa durante la fase inicial de la formación de las nanogotas y por lo tanto la precipitación del polímero sucede antes, produciendo un menor tamaño de nanopartículas.
- Eficiencia de encapsulación: depende de la cantidad de acetona y de polímero. La precipitación del polímero promueve la formación de nanopartículas embrionarias. Esta precipitación depende de la cantidad de acetona y de polímero.
- Todo este sistema también se verá afectado por el tipo y concentración de estabilizante empleado, que funciona como un coloide protector de la formación de las gotitas durante su preparación. Las moléculas de estabilizante se adsorben sobre la superficie de las gotitas y previenen su coalescencia.

Si se lleva acabo el mismo ensayo, pero sin la presencia de acetona, se obtienen partículas el doble de grandes y la recuperación de las nanoesferas disminuye drásticamente.

La cantidad de acetona en la solución orgánica de polímero dependerá del tipo de disolvente orgánico empleado y puede afectar la velocidad de migración durante el proceso inicial de formación de las nanogotas y por consiguiente, a la cinética de la precipitación del polímero.

Otra de las ventajas de esta técnica es que emplea un sistema de disolventes de una sola fase ("single-phase solvent system") en el que tanto el activo como el polímero son solubles y esto evita el tener que utilizar gran energía para mezclar, ya que las partículas se forman espontáneamente.

Otra ventaja es que al ser el activo soluble en la misma fase que el polímero, hay una distribución homogénea del activo en la nanopartícula. Esto se traduce en un menor efecto estallido en la

liberación, puesto que este efecto está ligado a la degradación del polímero.

Sin embargo, en la transposición de escala puede haber dificultades debido a que el proceso va regido por factores termodinámicos (Niwa y cols. 1994).

#### 1.1.3.2. Salificación o *Salting out*

La técnica de salificación fue desarrollada a principios de la década de los 90 por el grupo de Eric Doelker (Doelker y cols. 1990, Bindschaedler y cols. 1990). La principal ventaja de este método radica en que se evita el empleo de disolventes orgánicos volátiles como los disolventes organoclorados. En el método de salificación se emplea un disolvente orgánico soluble en agua, como es la acetona, y se emulsiona con una fase acuosa casi saturada con sal. Aunque la acetona es un disolvente miscible en agua, la alta concentración de sal de la fase acuosa previene que se mezcle con la acetona. El polímero se disuelve en el disolvente orgánico correspondiente (además de acetona, puede ser acetato de etilo, tetrahidrofurano, etc.), junto con el principio activo. A continuación se añade la disolución acuosa del coadyuvante junto con la sal. Se forma la emulsión mediante la agitación con el turboagitador, dando una emulsión de fase externa oleosa A/O. A continuación se añade una última fracción de agua que causa la inversión de fases, dando una emulsión final de fase externa acuosa O/A. El agua añadida en la última etapa induce la difusión del disolvente orgánico hacia la solución acuosa resultando en una dispersión de nanoesferas.

En este proceso también la formación de la emulsión es un paso clave en la obtención de las nanoesferas ya que el tamaño de gota está directamente relacionado con el tamaño final de la nanopartícula. Al mezclar las fases con el turboagitador se inducen altas fuerzas de cizalladura, provocando la formación de pequeñas gotas de tamaño inferior a  $0,5 \mu\text{m}$ , que constituyen las futuras nanoesferas del mismo tamaño (Quintanar-Guerrero y cols. 1998).

## 1.2. Polímeros Biodegradables

Se consideran polímeros biodegradables aquellos de origen natural o sintético que son degradados *in vivo* química o enzimáticamente y que dan lugar a productos no tóxicos que posteriormente son metabolizados o excretados mediante un mecanismo fisiológico normal (Jalil y Nixon 1990). A estos polímeros también se les ha denominado reabsorbibles o bioerosionables, ya que el proceso de degradación del polímero conlleva la erosión del sistema.

Otra característica que se les exige a estos polímeros es que sean biocompatibles, es decir, que sean: no tóxicos, no cancerígenos, no mutágenos, no alergénicos, que estén libres de contaminantes (disolventes, aditivos y residuos de síntesis), que generen productos de degradación biocompatibles, biorreabsorbibles y que no provoquen respuestas inmunológicas adversas.

Actualmente, en la FDA hay unas directrices para evaluar la biocompatibilidad de estos compuestos (Anderson y Langone 1999).

Son numerosos los polímeros que se han estudiado con vistas a la elaboración de sistemas de liberación modificada, tanto de origen natural como sintético.

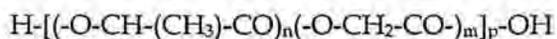
Entre los polímeros de origen natural destacan el colágeno, la albúmina y la gelatina. A pesar del interés generado al principio con estos polímeros citados, cada vez están más en desuso debido, principalmente, a las reacciones antigénicas a que han dado lugar. A este problema también se le debe añadir la dificultad para conseguir una encapsulación eficaz y una liberación modificada de principios

activos (Bogdansky 1990). Actualmente se está trabajando mucho con otro polímero de origen natural, el quitosano, ya que presenta muchas aplicaciones y numerosas ventajas (Lorenzo-Lamosa y cols. 1998, Rege y cols. 1999).

De entre los polímeros sintéticos destacan los poliésteres alifáticos como el ácido poliláctico poliglicólico o PLGA, los polianhídridos, policianoacrilatos de alquilo, policaprolactonas, poliaminoácidos y polioroésteres. De entre todos ellos destacan los copolímeros del ácido láctico y glicólico, por existir ya en el mercado formas de administración parenteral elaboradas a base de estos polímeros. Un ejemplo es el Lupron Depot<sup>®</sup>, que consiste en un inyectable de acción mensual a base de microesferas de PLGA que contienen acetato de leuprorelina (antagonista LH-RH) y que se emplea con éxito en el tratamiento de endometriosis y cáncer de próstata (Wood 1980, Heller 1984, Langer y Peppas 1984, Heller 1985, Okada y cols. 1987, Pitt 1990, Heya y cols. 1991, Shah y cols. 1992, Tice y Tabibi 1992, Radomsky y cols. 1993, DeLuca y cols. 1994, Okada y cols. 1994).

### 1.2.1. Copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA)

#### Estructura



Esta estructura también se esquematiza como:



#### Síntesis

Se sintetizan mediante un proceso de polimerización a alta temperatura y en presencia de catalizadores, después de una etapa previa de síntesis de los dímeros cíclicos de los respectivos ácidos. También es posible sintetizar polímeros de pequeño peso molecular directamente a partir de los respectivos monómeros e incluso en ausencia de catalizadores (Tanaka y cols. 1987, Fiachionen y Fischer 1994). En la figura 1.2 se esquematiza el método de síntesis.

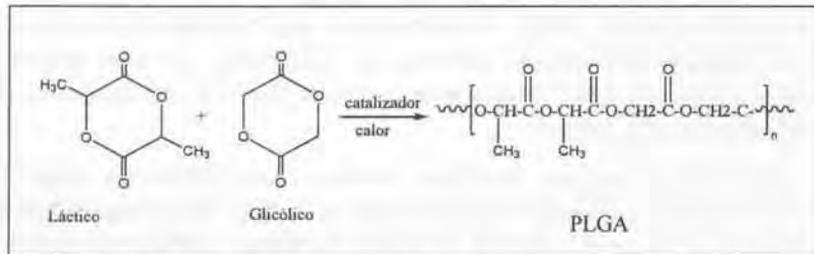


Figura 1.2. Síntesis de los copolímeros de ácido láctico y glicólico.

### Biodegradación

La degradación del polímero tiene lugar mediante unos mecanismos de hidrólisis de tipo no enzimática de las uniones éster (Pitt y cols. 1981). La hidrólisis da lugar a una progresiva disminución del peso molecular de las cadenas poliméricas y, como consecuencia, a un progresivo incremento de la hidrofilia de los fragmentos resultantes, que conducen finalmente a su solubilización. La hidrólisis depende del tamaño, cristalinidad e hidrofilia del polímero, así como del pH y temperatura del medio de disolución. Como productos finales se obtiene ácido láctico y glicólico, que se eliminan fácilmente del organismo en forma de anhídrido carbónico y agua, vía ciclo de Krebs (Autian 1978).

La velocidad de degradación de los copolímeros es dependiente de la proporción de ambos monómeros. El tiempo de degradación es menor en polímeros de bajo peso molecular, más hidrofílicos, amorfos y con más proporción de ácido glicólico (Visscher 1985). De este modo, mediante una adecuada selección de dicha composición es posible modificar la degradación del polímero, que puede oscilar entre pocos días a varios meses (Lewis 1990).

En resumen, las especiales características de los copolímeros del ácido láctico y glicólico hacen de ellos excipientes de elección para la elaboración de sistemas de liberación modificada destinados a la administración parenteral (Hutchison y Furr 1990). Además, la amplia documentación relativa a los mismos junto con el hecho de que hayan sido comercializadas diversas formulaciones, facilita considerablemente la aprobación por parte de las autoridades sanitarias de nuevas formulaciones, lo que hace menos costosa su puesta en el mercado.

### 1.3. Caracterización de las Nanopartículas

Existen numerosas técnicas que se pueden emplear en la caracterización de las nanopartículas y que servirán para aportar valiosa información para entender los mecanismos de formación o como afectan los parámetros de proceso a las características de las mismas. En la tabla 1.1 se citan las técnicas más empleadas en la caracterización de las nanopartículas y a continuación se describen brevemente algunas de las técnicas empleadas en el presente trabajo.

Parámetro	Técnica	Referencias
Tamaño partícula y morfología	SEM, TEM, PCS, Difracción láser	Kreuter y cols. 1994, Magenheimer y Benita 1991
Contenido en p.a.	UV, HPLC	Benita y cols. 1984 Barichello y cols. 1999
Liberación <i>in vitro</i>	Aparatos de la F.Eur. nº 1, 2 ó 4; viales., etc. HPLC, UV	Ammoury y cols. 1990 Guiziou y cols. 1996 Castelli y cols. 1998
Carga superficial	Potencial zeta	Lourenco y cols. 1996
Análisis químico superficial	XPS, AFM, RMN	Oliva y cols. 2002 y 2003 Scholes y cols. 1999
Análisis químico global	IR, RMN	Watts y cols. 1991 Peracchia y cols. 1997
Cristalinidad	RX, DSC	Dubernet y cols. 1991 Reich 1997 Pamujula y cols. 2004
Peso molecular	Cromatografía de permeación en gel	Magenheimer y Benita 1991
Hidrofobicidad superficial	Ángulo de contacto. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas	Lukowski y cols. 1992 Kreuter y cols. 1994

**Tabla 1.1.** Técnicas de caracterización aplicadas en la nanoencapsulación.

### 1.3.1. Tamaño de partícula y morfología

A continuación se describen brevemente las técnicas empleadas en la medición del tamaño y forma de las nanopartículas.

#### 1.3.1.1. Microscopía óptica

Es una técnica que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto por encima de las 2.000 veces, pero la potencia amplificadora está limitada por la longitud de onda de la luz visible.

#### 1.3.1.2. Microscopía electrónica

El microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones.

Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscope, TEM) y el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM). Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen

aumentada del espécimen. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstrom. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.

Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo con un SEM, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El SEM explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el TEM, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de barrido pueden ampliar los objetos 100.000 veces o más. Este tipo de microscopio es muy útil porque, al contrario que los TEM o los microscopios ópticos, produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto.

#### **1.3.1.3. Difracción láser**

En esta técnica se dispone de un generador de luz láser que emite un haz de luz paralelo, que incide sobre una cámara de análisis en la que se encuentra la muestra en suspensión. Las partículas de la muestra dispersan y/o difractan el haz en diferentes ángulos dependiendo de su tamaño. La luz dispersada es recogida por un detector multielemento de estado sólido, que transmite los datos a un ordenador. La distribución del tamaño se calcula a partir del patrón de dispersión que se ha medido al aplicar la teoría Fraunhofer para dispersión láser y el algoritmo de corrección para dispersión

múltiple. Las partículas pequeñas difractan el haz de láser más que las partículas gruesas. El patrón de difracción se mide con un sistema de sensores y las señales de resultado se usan para calcular la distribución del tamaño de partículas. Un detector de haz mide el haz de láser no difractado para controlar la dilución de la muestra.

#### **1.3.1.4. Espectroscopía de correlación fotónica (PCS)**

En esta técnica (también llamada de dispersión dinámica de la luz) se determina el tamaño de partícula midiendo la rapidez de fluctuación de la intensidad de la luz láser difractada por las partículas cuando se difunden a través del fluido.

### **1.3.2. Liberación *in vitro***

La metodología a aplicar en los ensayos de liberación *in vitro* de las micropartículas y nanopartículas es un tema en el que aún no hay consenso. Los métodos habituales emplean los aparatos de disolución número 1 y 2 de la USP, agitación en viales, métodos de diálisis o métodos de flujo continuo (aparato número 4 de la USP). En el último congreso de la AAPS (noviembre 2004) se propuso como método de elección el empleo del método de flujo continuo, si bien con algunas adaptaciones (Zolnik y cols. 2004). El problema radica en que debido a las limitaciones intrínsecas del equipo, sólo es apto para ensayos de liberación de micropartículas y no para las nanopartículas. En el presente trabajo se elige el método de diálisis directa y el procedimiento se explica en el capítulo de métodos.

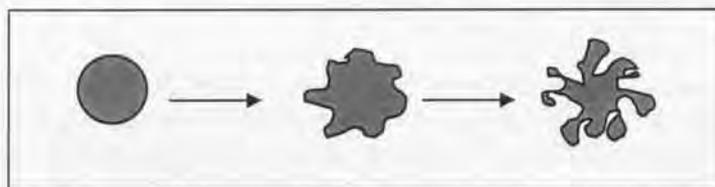
Existen varios factores que influyen en la liberación del principio activo de las nanopartículas, entre los que se encuentran la composición y peso molecular del polímero, el contenido en principio activo, así como el tamaño y porosidad de la nanopartícula.

El modelo de liberación de principios activos es una combinación de difusión y degradación. En primer lugar, las nanopartículas toman agua antes de empezar la degradación de la matriz y su disolución. Después de la hidratación de la matriz del polímero, el principio activo nanoencapsulado empieza a disolverse en el medio acuoso y difunde hacia el exterior de la nanopartícula.

Los procesos que intervienen en la liberación de un principio activo de una nanopartícula pueden incluir los siguientes pasos, que gráficamente también se representan en la figura 1.3 (Kondo, 1979, Spenlehaber y cols. 1988, Delgado y cols. 1995):

- 1- Erosión del polímero y consiguiente liberación del principio activo embebido en la región superficial de la nanopartícula. Se considera que nanopartículas formadas por polímeros con grupos funcionales muy reactivos tienden a degradarse de forma más rápida y sobretodo a nivel superficial, considerándose sistemas de "erosión superficial". Por el contrario, las nanopartículas de PLGA se consideran sistemas de "erosión matricial", puesto que el polímero se degrada de forma gradual y no sólo en las capas más superficiales, sino también en las inmediatamente inferiores. Esto es debido a que la penetración del solvente en la matriz de la nanopartícula es más rápida que la propia erosión del polímero (Tice y Lewis 1983). Se considera que nanopartículas formadas por otros tipos de polímeros con grupos funcionales más reactivos tienden a degradarse de forma más rápida y sobretodo a nivel superficial, considerándose sistemas de erosión superficial.
- 2- Difusión del principio activo a través de la matriz polimérica y de los poros generados durante la degradación de la misma. Los productos de degradación del polímero también pueden alterar significativamente las condiciones del microambiente del medio de disolución, por ejemplo, con la disminución del pH del solvente. La degradación del PLGA está catalizada por el medio ácido, por lo que un descenso en el pH del microambiente (causada por la liberación de ácido láctico y glicólico) puede provocar un efecto autocatalítico, acelerando la degradación del polímero (Jalil y Nixon 1990, Arshady 1991, Mathiowitz y cols. 1990). Dependiendo de la solubilidad del polímero y del activo en el medio de disolución, así como de las condiciones del microambiente, estos productos de degradación disolverán más o menos rápido, favoreciendo la difusión del principio activo.
- 3- Disolución del principio activo en el medio o solvente que le rodea. Hay una degradación de la matriz del polímero, con la

consiguiente liberación del principio activo. Los enlaces éster de las cadenas de polímero se degradan por hidrólisis a un tamaño lo suficientemente pequeñas como para ser solubilizadas.



**Figura 1.3.** Representación esquemática del mecanismo de liberación del principio activo desde una nanoesfera.

La importancia relativa de estos pasos en el total de la velocidad de liberación del principio activo varía mucho, dependiendo de la hidrofilia del polímero, su peso molecular, cristalinidad, tamaño, forma y porosidad (Guz y cols. 1992).

El perfil de liberación de un principio activo también dependerá de sus características físico-químicas, así como de su distribución en la matriz de polímero. Si el principio activo está homogéneamente distribuido en la matriz del polímero, la curva de liberación suele poseer un modelo bifásico, es decir, la primera fase no ocurre porque no hay principio activo en la superficie de la nanopartícula. En el caso de principios activos insolubles en el polímero (como proteínas y péptidos) no hay difusión del principio activo a través de la matriz, sino que tan sólo difunden a través de los poros generados durante la degradación de la cubierta de la nanopartícula.

Se han propuesto muchos modelos para explicar cinéticamente el perfil de liberación del principio activo a través de estos sistemas matriciales (Ike y cols. 1992, Conti y cols. 1995). Según la teoría de Higuchi (Higuchi 1963), la tasa de liberación de fármaco disminuirá con el tiempo debido a que el gradiente de concentración está continuamente decreciendo (Sturesson y cols. 1993). Sin embargo, la situación que se busca es la cinética de orden cero, donde se mantiene una liberación constante de principio activo durante todo el proceso (Julienne y cols. 1992). El verdadero orden cero es casi inalcanzable, aunque se ha postulado que un sistema matricial verdadero formado

por un polímero que sufra erosión de la superficie podría proporcionar una cinética de orden cero (Sukara y cols. 1992).

Con la técnica de evaporación de disolvente, y en función de los parámetros de proceso, se han conseguido identificar 5 tipos distintos de estructuras que presentan diferentes patrones de libración *in vitro*. (Spenehauer y cols. 1988). El trabajo de estos autores describe estructuras de microesferas, pero se considera extrapolable a nanoesferas (figura 1.4).

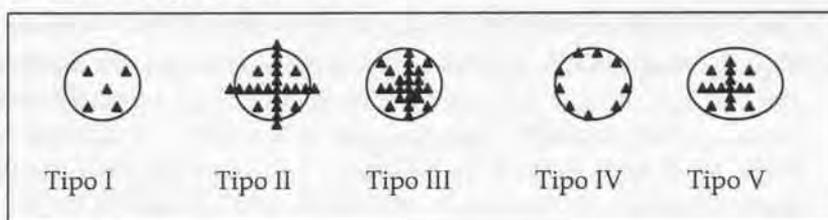


Figura 1.4. Distintos tipos de carga de principio activo en microesferas.

- **Tipo I:** los cristales de principio activo se encuentran dispersados en la matriz polimérica y no hay contacto entre ellos. El disolvente y/o las moléculas de principio activo deben difundir a través de la matriz polimérica para permitir la liberación del principio activo.
- **Tipo II:** hay un gran número de cristales presentes en las microesferas. Algunos de estos cristales están en contacto con los otros y forman una trama que conecta la parte interior con los cristales de la superficie exterior de las microesferas. Esta estructura permite la penetración del medio de disolución y la disolución y difusión del principio activo desde un cristal a otro, sin ninguna limitación de barrera polimérica. Al igual que en las estructuras de tipo I, estos cristales pueden liberarse por difusión del medio de disolución y a través de la matriz polimérica.
- **Tipo III:** todo el principio activo del interior de las microesferas forma una densa trama de cristales. La mayoría de cristales están en contacto entre ellos y el principio activo se libera por disolución y difusión. A diferencia del tipo II, aquí no hay

cristales solos aislados y por lo tanto no hay ninguna contribución de la difusión controlada por la degradación de la matriz polimérica.

- **Tipo IV:** los cristales están en contacto entre ellos, pero tienden a agruparse en la parte exterior de las microesferas por efecto de la centrifugación. Al centrarse todos los cristales en la superficie externa de las microesferas, provoca una mayor facilidad de penetración del medio de disolución. De esta forma, el principio activo se libera a partir de su propia disolución en el medio.
- **Tipo V:** presencia de una trama en el interior de las microesferas, pero no hay presencia de cristales en la superficie externa y por lo tanto, no hay conexión directa entre el exterior y el interior por culpa de la capa externa de polímero. La liberación del principio activo al medio de disolución se produce por difusión a través de la matriz polimérica y a una velocidad inferior que en el tipo IV.

Los perfiles de liberación *in vitro* se analizan con el programa WinNonlin 4.1. y el parámetro que se calcula y evalúa es el tiempo medio de disolución o MDT (Riegelman 1980, Emea: CPMP/QWP/604/96, 1999).

Los perfiles también se analizan con el mismo programa, con la finalidad de intentar ajustarlos a tres posibles modelos matemáticos que describan el patrón de liberación. Teniendo en cuenta la morfología de las nanoesferas, así como el hecho de que son sistemas matriciales que no se disgregan, se eligen tres posibles modelos: ecuación de primer orden, Higuchi o de raíz cuadrada y la ecuación de Hixson y Crowell o de raíz cúbica (Hixson y Crowell 1931, Higuchi 1963, Karasulu y cols. 2003).

**Ecuación de primer orden:** la cantidad de principio activo liberado depende de la difusión y/o disolución

$$Q = 100 (1 - e^{-k_1 t})$$

**Ecuación de Hixson Crowell o de la raíz cúbica:** modelo cinético empleado para describir la liberación desde matrices isométricas erodibles, como por ejemplo esferas.

$$Q = 100 - (100^{1/3} - K_2 t)^3$$

**Ecuación de Higuchi o de la raíz cuadrada:** modelo de liberación controlada por difusión desde matrices homogéneas y matrices granulares.

$$Q = K_3 * t^{0.5}$$

Q: % de principio activo liberado

$K_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$ : constantes de liberación

t: tiempo

La idoneidad del ajustado se analiza evaluando los valores del criterio de información de Akaike (AIC) y del criterio bayesiano de Schwarz (SBC). Para estos dos análisis, los resultados más bajos significan mejor ajustado del modelo teórico a los valores experimentales (Schwarz 1978, Koehler y Murphree 1988).

### 1.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que se emplea para estudiar el comportamiento de una muestra al ser sometida a un programa de temperatura controlado. Mediante esta técnica es posible determinar las temperaturas de fusión (transición que se manifiesta en sustancias cristalinas) y las temperaturas de transición vítrea (transición térmica que se manifiesta en sustancias y polímeros amorfos y es aquella a la que una sustancia o polímero cambia de un estado rígido y quebradizo a otro blando y maleable). La principal diferencia estriba en que al calentar una sustancia cristalina, los átomos abandonan su estructura para transformarse en

un líquido desordenado. La transición vítrea en cambio, es una transición que se manifiesta en sustancias y polímeros amorfos, es decir, polímeros cuyas cadenas no están dispuestas según un ordenamiento cristalino, sino que están esparcidas en cualquier ordenamiento, aún en estado sólido. Ciertos polímeros cristalinos también poseen una porción amorfa, que generalmente constituye el 40-70% de la muestra polimérica. Esto explica el por qué una misma muestra de un polímero puede tener tanto una temperatura de transición vítrea como una temperatura de fusión. La porción amorfa sólo experimentará la transición vítrea, y la porción cristalina sólo la fusión.

Con la técnica de DSC se registran las diferencias de temperatura y también de energías. Mediante el análisis de los termogramas se pueden identificar efectos endo o exotérmicos debidos a estos cambios de estado de las sustancias.

Ésta técnica se utiliza a nivel de preformulación para detectar posibles incompatibilidades entre sustancias, así como detectar cambios morfológicos o polimórficos en las mismas (Westesen y Siekmann 1996, Craig y cols. 2002).

#### 1.3.4. Espectroscopía de Infrarrojos

El espectro de infrarrojo (IR) se divide en infrarrojo cercano, que comprende el intervalo entre 0,75 y 0,25  $\mu\text{m}$  ( $13330\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ), el infrarrojo medio de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$  ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) y el infrarrojo lejano de 25 a 1000  $\mu\text{m}$  ( $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ). La espectroscopía de infrarrojo (IR) utiliza la radiación del espectro electromagnético cuya longitud de onda ( $\lambda$ ) es superior a los 800 nm. El efecto de esta radiación produce deformaciones de los enlaces de las sustancias, en forma de vibraciones. Solamente las moléculas polares pueden experimentar las vibraciones y rotaciones que le permiten absorber energías en el infrarrojo. Al vibrar se produce un campo electromagnético oscilante que hace que posible una interacción con la componente eléctrica. Debido a consideraciones de tipo histórico, la unidad más usada en la

espectroscopía infrarroja no es la longitud de onda ( $\lambda$ ) sino el número de onda ( $\nu = 1/\lambda \text{ cm}^{-1}$ ), correspondiendo el IR medio a la zona comprendida entre 4000 y 625  $\text{cm}^{-1}$ . La espectroscopía de infrarrojo se aplica a la determinación cualitativa de especies moleculares, fundamentalmente se emplea para la determinación de compuestos orgánicos. Estos espectros dan gran cantidad de información puesto que el espectro es único para cada compuesto orgánico excepto para isómeros ópticos.

Las gráficas de los espectros de IR representan en ordenadas el porcentaje de transmitancia (T) en función del número de onda. La transmitancia es una magnitud similar a la absorbancia (A) que indica la fracción de radiación (de la correspondiente longitud de onda  $I_\lambda$ ) que se transmite a través de la muestra, con respecto al haz de referencia  $I_{\lambda_0}$  (Colthup y cols. 1990).

$$T = (I_\lambda/I_{\lambda_0}) \times 100 \qquad A = \log (I_{\lambda_0}/I_\lambda)$$

La relación absorbancia y transmitancia se refleja en la siguiente ecuación:

$$A = \log 1/T$$

### 1.3.5. $^1\text{H}$ -Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las técnicas más potentes para la determinación estructural de compuestos orgánicos. Los equipos modernos permiten realizar experimentos de correlación homonuclear y heteronuclear (experimentos 2D), los cuales otorgan mayor seguridad y facilidad en la interpretación y asignación de las señales de los espectros.

La mayoría de los núcleos atómicos poseen un espín, que es una propiedad de las partículas que componen los átomos. Al momento de introducir estos átomos con espín en un campo magnético intenso, el núcleo se comporta como un pequeño imán. El momento magnético del núcleo tiende a orientarse preferentemente a favor del campo magnético aplicado. Si se aplica energía que obligue a los

núcleos a invertir el sentido de su orientación, se dice que el sistema está en **resonancia**. En este momento es cuando se realiza el fenómeno de resonancia magnética nuclear (figura 1.5).

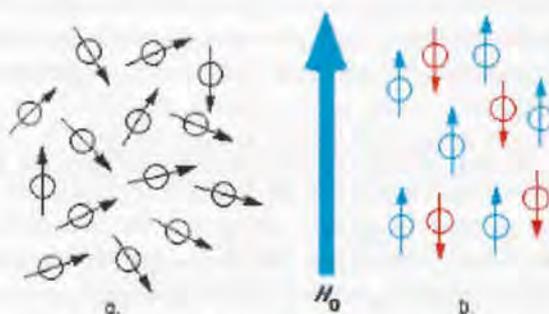


Fig. 1.5. Orientación de los núcleos tras entrar en contacto con un campo magnético  $H_0$ .

La energía aplicada corresponde a radiación electromagnética de la región de las radiofrecuencias. Cada tipo de núcleo,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ó  $^{15}\text{N}$ , absorben en una región específica. Sin embargo, no todos los núcleos de todas las moléculas absorben a la misma energía; existen pequeñas variaciones que dependen preferentemente de la densidad electrónica que lo rodea, o entorno químico. El desplazamiento resultante en la señal de RMN para un núcleo determinado es conocido como desplazamiento químico y ayuda a identificar cada protón en una molécula.

$$\text{Desplazamiento químico } (\delta) = (\text{desplazamiento observado/frecuencia del oscilador}) \times 10^6 = \text{ppm}$$

Para obtener un espectro se debe introducir la muestra en un campo magnético generado por un imán, que suele ser en realidad unos superconductores que alcanzan campos muy intensos. A continuación, y puesto que la absorción de energía en el RMN corresponde a la longitud de onda de las radiofrecuencias, se precisa de un emisor de radiofrecuencias con el que irradiar la muestra y con

el fin de observar si se ha producido absorción se requiere también de un receptor de las mismas y un detector para comparar dichas radiaciones. Finalmente se precisa de un ordenador que convierta las ondas observadas en un espectro de RMN interpretable (Bovey y cols. 1988).

Hay que destacar que en muchos casos se debe recurrir a técnicas complementarias para poder completar la caracterización.

### 1.3.6. Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X en muestras de polvo cristalino es una técnica no destructiva que permite tanto la identificación de las distintas fases cristalinas existentes en una muestra como la caracterización estructural de sólidos. Debido a que las longitudes de onda de los rayos X son del mismo orden que las distancias interatómicas de los cristales, estos actuarán como redes de difracción, difractando los rayos X en direcciones determinadas y con intensidades características en función de su estructura cristalina. Las direcciones de difracción están determinadas por la ley de Bragg y por tanto sólo dependen del aspecto (estructura cristalina) y el tamaño de la celda unidad del cristal (figura 1.6).

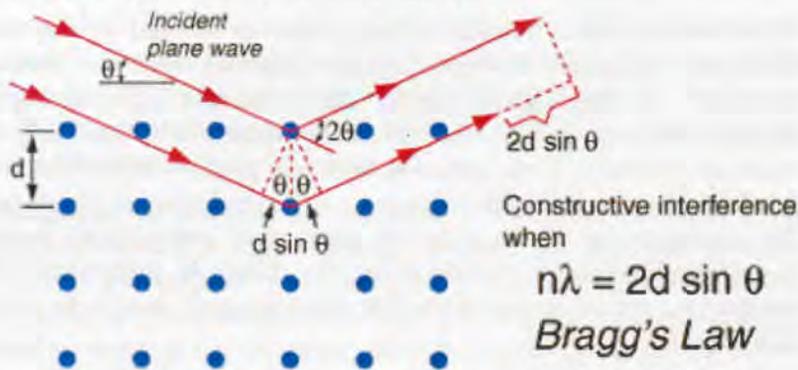


Fig. 1.6. Formación de un cono de difracción.

La ley de Bragg responde a la ecuación:  $2d \sin \theta = n\lambda$

Donde  $n$  es el orden de reflexión,  $\lambda$  la longitud de onda,  $d$  la distancia entre las capas de la sustancia y  $\theta$  el ángulo incidente formado entre el haz de rayos X y el plano de la sustancia.

La difracción de rayos X es una técnica de caracterización muy útil, que proporciona una información estructural muy detallada. Es una técnica no destructiva que analiza grandes áreas de la muestra, hasta una penetración del orden de 10 mm, pero al mismo tiempo proporciona información a escala atómica. Otra gran aplicación de la difracción de rayos X es la resolución de estructuras de compuestos químicos, especialmente compuestos orgánicos (Dash y cols. 2002).

### 1.3.7. Microscopía de Fuerza Atómica

La técnica de microscopía de fuerza atómica (más conocida como AFM) es una herramienta muy moderna de caracterización morfológica de compuestos. Los microscopios de fuerza atómica son unos microscopios de barrido por sonda y hasta la fecha son la única familia de instrumentos que permiten obtener imágenes topográficas de las superficies de las muestras sin restricciones de medio, es decir, permiten trabajar en vacío, aire o líquidos con una resolución nanométrica (figura 1.7).

Los microscopios de fuerza atómica permiten trabajar de dos formas distintas: tomando contacto con la muestra (en el "modo de contacto") o bien manteniendo una distancia operativa punta-muestra de pocas decenas de Å ("modo contacto intermitente"). En el modo de contacto, al disminuir la distancia punta-muestra disminuye también el área de exploración y se obtienen mayores resoluciones. Sin embargo, en el caso de las sustancias poliméricas, aumenta considerablemente la probabilidad de dañar la superficie de las moléculas, por lo que es preferible trabajar en el modo de contacto intermitente.

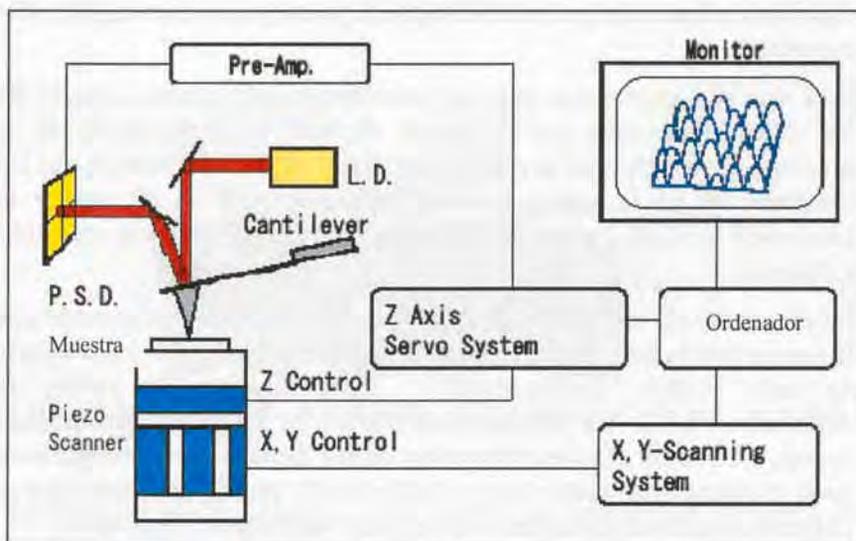


Fig. 1.7. Representación esquemática del fundamento de la técnica de AFM.

En su reciente aplicación en el campo de la micro y nanoencapsulación, esta técnica permite poner de manifiesto la morfología espacial del complejo de interacción fármaco-polímero a nivel molecular mediante su descripción molecular. El AFM permite conocer el tamaño de las nanoesferas de un modo muy preciso, puesto que a diferencia de las otras técnicas habituales en la medición de partículas, permite identificar partículas individuales. Esta técnica nanométrica también presenta otras ventajas adicionales como son la gran resolución de las imágenes obtenidas, la posibilidad de trabajar en ambiente controlado a presión atmosférica y que no es necesario un tratamiento previo de las muestras.

La magnitud de medida del microscopio de fuerza atómica es la fuerza que afecta a la punta afilada. Para ello, la punta está unida al extremo de una palanca o *cantilever*, cuya curvatura es detectada por una matriz de fotodiodos. En el modo de contacto intermitente se fuerza la vibración del *cantilever* cerca de su frecuencia de resonancia y se mide la amplitud de la vibración (que es del orden de unos nm) y

disminuye lentamente a medida que la punta se va acercando a la muestra.

Esta técnica nanométrica obtiene las imágenes por cálculo a partir de los datos detectados por la sonda durante la exploración de la muestra. De este modo, la resolución lateral está condicionada por las dimensiones de la punta (que en este caso son de 10 nm) y la resolución vertical (que es del orden de 0,1 Å) sólo depende del ruido ambiental.

En el estudio de materiales de baja consistencia, la fuerza ejercida por la sonda puede deformar las superficies de las moléculas. Pero aparte de esta posible deformación, a bajos niveles de ruido, la determinación de las dimensiones verticales es nanométricamente exacta. En cambio, la determinación de las dimensiones horizontales de la muestra está sujeta a convolución con la punta, de forma que se obtienen anchuras aparentes a veces muy superiores a las reales.

Es posible calcular la magnitud de esta distorsión a partir del modelo descrito para partículas idealmente esféricas y calcular así las medidas reales, tras aplicar el pertinente factor de corrección.

### 1.3.8. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

La técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (conocida como XPS) consiste en la excitación mediante un haz de rayos X de los niveles más internos de los átomos, provocando la emisión de fotoelectrones que proporcionan información sobre la energía de cada nivel y, por tanto, sobre la naturaleza de cada átomo emisor.

A partir de la energía cinética y de la energía de excitación  $h\nu$  se determina la energía de enlace del electrón emitido:

$$E_e = h\nu - E_{cin}$$

Siendo:

$E_e$ : energía de enlace

$h$ : constante de Planck

$\nu$ : frecuencia de vibración

$E_{cin}$ : energía cinética de los electrones emitidos

En la figura 1.8 se esquematiza el fundamento de la técnica de XPS.

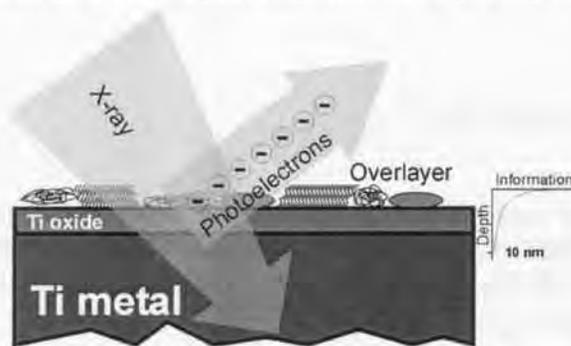


Fig. 1.8. Representación esquemática del fundamento de la técnica de XPS.

Los electrones de valencia cuya energía de enlace sea inferior a  $h\nu$  podrán extraerse, lo que permite representar el diagrama de energías electrónicas de un elemento. El desplazamiento químico de los electrones de valencia depende del entorno químico del átomo, lo que proporciona información sobre su estado en el material analizado.

En el caso de un sólido, el pequeño recorrido libre de los electrones en la materia limita la profundidad analizada a una capa superficial, cuyo espesor puede variar entre 1 y 10 nm, según las condiciones experimentales y la naturaleza del material analizado. Es posible saber la composición superficial de un material e incluso el estado de oxidación y si contiene un determinado elemento. Se pueden detectar todos los elementos, exceptuando el hidrógeno. La sensibilidad depende de cada elemento en particular.

El objetivo principal de esta técnica consiste en el cálculo de la composición porcentual de una determinada capa así como el estado de oxidación de los elementos que la forman.

En el presente trabajo se pretende aplicar el análisis de XPS en la cuantificación de la composición de la cubierta de las nanoesferas, especialmente para facilitar la valoración del contenido remanente en alcohol polivinílico, excipiente que actúa como coadyuvante en los procesos de nanoencapsulación y que habitualmente se cuantifica por métodos espectrofotométricos que requieren una engorrosa

---

preparación de la muestra (Finley 1961, McGee y cols. 1997, Sahoo y cols. 2002).

### 1.3.9. Potencial Zeta

El potencial zeta es una medida de la magnitud de repulsión o atracción entre partículas. Su medida da información detallada del mecanismo de dispersión y es clave en el control de las dispersiones electrostáticas.

Podemos diferenciar entre movilidad electroforética y potencial zeta.

La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de las partículas en suspensión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de la suspensión. El potencial zeta expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las partículas.

El método de medida se basa en la producción de dos haces coherentes procedentes de una fuente láser de helio-neón de baja potencia, los cuales se cruzan en la celda de medida donde se coloca una suspensión de partículas (5 nm-5.000 nm o más), originándose una serie de franjas de interferencias. Las partículas, cuyos movimientos a través de las franjas se fuerzan mediante la aplicación de un campo eléctrico, dispersan la luz con una intensidad que varía según una frecuencia dependiente de su velocidad. La luz dispersada se recoge en un fotomultiplicador y se analiza para dar un espectro de frecuencias, a partir del cual se calcula la distribución de la movilidad de las partículas. Los resultados se presentan en una gráfica que muestra el espectro completo del potencial zeta o de la movilidad electroforética de todas las partículas en la muestra.

Se pretende valorar el potencial zeta de las nanopartículas y poder correlacionar los valores obtenidos con las cantidades residuales de alcohol polivinílico hallado en la cubierta.

## ***1.4. Disolventes Alternativos***

---

Uno de los principales objetivos del presente trabajo consiste en la obtención de un método de nanoencapsulación que además de ser eficaz sea fácilmente industrializable y que cumpla con las normativas vigentes requeridas para el registro de la especialidad.

Los métodos de micro y nanoencapsulación presentan un problema importante que limita su empleo a nivel industrial puesto que la mayoría requieren el empleo de un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición. Los disolventes de elección son los organoclorados, principalmente diclorometano y cloroformo.

La aparición de la ICH Q3C ha supuesto una limitación en el empleo de estos disolventes y si bien a nivel de investigación aún hay muchos grupos que los siguen utilizando, hoy en día las agencias regulatorias difícilmente autorizan la comercialización de medicamentos en cuyo proceso de fabricación intervengan este tipo de disolventes. Esta situación, junto con una conciencia medioambiental cada vez más arraigada ha supuesto la aplicación de los principios de la *Green Chemistry* o química verde, también en el campo de la formulación (Anastas y Warner 1998).

Las aproximaciones más novedosas en la obtención de micropartículas proponen el empleo de disolventes supercríticos, si bien los costes y la infraestructura requeridos para la implementación de esta tecnología suponen que sea poco asequible para la mayoría de centros de investigación y producción (Thies y cols. 2003, Yu-Sung y cols. 2004). La alternativa más viable consiste en la sustitución de los disolventes organoclorados por otros de los incluidos en la clase 3 de la ICH Q3C, es decir, disolventes con potencial baja toxicidad y por lo

tanto menor riesgo para la salud humana. En este grupo se incluyen disolventes como son el ácido acético, acetona, butanol, acetato de etilo, etc.

En la tabla 1.9 se adjuntan los resultados de las propiedades físicas de algunos disolventes. También se ha incluido el parámetro “impacto en la salud” puesto que es de crucial importancia en la selección de disolventes alternativos a utilizar en el proceso de encapsulación.

Disolvente	Viscosidad (cps, 25°C)	Densidad (g/ml)	Punto ebullición (°C)	Impacto en la salud
Ácido acético glacial	1,10	1,049	118	4
Acetona	0,30	0,791	56	6
Acetonitrilo	0,34	0,786	82	3
Ciclohexano	0,90	0,774	81	6
Acetato de etilo	0,43	0,900	77	7
n-Heptano	0,40	0,684	98	5
Metanol	0,54	0,791	65	4
Diclorometano	0,41	1,327	40	2
2-Propanol	1,90	0,785	82	7
Piridina	0,88	0,980	115	1
Tetrahidrofurano	0,46	0,881	66	4
Agua	0,89	1,000	100	10

Tabla 1.9. Propiedades físicas de distintos disolventes. También se incluyen valores de impacto en la salud humana, siendo 10= benigno y 0= perjudicial.

De acuerdo con estos datos y teniendo en cuenta las características necesarias para lograr la encapsulación del principio activo se elige como disolvente alternativo al acetato de etilo, por ser el que presenta el menor impacto negativo sobre la salud humana, seguido por la acetona. Además, ambos disolventes también presentan un punto de ebullición relativamente bajo, lo que facilita la evaporación del disolvente del medio de reacción, acortando los tiempos de nanoencapsulación.

## ***1.5. Terapia antiinflamatoria***

---

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un conjunto de fármacos que poseen acciones analgésica, antipirética y antiinflamatoria. La eficacia relativa de cada uno puede ser diferente para cada acción, de ahí que su utilización en una u otra indicación terapéutica dependerá de su grado de eficacia y de su grado de toxicidad. Los AINE son fármacos muy prescritos tanto para tratamiento sintomático de procesos agudos como crónicos. Se estima que aproximadamente el 20% de las personas mayores de 65 años los toman y que se prescriben a alrededor del 20% de los pacientes ingresados en hospitales (Brooks y Day 1991).

Aunque los AINE son fármacos relativamente seguros, cuando se administran a dosis elevadas pueden presentar efectos adversos e interacciones potencialmente graves. Se estima que entre el 21% y el 25% de los consumidores de AINE presentan reacciones adversas, sobretodo gastrointestinales y renales (Hollander 1993).

### **1.5.1. Mecanismo de acción**

Desde 1971 y gracias al trabajo de Sir Jhon Vane se conoce que el principal mecanismo de acción de los AINE es debido a su acción inhibitoria sobre la enzima ciclooxigenasa (Vane 1971). Cualquier clase de estímulo inflamatorio, como un traumatismo físico, radiaciones, infecciones, irritantes químicos, etc., produce una agresión sobre las células del huésped, que pone en marcha la cascada de reacciones que conducen a la respuesta inflamatoria (figura 1.10).

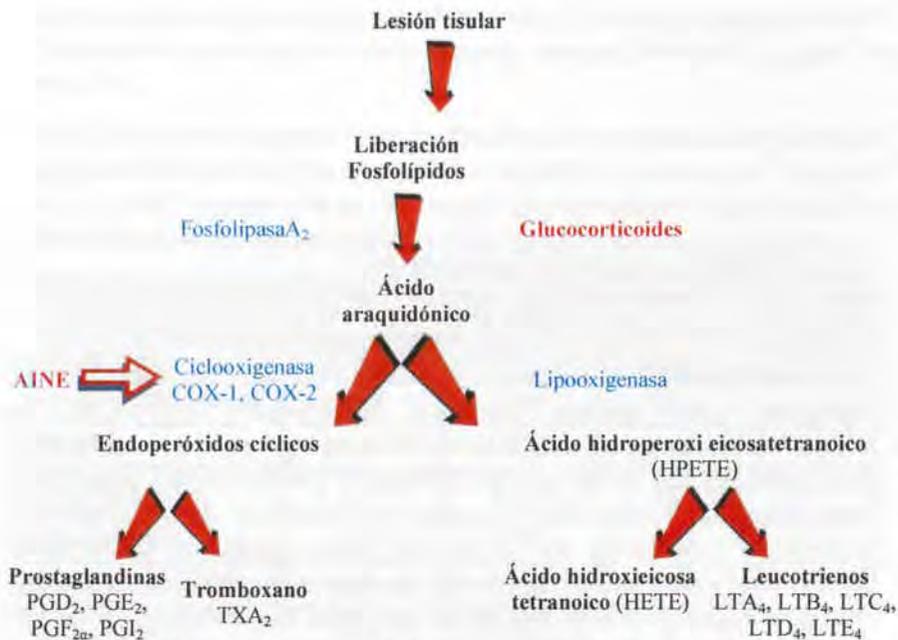


Fig. 1.10. Esquema de la respuesta antiinflamatoria.

Esquemáticamente, la acción de los AINE se puede resumir en los siguientes puntos:

1. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas.
2. Inhibición de la síntesis de leucotrienos.
3. Inhibición de la síntesis de factor activador de las plaquetas.
4. Inhibición de la generación de radicales libres.
5. Inhibición de la producción de citocinas.
6. Inhibición de la liberación de enzimas lisosómicas por polimorfonucleares.
7. Inhibición de la agregación y adhesión de neutrófilos.
8. Inhibición de procesos asociados a la membrana celular:
  - Actividades enzimáticas: NADPH oxidasa y fosfolipasa C
  - Fosforilación oxidativa
  - Transporte aniónico
9. Inhibición de la función linfocitaria.
10. Disminución de la producción de factor reumatoide.
11. Interferencia con el metabolismo del cartílago.

### 1.5.2. Principales grupos de AINE

La familia de los AINE está formada por un numeroso grupo de fármacos (Prieto-Yerro y Vargas-Castrillón 2000), diferenciados según su estructura química (tabla 1.2).

<b>Salicilatos</b>	Ácido acetil salicílico Difumisal	Salicilato sódico Salsalato
<b>p-aminofenoles</b>	Paracetamol	
<b>Pirazolonas</b>	Metamizol	
<b>Ácidos propiónicos</b>	Ibuprofeno Naproxeno Fenoprofeno Ketoprofeno Flurbiprofeno	Ác. Tiaprofénico Butibufeno Dexketoprofeno Fenbufeno
<b>Ácidos acéticos</b>	Indometacina Sulindaco Acetaminicina Proglutacina	Fentiazaco Ketorolaco Diclofenaco Aceclofenaco
<b>Ácidos antranílicos</b>	Ác. Mefenámico Ác. Meclofenámico	Ác. Niflúmico
<b>Oxicams</b>	Piroxicam Tenoxicam	Meloxicam
<b>Otros</b>	Etodolaco Nimesulida Nabumetona	Rofecoxib Celecoxib Valdecoxib

Tabla 1.2. Clasificación de los AINE.

### 1.5.3. Efectos adversos de los AINE

El principal mecanismo de acción de los AINE es debido a su acción inhibitoria sobre la enzima ciclooxigenasa. La enzima ciclooxigenasa convierte el ácido araquidónico en prostaglandina, que es un potente pro-inflamatorio. El problema está en que también inhiben la producción de prostaglandinas E1, E2, I2, y F2, que a nivel gastrointestinal incrementan la producción de bicarbonato, preserva la microvasculatura de la mucosa e incrementa su regeneración. Estas prostaglandinas, que tienen una función fisiológica de protección

sobre el tracto gastrointestinal, son inhibidas por los AINE tradicionales. Recientemente se ha descrito que no existe una sola ciclooxigenasa sino dos: la COX-1 y la COX-2. (DeWitt y cols. 1993). La COX-1 está involucrada en la producción de las prostaglandinas antes descritas, que tienen efecto fisiológico en la mucosa gástrica, riñón y endotelio, mientras que la COX-2 lo está en las prostaglandinas encargadas del proceso inflamatorio. El AINE ideal debería inhibir selectivamente a la COX-2. Los AINE producen toxicidad gastrointestinal tanto por la acción directa del medicamento sobre la mucosa como por su efecto sistémico. En la tabla 1.3 se resumen los efectos secundarios asociados a la terapia con AINE (Frölich 1995, Sing 1998, Brooks y cols. 1999, Wolfe y cols. 1999).

SISTEMA	EFEECTO
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Úlcera péptica</li> <li>• Esofagitis</li> <li>• Ulceraciones del intestino delgado y grueso</li> <li>• Colitis</li> </ul>
Renal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insuficiencia renal aguda reversible</li> <li>• Alteraciones del agua y electrolitos</li> <li>• Insuficiencia renal crónica</li> <li>• Nefritis intersticial</li> <li>• Síndrome nefrótico, cistitis</li> </ul>
Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exacerbación de la hipertensión arterial</li> <li>• Exacerbación de la insuficiencia cardíaca congestiva</li> <li>• Exacerbación de la angina</li> </ul>
Hepático	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevación de las transaminasas</li> <li>• Insuficiencia hepática fulminante</li> </ul>
Sistema nervioso central	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cefalea, somnolencia</li> <li>• Alteraciones del comportamiento y confusión</li> </ul>
Hematológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trombocitopenia</li> </ul>
Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exacerbación de asma en pacientes con poliposis nasal</li> <li>• Rash cutáneo</li> </ul>

Tabla 1.3. Principales efectos secundarios asociados a la terapia con AINE.

De entre todos estos efectos secundarios, el más grave es la producción de lesiones gastrointestinales (Goodman-Gilman 1996, Hernández-Díaz y García-Rodríguez 2000).

Entre el 35% y 50% de los enfermos que reciben las dosis terapéuticas usuales de indometacina presenta síntomas indeseables y aproximadamente un 20% debe abandonar su empleo.

Hasta la fecha, sólo unos pocos principios activos se han formulado en forma de micro o nanocápsulas, focalizándose en la administración intraarticular, objeto de estudio en el presente trabajo (Bozdag y cols. 2001, Horisawa y cols. 2002, Liang y cols. 2004).

#### **1.5.4. Indometacina**

La indometacina es un antiinflamatorio no esteroideo con propiedades analgésicas y antipiréticas.

La indometacina se ha utilizado con éxito en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis, bursitis, tendinitis, espondilitis anquilosante, procesos inflamatorios agudos del aparato locomotor, procesos inflamatorios secundarios a intervenciones ortopédicas, artritis gotosa aguda y dismenorrea primaria.

La indometacina es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y de la migración de leucocitos a áreas inflamadas. Además, inhibe la fosfodiesterasa interfiriendo con la producción de anticuerpos. Al igual que otros AINE, reduce el dolor a nivel periférico, al disminuir la sensibilización de los receptores del dolor. También posee acción antipirética por inhibición de prostaglandinas hipotalámicas.

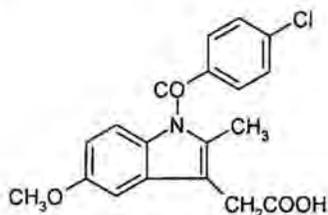
##### **1.5.4.1. Caracterización físico-química**

A continuación se detallan las propiedades físico-químicas más relevantes de la indometacina (O'Brien y cols. 1984, Clarke's 1986, USP 27 2005, European Pharmacopoeia. 5th ed. 2005).

##### Fórmula Molecular



PM: 357,8

Estructura QuímicaDefinición

La indometacina puede presentar distintas formas cristalinas, pero en preparados farmacéuticos se usa principalmente la Forma I.

Se describe como un polvo blanco o amarillo pálido, cristalino e inodoro. Prácticamente insoluble en agua y soluble en alcohol (tabla 1.4).

Solubilidad

Disolvente	Temperatura (°C)	Solubilidad
Agua	25	0,40 mg/100 mL <sup>a</sup>
Agua	25	0,52 mg/100 mL <sup>b</sup>
Agua	25	0,88 mg/100 mL <sup>c</sup>
Agua	25	Pract. insoluble
Tampón Fosfato pH 5,6	25	3 mg/100 mL <sup>a</sup>
Tampón Fosfato pH 5,6	25	5 mg/100 mL <sup>b</sup>
Tampón Fosfato pH 6,2	25	11 mg/100 mL <sup>a</sup>
Tampón Fosfato pH 6,2	25	16 mg/100 mL <sup>b</sup>
Tampón Fosfato pH 7,0	25	54 mg/100 mL <sup>a</sup>
Tampón Fosfato pH 7,0	25	80 mg/100 mL <sup>b</sup>
Etanol 95%	25	1 en 50
Cloroformo	25	1 en 30
Éter	25	1 en 45
Metanol	25	32 mg/g
Benceno	25	4 mg/g
n-butanol	25	19 mg/g
sec-butanol	25	27 mg/g
Acetona	25	soluble

<sup>a</sup> Forma I

<sup>b</sup> Forma II

<sup>c</sup> Forma III

Tabla 1.4. Solubilidades de la indometacina.

### Punto de fusión

Forma Polimórfica	Punto de Fusión °C
Forma I ( $\gamma$ )	158-161,5
Forma II ( $\alpha$ )	152-155,5
Forma III	148
Forma IV	134
Tipo $\beta$	158-160,5

Tabla 1.5. Formas polimórficas de la indometacina y sus puntos de fusión.

### Propiedades cristalinas

La indometacina presenta 3 formas cristalinas, conocidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , aunque algunos autores relatan hasta 4 polimorfos distintos.

La forma I es la que presenta el punto de fusión más alto (160 °C) y la solubilidad más baja (tabla 1.4) y es, por lo tanto, la forma cristalina termodinámicamente más estable de la indometacina. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, las dos formas I y II son equivalentes biológicamente.

### Síntesis

La indometacina se preparó originariamente, tal y como se muestra en el esquema (figura 1.11), por conversión del ácido 5-metoxi-2-metilindol-3-acético en su anhídrido, usando dicitclohexilcarboimida en tetrahidrofurano (THF). El tratamiento del anhídrido en presencia de cloruro de zinc y butanol produce el butil éster, que al tratarlo con ácido p-clorobenzoico da la indometacina butil éster. El éster se piroliza y purifica para dar la indometacina.

La indometacina etil éster se sintetiza por reacción del N-p-clorobenzoil-N-p-metoxifenilhidracina con 1-hidroxi-2-propanona y 2-bromoetilacetato.

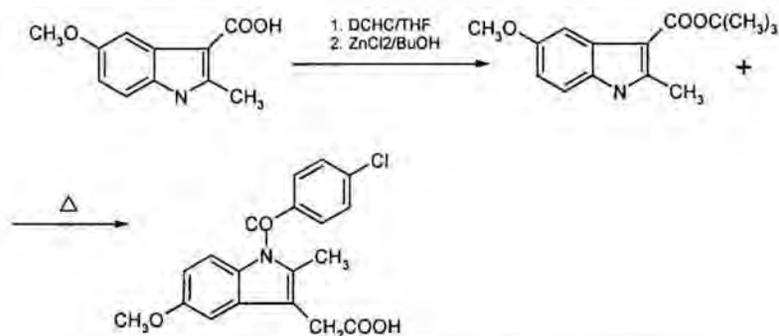


Figura 1.11. Esquema de la ruta sintética de la indometacina.

### Estabilidad

En general, la indometacina en polvo y en sus distintas formulaciones, es estable a temperatura ambiente como mínimo durante 5 años. La exposición prolongada a luz directa induce a un cambio de color. Sin embargo, aunque la degradación es ligera, se toma como precaución el guardarla en contenedores opacos, para minimizar su decoloración.

La indometacina también sufre hidrólisis alcalina, dando 2-metil-5-metoxi-indol-3-acetato (figura 1.12).

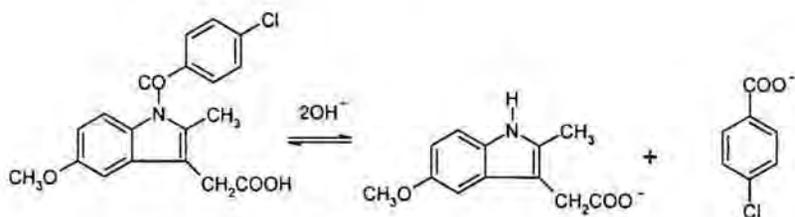


Figura 1.12. Hidrólisis alcalina de la indometacina.

#### 1.5.4.2. Acción farmacológica

La indometacina presenta una potente actividad antiinflamatoria, antitérmica y analgésica ya que es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y de la migración de leucocitos a áreas inflamadas. Concretamente, la indometacina produce una inhibición reversible de la ciclooxigenasa al competir con su sustrato, el ácido araquidónico, por el centro activo de la enzima. Además, inhibe la fosfodiesterasa interfiriendo con la producción de anticuerpos. Al igual que otros AINE, reduce el dolor a nivel periférico al disminuir la sensibilización de los receptores del dolor. Posee acción antipirética por inhibición de prostaglandinas hipotalámicas. No es uricosúrica, pero es muy eficaz en el tratamiento agudo de la gota por su actividad antiinflamatoria.

#### Características farmacocinéticas y metabolismo

La absorción por vía oral es rápida y completa. La concentración máxima en plasma se alcanza en término de dos horas. Las concentraciones en equilibrio dinámico en plasma después de administración durante largo tiempo son de 0,5 µg/mL de promedio. La indometacina se liga un 90% a las proteínas plasmáticas y también lo hace de forma extensa a los tejidos. La absorción de los supositorios es más rápida que la forma oral, pero la cantidad absorbida parece ser menor. Atraviesa la placenta y es secretada en la leche.

La indometacina es convertida primordialmente en metabolitos inactivos, incluidos aquellos que se forman por O-desmetilación (50%), conjugación con ácido glucurónico (10%) y N-desacilación. Algunos de estos metabolitos son detectables en plasma y los metabolitos libres y conjugados se eliminan por orina, bilis y heces. Hay recirculación enterohepática de los conjugados y de la propia indometacina. Se elimina por la vía renal en un 60% y el resto por vía biliar (Goodman-Gilman 1996).

#### 1.5.4.3. Reacciones adversas

Los efectos adversos de la indometacina afectan principalmente al sistema nervioso central y al sistema gastro-intestinal. Entre el 30 y 60% de los pacientes experimenta algún tipo de efecto adverso. Las reacciones adversas más comunes son: cefaleas (10-50%), mareo (3-9%) y alteraciones digestivas (20%).

La indometacina presenta en ancianos un incremento del 50% en la incidencia de efectos neurotóxicos (confusión, dolor de cabeza, etc). Además, los ancianos muestran mayor sensibilidad a los efectos tóxicos hematológicos, digestivos, renales y hepáticos de los AINEs. También pueden causar retención de líquidos, pudiendo producir complicaciones cardiovasculares y reducción de la eficacia de los tratamientos antihipertensivos. No se recomiendan tratamientos superiores a una semana, utilizando además dosis 50% inferiores a las de los adultos jóvenes.

#### 1.5.4.4. Formas farmacéuticas comercializadas

En la tabla 1.6 se resumen las formas farmacéuticas en que se presenta la indometacina.

Formas Farmacéuticas de Indometacina
Cápsulas de 25 y 50 mg
Cápsulas retard de 75 mg
Grageas de 25 mg
Supositorios de 50 y 100 mg
Liofilizado para solución inyectable de 50 mg

Tabla 1.6. Formas farmacéuticas comercializadas de indometacina

Los inyectables requieren la siguiente posología: Dosis intramuscular: 25-100 mg diarios; excepcionalmente pueden ser necesarios 150 mg. Dosis intramuscular única máxima 50 mg. Dosis máxima diaria 200 mg.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## 2. MATERIALES

---

### 2.1. Principio Activo

- Indometacina: Roig Farma (Barcelona, España).

### 2.2. Excipientes y materiales auxiliares

- PLGA 50/50 viscosidad inherente 0,20-0,58 dL/g y PLGA 85/15 viscosidad inherente 0,66 dL/g, Birmingham Polymers Inc. (Birmingham, E A ).
- PVA: Mowiol® 4-88, viscosidad inherente  $4 \pm 0,5$  mPaS, porcentaje de hidrólisis =  $87,7 \pm 1\%$ , Hoechst Ibérica (Barcelona, España).
- PVA: Airvol® 540, viscosidad inherente  $50 \pm 5$  mPaS, porcentaje de hidrólisis =  $88 \pm 1\%$ , Quimigranel (Barcelona, España).
- Poloxámero 188: Lutrol® 68, BASF (Ludwigshafen, Alemania).
- Hidroxipropilmetilcelulosa: Pharmacoat® 606, Seppic (París, Francia).
- PEG-660-12-hidroxi-estearato: Solutol® HS15: BASF (Ludwigshafen, Alemania).
- Quitosano: Hydagen® DCMF, Cognis Iberia (Barcelona, España).
- Cloruro cálcico hexahidrato: Roig Farma (Barcelona, España).

- Cloruro magnésico hexahidrato: Roig Farma (Barcelona, España).
- Sacarosa: Roig Farma (Barcelona, España).
- Lactosa: Roig Farma (Barcelona, España).
- Manitol: Roig Farma (Barcelona, España).
- Glicina: Roig Farma (Barcelona, España).
- Trehalosa: AMCAN (París, Francia).
- Cloruro de plata: Roig Farma (Barcelona, España).
- Dihidrógenofosfato sódico: Roig Farma (Barcelona, España).
- Hidrógenofosfato disódico: Roig Farma (Barcelona, España).
- Diclorometano para análisis: Merck (Darmstadt, Alemania).
- Acetato de etilo para análisis: Merck (Darmstadt, Alemania).
- Acetona: Panreac (Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico 1N: Panreac (Barcelona, España).
- Ácido glicólico: Roig Farma (Barcelona, España).
- Ácido cítrico: Roig Farma (Barcelona, España).
- Hidróxido sódico lentejas: Roig Farma (Barcelona, España).
- Acetonitrilo para análisis: Merck (Darmstadt, Alemania).
- Membrana de diálisis *Dialysis Tubing* de 32 x 20 mm con retención superior al 99% de partículas de peso molecular superior a 12400. Sigma- Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Papel de filtro acetato de celulosa Whatman n°11, Whatman Inc. (New Jersey, EUA).
- Filtros PVDF de 25 mm de diámetro y de 0,45 y 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Acrodisc LC, Pall Filter ( Michigan, EUA).
- Agua bidestilada purificada por un sistema Milli-Q de 18  $\text{m}\Omega \times \text{cm}^{-1}$ , Millipore Ibérica (Madrid, España).

### 2.3. Equipos

- Reactor de encapsulación RW20 DZM-P4 equipado con ultratúrrax T25 y bomba de vacío Vaccubrand Diaphragm vacuum pump, todo de IKA-Laborstechnik (Staufen, Alemania).
- Baño circulador de agua Cole Palmer Polystat circulator 57-951-004, de Hanson Research (California, EUA).

- Baño termostatzado con agitación Nitronic 320 OR, PSelecta (Barcelona, España).
- Espectrofotómetro Diode-Array Advantage V /visible Spectrometer HP8452A, Hewlett Packard (Grenoble, Francia).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Kontron compuesto por una bomba Kontron Pump System 420, autoinyector Kontron 465 con detector ultravioleta Kontron 432 provisto de una estación de datos PC Integration Pack. Kontron Instruments (Milán, Italia).
- Difractómetro Diferencial de Barrido TA-400 equipado con célula DSC 25 y termobalanza TG50, Mettler Toledo (Greifensee, Suiza).
- Equipo de potencial zeta Zetasizer Nano S, Malvern Instruments (Worcestershire, R ).
- Analizador de tamaño de partícula por difracción de rayo láser Coulter LS 230 con el módulo Small Volume Modul Plus, He-Ne-láser de 633 nm y un módulo PIDS *Polarization Intensity Differential Scattering*, Beckman Coulter (California, E A).
- Microscopio Eclipse E600 con cámara CCD-Iris SSC-C370P y objetivos 4 x 0.10 / 10 x 0.25 / 20 x 0.40 / 40 x 0.65/ y 100 x 1,25. Nikon (California, E A ).
- Microscopio electrónico de barrido Hitachi 2300, Hitachi-High Technologies (Krefeld, Alemania).
- Liofilizador Christ Alpha 2-4, B. Braun Biotech Internacional (Osterode, Alemania).
- Sistema AFM: Extended Multimode Nanoscope IIIa, Digital Instruments (Santa Bárbara, E A).
- Sistema XPS: PHI-5500 Multitechnique System, Physical Electronics SA (Chanhassen, E A).
- Espectrómetro FTIR: Bomem MB-120, Jenk Instrumental (Buenos Aires, Argentina). Medidas realizadas con pastilla de cloruro potásico.
- Difractómetro XRD Bebbbye-Scherrer: CPS-120, Inel (Artenay, Francia).
- Viscosímetro Brookfield RVT (Massachussets, E A).



- Viscosímetro Epprecht-Rheomat 15 Contraves AG (Zurich, Suiza).
- pHímetro Metrohm 713 (Herisau, Suiza).
- Agitador MS1 Minishaker, IKA-Labortechnik (Staufen, Alemania).
- Osmómetro Advanced Micro-Osmometer 3MO, Advanced Instruments (Massachusetts, EUA).
- Ultracentrífuga Beckman Avanti™ equipada con un rotor GS-15 (California, EUA).
- Estufa de vacío Heraeus (Hanau, Alemania) acoplada a bomba de vacío de aceite Telstar Torricelli (Barcelona, España).
- Pipetas automáticas de 0,5 a 5 mL de Finnpipette (Vantaa, Finlandia).

## 2.4. Software específico

- **Espectrofotómetro:** UV-VIS HP 89532A UV-VIS Software Rev 1.00.00. Hewlett Packard (Grenoble, Francia).
- **DSC:** STARe, Mettler Toledo (Grefensee, Suiza).
- **Microscopio óptico:** Soft Imaging System, analySIS 3.0 (Münster, Alemania).
- **AFM:** Nanoscope v5.12.r3, Digital Instruments (Santa Bárbara, EUA).
- **XPS:** Multipack v6.0A, Physical Electronics USA (Chanhassen, EUA).
- **XRD:** Peakoc, Inel (Artenay, Francia).
- **Statgraphics Plus 5.1.** (Statistical graphics Corp., EUA).
- **WinNonlin 4.1.,** Pharsight (California, EUA).

## 3. MÉTODOS

---

En este capítulo se describen los métodos analíticos y matemáticos aplicados en la caracterización de las nanoesferas.

### 3.1. Cálculos de evaluación de procesos

A continuación se detallan los cálculos aplicados para la evaluación de los distintos lotes de nanoesferas fabricados.

#### 3.1.1. Contenido teórico en principio activo (%)

$$\text{Contenido teórico p.a. (\%)} = \frac{\text{(cantidad teórica p.a.)}}{\text{(cantidad teórica p.a. + cantidad teórica de polímero)}} \times 100$$

#### 3.1.2. Cantidad de principio activo encapsulado

$$\text{Cantidad p.a. encapsulado*} = \text{cantidad teórica p.a.} - \text{cantidad p.a. sobrenadante}$$

\* ver detalles en capítulo 4

#### 3.1.3. Contenido en principio activo en las nanoesferas (%)

$$\text{Contenido en p.a. (\%)} = \frac{\text{cantidad de p.a. encapsulado}}{\text{(cantidad teórica p.a. + cantidad teórica de polímero)}} \times 100$$

### 3.1.4. Eficacia de encapsulación (%)

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{Contenido teórico en principio activo}} \times 100$$

### 3.1.5. Rendimiento total del proceso de encapsulación (%)

$$Rdt (\%) = \frac{\text{Peso final de nanoesferas}}{\text{Peso teórico de nanoesferas}} \times 100$$

## 3.2. Características morfométricas

En la caracterización morfométrica de las nanoesferas se utilizan tres métodos distintos, que se describen a continuación.

### 3.2.1. Microscopía óptica

Las observaciones y medidas de microscopía óptica se realizan con un microscopio Eclipse E600 con cámara CCD-Iris SSC-C370P de Nikon (California, EUA) y empleando luz polarizada cruzada. A no ser que se indique lo contrario, se toma una alícuota de muestra pulverulenta a analizar, se coloca en un tubo *eppendorf* y se diluye en 1000  $\mu\text{L}$  de dimeticona fluida. La preparación se agita en un agitador MS1 Minishaker, de la marca IKA a 1800 unidades durante 1 minuto. En los casos en que se mide el tamaño de partícula de las suspensiones de nanoesferas, se toma una gota de la muestra y se observa directamente.

### 3.2.2. Difracción láser

Se emplea un equipo por difracción láser de la marca Coulter LS 230, USA-Miami; He-Ne-láser de 633 nm. El equipo posee un módulo PIDS (*Polarization Intensity Differential Scattering*) capaz de medir

tamaños de partícula de hasta 40nm. Para el cálculo de los datos con PIDS se ha estimado el índice de refracción de las partículas como 1,456 para el valor real y 0,001 para el imaginario.

A no ser que se indique lo contrario, se toma una alícuota de la muestra pulverulenta de nanoesferas y se suspende en agua purificada. Se va añadiendo muestra hasta que el equipo señala que tiene cantidad suficiente de muestra para realizar las medidas. En los casos en que se mide el tamaño de partícula de las suspensiones de nanoesferas, se adicionan directamente, sin dilución previa. Los resultados se expresan en número de partículas y todas las medidas se realizan a 25 °C y por triplicado.

### 3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías se realizan con un microscopio electrónico de barrido Hitachi 2300, Hitachi-High Technologies (Krefeld, Alemania). Las muestras de nanoesferas sólidas se depositan sobre un soporte al que previamente se ha fijado un papel adhesivo a doble cara. Las muestras se recubren con un baño de oro al vacío mediante un *SEM Coating System*, durante 2 minutos en un intervalo de 1 a 10 mbar. Las muestras se observan con un microscopio electrónico Hitachi 2300 a diferentes aumentos y diferentes potenciales de aceleración.

### 3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para la realización de las medidas de DSC se utiliza un difractómetro diferencial de barrido TA-400 equipado con célula DSC 25 y termobalanza TG50, Mettler Toledo (Greifensee, Suiza). Las muestras (con un peso entre 1 y 10 mg) se sellan en cápsulas de aluminio. Las muestras se colocan sobre unos crisoles de aluminio y como crisol de referencia se utiliza uno de zinc, puesto que es inerte en un amplio intervalo de temperaturas. El intervalo de temperatura estudiado fue de 30 °C a 250 °C, a una velocidad de calentamiento 10 °C/minuto.

Las mediciones se realizan bajo atmósfera de nitrógeno de 99,9 % de pureza a una velocidad de flujo de 45 cm<sup>3</sup>/min.

### **3.4. Ensayos de liberación *in vitro***

Para la realización de los ensayos de liberación *in vitro* se introduce una cantidad exactamente pesada de nanoesferas en polvo dentro de un saco de diálisis, previamente tratado como se describe en el apartado 3.4.2. Para facilitar la incorporación de la muestra se deposita junto con 2 mL del medio de disolución. A continuación, con hilo de nylon se ata el cabo superior del saco de diálisis. El saco cargado con la muestra se introduce dentro de un vial de cristal topacio con un volumen conocido de medio de disolución. El medio de disolución se prepara según se describe en el apartado 3.4.1.

Los viales se cierran con un tapón de cierre hermético y se sumergen en un baño termostatzado a 37,6 °C con agitación oscilante constante de 24 oscilaciones/minuto. El motivo de fijar la temperatura del agua del baño a 37,6 °C es para garantizar que en el interior de los viales el medio de disolución se encuentra a 37 °C.

Se toman muestras a tiempos prefijados con ayuda de una pipeta automática y se repone la cantidad extraída con nuevo medio de disolución. Las muestras se filtran en filtro de membrana Pall® de 0,45 µm y se valoran por lectura directa al espectrofotómetro a λ de 318 nm, empleando el medio de disolución como blanco.

Todos los ensayos se realizan con 6 replicados, excepto para las muestras D6, S5 y F1 fabricadas con el método optimizado de acetato de etilo, de las que se realizan 12 replicados.

#### **3.4.1. Preparación del medio de disolución**

Se emplea como medio de disolución una solución reguladora de fosfato monopotásico 0,1 M de pH 7,4, preparada según se describe en la Farmacopea Europea, 5ª edición.

#### **3.4.2. Preparación de los sacos de diálisis**

Las membranas se deben tratar siguiendo las instrucciones del proveedor, que las suministra en estado seco y protegidas con glicerina. Tras su tratamiento y consiguiente enjuagado en agua purificada, se cortan en trozos de 5 cm y se atan por un extremo con hilo de nylon. Los sacos se conservan sumergidos en agua purificada y en la nevera hasta su empleo.

### 3.4.3. Cálculos para el ensayo de liberación *in vitro*

Para el cálculo del porcentaje de principio activo liberado se aplica la siguiente ecuación:

$$Q = [C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i S]$$

Siendo:

Q = Cantidad cedida acumulada de indometacina (mg)

$C_n$  = Concentración de indometacina en un intervalo de muestreo n (mg/mL).

V = Volumen individual de medio de disolución contenido en los viales (mL)

$\sum_{i=1}^{n-1} C_i$  = Suma de concentraciones de indometacina en el intervalo muestreo 1 a n-1 (mg/mL).

S = Volumen de la alícuota de muestreo.

### 3.4.4. Cálculos de MDT y ajustes de los datos de liberación *in vitro*

Para el cálculo del tiempo medio de disolución (MDT) se emplea el programa WinNonlin 4.1., Pharsight (California, E A). Para realizar los cálculos se asume un modelo no compartimental, extravascular.

Para los cálculos de ajustes de los perfiles de liberación *in vitro* a modelos matemáticos se emplea el método de Gauss-Newton.

### 3.5. Liofilización

Como se describe en los capítulos correspondientes, el paso final en los tres métodos descritos de nanoencapsulación consta de varios lavados y ultracentrifugados de las muestras, seguido de la decantación de los sobrenadantes y finalmente el secado en estufa de vacío de los residuos secos. Como último paso previo a la obtención de la formulación final del inyectable de nanoesferas de indometacina, se aborda la elaboración del liofilizado. Para ello, se estudia la obtención del liofilizado con nanoesferas placebo y con nanoesferas cargadas con activo.

También se estudia el efecto de la adición de sustancias crioprotectoras en la velocidad de reconstitución del liofilizado, así como en las características morfológicas de las nanoesferas.

Las sustancias crioprotectoras elegidas han sido la sacarosa, lactosa, glicina, trehalosa y manitol, por ser excipientes en la práctica habitual de la liofilización, con conocida acción crioprotectora (Konan y cols. 2002, Jeong y cols. 2003, Bozdog y cols. 2004).

#### 3.5.1. Preparación de las muestras

Para liofilizar las muestras, se parte de un peso conocido de residuo seco (procedente de los lavados y ultracentrifugados), que se resuspende en 25 mL de agua Milli-Q. Los viales de liofilización se llenan con 3 mL de dicha suspensión de nanoesferas a los que también se adicionan 2 mL de la solución con el crioprotector correspondiente (cuando procede).

Las soluciones se preparan diluyendo el crioprotector al 2% (p/v) en agua purificada.

#### 3.5.2. Condiciones de liofilización

La liofilización de las suspensiones de nanoesferas se realiza en un liofilizador de laboratorio B. Braun Biotech Internacional (Christ Alpha 2-4).

Los envases elegidos son viales de cristal topacio de 16 mL. Los viales se llenan con 5 mL totales de las suspensiones de nanoesferas y se liofilizan por un periodo de 24h. Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- Temperatura inicial: -40 °C
- Temperatura de pre-congelación: -10 °C
- Vacío: 0,120 mbar
- Incremento de temperatura: 5 °C

### 3.6. Difracción de Rayos X

Las medidas de difracción de rayos X han sido realizadas en un difractor de geometría Debye-Scherrer INEL CPS-120 de 250 mm de radio. El equipo posee un detector sensible a la posición de 120° y dispone de 4096 canales de medida.

La radiación de Cu  $K_{\alpha 1}$  ( $\lambda=1,540598 \text{ \AA}$ ) se selecciona con un monocromador primario de Ge (111). Se utiliza un espejo reflector OSMIC Gutman optics #13B-413.

La potencia de trabajo es de 40 kV y 30 mA y las dimensiones del haz son de 5,0 mm de altura y 0,3 mm de ancho.

El detector del difractor se calibra empleando  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{F}_{13}$  (NAC) como patrón externo y función cúbica *Spline*. Para la linearización se emplea el software *Peakoc*, comercializado por INEL®.

Para realizar las medidas, las muestras pulverulentas se disponen en el interior de capilares de vidrio *Lindemann* de 0,7 mm de diámetro. Una vez sellados los tubos, el tiempo de exposición de las muestras es de 1 hora.

### 3.7. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Los estudios de AFM se realizan con un microscopio Extended Multimode Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, EUA) en modo de *tapping* o contacto intermitente. Las imágenes han sido captadas y procesadas mediante el software Nanoscope v5.12.r3 del mismo proveedor.

Para los análisis se utilizan puntas fabricadas en silicio monocristalino (NT-MDT, Moscú, Rusia) con un radio nominal de unos 10 nm (también comprobado por SEM), de forma rectangular, con una constante de fuerza de aproximadamente 0,3 N/m y una frecuencia de resonancia de 21 KHz.

#### 3.7.1. Preparación de las muestras

Se toman alícuotas de las suspensiones y se depositan sobre un sustrato recién exfoliado. La exfoliación del sustrato se realiza inmediatamente antes de depositar la muestra, con ayuda de una cinta adhesiva.

Las suspensiones de nanoesferas se preparan a una concentración de  $10^{-6}$  mg/mL, lo que corresponde aproximadamente a una concentración superficial de 10 moléculas/ $\mu\text{m}^2$ , asumiendo que todas las moléculas de la muestra están adsorbidas en la superficie. Para conseguir las condiciones descritas, se deposita sobre el sustrato 1  $\mu\text{L}$  de la muestra, lo que corresponde a una gota de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta concentración ha sido fijada con el objetivo de obtener y procesar las imágenes en condiciones óptimas, por lo que es necesario que las moléculas de la muestra no cubran la totalidad del sustrato, que es la referencia de las medidas de la sonda.

Para evitar la presencia de impurezas que puedan interferir en el estudio, las suspensiones se preparan con agua Milli-Q y se agitan en un baño de ultrasonidos.

El sustrato utilizado es una superficie de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG: *Highly Oriented Pyrolytic Graphite*), cuya elevada

exfoliabilidad permite la obtención de superficies atómicamente lisas. En la extensión de la muestra se ha tomado la precaución de no superar los 500 nm de espesor, porque si el retroceso de la punta es mayor, las determinaciones del sistema dejan de ser lineales.

Una vez depositada la muestra en el sustrato, se seca en una cámara de flujo de nitrógeno ( $HR < 0,1\%$ , 20-30 minutos) hasta la completa evaporación del líquido. Con estas condiciones de trabajo se obtienen zonas con pocos agregados, máximo de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ , por lo que no se requiere tratamientos de muestra adicionales.

Las suspensiones de nanoesferas se preparan a una concentración de  $0,1 \text{ mg/mL}$  y se van diluyendo hasta  $10^{-8} \text{ mg/mL}$  con un factor de dilución de 1:10. Las muestras se preparan justo antes de realizar las medidas.

### 3.7.2. Medidas de tamaño de partícula

Las medidas en el plano XY son convoluciones del diámetro de la topografía real de las partículas y la forma de la punta, por lo que las medidas deben ser deconvolucionadas.

En este trabajo el diámetro de las partículas se ha estimado aplicando un "modelo simplificado de deconvolución" que se describe según la siguiente ecuación (Vesenka y cols. 1992, Gómez y cols. 1995, Van Noort y cols. 1997, Oliva y cols. 2003):

$$w = 2 \cdot (2 \cdot R_t \cdot h)^{1/2}$$

siendo:

w: anchura aparente de la partícula en la imagen de AFM

$R_t$ : radio de la punta

h: diámetro real de la partícula

A todos los valores correspondientes a medidas en el plano XY que se presentan se les ha corregido el efecto de la convolución. El radio de las puntas utilizadas es de 10 nm, lo que conduce a la expresión  $h = w^2 / 80$ , y por lo tanto solamente es necesario aplicar la corrección a distancias XY inferiores a 80 nm.

### 3.8. Espectroscopía de fotoelectrones X (XPS)

Los análisis de XPS se realizan con un equipo PHI-5500 MultiTechnique System (Physical Electronics), provisto de rayos X no-mocromáticos de Mg-Al que opera a 300 W. Este equipo está provisto de un software MultiPak v6.0A.

Los espectros se adquieren con UHV (*Ultra High Vacuum*) a  $5 \times 10^{-9}$  Torr, empleando rayos en cámara de vacío de Al K $\alpha$  con un ángulo de emisión de electrones de 45° relativos a la superficie de la muestra, lo que conduce a una profundidad efectiva de emisión de unos 5 nm. El espectrómetro se calibra con el pico de Ag 3d $_{5/2}$  en la posición de calibración de 367,8 eV, BE.

Las muestras se analizan en forma de polvo. Se adquieren tanto los espectros generales como los espectros de carbono C1s de alta resolución. Un espectro general es un análisis rápido sobre un intervalo continuo de energía para examinar los elementos presentes en una muestra. Un espectro de alta resolución de carbono C1s es un análisis de varios intervalos estrechos de energía para obtener un espectro de mejor resolución y detalle. Todas las especificaciones de energía se detallan en la tabla 3.1.

Transición	Inicio (eV)	Fin (eV)	Incremento (eV)	Energía de paso. (eV)
<i>Espectro general</i>	1100,00	0,00	-0,80	187,85
<i>C1s</i>	296,00	276,00	-0,10	11,75

Tabla 3.1. Especificaciones de energía en la adquisición de los espectros de XPS.

Con estas condiciones de trabajo se consigue una resolución de energía de aproximadamente 1,1 eV, que se considera apropiada para la finalidad analítica requerida. En la tabla 3.2 se resumen las

condiciones experimentales específicas aplicadas en los análisis de XPS.

RX	Al K $\alpha$
Condiciones de vacío	5x10 <sup>-9</sup> Torr
Pico de calibración (BE)	Ag 3d <sub>5/2</sub> (367,8 eV)
Ángulo de emisión de electrones	45°
Profundidad de análisis	3,5-7 nm
Resolución	1,1 eV

Tabla 3.2. Condiciones experimentales en la adquisición de los espectros de XPS.

La asignación de las energías de enlace se realiza aplicando una corrección de cada espectro, referenciándolo respecto al carbono metílico adventicio de referencia a una energía de enlace de 284,8 eV (Swift 1982).

Deben aplicarse criterios químicos en la definición de los dominios de los parámetros y utilizar las relaciones porcentuales de átomos impuestas por la estequiometría para ajustar los parámetros de intensidad. El número de componentes también está condicionado por la posibilidad de situaciones químicas distintas. Para ello, se procede a un ajuste manual de la curva, definiendo el número de componentes o contribuciones y acotando el dominio de sus parámetros. A continuación se aplica una rutina de minimización que básicamente es el equivalente al ajuste por mínimos cuadrados extendido al espacio multidimensional. Este espacio está definido por el producto de los parámetros que caracterizan a cada componente, por el número de componentes o contribuciones. En este espacio se puede definir una función que es la expresión de las diferencias punto a punto entre el espectro medido y el espectro ajustado por la suma de componentes. A esta función se le aplica la rutina de minimización.

La metodología aplicada para la caracterización de la composición química de la superficie de las nanoesferas ha consistido en la separación de los espectros en función de su complejidad. Las asignaciones propuestas para cada espectro se utilizan para el análisis

de los siguientes, con el fin de construir una matriz de asignaciones. Los espectros se han dividido en dos grupos: patrones (PLGA, indometacina y PVA) y muestras (con activo y con placebo).

### **3.9. Potencial Zeta**

Los análisis de potencial zeta se realizan con un equipo Zetasizer Nano S, Malvern Instruments (Worcestershire, RU).

Para realizar las medidas, se toma una alícuota de la muestra pulverulenta y se suspende en agua purificada. Las suspensiones de nanoesferas se preparan a una concentración de 0,1 mg/mL. Esta concentración ha sido fijada con el objetivo de obtener y procesar las muestras en condiciones óptimas.

Para evitar la presencia de impurezas que puedan interferir en el estudio, las suspensiones se preparan con agua Milli-Q y se someten a un baño de ultrasonidos hasta conseguir una suspensión homogénea de la muestra.

## ***RESULTADOS***

---

## **4. PUESTA A PUNTO DE LOS MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOESFERAS**

Los métodos de elaboración de nanoesferas comprenden distintas etapas, que se deben adaptar y ajustar para cada tipo de principio activo, excipientes y de instrumental disponible.

En este capítulo se describen los ensayos de puesta a punto de los métodos que se van a emplear para la obtención de las nanoesferas: emulsificación espontánea-difusión de disolvente (método descrito en el capítulo 1.1.3.1) y el de salificación (capítulo 1.1.3.2), el estudio de coadyuvantes alternativos al PVA, así como la puesta a punto del método de liofilización de las nanoesferas.

### **4.1. Estudio del efecto de la concentración de fármaco sobre el tamaño de partícula**

La óptima concentración de fármaco a encapsular ha sido escogida tras valorar el efecto de la incorporación de concentraciones crecientes de indometacina en las nanoesferas. Para su evaluación se analizan distintos lotes preparados con la técnica de SESDM y escogiendo como formulación modelo la referencia D7 (ver detalles en el capítulo 6). Se estudian los valores de viscosidad de las emulsiones (es decir, la mezcla obtenida tras juntar las dos fases y aplicar el turboagitador), así como su influencia sobre el tamaño de

partícula. A continuación se detalla la composición de las muestras analizadas y los resultados obtenidos (tabla 4.1). Los valores de tamaño medio de partícula han sido analizados por microscopía óptica y corresponden al promedio de 10 campos, con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas.

Relación indometacina/polímero	Concentración de indometacina en la fase orgánica %	Viscosidad cps	Tamaño medio $\mu\text{m} \pm \text{DS}$
Placebo	0	5,1781	4,64 $\pm$ 1,44
1 : 7,5	71,11	5,8369	2,67 $\pm$ 1,40
1 : 10	53,33	5,6908	2,19 $\pm$ 1,05
1 : 20	26,66	5,7871	2,52 $\pm$ 1,10
1 : 40	13,33	6,0223	2,53 $\pm$ 1,27

**Tabla 4.1.** Resumen de los valores de viscosidad y tamaño promedio de las partículas de PLGA obtenidas con diferentes concentraciones iniciales de indometacina.

Se observa que se obtienen tamaños de partícula micrométricos, hecho atribuible a que la técnica de encapsulación se está poniendo a punto y aún no ha sido optimizada para la obtención de nanoesferas (figura 4.1).

**Efecto de la concentración de fármaco sobre el tamaño de partícula**



**Figura 4.1.** Variación del tamaño medio de las nanoesferas preparadas con cantidades variables de indometacina.

Tal y como se observa en la figura 4.1, la adición de principio activo supone una disminución de alrededor del 46% en el tamaño de partícula, pasando de 4,64  $\mu\text{m}$  de las nanoesferas placebo a un promedio de 2,50  $\mu\text{m}$  en las muestras con distintas cantidades de principio activo.

Entre las muestras con principio activo, no se observan diferencias significativas en reducción de tamaño a las distintas concentraciones estudiadas, obteniéndose tamaños entre 2,19 y 2,67  $\mu\text{m}$ . Este resultado es explicable al observar los valores de viscosidad de las muestras, ya que al aumentar la cantidad de indometacina no se modifica suficientemente la viscosidad de la emulsión (tabla 4.2) como para afectar el tamaño de las gotitas de la emulsión (futuras nanoesferas).

RESUMEN	Análisis de varianza de un factor para el análisis de la viscosidad					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de variaciones	Suma de cuadrados	Grados libertad	Promedio cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico F
Entre grupos	0,17449	3	0,05817	1,77089	0,23029	4,06618
Dentro de los grupos	0,26276	8	0,03285			
Total	0,43726	11				

Tabla 4.2. Análisis de la varianza sobre la viscosidad.

Se elige como concentración de trabajo la relación 1 a 10 (indometacina:polímero) porque es la proporción con la que se obtienen tamaños de partícula más pequeños.

#### 4.2. Estudio del efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño de partícula

Se estudia el efecto de la concentración de polímero en base a la influencia en el tamaño de partícula y viscosidad de las partículas resultantes, empleando la técnica de SESDM (ver detalles en el

capítulo 1.1.3.1). Para ello se estudian distintas concentraciones de polímero y se evalúan las respuestas obtenidas en los lotes resultantes, en cuanto a tamaño de partícula y viscosidad se refiere. La influencia del efecto de la concentración de polímero sobre los parámetros tamaño de partícula y viscosidad es conocida, si bien hay discrepancias en la valoración e interpretación de los efectos obtenidos (Allémann y cols. 1992, Scholes y cols. 1993, Quintanar-Guerrero y cols. 1998, Zweers y cols. 2003). Los valores de tamaño medio de partícula se han analizado por microscopía óptica y corresponden al promedio de 10 campos, con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas (tabla 4.3 y figura 4.2).

Concentración polímero mg/mL	Viscosidad cps	Tamaño medio $\mu\text{m} \pm \text{DS}$
2,66	2,3411	2,06 $\pm$ 0,09
5,33	2,3938	2,36 $\pm$ 0,07
8,00	2,4573	2,41 $\pm$ 0,25

Tabla 4.3. Efecto de la variación en la cantidad de polímero sobre los parámetros viscosidad y tamaño medio de partícula.

Influencia de la concentración de polímero sobre la viscosidad y el tamaño de partícula

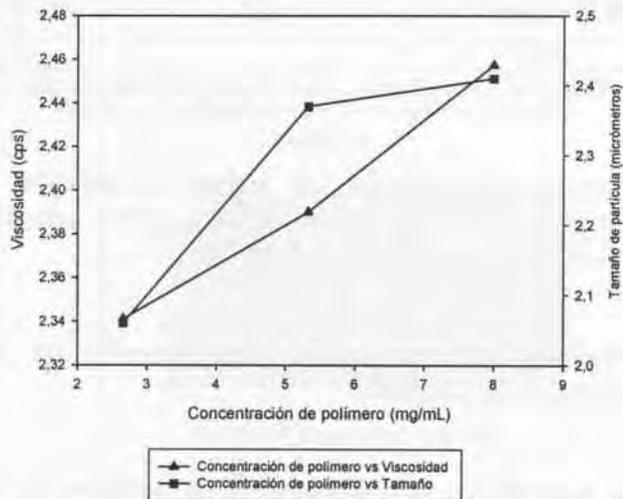


Fig. 4.2. Representación gráfica de la influencia del porcentaje de polímero en la viscosidad de la fase orgánica y en el tamaño medio de partícula.

Como puede observarse en la figura 4.2, un incremento en la concentración de polímero en el medio afecta al valor de la viscosidad y del tamaño de partícula. Al aumentar la concentración de polímero se observa un ligero incremento en la viscosidad de la fase orgánica que conduce a la formación de una emulsión más viscosa. Este aumento comporta un aumento de la resistencia a las fuerzas de cizalla en la emulsión y a una agitación menos eficaz, con un impacto negativo sobre el tamaño de partícula. Este efecto se encuentra documentado en la bibliografía y hay autores que justifican estos resultados en base a diferencias en la densidad de las fases interna y externa de las gotitas (Murakami y cols. 1997). Al analizar estadísticamente los valores obtenidos del tamaño medio de partícula, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.4). Para los siguientes estudios se elige como condición de trabajo la concentración de 5,33 mg/mL de polímero, por ser la concentración que habitualmente se emplea en la técnica de SESDM (Niwa y cols. 1993).

RESUMEN	Análisis de varianza de un factor para el análisis del tamaño de partícula					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de variaciones	Suma de cuadrados	Grados libertad	Promedio cuadrados	F	Proba-bilidad	Valor crítico F
Entre grupos	0,39296	2	0,19648	19,72925	2,9058x 10 <sup>-5</sup>	3,55456
Dentro de los grupos	0,17925	18	0,00996			
Total	0,57222	20				

**Tabla 4.4.** Análisis de la varianza sobre el tamaño medio de partícula.

### 4.3. Estudio de la influencia de la concentración de coadyuvante en el tamaño de partícula

Estudios previos han demostrado que aumentando la concentración de PVA de la fase acuosa externa se produce un aumento en el tamaño de partícula, que en algunos casos incluso llega a doblar el tamaño de la partícula cuando se multiplica por 5 la concentración de PVA (Murakami y cols. 1997, Flu y cols. 2003). Este aumento de

tamaño probablemente está causado por una disminución en la velocidad de difusión del disolvente debido al incremento de viscosidad del medio acuoso.

Con la finalidad de comprobar el efecto de la concentración de coadyuvante en el sistema, se estudian concentraciones distintas de dos tipos de PVA con viscosidades extremas (Mowiol® 4-88 y Airvol® 540), manteniendo constantes el resto de parámetros. Se escogen como formulaciones tipo las preparadas con el método de SESDM, escogiendo como polímero el PLGA 85/15 (ver detalles de composición en el capítulo 6).

Mowiol® 4-88 viscosidad:  $4 \pm 0,5$  mPaS /  $87,7 \pm 1$  (% hidrólisis)  
 Airvol® 540 viscosidad:  $50 \pm 5$  mPaS /  $88 \pm 1$  (% hidrólisis)

Los valores de tamaño de partícula corresponden al promedio de 10 campos, con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas por microscopía óptica (tabla 4.5 y figura 4.3).

Coadyuvante	Viscosidad (cps)	Tamaño medio $\mu\text{m} \pm \text{DS}$
Mowiol 1%	4,6434	$1,26 \pm 0,28$
Mowiol 2%	5,5589	$1,29 \pm 0,09$
Mowiol 3%	7,8924	$1,26 \pm 0,17$
Mowiol 4%	18,6194	$1,38 \pm 0,07$
Mowiol 6%	34,5044	$1,56 \pm 0,38$
Airvol 1%	6,7756	$1,42 \pm 0,32$
Airvol 2%	20,0896	$1,88 \pm 0,09$
Airvol 3%	156,4631	$1,94 \pm 0,91$
Airvol 4%	122500,0	$1,80 \pm 0,16$
Airvol 6%	385968,75	$2,09 \pm 1,34$

Tabla 4.5. Efecto de la variación en la concentración de PVA sobre la viscosidad y el tamaño medio de partícula (n=3).

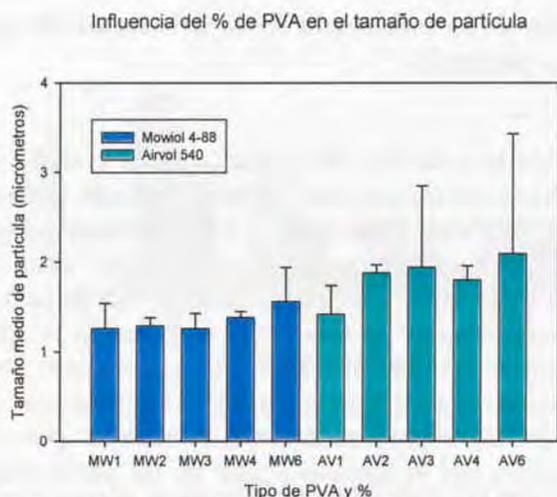


Fig. 4.3. Variación del tamaño de partícula en función del tipo y % de PVA.

Las medidas se han realizado en la emulsión con las nanoesferas recién formadas, antes de la evaporación del disolvente.

De los resultados obtenidos puede concluirse que el tipo de PVA afecta en gran medida al tamaño de partícula, obteniéndose los valores más pequeños en los lotes elaborados con Mowiol® al 1% y al 3%. En las referencias fabricadas con Airvol®, la variación de concentración no se traduce en grandes diferencias en los valores de tamaño de partícula, a pesar de que la viscosidad varía substancialmente.

Se escoge como concentraciones de trabajo el 2 y 4% (en ambos tipos de PVA) por ser los valores de porcentajes centrales con los que es posible observar diferencias entre muestras. Se descarta la concentración de Airvol® al 6% porque debido a la viscosidad que proporciona hace difícil su manipulación.

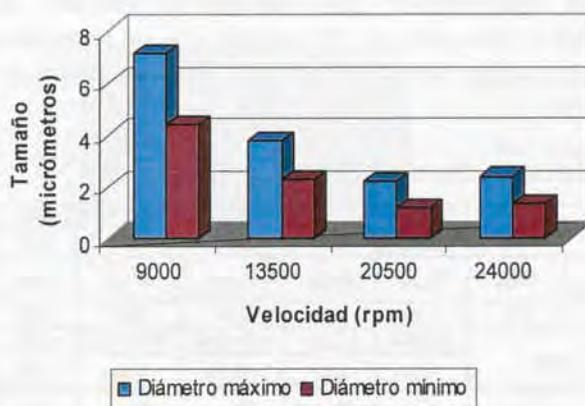
#### 4.4. Estudio de la influencia de la velocidad de agitación en el tamaño de partícula

La influencia de la velocidad de agitación en el tamaño de partícula ha sido estudiado utilizando una muestra formada por una solución con un 2% de PVA como fase acuosa. Las microesferas (en este caso tampoco se obtienen nanoesferas puesto que como ya se ha comentado, el método de elaboración aún no está puesto a punto) se preparan con el método de SESDM y empleando la referencia D7 como modelo (ver detalles en capítulo 6). Los valores de tamaño de partícula corresponden al promedio de 10 campos, con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas por microscopía óptica. Se observa que el tamaño medio de las partículas disminuye al aumentar la velocidad de agitación de 9000 a 24000 rpm (tabla 4.6 y figura 4.4).

	9000 rpm	13500 rpm	20500 rpm	24000 rpm
Media ( $\mu\text{m}$ )	7,13	3,76	2,19	2,38
Mediana ( $\mu\text{m}$ )	4,12	3,38	1,85	1,89
Moda ( $\mu\text{m}$ )	2,21	3,31	1,65	1,65
Máximo ( $\mu\text{m}$ )	133,05	25,50	8,52	14,68
Mínimo ( $\mu\text{m}$ )	0,92	0,92	0,92	0,92
DS ( $\mu\text{m}$ )	4,62	1,82	1,05	1,30
D <sub>10%</sub>	2,18	2,09	1,30	1,30
D <sub>25%</sub>	2,63	2,75	1,48	1,49
D <sub>50%</sub>	3,51	3,13	1,65	1,75
D <sub>75%</sub>	7,49	4,28	2,53	2,79
D <sub>90%</sub>	14,94	5,88	3,70	4,15

Tabla 4.6. Variación de los parámetros morfométricos en función de la velocidad de agitación.

A velocidades iguales o superiores a las 20500 rpm se obtienen unos valores promedios de 2 micrómetros en el tamaño medio de las partículas. A partir de este valor, incrementos de velocidad de agitación no suponen una disminución significativa en el tamaño medio de las partículas.



**Figura 4.4.** Influencia de la velocidad de agitación en el tamaño de partícula, comparando los valores de diámetro máximo y mínimo obtenidos.

En base a estas observaciones se elige como velocidad de agitación a aplicar en los ensayos 20500 rpm.

#### 4.5. Estudio del efecto de la relación de volumen de las fases sobre el tamaño de partícula

Se estudia el efecto de la relación de volumen de las fases orgánica y acuosa en la técnica de emulsificación espontánea-difusión de disolvente (ver detalles en capítulo 1.1.3.1). La fase orgánica está compuesta por una mezcla de los disolventes originalmente propuestos para esta técnica, diclorometano y acetona (tabla 4.7).

Agua / (acetona + diclorometano) mL	Viscosidad cps
50 / 11 (3,5+7,5)	4,2541
50 / 22 (7+15)	8,5294

**Tabla 4.7.** Relación entre la composición de la fase orgánica y la viscosidad.

A continuación se detallan los resultados de las diferencias morfológicas observadas. Los valores de tamaño de partícula corresponden al promedio de 10 campos, con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas por microscopía óptica.

- Relación de fases 50/11

Diámetro( $\mu\text{m}$ )		Media	Moda	Máximo	Mínimo	DS	Mediana
			2,53	1,89	24,13	0,92	1,27
Percentiles	D5%	D10%	D25%	D40%	D75%	D90%	D95%
	1,31	1,49	1,83	2,05	2,85	3,83	4,74
Área ( $\mu\text{m}^2$ )		Media	Moda	Máximo	Mínimo	DS	Mediana
		3,72	2,10	89,14	0,50	1,60	2,47
Percentiles	D5%	D10%	D25%	D40%	D75%	D90%	D95%
	0,67	0,88	1,55	2,10	4,23	7,25	9,98

- Relación de fases 50/22

Diámetro ( $\mu\text{m}$ )		Media	Moda	Máximo	Mínimo	DS	Mediana
			2,11	1,89	9,05	0,92	0,75
Percentiles	D5%	D10%	D25%	D40%	D75%	D90%	D95%
	1,25	1,37	1,65	1,83	2,40	3,04	3,53
Área ( $\mu\text{m}^2$ )		Media	Moda	Máximo	Mínimo	DS.	Mediana
		2,22	1,09	40,50	0,50	1,59	1,84
Percentiles	D5%	D10%	D25%	D40%	D75%	D90%	D95%
	0,63	0,75	1,17	1,59	2,77	4,03	5,03

A continuación se muestran gráficamente los resultados obtenidos, expresados en valores de diámetro máximo de partícula (figura 4.5).

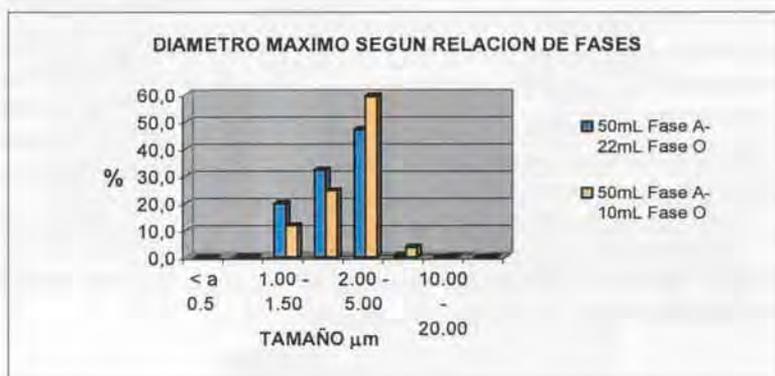


Figura 4.5. Relación de fases y su efecto sobre el tamaño de partícula.

Como conclusión se puede afirmar que en base a los resultados obtenidos, empleando 50 mL de fase acuosa y 22 mL del global de la fase orgánica se obtienen tamaños de partícula más pequeños, así como más homogéneos, con el método de elaboración de SESDM.

#### 4.6. Estudio de la influencia del tipo de disolvente en el tamaño de partícula

El efecto combinado del disolvente orgánico, el cosolvente y la concentración de polímero es conocido que tienen influencia en el tamaño de partícula (Wehrle y cols. 1995). Se ha estudiado la influencia en el tamaño de partícula al emplear los disolventes diclorometano, acetona, acetato de etilo y sus combinaciones con acetona como cosolvente, manteniendo constantes el resto de parámetros de la formulación. La fórmula escogida como modelo es la referencia D7 (ver detalles en el capítulo 6). Los valores de tamaño de partícula corresponden al promedio de 10 campos, con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas por microscopía óptica. En la tabla 4.8 se resumen los resultados de la viscosidad y del tamaño medio de partícula.

Disolvente	Viscosidad cps	Tamaño medio $\mu\text{m} \pm \text{DS}$
Acetato de etilo	5,3991	$1,18 \pm 0,18$
Acetona	4,0164	$1,51 \pm 0,35$
Diclorometano	5,3895	$2,81 \pm 1,72$
Acetato de etilo: acetona (2:1)	4,3338	$1,36 \pm 0,29$
Diclorometano: acetona (2:1)	5,6908	$2,19 \pm 1,05$
Diclorometano: acetona (1:1)	6,5179	$2,17 \pm 0,88$
Diclorometano: acetona (1:2)	6,6493	$1,93 \pm 0,78$

Tabla 4.8. Efecto del disolvente en la viscosidad y tamaño medio de partícula (n=3).

En la figura 4.6 se representan gráficamente los resultados del tamaño medio de partícula.

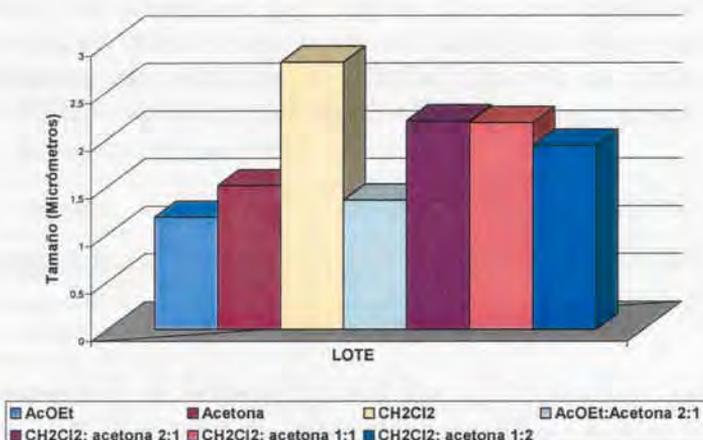


Fig. 4.6. Representación gráfica de la influencia de los disolventes en el tamaño medio de las nanoesferas.

Por los resultados obtenidos puede concluirse que empleando un disolvente con ventajas medioambientales como el acetato de etilo, se pueden conseguir tamaños de partícula incluso inferiores a los obtenidos con disolventes orgánicos habituales en el método de evaporación de disolvente (diclorometano) o en el de emulsificación

espontánea-difusión de disolvente (diclorometano y acetona). En el sistema diclorometano: acetona el tamaño de las partículas se reduce en gran medida (con respecto al uso de diclorometano en solitario) debido a que al aumentar el volumen de cosolvente aumentan las fuerzas de difusión de la fase orgánica hacia la fase acuosa. En cambio, en la mezcla de disolventes acetato de etilo: acetona este efecto no es perceptible, obteniéndose resultados de tamaño medio de partícula similares a cuando se utiliza acetato de etilo solo.

En base a estos resultados se elige como disolvente alternativo a emplear en la fabricación verde de nanoesferas -capítulo 9- el acetato de etilo, como disolvente único.

Se demuestra, por lo tanto, que el uso de un disolvente no habitual en la elaboración de micropartículas y nanopartículas, como es el acetato de etilo, proporciona mejores resultados en cuanto al tamaño de partícula se refiere, que los proporcionados por disolventes convencionalmente empleados. De esta manera, se propone el uso innovador de acetato de etilo para la obtención de nanoesferas por la ventaja que ofrece la reducción de tamaño de partícula, a la que debe añadirse la ventaja medioambiental de su uso, con respecto al diclorometano y acetona.

#### **4.7. Estudio del efecto de la concentración de sal en la viscosidad**

Como se comenta en el capítulo 1.1.3.2, en el método de encapsulación por salificación se requiere la presencia de una sal, que disuelta en el medio acuoso proporciona unos valores de viscosidad que están relacionados con el tamaño de partícula de las futuras nanoesferas. A continuación se procede al estudio de la influencia de la concentración de sal en la viscosidad del medio acuoso, empleando cloruro cálcico hexahidrato y cloruro magnésico hexahidrato, por ser dos sales que presentan la estructura química más parecida, puesto que sólo difieren en el catión y datos bibliográficos avalan su idoneidad (Allémann y cols. 1992, Ibrahim y cols. 1992). Los datos que se presentan corresponden a la viscosidad proporcionada por las

sales disueltas en agua purificada, no en la formulación. En la tabla 4.9 y figura 4.7 se presentan los resultados obtenidos.

Porcentaje de sal	Datos de viscosidad (cps)	
	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
40	4,3775	4,597
60	4,8499	5,7313
80	5,4007	6,2732

Tabla 4.9. Viscosidad proporcionada por las dos sales a distintas concentraciones.

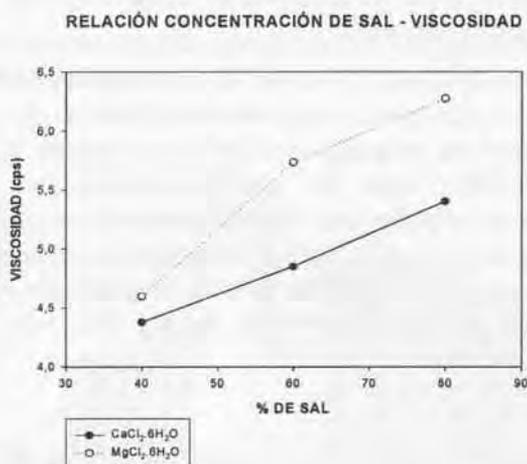


Figura 4.7. Representación gráfica de la concentración de las sales sobre la viscosidad.

Puede concluirse que el cloruro magnésico hexahidrato proporciona valores de viscosidad superiores a los que proporciona el cloruro de calcio hexahidrato, y estos valores van incrementándose a medida que aumenta la concentración de sal en el medio líquido. Se elige el 60% como concentración de trabajo en el método de salificación, por ser la mínima concentración que permite observar diferencias entre los valores de viscosidad de las dos sales.

#### 4.8. Lavado de las nanoesferas: método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente

Tras la formación de las nanoesferas (tal y como se explica con detalle en el capítulo 1.1.3.1) se realiza un lavado de la muestra para eliminar restos de polímero, así como los coadyuvantes e incluso el excedente de principio activo que no se ha encapsulado.

A fin de definir las condiciones de trabajo que aseguren la completa eliminación de estos restos, se procede a realizar un ensayo donde se valora la cantidad de indometacina presente en el sobrenadante. Una vez formadas las nanoesferas, se centrifugan durante 20 minutos a 140.000 G. A continuación se separa el sobrenadante y las nanoesferas se resuspenden en 50 mL de solución reguladora de fosfatos 0,1 M pH 7,4. Se centrifuga la muestra por segunda vez durante 20 minutos a la misma velocidad, se separa el sobrenadante y se repite la operación una tercera vez. Como resultado de la valoración de los sobrenadantes se puede concluir que tras el tercer lavado de la muestra, la cantidad de indometacina que se encuentra presente en el sobrenadante es prácticamente despreciable ( $< 0,040\%$ ) con respecto al valor teórico inicial (tabla 4.10 y figura 4.8). Este hecho demuestra que lavando la muestra tres veces consecutivas, según la metodología propuesta, se consigue eliminar prácticamente en su totalidad todo el fármaco no encapsulado.

Centrifugación	% indometacina en el sobrenadante
140.000 G 20 minutos	41,07
+ 140.000 G 20 minutos (2º lavado)	1,28
+ 140.000 G 20 minutos (3º lavado)	0,040

Tabla 4.10. Cantidades de indometacina presentes en los sobrenadantes.



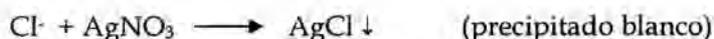
Figura 4.8. Porcentaje de indometacina presente en el sobrenadante tras ultracentrifugar y lavar la muestra hasta tres veces.

Después de cada centrifugado (veinte minutos a 140.000 G en todos los casos), se separa el sobrenadante y las nanoesferas se resuspenden completamente con 50 mL de la solución reguladora. En base a estas conclusiones, se elige definir como método estándar el lavar las muestras tres veces con 50 mL de solución reguladora de fosfatos 0,1 M pH 7,4 cada vez.

#### 4.9. Lavado de las nanoesferas: método de salificación

En el lavado de las nanoesferas obtenidas con la técnica de salificación (técnica que se describe con detalle en el capítulo 1.1.3.2), además de eliminar los restos de coadyuvante, polímero o principio activo sobrantes, se debe eliminar también las sales que intervienen en el proceso. Para ello, se procede a evaluar la cantidad de agua purificada, así como el número de lavados necesarios para limpiar completamente la muestra.

En este caso la idoneidad de la técnica de lavado se completa con una identificación de los cloruros presentes en las aguas de lavado, mediante la reacción de Mohr (APHA 1992, Skoog y cols. 1995).



Se prepara una solución acuosa concentrada de nitrato de plata. Tras cada centrifugado, se añaden 5 gotas de la solución de nitrato de plata a las aguas de lavado y se valora la ausencia o presencia del precipitado blanco.

Tras varios ensayos se establece que para una completa eliminación de las sales es necesario realizar:

- 2 lavados con agua purificada
- 1 último lavado con solución reguladora de fosfatos 0,1 M pH 7,4
- Emplear un mínimo de 200 mL por cada lavado

Con la valoración de las aguas del tercer lavado también se confirma la ausencia de indometacina en el medio (% de indometacina < 0,040 con respecto al valor teórico inicial).

#### 4.10. Separación de las nanoesferas

Como parte final en la fabricación de las nanoesferas (ver detalles del método de elaboración en capítulo 1.1.3.1 y 1.1.3.2) se procede a su separación mediante el proceso de ultracentrifugación. Para ello se emplea una ultracentrífuga Beckman Avanti™ equipada con un rotor GS-15 a distintas velocidades y durante distintos tiempos.

Para el análisis de las mejores condiciones de trabajo, se procede a realizar una monitorización de los tiempos y velocidades de centrifugado. Se comprueba la idoneidad de estos parámetros evaluando la presencia de nanoesferas en los sobrenadantes con el microscopio óptico a 400 aumentos (figura 4.9).



**Figura 4.9.** Representación gráfica de las condiciones de ultracentrifugación ensayadas. La punta de la pirámide representa los valores que proporcionan mejores resultados en la separación de las nanoesferas.

Se eligen como condiciones óptimas de trabajo 140.000 G y 20 minutos de centrifugado, puesto que a estas condiciones se asegura que prácticamente todas las nanoesferas están sedimentadas y no se observan en el líquido sobrenadante.

Esta relación velocidad-tiempo ha demostrado ser eficaz con la ventaja de ser un tiempo relativamente corto.

#### **4.11. Determinación de la cantidad de principio activo encapsulado**

Existen distintos métodos de valoración de la cantidad de principio activo encapsulado:

1. Determinación de la cantidad de principio activo en el sobrenadante de la centrifugación. Durante la limpieza de la muestra se separa el sobrenadante, arrastrando restos de excipientes así como principio activo presente en el medio o en la cubierta de las partículas. Por sustracción de la cantidad de principio activo

incorporado al sistema de la cantidad presente en el sobrenadante es posible calcular la cantidad de activo encapsulado.

2. El principio activo se valora tras romper la cubierta de la partícula: se disuelve una cantidad conocida de muestra en un disolvente en el que el polímero formador de la cubierta es soluble. El polímero se separa del principio activo tras centrifugar la muestra o por filtración. A continuación se disuelve el residuo de activo y se valora.

El primer método presenta como ventaja que es una técnica no destructiva y que evita las complejas manipulaciones a que se debe someter la muestra al tener que romper la cubierta de las nanoesferas. A fin de comprobar la idoneidad de cada una de las técnicas de valoración del contenido en principio activo, se procede a la elaboración de distintos lotes de nanoesferas y a la posterior valoración de la muestra en paralelo, por los dos métodos descritos.

1. Determinación de la cantidad de principio activo en el sobrenadante de centrifugación. El proceso se realiza mediante el lavado de las muestras con solución reguladora fosfatos 0,1 M pH 7,4, posterior ultracentrifugación y lectura de los sobrenadantes al ultravioleta. La valoración del sobrenadante se hace en la recta de regresión establecida en el apartado de la validación de la metódica analítica que se describe en el capítulo 5.

2. Determinación de la cantidad de principio activo por rotura previa de la cubierta capsular. El proceso comprende los siguientes pasos:

- Se toma una alícuota de 50 mg de muestra de las nanoesferas sólidas.
- Se añade a la muestra sólida 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol. Agitar durante 10 minutos. Opcionalmente puede ser necesario ultrasonificar la muestra por un periodo aproximado de 1 a 3 minutos.
- Evaporar los disolventes en un rotavapor durante 15 minutos.

- Añadir al residuo del rotavapor 10 mL de una solución mezcla de metanol: ácido clorhídrico 1N en proporción 9:1.
- Ultrasonicar la muestra durante 1 minuto.
- Filtrar la muestra con papel de filtro de celulosa.
- Leer la solución resultante al ultravioleta.

La valoración del principio activo tras romper la cubierta se realiza sobre el blanco de metanol: ácido clorhídrico 1N en proporción 9:1. A continuación se muestran los valores de las absorbancias, así como la ecuación de la recta de calibrado  $y = bx + a$ , tomando en abcisas las concentraciones (mg/mL) y en ordenadas las correspondientes absorbancias (figura 4.10 y tablas 4.11-4.12).

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0	0
0,010	0,16740
0,012	0,20070
0,020	0,34431
0,030	0,51134
0,040	0,69398
0,050	0,87531
0,080	1,40266

Tabla 4.11. Resultados de las lecturas en Metanol: HCl 9:1

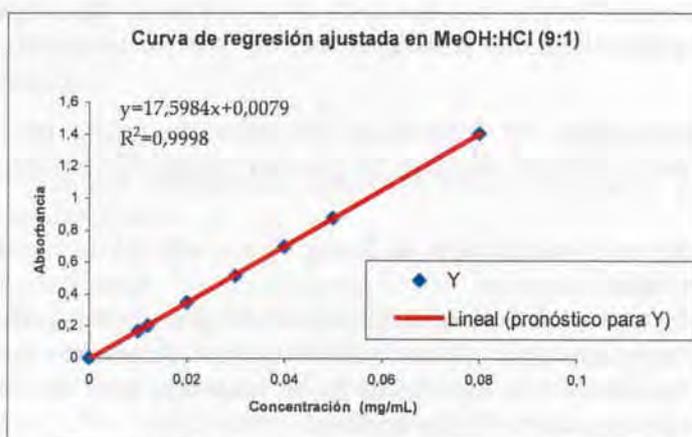


Fig. 4.10. Recta de calibración empleando como disolvente MeOH:HCl 9:1

Resumen	
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999943
Coefficiente de determinación $r^2$	0,999885
$r^2$ ajustado	0,999866
Error típico	0,005288
Observaciones	8

**Tabla 4.12.** Estadística de la regresión en MeOH: HCl

El coeficiente de correlación y de determinación indican una buena linealidad. El coeficiente de determinación indica el grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Según los datos de las tablas 4.13 y 4.14 puede concluirse que esta relación lineal explica el 99,98% de la varianza de la absorbancia.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Ordenada en el origen (a)	-0,00789123	0,002985327	-2,643338709	0,038368746
Pendiente (b)	17,5984704	0,07693988	228,7301503	4,7123x10 <sup>-13</sup>

**Tabla 4.13.** Test de proporcionalidad de la regresión en MeOH: HCl

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F experimental</i>	<i>F (tablas)</i>
Regresión	1	1,462897	1,462897	52317,48165	4,7123x10 <sup>-13</sup>
Residuos	6	0,000167	0,00002796		
Total	7	1,463065			

**Tabla 4.14.** Análisis de la varianza de la regresión en MeOH: HCl

Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}} > F_{\text{tablas}}$ , queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos y que existen diferencias estadísticamente significativas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los ensayos D3 y D4 (ver detalles de composición en capítulo 6) valorados con ambos métodos (tablas 4.15 y 4.16).

Ensayo	Eficacia de Encapsulación (%) $X \pm DS$	Contenido en activo (%) $X \pm DS$
D3 PROMEDIO $\pm$ DS	42,08 $\pm$ 2,47	3,82 $\pm$ 0,18
D4 PROMEDIO $\pm$ DS	25,21 $\pm$ 2,75	2,23 $\pm$ 0,26

Tabla 4.15. Resultados obtenidos valorando el principio presente en el sobrenadante (X: media aritmética, DS: desviación estándar, n=3).

Ensayo	Eficacia de Encapsulación (%) $X \pm DS$	Contenido en activo (%) $X \pm DS$
D3 PROMEDIO $\pm$ DS	42,56 $\pm$ 2,47	3,68 $\pm$ 0,12
D4 PROMEDIO $\pm$ DS	25,17 $\pm$ 2,75	2,29 $\pm$ 0,28

Tabla 4.16. Resultados obtenidos valorando el principio activo tras romper las nanoesferas (X: media aritmética, DS: desviación estándar, n=3).

Como conclusión, se puede afirmar que es equivalente valorar el principio activo contenido en el interior de las nanoesferas por ambos métodos.

Por su menor complejidad, así como para el ahorro de muestra, se elige valorar el principio activo presente en el sobrenadante de las aguas de centrifugado.

#### 4.12. Estudio del cambio de coadyuvante en la técnica de emulsificación espontánea-difusión de disolvente

El alcohol polivinílico ha sido y sigue siendo el coadyuvante más empleado en la mayoría de métodos de encapsulación, además de ser un polímero muy empleado en la industria farmacéutica. Sin embargo, los niveles de PVA tras la administración parenteral (e intraarticular, por extensión) deben controlarse puesto que puede afectar a la recaptación intracelular de las nanopartículas, además de

provocar efectos secundarios como la infiltración a órganos y tejidos (Finley 1961, McGee y cols. 1997, Sahoo y cols. 2002).

Como parte del trabajo experimental se aborda el estudio de alternativas a este polímero.

#### 4.12.1. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)

Como primera aproximación a la sustitución del PVA se ensaya la HPMC, por ser un polímero muy utilizado en la industria farmacéutica, de contrastada eficacia como agente emulsificante y coadyuvante en la encapsulación de sustancias (Gabor y cols. 1999, Rowe y cols. 2003).

Para evaluar su idoneidad en los sistemas experimentales objeto de estudio se realizan distintas pruebas, a las condiciones que se describen a continuación (tabla 4.17).

Ensayo	Polímero	Coadyuvante %
NC-1	PLGA 50/50	HPMC 2%
NC-2	PLGA 85/15	HPMC 2%
NC-3	PLGA 50/50	HPMC 0,5%
NC-4	PLGA 50/50	HPMC 0,5%

Tabla 4.17. Referencias elaboradas con HPMC en diclorometano/acetona.

Para la obtención de las nanoesferas se utiliza el método original de emulsificación espontánea-difusión de disolvente, que emplea como disolventes diclorometano y acetona (2:1). En la figura 4.11 se esquematiza brevemente el método de elaboración.

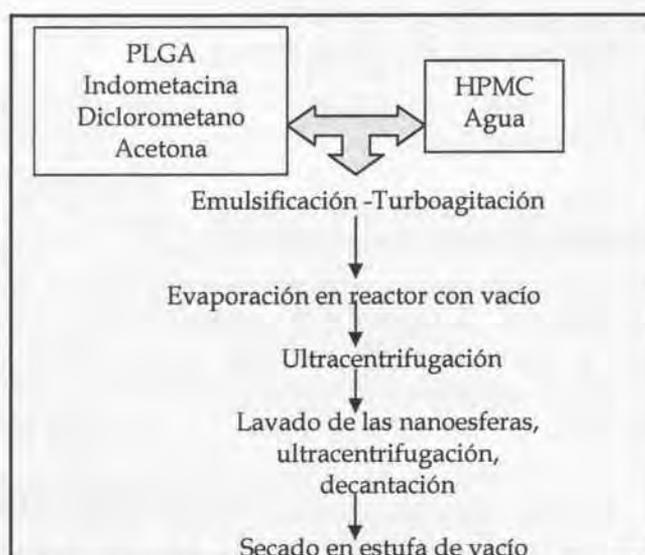


Fig. 4.11. Esquema del proceso de encapsulación con el método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente empleando HPMC como coadyuvante.

En la tabla 4.18 se muestran los resultados de la valoración de los 4 lotes fabricados con HPMC. En todos los casos se obtienen eficacias de encapsulación superiores al 79%, así como rendimientos del proceso comprendidos entre el 55% y 75%.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NC-1	79,94	9,09	7,26	69,38
NC-2	89,17	9,13	8,14	75,51
NC-3	83,99	9,09	7,64	55,88
NC-4	87,87	9,13	8,02	68,54

Tabla 4.18. Resultados del análisis de los lotes con HPMC.

Las principales diferencias entre lotes aparecen al analizar las características morfométricas de las nanoesferas por difracción láser. Los datos que se presentan corresponden al promedio de 3 lecturas. En la figura 4.12 se observa que aparecen 2 grupos bien diferenciados, según el tamaño promedio de partícula.

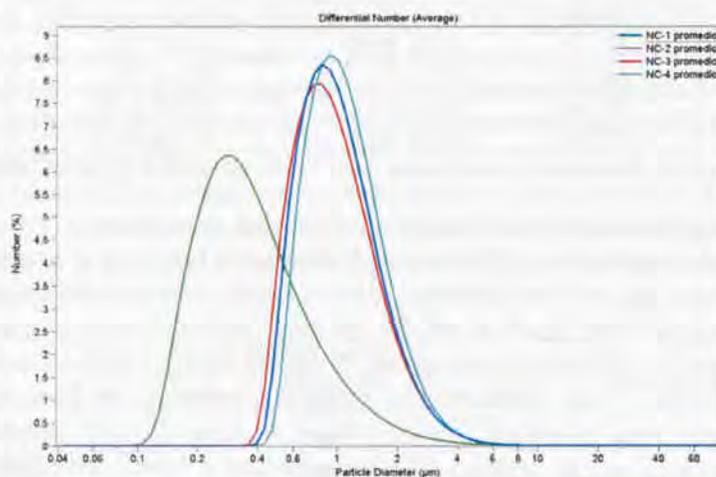


Fig. 4.12. Tamaño promedio de los ensayos elaborados con HPMC.

Al analizar los valores en detalle (tabla 4.19) se observa que la referencia NC-2 es la que presenta un tamaño medio de partícula 3 veces inferior a las referencias NC-1, NC-3 y NC-4. Esta referencia NC-2 corresponde al lote fabricado con HPMC al 2% y PLGA 85/15.

	MEDIA $\mu\text{m} \pm \text{DS}$	MEDIANA $\mu\text{m}$	MODA $\mu\text{m}$	D <sub>10%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>90%</sub>
NC-1	1,013 $\pm$ 0,006	0,957	0,829	0,591	0,721	0,957	1,340	1,875
NC-2	0,380 $\pm$ 0,030	0,345	0,297	0,182	0,238	0,345	0,551	0,910
NC-3	0,972 $\pm$ 0,017	0,917	0,829	0,552	0,681	0,917	1,305	1,854
NC-4	1,095 $\pm$ 0,008	1,041	0,910	0,650	0,790	1,041	1,441	1,981

Tabla 4.19. Caracterización morfométrica de los lotes elaborados con HPMC.

Tras los resultados obtenidos con HPMC como coadyuvante se procede a la fabricación de los mismos lotes sustituyendo los disolventes originales (diclorometano y acetona) por acetato de etilo y acetona en la misma proporción 2:1 (tabla 4.20). El objetivo de este cambio es utilizar el mismo método de elaboración de nanoesferas (figura 4.11), pero sustituyendo el diclorometano por acetato de etilo, como una primera aproximación al método de elaboración verde que se pretende abordar en la última parte del trabajo experimental.

Ensayo	Polímero	Coadyuvante %
NCA-1	PLGA 50/50	HPMC 2%
NCA-2	PLGA 85/15	HPMC 2%
NCA-3	PLGA 50/50	HPMC 0,5%
NCA-4	PLGA 50/50	HPMC 0,5%

Tabla 4.20. Referencias elaboradas con HPMC en acetato de etilo/acetona.

En ningún caso es posible la obtención de las nanoesferas.

A fin de mejorar la estabilidad de la emulsión formada al mezclar las dos fases, se realizan pruebas incorporando como estabilizante del sistema Solutol® HS15 al 3%. Se observa que al formar la emulsión aumenta la turbidez de la misma, indicativo de la formación de las nanoesferas, pero analizadas al microscopio óptico se observa que hay muy poca cantidad de nanoesferas. A pesar de esta observación, se continua con el proceso de encapsulación y tras la evaporación y ultracentrifugación, el residuo seco que es posible separar en los distintos lotes es prácticamente despreciable, incluso aumentando los tiempos y velocidades de centrifugación.

Como conclusión, se descarta la utilización de HPMC como potencial sustituto del PVA porque se pretende encontrar un coadyuvante suficientemente versátil que permita el empleo de distintos disolventes y condiciones de trabajo.

#### 4.12.2. Poloxámero 188

Otro de los excipientes elegidos para sustituir al PVA es el poloxámero 188. Al igual que la HPMC, el poloxámero 188 es un polímero muy utilizado en la industria farmacéutica, de contrastada eficacia como agente emulsificante y coadyuvante en la encapsulación de sustancias (Duun y cols. 1997, Rowe y cols. 2003). Se realizan distintas pruebas, a las condiciones que se describen a continuación (tabla 4.21).

Ensayo	Polímero	Coadyuvante %
NC-5	PLGA 50/50	Poloxámero 188 2%
NC-6	PLGA 85/15	Poloxámero 188 2%
NC-7	PLGA 50/50	Poloxámero 188 0,5%
NC-8	PLGA 85/15	Poloxámero 188 0,5%

Tabla 4.21. Referencias elaboradas con poloxámero 188 en diclorometano/acetona.

Para la obtención de las nanoesferas se utiliza el método de SESDM, empleando como disolvente el diclorometano y la acetona. En la figura 4.11 se esquematiza brevemente el método de elaboración empleado, con la salvedad de que en este caso se sustituye la HPMC por poloxámero 188.

En la tabla 4.22 se muestran los resultados de la valoración de los 4 lotes. En todos los casos se obtienen eficacias de encapsulación superiores al 80%, así como rendimientos del proceso entre el 66% y el 84%.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NC-5	86,85	9,09	7,90	66,91
NC-6	87,77	9,09	7,98	84,27
NC-7	82,37	9,09	7,49	70,70
NC-8	80,41	9,13	7,34	74,04

Tabla 4.22. Resultados del análisis de los lotes con poloxámero 188.

Las principales diferencias entre lotes aparecen al analizar las características morfométricas de las nanoesferas por difracción láser. Los datos que se presentan corresponden al promedio de 3 lecturas. Según se observa en la figura 4.13, aparecen 3 grupos bien diferenciados según el tamaño promedio de partícula.

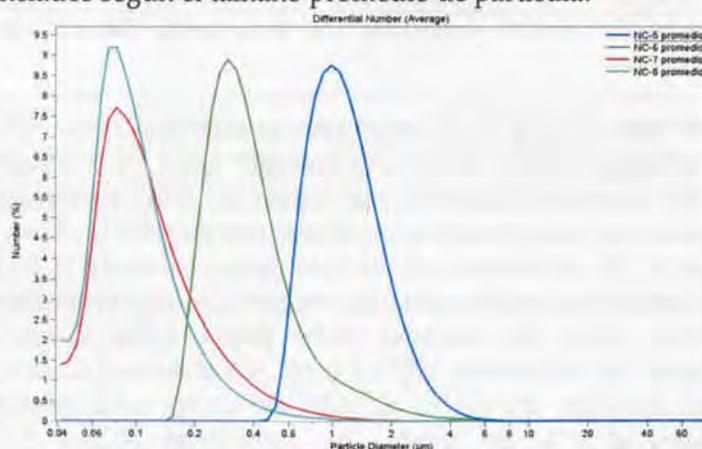


Fig. 4.13. Tamaño promedio de los 4 ensayos con poloxámero 188.

Al analizar los valores en detalle (tabla 4.23) se observa que las referencias NC-7 y NC-8 presentan un tamaño medio de partícula diez veces inferior a la referencia NC-5 y tres veces inferior a la referencia NC-6. Estos datos coinciden con las referencias que presentan un porcentaje más bajo de poloxámero, independientemente del tipo de polímero empleado.

	MEDIA $\mu\text{m} \pm \text{DS}$	MEDIANA $\mu\text{m}$	MODA $\mu\text{m}$	D <sub>10%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>90%</sub>
NC-5	1,117 $\pm$ 0,003	1,121	0,999	0,705	0,854	1,121	1,537	2,108
NC-6	0,390 $\pm$ 0,007	0,348	0,297	0,220	0,266	0,348	0,496	0,805
NC-7	0,117 $\pm$ 0,008	0,104	0,080	0,061	0,076	0,104	0,160	0,267
NC-8	0,101 $\pm$ 0,001	0,092	0,081	0,058	0,071	0,092	0,131	0,198

Tabla 4.23. Caracterización morfométrica de los lotes con poloxámero 188.

Tras los resultados obtenidos con el poloxámero como coadyuvante se procede a la fabricación de los mismos lotes sustituyendo los disolventes originales (diclorometano y acetona) por acetato de etilo y acetona en la misma proporción. Los lotes se elaboraron según el método descrito anteriormente de SESDM (tabla 4.24).

Ensayo	Polímero	Coadyuvante %
NCA-5	PLGA 50/50	Poloxámero 188 2%
NCA-6	PLGA 85/15	Poloxámero 188 2%
NCA-7	PLGA 50/50	Poloxámero 188 0,5%
NCA-8	PLGA 85/15	Poloxámero 188 0,5%

Tabla 4.24. Referencias elaboradas con poloxámero 188 en acetato de etilo/acetona.

Al igual que en el caso de las referencias elaboradas con HPMC, ha sido necesario añadir un 3% de Solutol® HS15 para aumentar la turbidez (que es indicativo de que se está produciendo la encapsulación) de la emulsión resultante tras mezclar las fases acuosa y orgánica. El análisis en microscopio óptico confirma la formación de las nanoesferas. Al analizar las muestras se observan diferencias relevantes entre los distintos lotes (tabla 4.25). Como puede observarse, las referencias NCA-5 y NCA-6 muestran unas eficacias de encapsulación superiores al 96%, así como unos rendimientos superiores al 87%. En cambio, las referencias NCA-7 y NCA-8

muestran unos resultados muy bajos en las eficacias de encapsulación y en los rendimientos globales del proceso.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCA-5	96,14	9,08	8,73	89,25
NCA-6	96,20	9,15	8,81	87,37
NCA-7	21,83	9,08	1,98	2,38
NCA-8	24,96	9,15	2,28	2,65

**Tabla 4.25.** Resultados del análisis de los lotes elaborados con poloxámero 188 en acetato de etilo y acetona.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de trabajar con concentraciones altas de poloxámero para poder obtener encapsulaciones eficaces de indometacina.

A continuación se estudia el efecto en la encapsulación de indometacina empleando los mismos coadyuvantes que dieron los mejores resultados (poloxámero 2% y Solutol® HS15 3%), pero en presencia de acetato de etilo como único disolvente en la fase orgánica. A fin de evitar la presencia de otros parámetros que pudieran afectar al sistema, se fija como polímero el PLGA 50/50. También se elaboran lotes con los mismos coadyuvantes, pero doblando su concentración, es decir, poloxámero 4% con Solutol® HS15 al 6% (tabla 4.26).

Ensayo	Polímero	Coadyuvante %
NCB-1	PLGA 50/50	Poloxámero 188 2% Solutol HS15 3%
NCB-2	PLGA 50/50	Poloxámero 188 4% Solutol HS15 6%

**Tabla 4.26.** Referencias elaboradas con poloxámero 188 en acetato de etilo.

En la tabla 4.27 se presentan los resultados obtenidos tras el análisis de los lotes NCB-1 y NCB-2.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCB-1	21,97	9,47	2,08	70,10
NCB-2	61,15	9,52	5,82	47,17

Tabla 4.27. Resultados del análisis de los lotes elaborados con poloxámero 188 en acetato de etilo como único disolvente.

Puede observarse por los resultados de la tabla 4.27 que se obtienen unos resultados globales con eficiencias de encapsulación muy bajas. Como se comenta en el capítulo 7, es conocido el efecto que produce el pH en la eficacia de encapsulación, por lo que se decide trabajar con la fase acuosa ajustada a pH 3,5 (pH inferior al del pKa de la indometacina, que es de 4,5) para intentar mejorar los resultados obtenidos. En la tabla 4.28 se resumen los resultados experimentales hallados tras la valoración de las nuevas referencias.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCC-1	21,26	9,30	1,98	70,34
NCC-2	19,21	9,32	1,79	76,81

Tabla 4.28. Resultados del análisis de los lotes elaborados con poloxámero 188 en acetato de etilo como único disolvente y pH fase acuosa 3,5.

A pesar de observarse una mejora en los rendimientos del proceso de encapsulación, las eficacias de encapsulación continúan presentando unos valores muy bajos. En este caso se descarta también la utilización de poloxámero 188, por las mismas razones expuestas para descartar el uso de HPMC.

#### 4.12.3. Quitosano

Como otra alternativa más al PVA se plantea el uso quitosano. Como ya se ha comentado, el quitosano es un polímero muy estudiado en el campo de la encapsulación, si bien su actividad como coadyuvante por sí solo en la formación de nanoesferas es poco conocida.

Se realiza una primera aproximación de encapsulación de indometacina aplicando el método de emulsificación espontánea-

difusión de disolvente (ver figura 4.11) utilizando como coadyuvante una solución acuosa de quitosano al 0,08%, puesto que habitualmente se utiliza a concentraciones inferiores al 0,1% (Kulkarni y cols. 2003). Las soluciones de quitosano se preparan con ácido glicólico al 1%, proporcionando un pH final de 2,4. Por la experiencia adquirida en el estudio de los coadyuvantes alternativos se conoce que las dificultades de encapsulación aparecen al trabajar con acetato de etilo, por lo que es este caso se aborda directamente el empleo acetato de etilo como único disolvente.

Ensayo	Polímero	Coadyuvante %
NCD-1	PLGA 50/50	Quitosano 0,08%

Los análisis por microscopía óptica confirman la formación de nanoesferas y en la valoración de las muestras se observa un valor de eficacia de encapsulación del 99,79%. Estos resultados inducen a pensar que el quitosano puede ser un buen candidato a sustituir el PVA en su papel de coadyuvante en la formación de las nanoesferas. En la tabla 4.29 se adjuntan los valores obtenidos tras la valoración del lote NCD-1.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCC-1	99,79	9,21	9,19	34,27

	MEDIA $\mu\text{m} \pm \text{DS}$	MEDIANA $\mu\text{m}$	MODA $\mu\text{m}$	D <sub>10%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>90%</sub>
NCC-1	0,509 $\pm$ 0,024	0,479	0,431	0,317	0,377	0,479	0,640	0,884

**Tabla 4.29.** Resultados del análisis del lote elaborado con quitosano en acetato de etilo como único disolvente.

El bajo valor del rendimiento de encapsulación no se considera significativo, puesto que este ensayo corresponde a una aproximación para fijar las condiciones experimentales del diseño factorial. En este caso el bajo rendimiento del proceso se atribuye a que al utilizar acetato de etilo como disolvente la evaporación es muy lenta. Para futuros ensayos se plantea el uso de un agitador con vacío, así como el calentar ligeramente la muestra para logra aumentar el rendimiento del proceso de encapsulación.

### 4.13. Puesta a punto de los parámetros de proceso para el diseño factorial de la serie "F": comparación de métodos

Se plantean unos experimentos iniciales previos al inicio del diseño factorial, destinados a confirmar la idoneidad de los parámetros de proceso. Se pretende comparar el método de SESDM con el de salificación.

#### 4.13.1. Selección de los parámetros de proceso y condiciones experimentales

Se estudia la formación de nanoesferas empleando poloxámero 188 como coadyuvante en la fase acuosa y acetato de etilo en la fase orgánica, como único disolvente. En el método de salificación se elige el cloruro cálcico hexahidrato como sal, en base a los resultados obtenidos en el diseño factorial de la serie "S", puesto que es la sal con la que se consiguen eficacias de encapsulación superiores (capítulo 7). Como concentración de partida del coadyuvante se elige poloxámero 188 al 2% porque ensayos previos (descritos en el capítulo 4.12.2) mostraron la idoneidad de esta concentración. Como segunda concentración de poloxámero se elige el 4% puesto que tal y como se describe en el mencionado capítulo, se observa que concentraciones altas de poloxámero producen más altas eficacias de encapsulación.

En la tabla 4.30 se resumen las condiciones ensayadas.

Ensayo	Método	Coadyuvante	% Coadyuvante
NCD-1	Salificación	Poloxámero	4
NCD-2	Salificación	Poloxámero	2
NCD-3	Evaporación	Poloxámero	4
NCD-4	Evaporación	Poloxámero	2

Tabla 4.30. Referencias elaboradas con poloxámero 188 en acetato de etilo comparando dos métodos distintos de elaboración de nanoesferas.

Los métodos de elaboración se describen en detalle en el capítulo 8 (diseño factorial serie "F"), siendo el método de salificación el empleado para los ensayos NCD-1 y NCD-2 y el de SESDM el

método empleado para los ensayos NCD-3 y NCD-4. Las primeras diferencias entre los ensayos aparecen durante la evaporación del disolvente, puesto que a temperatura ambiente el proceso de evaporación se prolonga durante más de 10 horas. También surgen dificultades durante la centrifugación, puesto que tras decantar el sobrenadante, en las referencias NCD-1 y NCD-2 el residuo sedimentado presenta un aspecto de gel, sobretudo en la referencia NCD-2. En la observación al microscopio óptico de muestras de dicho gel se constata que está formado por nanoesferas, por lo que se continúa con el proceso de lavado de la muestra. Tras dos lavados del lote NCD-1 ya no es posible separar ningún residuo, ni en forma de gel. En la referencia NCD-2 sí que es posible su separación, pero es necesario secar en estufa de vacío durante el doble de tiempo que en el resto de referencias. Los resultados del análisis de las muestras se describen en la tabla 4.31.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCD-1	---	---	---	---
NCD-2	85,94	9,34	8,03	59,19
NCD-3	96,24	9,06	8,72	84,42
NCD-4	97,19	9,16	8,90	88,02

Tabla 4.31. Resultados del análisis de los lotes elaborados con poloxámero 188 en acetato de etilo como único disolvente y comparando dos métodos de elaboración de nanoesferas.

Como puede observarse, se obtienen unos valores de eficacia de encapsulación superiores al 85% en todos los casos, si bien las dificultades en la separación de la muestra aparecidas en el ensayo NCD-2 se ven reflejadas con un valor del rendimiento bastante inferior al de los otros lotes.

Se repiten las experiencias NCD-1 y NCD-2 incorporando cantidades variables de Solutol<sup>®</sup> HS15 (del 3 al 6%) junto con el poloxámero 188, pero no es posible mejorar los resultados obtenidos trabajando con el poloxámero 188 solo. A continuación se preparan las mismas referencias NCD-1 y NCD-2 sustituyendo el disolvente original (acetato de etilo) por acetona, con el principal objetivo de aumentar la

velocidad de evaporación del disolvente orgánico del sistema y aumentar el rendimiento del proceso. En paralelo se realizan dos experiencias más incorporando junto con el poloxámero 188 un 1% de PVA Mowiol® 4-88, aplicando igualmente la técnica de salificación. El objetivo de esta combinación es reforzar el papel del coadyuvante en la formación de las nanoesferas porque los resultados preliminares inducen a pensar que el poloxámero solo no proporciona la suficiente estabilidad a las nanoesferas recién formadas. Las nuevas condiciones ensayadas se resumen en la tabla 4.32.

Ensayo	Método	Coadyuvante	% Coadyuvante
NCD-5	Salificación	Poloxámero	4
NCD-6	Salificación	Poloxámero	2
NCD-7	Salificación	Poloxámero : Mowiol	4: 1
NCD-8	Salificación	Poloxámero : Mowiol	2: 1

Tabla 4.32. Referencias elaboradas con poloxámero 188 (con/sin Mowiol®) en acetona.

Las reacciones se monitorizan con el microscopio óptico, pudiéndose observar la formación de nanoesferas en los 4 lotes. La evaporación del disolvente a temperatura ambiente se efectúa en 6 horas. El proceso de centrifugación y lavado de las muestras se realiza sin que se observe la aparición de gel, sino que se forma un residuo sólido de fácil resuspensión, especialmente en las referencias NCD-7 y NCD-8.

En la tabla 4.33 se muestran los resultados de la valoración de las muestras.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCD-5	87,83	9,24	8,12	59,28
NCD-6	98,16	9,33	9,15	63,15
NCD-7	35,43	9,14	3,24	21,68
NCD-8	78,93	9,07	7,16	65,38

Tabla 4.33. Resultados del análisis de los lotes elaborados con poloxámero 188 en acetona como único disolvente y analizando el efecto de la incorporación de PVA junto con el poloxámero.

Pese a que los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 4.33 inducen a pensar que no es necesaria la presencia del PVA para obtener unos resultados satisfactorios de EE y rendimientos, durante el proceso de elaboración se observan más ventajas en las referencias que contienen PVA: el residuo sólido del centrifugado resuspende más fácilmente cuando está presente el PVA. Tras el secado de las nanoesferas en estufa de vacío, también se observa un mejor aspecto del polvo correspondiente a las referencias que incorporan PVA, presentando mayor fluidez. Por estos motivos se elige incluir el PVA en los próximos ensayos a realizar con el objetivo de mejorar los resultados de eficacias de encapsulación y rendimiento tras el ajuste de los parámetros de proceso en el diseño factorial.

Siguiendo el mismo razonamiento, se estudia el resultado de la incorporación de un 1% de PVA (Mowiol® 4-88) en las referencias que emplean como coadyuvante el quitosano, en el método de salificación, y en presencia de acetona como disolvente de la fase orgánica. En la tabla 4.34 se detallan las condiciones de los distintos lotes. El método de elaboración se describe en detalle en el capítulo 8.

Ensayo	Método	Coadyuvante	% Coadyuvante
NCD-9	Salificación	Quitosano	0,08
NCD-10	Salificación	Quitosano	0,03
NCD-11	Salificación	Quitosano : Mowiol	0,08: 1
NCD-12	Salificación	Quitosano : Mowiol	0,03: 1

Tabla 4.34. Referencias elaboradas con quitosano (con/sin Mowiol®) en acetona.

Al cabo de aproximadamente 1 hora de haberse iniciado la fase de evaporación del disolvente orgánico, se observa la aparición de una coloración amarilla en las emulsiones correspondientes a los lotes NCD-9 y NCD-10. Al observarse en el microscopio óptico se constata la presencia de una cierta cantidad de diminutos cristales aciculares y en cambio apenas hay nanoesferas visibles, por lo que se decide discontinuar estas 2 referencias. La coloración amarilla, típica de la indometacina en solución, es indicativo de que aunque inicialmente hubiera encapsulación del activo, las nanoesferas embrionarias no tienen la cubierta lo suficientemente consistente para soportar el

proceso de evaporación de disolvente. Esto indica que el quitosano por sí solo no es un coadyuvante adecuado en el método de salificación y en las condiciones experimentales ensayadas. En cambio, las referencias que incorporan un 1% de Mowiol® pueden culminar el proceso sin problemas. En la tabla 4.35 se muestran los resultados de la valoración de los lotes NCD-11 y NCD-12, donde destaca que además de poder encapsular con éxito el principio activo, los resultados de la eficacia de encapsulación y el rendimiento del proceso son superiores al 80%. Se fijan estos parámetros para el diseño factorial de la serie "F".

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
NCD-9	---	---	---	---
NCD-10	---	---	---	---
NCD-11	86,91	9,00	7,82	82,61
NCD-12	92,04	9,09	8,37	84,60

Tabla 4.35. Resultados del análisis de los lotes elaborados con quitosano en acetona como único disolvente y analizando el efecto de la incorporación de PVA junto con el quitosano.

#### 4.13.2. Ajuste de los parámetros de proceso para evitar la formación de cristales

Al observar los medios de reacción de los 8 ensayos de la serie "F" al microscopio óptico (ver capítulo 8) se aprecia que en las referencias que incorporan el quitosano como coadyuvante hay presencia de cristales aciculares en el medio de encapsulación, sobretodo en las referencias de quitosano con evaporación de disolvente (figura 4.14).

A continuación se procede a la identificación de la naturaleza de los cristales.

Se analizan al microscopio óptico las soluciones de PVA y quitosano, sin observarse cristales. Se elaboran placebos de las nanoesferas correspondientes a las referencias F2 y F6 (ver detalles de composición en el capítulo 8) y tras la evaporación del disolvente ya no se observan cristales en el medio, lo que parece indicar que el origen de los cristales puede estar en la precipitación de la

indometacina. Esta precipitación se atribuye a que para conseguir tener solubilizado el quitosano se acidifica el pH del medio hasta un valor cercano a 1. A continuación se repiten los ensayos ajustando el valor de la fase acuosa a pH 3,5. Siguen apareciendo cristales en el medio, aunque de tamaño inferior y en menor cantidad.



Fig. 4.14. Imagen de microscopio óptico de la referencia F6 (200 aumentos).

Se analizan el resto de lotes de la serie "F" al microscopio y se observa presencia de cristales, en menor medida en las referencias F1 y F6, lo que parece indicar que el origen de los cristales radica en la precipitación de la indometacina en el medio de reacción durante la evaporación del disolvente en el proceso de nanoencapsulación.

Para comprobar el efecto del pH en los medios de reacción se realizan 4 ensayos:

1. Se mezclan 50 mL de quitosano al 0,08% disuelto en ácido glicólico al 1% con 12 mg de indometacina previamente disuelta en 22 mL de acetona. El pH de la fase acuosa se ajusta a 2,3.
2. Se mezclan 50 mL de quitosano al 0,08% disuelto en ácido glicólico al 1% con 12 mg de indometacina previamente

disuelta en 22 mL de acetona. El pH de la fase acuosa se ajusta a 5,2 con una solución 10 M de hidróxido sódico.

3. Se mezclan 50 mL de quitosano al 0,08% disuelto en ácido glicólico al 1% con 12 mg de indometacina previamente disuelta en 22 mL de acetona. El pH de la fase acuosa se ajusta a 9,3 con una solución 10 M de hidróxido sódico.
4. Se mezclan 50 mL de quitosano al 0,08% con 1% de PVA Mowiol® disuelto en ácido glicólico al 1% con 12 mg de indometacina previamente disuelta en 22 mL de acetona. El pH de la fase acuosa se ajusta a 3,5 con una solución 1 N de ácido clorhídrico.

Se mezclan las 2 fases 1 minuto con el turboagitador. A continuación se observan las 4 soluciones al microscopio óptico y no se observa presencia de cristales en ninguno de los 4 ensayos.

Se procede a la evaporación del disolvente mediante agitación magnética y calentando las soluciones hasta 25 °C durante una hora y media. Transcurrido este tiempo se vuelven a observar las 4 soluciones al microscopio y se observan distintos resultados:

*Muestra 1:* Aparecen gran cantidad de cristales aciculares, de aspecto flexible.

*Muestra 2:* No se observa presencia de cristales aciculares, pero en cambio se observa que la solución empieza a gelificar.

*Muestra 3:* No se observan cristales aciculares, pero el medio tiene textura de gel.

*Muestra 4:* En presencia de Mowiol®, se observan pocos cristales aciculares, pero de mayor tamaño y de consistencia más rígida.

A continuación se filtran las 4 muestras por separado con un filtro de celulosa (es una filtración grosera, ya que se pretende que separar las nanoesferas de los cristales) y se observan las soluciones al microscopio. Se constata que en la muestra 4 la filtración ha sido muy eficaz, puesto que sólo se detecta la presencia de las nanoesferas, sin

que se observen cristales. Se fija por lo tanto el pH del medio a 3,5 para la realización de los ensayos del diseño factorial de la serie "F".

Con la finalidad de verificar la naturaleza de los cristales de forma precisa, se pone a punto el método de valoración de indometacina por HPLC descrito en la USP XXVII.

- La fase móvil es una mezcla de acetonitrilo y una solución reguladora compuesta por la disolución 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 a 1).
- Las lecturas se realizan con el HPLC y el detector de UV-Vis a 318 nm.
- Se emplea una columna 4 mm x 30 cm, 10  $\mu\text{m}$ , packLhip L1 (ODS).
- Se fija el flujo en 1mL/min y el volumen de inyección en 20  $\mu\text{l}$ .

Se prepara una recta patrón con indometacina disuelta en fase móvil. La fase móvil contiene un 40% de acetonitrilo y un 60% de la solución de fosfatos, apareciendo el pico a los 4 minutos. En las tablas 4.36 a 4.38 se muestran los datos de la recta de calibración y cálculos relacionados.

Concentración (mg/mL)	Áreas (mV)
0,00	0,00
0,04	98,84
0,06	135,75
0,08	181,76
0,1	226,51
0,14	347,46
0,16	392,98

Tabla 4.36. Valores de la recta de calibración de indometacina disuelta en la fase móvil.

En la figura 4.15 se representa la curva de regresión ajustada de la recta de calibrado.

<b>Estadísticas de la regresión</b>						
Coefficiente de correlación múltiple	0,9978739					
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99575231					
R <sup>2</sup> ajustado	0,99490278					
Error típico	9,85588426					
Observaciones	7					
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	113857,084	113857,084	1172,11134	3,9987E-07	
Residuos	5	485,692273	97,1384546			
Total	6	114342,776				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-6,6028048	7,03261607	-0,93888317	0,3908954	-24,680690	11,4750807
Variable X 1	2464,68902	71,9909157	34,2361116	3,9987E-07	2279,63079	2649,74726

Tabla 4.37. ANOVA de la recta de calibrado.

## Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Residuos estándares
1	-6,602804878	6,602804878	0,733877362
2	91,9847561	6,855243902	0,761935027
3	141,2785366	-5,528536585	-0,614476412
4	190,5723171	-8,812317073	-0,979456478
5	239,8660976	-13,35609756	-1,484480888
6	338,4536585	9,006341463	1,001021572
7	387,747439	5,232560976	0,581579816

Tabla 4.38. Análisis de los residuales de la recta de calibrado.

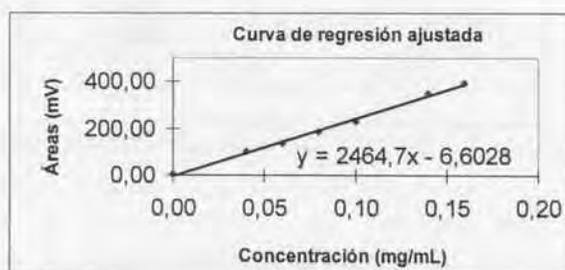


Fig. 4.15. Curva de regresión ajustada de la recta de calibrado.

Para verificar la naturaleza de los cristales, se toma como patrón una muestra de la referencia F5 liofilizada (ver detalles de composición en el capítulo 8). Se resuspende la muestra en agua Milli-Q y se efectúan los ensayos que se detallan a continuación (tabla 4.39). Las lecturas se realizan previa dilución de la muestra en fase móvil.

	Área promedio	Concentración de principio activo (mg/mL)	Cantidad de indometacina (mg)	Comentarios
(1) Filtrar por 0,45 $\mu$ m. Se mide la cantidad de indometacina en el filtrado	0,253	0,0028	0,056	Quedan los cristales y las nanoesferas retenidas en el filtro.
(2) Filtrar con papel de celulosa. Se mide la cantidad de indometacina en el filtrado	64,09	0,0287	0,574	Esta cantidad de indometacina se atribuye a la que está presente en el interior de las nanoesferas, que son las únicas que están en el filtrado*
(3) Lavado del filtro de celulosa con fase móvil (disolución de los cristales)	88,36	0,0385	0,385	Cantidad atribuible a la indometacina cristalizada
(4) Disolución de la muestra en fase móvil	193,01	0,0810	0,810	Cantidad total de indometacina

**Tabla 4.39.** Resumen de las condiciones ensayadas en la identificación de la naturaleza de los cristales.

\* Se han analizado todos los filtrados en el microscopio óptico a 400 aumentos. En este caso se verifica que sólo hay nanoesferas y no se detectan cristales.

Tras estos primeros ensayos se decide la inclusión de dos nuevos parámetros que se aplican por igual a todas las experiencias del diseño factorial de la serie "F":

- Ajuste del pH de la fase acuosa a 3,5
- Filtración de los medios (una vez concluida la evaporación del disolvente orgánico y antes de ultracentrifugar) por un filtro de papel de celulosa.

#### **4.14. Puesta a punto del proceso de liofilización**

En este capítulo se describe el estudio de la liofilización de las suspensiones de nanoesferas. Se ha elegido la técnica de liofilización para estabilizar las nanoesferas porque es un proceso que permite la rápida resuspensión de las muestras, permite la obtención de preparados estériles y son procesos fácilmente escalables e industrializables.

Se estudia la necesidad de añadir algún crioprotector al sistema y en caso afirmativo, cuál es el más idóneo. Los crioprotectores estudiados han sido la sacarosa, lactosa, manitol, glicina y trehalosa y se han añadido en una concentración del 2% (p/v), que es la habitualmente utilizada en la liofilización farmacéutica.

Tras los 3 centrifugados para limpiar las muestras (ver apartados 4.1 y 4.2), el sólido resultante se resuspende en 25 mL de agua Milli-Q. A continuación se llenan los viales con 2 mL de la solución con crioprotector (si procede) y con 3 mL de la suspensión de nanoesferas. Los viales se dejan en el liofilizador, en las condiciones descritas en el capítulo 3.5. Se evalúan las muestras antes y después de liofilizar y los parámetros que se estudian son las características morfométricas de las nanoesferas, el pH, la resuspensión de las muestras liofilizadas y la agregación de las muestras reconstituidas.

##### **4.14.1. Caracterización morfométrica**

A continuación se describen las características morfométricas de las muestras antes y después de liofilizar, una vez reconstituidas con agua Milli-Q. Los estudios de selección del agente crioprotector se realizan empleando como formulación tipo la referencia F5 (tabla

4.40). En las dos primeras filas se incluyen los valores para las nanoesferas F5 y en las dos siguientes los datos para el F5 placebo (F5P). A continuación se evalúa el efecto de la adición de los distintos crioprotectores sobre las nanoesferas placebo (F5P) y las nanoesferas con indometacina (F5) después de liofilizar, en ambos casos. Los datos corresponden al promedio de 3 muestras analizadas. Los valores de tamaño de partícula corresponden al promedio de 10 campos (de cada muestra), con un número aproximado de 5000 partículas totales medidas por microscopía óptica.

	MEDIA µm	MEDIANA µm	MODA µm	DS µm	D <sub>10%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>90%</sub>
F5 antes de liofilizar	0,888	0,702	0,520	0,77	0,440	0,524	0,702	1,027	1,464
F5 liofilizado	1,756	1,476	1,321	1,15	1,004	1,178	1,476	1,953	2,672
F5P antes de liofilizar	1,941	1,752	1,592	0,97	1,280	1,464	1,752	2,164	2,733
F5P liofilizado	1,960	1,698	1,451	1,06	1,223	1,402	1,698	2,166	2,880
F5P glicina	1,990	1,547	1,321	1,77	1,018	1,208	1,547	2,140	3,187
F5 glicina	1,691	1,418	1,204	1,06	0,942	1,115	1,418	1,908	2,644
F5P lactosa	1,956	1,681	1,451	1,11	1,168	1,355	1,681	2,203	2,983
F5 lactosa	1,697	1,416	1,204	1,12	0,937	1,111	1,416	1,909	2,647
F5P manitol	2,094	1,678	1,451	1,59	1,101	1,307	1,678	2,327	3,398
F5 manitol	1,700	1,431	1,321	1,05	0,960	1,130	1,431	1,915	2,639
F5P sacarosa	2,021	1,745	1,592	1,10	1,230	1,418	1,745	2,271	3,062
F5 sacarosa	1,707	1,427	1,204	1,12	0,953	1,124	1,427	1,916	2,652
F5P trehalosa	1,853	1,641	1,451	0,89	1,167	1,343	1,641	2,104	2,742
F5 trehalosa	1,767	1,484	1,321	1,14	1,004	1,180	1,484	1,973	2,718

Tabla 4.40. Características morfométricas de las nanoesferas con /sin agentes crioprotectores.

Esquemáticamente, los resultados se resumen en las siguientes tablas 4.41 y 4.42. Se utiliza como factor comparativo la media del tamaño de partícula (en micrómetros) así como el cociente de las medias de los tamaños de partícula antes (Si) y después de liofilizar (Sf).

Nanoesferas con activo F5P			
	Antes Liofilización (Si)	Después Liofilización (Sf)	Sf/Si
	(media, $\mu\text{m} \pm \text{DS}$ )		
Sin crioprotector	1,941 $\pm$ 0,97	1,960 $\pm$ 1,06	1,0098
Glicina	1,941 $\pm$ 0,97	1,990 $\pm$ 1,77	1,0252
Lactosa	1,941 $\pm$ 0,97	1,956 $\pm$ 1,11	1,0077
Manitol	1,941 $\pm$ 0,97	2,094 $\pm$ 1,59	1,0788
Sacarosa	1,941 $\pm$ 0,97	2,021 $\pm$ 1,10	1,0412
Trehalosa	1,941 $\pm$ 0,97	1,853 $\pm$ 0,89	0,9598

Nanoesferas con activo F5			
	Antes Liofilización (Si)	Después Liofilización (Sf)	Sf/Si
	(media, $\mu\text{m} \pm \text{DS}$ )		
Sin crioprotector	0,888 $\pm$ 0,77	1,756 $\pm$ 1,15	1,9774
Glicina	0,888 $\pm$ 0,77	1,691 $\pm$ 1,06	1,9042
Lactosa	0,888 $\pm$ 0,77	1,697 $\pm$ 1,12	1,9110
Manitol	0,888 $\pm$ 0,77	1,700 $\pm$ 1,05	1,9144
Sacarosa	0,888 $\pm$ 0,77	1,707 $\pm$ 1,12	1,9229
Trehalosa	0,888 $\pm$ 0,77	1,767 $\pm$ 1,14	1,9898

Tablas 4.41 y 4.42. Influencia de los crioprotectores en el tamaño medio de las nanoesferas antes (Si) y después de liofilizar (Sf).

La observación de las muestras al microscopio electrónico SEM revela que las nanoesferas conservan la morfología original anterior al proceso de liofilización. En la figura 4.16 se muestran micrografías de la referencia S6 -ver detalles de composición en capítulo 7-. Se observa que las nanoesferas presentan una forma esférica, de cubierta continua, sin poros y de tamaño homogéneo. Los cristales que se observan corresponden a los crioprotectores presentes en el medio, en este caso, manitol.

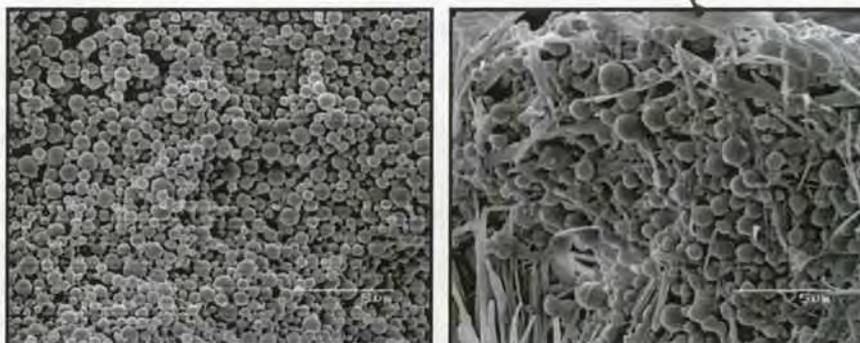


Fig. 4.16. Imagen obtenida con SEM de la muestra S6 antes de liofilizar (imagen izquierda) y después de liofilizar (derecha).

#### 4.14.2. Efecto de la liofilización sobre el valor de pH

Uno de los parámetros a valorar en los liofilizados es el pH, puesto que es conocido que puede variar unas unidades durante el proceso de la liofilización. A continuación se adjuntan los valores de pH obtenidos en las muestras (tabla 4.43).

	Valor de pH referencia F5 después de liofilizar
Sin crioprotector	3,3
Glicina	3,2
Lactosa	3,2
Manitol	3,2
Sacarosa	3,3
Trehalosa	3,2
pH original de la referencia F5 antes de liofilizar: 4,1	

Tabla 4.43. Variación del valor de pH antes y después de la liofilización de las nanoesferas F5.

Según se muestra en la tabla 4.43, ninguno de los crioprotectores estudiados interfiere en el valor de pH final de las muestras.

### 4.13.3. Agregación y resuspensión de los liofilizados

Uno de los parámetros que ayudan a discriminar y valorar la calidad de los productos liofilizados es su velocidad de resuspensión, que debe ser idealmente inmediata o con una ligera agitación. Una vez reconstituida la suspensión se debe valorar si lo hace de forma homogénea o presenta agregados. Para ello, algunos autores han definido una escala de agregación (Quintanar-Guerrero y cols. 1998, Bozdag y cols. 2004) y siguiendo el criterio establecido se han valorado las series de liofilizados con familias distintas de crioprotectores (tabla 4.44).

En la escala de agregación se considera:

- 0 → Ausencia de agregados
- 1 → Pocos agregados
- 2 → Muchos agregados

En la escala de velocidad de resuspensión se ha establecido:

- + → Difícil de resuspender manualmente.
- ++ → Fácil resuspensión, aunque precisa agitación manual.
- +++ → Resuspensión (prácticamente) inmediata, sin agitación.

Escala de agregación/ velocidad de resuspensión		
	Nanoesferas placebo F5P	Nanoesferas con activo F5
Sin crioprotector	2/ +	2/ +
Glicina	2/ +	2/ +
Lactosa	2/ ++	2/ ++
Manitol	0/ +++	0/ +++
Sacarosa	0/ ++	0/ ++
Trehalosa	0/ ++	0/ ++

Tabla 4.44. Valoración de la agregación y velocidad de resuspensión de las distintas muestras de liofilizados.

En la figura 4.17 se muestra una micrografía de la muestra S6 liofilizada con lactosa. A diferencia del aspecto de las micrografías de la figura 4.16, se observa que las nanoesferas están formando

agregados de gran tamaño, lo que justifica las dificultades de resuspensión de la muestra.

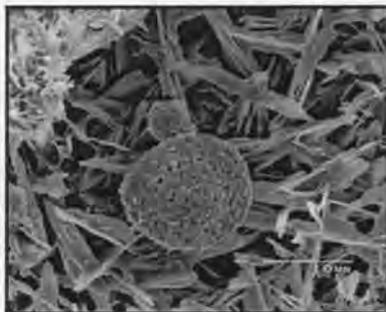


Fig. 4.17. Imagen obtenida por SEM de agregados de nanoesferas de la muestra F5 liofilizada con lactosa.

Tal y como puede observarse en la tabla 4.44, no aparecen diferencias significativas entre las muestras liofilizadas de activo y placebo. No obstante, se observan diferencias en cuanto a la valoración de la agregación y de la velocidad de resuspensión, quedando patente la necesidad de incorporar un crioprotector y dentro de éstos, el que ofrece mejores resultados en cuanto a los parámetros estudiados es el manitol. Este excipiente presenta, además, una ventaja adicional sobre el resto de azúcares puesto que es el que comúnmente se emplea para ajustar la isotonicidad en los inyectables. Esto supone un beneficio en la formulación del inyectable puesto que con un mismo excipiente se consigue favorecer la resuspensión del liofilizado y conseguir la osmolalidad requerida para su aplicación.

Como conclusión se puede afirmar que el análisis de las características morfométricas de las nanoesferas indica que las muestras placebo no sufren ningún cambio de tamaño tras la liofilización, independientemente de la presencia o ausencia de agentes crioprotectores. En cambio, se observa como característica común de las nanoesferas con activo que el tamaño de partícula ha aumentado sensiblemente, llegando en la mayoría de casos a doblar

el tamaño inicial, es decir, pasando de 880 nm a 1,90  $\mu\text{m}$ . El cociente Sf/Si pasa del valor 1,0 de las muestras de nanoesferas placebo a un valor máximo de 1,97 cuando no posee crioprotector, ó 1,98 si el crioprotector es trehalosa y a un valor mínimo de 1,90 cuando se adiciona glicina.

Dado que este aumento en el tamaño de las nanoesferas se observa en todas las muestras, se atribuye a una agregación de las nanoesferas asociada al proceso de liofilización. En base al estudio de distintos agentes crioprotectores se ha podido conseguir una formulación que permite la reconstitución prácticamente inmediata del liofilizado al añadir el vehículo agua purificada.

A pesar de la buena resuspensión de los liofilizados con manitol al 2% (p/v) y que visualmente no se observen agregados, el aumento en el tamaño de partícula se atribuye a pequeños agregados de tamaño micrométrico, por lo tanto no perceptibles a simple vista.

Esta teoría se corrobora tras la observación de las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se ven las nanoesferas individuales, sin presencia de agregados ni cambios morfológicos respecto a las muestras antes de liofilizar.

Algunos autores atribuyen la formación de los agregados a la cantidad residual de PVA presente en la cubierta de las nanoesferas. En este caso se puede afirmar que la formación de agregados se ha constatado por igual en todas las referencias, independientemente del porcentaje de PVA que interviene en la formación de las nanoesferas.

## **5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

---

La validación del método analítico es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico empleado para un ensayo específico es adecuado para el objetivo que se pretende.

Con la finalidad de comprobar la idoneidad del método analítico frente a los distintos excipientes que puedan estar presentes en las nanoesferas, los placebos se han preparado con mezcla de todos los excipientes, a las cantidades teóricas de la formulación.

Los criterios de aceptación de cada uno de los parámetros que se describen en el capítulo de la validación están basados en los criterios considerados por la AOAC, por las normativas ICH Q2A y Q2B, así como en los criterios considerados en la monografía de validación de métodos analíticos editada por AEFI (Pérez y cols. 2001).

En el estudio de la precisión, en referencia a la repetibilidad del sistema instrumental, el límite máximo del coeficiente de variación porcentual se establece en un 1%. Para el resto del estudio (repetibilidad de la solución patrón, repetibilidad de la solución problema y estudio de la precisión intermedia) dicho límite se establece en función del porcentaje en que se encuentra el principio activo (o analito) en las nanoesferas, según los criterios establecidos por la AOAC. En este caso, como el porcentaje teórico de indometacina en las nanoesferas es de 9,09% el límite máximo del coeficiente de variación porcentual corresponde a 2,7%.

El criterio de evaluación del estudio de la recuperación del método (exactitud) para la validación de producto acabado se establece entre un 95-105%.

Para el estudio de la linealidad, los criterios de aceptación son de 0,995 para el coeficiente de correlación ( $r$ ) y de 0,990 para el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Se establece el límite máximo del coeficiente de variación porcentual para el factor respuesta en un 5% en el estudio de validación de producto acabado.

### 5.1. Control de disolventes

Se determina la absorbancia del disolvente, solución reguladora de fosfatos 0,1 M, pH 7,4 preparado según el método descrito en la Farmacopea Europea, 5ª edición.

Según se muestra en la figura 5.1, la absorbancia del disolvente posee de un valor despreciable a 318 nm y en todo el espectro.

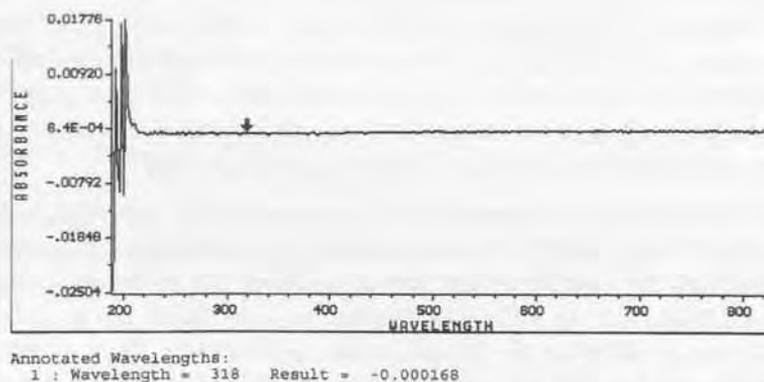


Fig. 5.1. Absorbancia del disolvente (solución reguladora de fosfatos pH 7,4).

Por otra parte, también se comprueba el máximo de absorbancia de la indometacina ( $\lambda=318$  nm) en el medio especificado (figura 5.2).

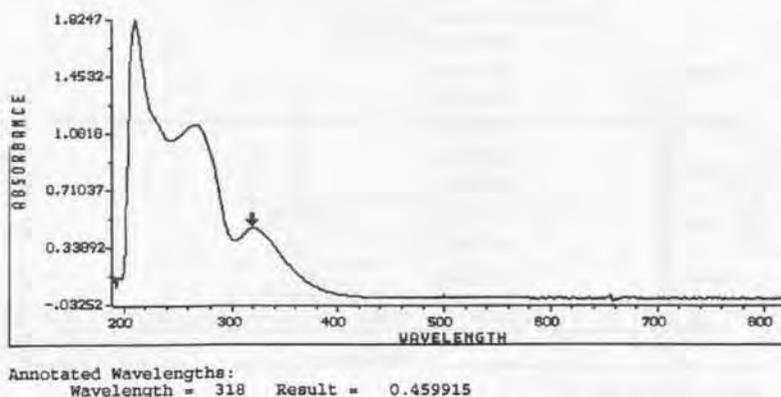


Fig. 5.2. Máximo de absorbancia de la indometacina en la solución reguladora de fosfatos pH 7,4.

## 5.2. Selectividad

La USP define la selectividad de un método analítico como su capacidad de medir con precisión un analito en presencia de interferencias como pueden ser sus precursores de síntesis, excipientes, enantiómeros y productos de degradación conocidos que puedan estar presentes en la muestra (USP 28).

Se prepara una muestra problema de placebo en las mismas condiciones en las que se tratarían las nanoesferas cargadas con principio activo y se efectúa un espectro completo al UV (figura 5.3). Se analiza la absorbancia a la longitud de onda de lectura de la indometacina,  $\lambda=318$  nm. En todos casos, las lecturas obtenidas son de valor despreciable, por lo que se puede considerar que el método analítico de UV-VIS es selectivo, ya que ninguno de los excipientes ofrece valores de absorbancia significativos que pueda interferir con la lectura de la absorbancia de la indometacina.

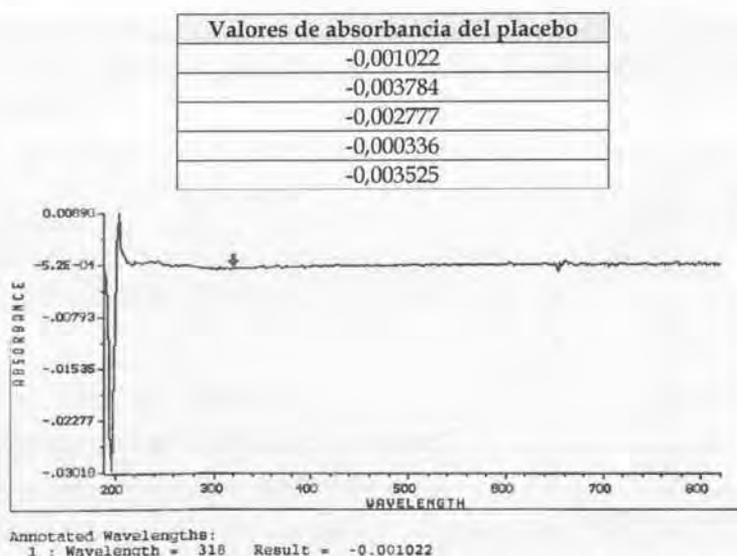


Figura 5.3. Espectro del placebo en solución reguladora de fosfatos pH 7,4.

### 5.3. Precisión

La precisión es el parámetro que expresa el grado de concordancia o de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples, a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones preestablecidas. El objetivo de su estudio es conocer la variabilidad del método de ensayo, si bien ésta puede ser debida a errores aleatorios inherentes al método de ensayo, como por ejemplo al analista, equipo instrumental, reactivos, etc. La precisión engloba dos tipos de estudios:

#### 5.3.1. Repetibilidad del sistema instrumental

Capacidad del instrumento para reproducir sus propias medidas. Se demuestra con lecturas consecutivas de la misma muestra. En la tabla 5.1 se adjuntan los resultados de las absorbancias y del factor de respuesta de las 7 lecturas correspondientes a una concentración de 0,023 mg/mL. El coeficiente de variación obtenido ( $CV = 0,76\%$ ) es inferior al 1%, valor límite establecido para la repetibilidad del sistema instrumental (AOAC). Este resultado demuestra que el

equipo utilizado para el estudio funciona correctamente para el método analítico utilizado.

Lectura	Absorbancia
1	0,464355
2	0,457596
2	0,454605
4	0,454193
5	0,455902
6	0,459915
7	0,457306
<b>Media</b>	0,457696
<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,003523
<b>CV%</b>	0,769739

Tabla 5.1. Resultados obtenidos para el estudio de la repetibilidad del sistema instrumental.

### 5.3.2. Repetibilidad del método

Grado de precisión entre los resultados individuales del ensayo realizado repetidamente sobre una muestra homogénea. Este ensayo se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde la preparación de muestra hasta las lecturas por el mismo instrumento y el mismo analista. Se realiza con 7 muestras a la concentración nominal de 0,04 mg/mL.

5.3.2.1. *Repetibilidad de la solución patrón:* Se muestran los resultados en la tabla 5.2.

Lectura	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de respuesta
1	0,0416	0,804031	19,3276
2	0,0416	0,786346	18,9025
2	0,0408	0,769928	18,8708
4	0,0420	0,799057	19,0252
5	0,0420	0,807998	19,2380
6	0,0424	0,815567	19,2351
7	0,0424	0,804748	18,9799
	<b>Media</b>		19,0827
	<b>S<sub>n-1</sub></b>		0,1819
	<b>CV%</b>		0,9533

Tabla 5.2. Resultados obtenidos para el estudio de la repetibilidad de la solución patrón.

En este caso el CV es 0,95%, por lo que se puede concluir que con el método estudiado para la solución patrón se obtiene una buena repetibilidad, puesto que es inferior a 2,7%, valor fijado para un intervalo de confianza del 95-105%.

5.3.2.2. *Repetibilidad de la solución problema*: Se determina el factor respuesta y el coeficiente de variación igualmente debe ser inferior a 2,7%, que es el valor que se define como especificación. Se valora el principio activo junto con los excipientes (tabla 5.3).

Lectura	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de respuesta
1	0,0395	0,799103	20,2304
2	0,0407	0,830078	20,3700
2	0,0402	0,825058	20,4983
4	0,0392	0,796616	20,2959
5	0,0407	0,836395	20,5250
6	0,0397	0,810242	20,3834
7	0,0402	0,811005	20,1492
Media			20,3503
S <sub>n-1</sub>			0,1364
CV%			0,6704

**Tabla 5.3.** Resultados obtenidos para el estudio de la repetibilidad de la solución problema.

El CV es 0,67%, por lo que se puede concluir que con el método estudiado para la solución patrón se obtiene una buena repetibilidad.

### 5.3.3. Precisión intermedia

Grado de precisión de los datos obtenidos por un mismo analista en diferentes días y también por analistas diferentes. Se comprueba con lecturas consecutivas de muestras preparadas desde un principio en diferentes días por un mismo analista y lecturas de muestras preparadas por dos analistas diferentes (tablas 5.4 y 5.5).

Lectura	Día 1			Día 2		
	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de respuesta	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de respuesta
1	0,0404	0,788956	19,5286	0,0416	0,804031	19,3276
2	0,0404	0,756195	18,7176	0,0416	0,786346	18,9025
3	0,0408	0,765562	18,7637	0,0408	0,769928	18,8708
4	0,0408	0,794724	19,4785	0,042	0,799057	19,0251
5	0,0424	0,800614	18,8824	0,042	0,807998	19,2380
6	0,0399	0,74476	18,6376	0,0424	0,815567	19,2351
7	0,0412	0,799759	19,4116	0,0424	0,804748	18,9799
		Media	19,0600		Media	19,0827
		S <sub>n-1</sub>	0,3943		S <sub>n-1</sub>	0,1819
		CV %	2,0692		CV %	0,9533
		Media interdía	19,0713912			
		DS interdía	0,29530418			
		CV % interdía	1,54841446			

Tabla 5.4. Resultados obtenidos para el estudio de la precisión intermedia de un mismo analista en dos días diferentes.

Lectura	Analista 1			Analista 2		
	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de respuesta	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de respuesta
1	0,0404	0,788956	19,5286	0,0396	0,734253	18,5417
2	0,0404	0,756195	18,7176	0,04	0,734787	18,3696
3	0,0408	0,765562	18,7637	0,0408	0,754486	18,4923
4	0,0408	0,794724	19,4785	0,0396	0,751709	18,9825
5	0,0424	0,800614	18,8824	0,0412	0,756439	18,3602
6	0,0399	0,74476	18,6376	0,0404	0,777771	19,2517
7	0,0412	0,799759	19,4116	0,04	0,74469	18,6172
		Media	19,0600		Media	18,6593
		S <sub>n-1</sub>	0,3943		S <sub>n-1</sub>	0,3347
		CV %	2,0692		CV %	1,7939
		Media interdía	18,8596953			
		S <sub>n-1</sub> interdía	0,4083293			
		CV % interdía	2,16508959			

Tabla 5.5. Resultados obtenidos para el estudio de la precisión intermedia para dos analistas.

En todos los casos se obtienen unos valores de coeficiente de variación inferiores a 2,7%. Esto demuestra que el método analítico propuesto es suficientemente preciso.

## 5.4. Exactitud

Se define como la capacidad del sistema para ofrecer resultados próximos al aceptado convencionalmente como valor verdadero (o un valor de referencia) y el valor experimental encontrado. Es una medida del rigor del método analítico y refleja los posibles errores sistemáticos del método. Con este parámetro se establece la capacidad de recuperación del principio activo en la forma farmacéutica. Según la ICH Q2A y la USP XXVII, este parámetro debe ensayarse en métodos de análisis de valoración de la materia prima, producto acabado y en métodos de análisis de velocidad de disolución. Los criterios de aceptación en la recuperación de la muestra, calculada como  $(A_{\text{real}}/A_{\text{teórica}})*100$ , varían mucho en función del tipo de muestra, puesto que en productos naturales, fluidos biológicos, etc., la recuperación es muy difícil. En el presente trabajo se escoge como límites del factor de recuperación el intervalo 95-105%, siguiendo la recomendación de la AOAC y la práctica habitual de la industria farmacéutica (Pérez y cols. 2001). A continuación se muestran los valores para el cálculo de la exactitud de la solución patrón (tabla 5.6) y de la solución problema (tabla 5.7).

### 5.4.1. Exactitud de la solución patrón

Muestra	%	Conc (mg/mL)	Absorbancia real	Absorbancia teórica	Recuperación %
1	80	0,00200	0,045822	0,0450360	101,7452
2	80	0,00205	0,046906	0,0459794	102,0152
3	80	0,00215	0,047668	0,0478662	99,5859
4	100	0,0416	0,804031	0,7922088	101,4923
5	100	0,0416	0,786346	0,7922088	99,2599
6	100	0,0408	0,769928	0,7771144	99,0752
7	100	0,0420	0,799057	0,7997560	99,9126
8	100	0,0420	0,807998	0,7997560	101,0306
9	100	0,0424	0,815567	0,8073032	101,0236
10	100	0,0424	0,804748	0,8073032	99,6835
11	120	0,0812	1,559753	1,5393816	101,3233
12	120	0,0804	1,553940	1,5242872	101,9453
13	120	0,0820	1,566559	1,5544760	100,7773
<b>Media</b>					100,6823
<b>S<sub>n-1</sub></b>					1,0493
<b>CV %</b>					1,0422

Tabla 5.6. Resultados obtenidos en el estudio de la exactitud de la solución patrón.

Según se observa en la tabla 5.6, todos los valores del factor de recuperación se encuentran dentro de los márgenes preestablecidos del 95-105%. Se puede concluir que la recuperación del principio activo en la solución patrón es correcta y por lo tanto, el método analítico es suficientemente exacto.

#### 5.4.2. Exactitud de la solución problema

Para el cálculo de la exactitud de la solución problema las muestras se preparan mezclando junto con el principio activo una mezcla de los excipientes que componen las nanoesferas, a la concentración teórica inicial (tabla 5.7).

Muestra	%	Conc (mg/mL)	Absorbancia real	Absorbancia teórica	Recuperación %
1	80	0,00215	0,046127	0,0479619	103,98
2	80	0,00215	0,046402	0,0479619	103,36
3	80	0,00210	0,047073	0,0470186	99,88
4	100	0,0412	0,806946	0,785605	97,36
5	100	0,0422	0,825699	0,804473	97,43
6	100	0,0412	0,799377	0,785605	98,28
7	100	0,0397	0,769485	0,757303	98,42
8	100	0,0397	0,775177	0,757303	97,69
9	100	0,0415	0,815979	0,790322	96,86
10	100	0,0422	0,834091	0,804473	96,45
11	120	0,0820	1,544281	1,554476	100,66
12	120	0,0820	1,573456	1,554476	98,79
13	120	0,0820	1,561798	1,554476	99,53
Media					99,1297
S <sub>n-1</sub>					2,3504
CV %					2,3710

Tabla 5.7. Resultados obtenidos en el estudio de la exactitud de la solución problema.

Según se observa en la tabla 5.7, todos los valores del factor de recuperación se encuentran dentro de los márgenes preestablecidos del 95-105%. Se puede concluir que la recuperación del principio activo en la solución problema es correcta y por lo tanto, el método analítico es suficientemente exacto.

## 5.5. Linealidad

Se define como la capacidad de un procedimiento analítico para proporcionar unos resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un determinado intervalo.

Para el cálculo de la linealidad se realizan tres rectas con ocho concentraciones distintas en cada una y que se compararán entre ellas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.8.

Número de recta	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Factor de Respuesta
1	0,001995	0,054947	27,5424
2	0,002000	0,032425	16,2125
3	0,002075	0,044266	21,3330
1	0,0039	0,096497	24,1847
2	0,0040	0,070984	17,7460
3	0,0042	0,075211	18,1231
1	0,0079	0,168594	21,1271
2	0,0080	0,164795	20,5994
3	0,0083	0,157043	18,9208
1	0,0160	0,329895	20,6701
2	0,0160	0,306793	19,1746
3	0,0166	0,308792	18,6019
1	0,0319	0,608276	19,0563
2	0,0320	0,603745	18,8670
3	0,0332	0,632767	19,0592
1	0,0479	0,927872	19,3791
2	0,0480	0,907455	18,9053
3	0,0498	0,946335	19,0027
1	0,0638	1,225235	19,1923
2	0,0640	1,200912	18,7643
3	0,0664	1,259888	18,9742
1	0,0798	1,520355	19,0521
2	0,0800	1,501785	18,7723
3	0,0830	1,576828	18,9979
		<b>Media</b>	19,6774
		<b>S<sub>n-1</sub></b>	2,2339
		<b>CV%</b>	11,3530
Ecuación de la recta:			
$Y = 18,866x + 0,0074$			
Coeficiente de correlación R: 0,9998			
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup> : 0,9996			

**Tabla 5.8.** Resultados obtenidos en el ensayo de la linealidad.

A continuación se describen los resultados del estudio estadístico realizado sobre los valores de la linealidad (tabla 5.9).

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99980822
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99961648
R <sup>2</sup> ajustado	0,99959905
Error típico	0,01078555
Observaciones	24

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio cuadrados	F	Valor crítico F
Regresión	1	6,670485922	6,670485922	57341,96977	4,44109x10 <sup>-39</sup>
Residuos	22	0,00255922	0,000116328		
Total	23	6,673045142			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada origen	0,00743570	0,00335419	2,21683585	0,03727858	0,00047951	0,01439189
Pendiente	18,8655164	0,07878297	239,461833	4,44109x10 <sup>-5</sup>	18,7021304	19,0289025

**Tabla 5.9.** Resumen estadístico de la recta de regresión obtenida en el estudio de la linealidad.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración ensayada con su respuesta corresponde a  $Y = 18,866x + 0,0074$  (figura 5.4) siendo el valor del coeficiente de correlación 0,9998 que es un valor superior al establecido al inicio del estudio (0,995).

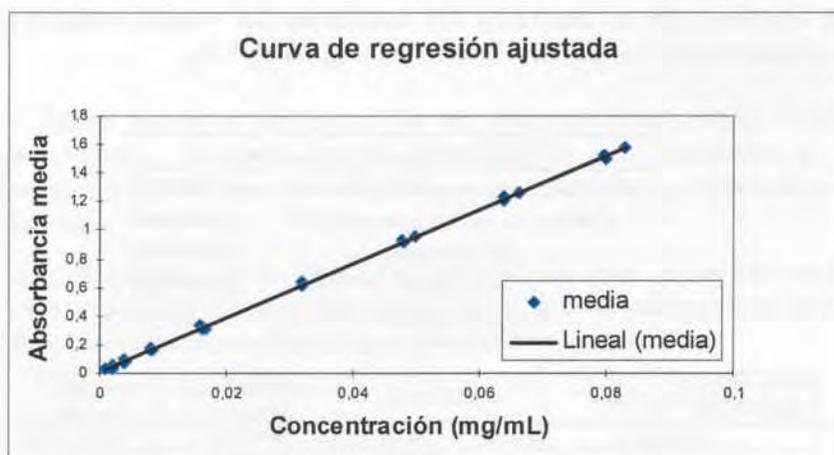


Fig. 5.4. Recta de calibración obtenida con los valores medios de la linealidad.

El coeficiente de determinación es 0,9996 siendo también superior al valor establecido (0,990). Este valor indica que existe una correlación del 99,96% entre la concentración ensayada y la respuesta obtenida, indicando por lo tanto una buena relación lineal, tal y como se observa en la figura 5.5.

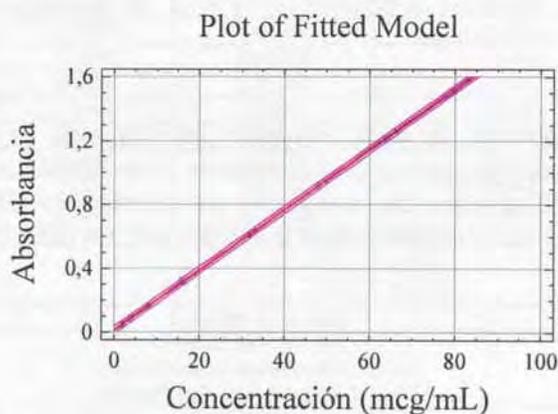


Fig. 5.5. Relación lineal entre la concentración ensayada y su respuesta.

En la figura 5.5 también se encuentran representados gráficamente los intervalos de confianza para cada uno de los puntos ensayados, con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados del estudio estadístico muestran que el valor de  $F$  obtenido para el 95% de probabilidad es de 57341,9 que es un valor superior al establecido en las tablas correspondientes al estudio de la linealidad ( $4,4410 \times 10^{-39}$ ). La ordenada en el origen presenta un valor de prácticamente cero (entre 0,00047951 y 0,01439189). También se demuestra que la pendiente en el intervalo obtenido para el 95% comprende desde 18,7021 a 19,0289 es decir, no incluye el cero. Por lo tanto, cumple con uno de los ensayos a realizar para observar la linealidad de un estudio.

En el estudio del factor de respuesta, que es el término que representa la relación existente entre la respuesta obtenida (lectura) y la concentración estudiada, se obtiene un valor medio de 19,6774. Este valor es muy parecido al valor obtenido de la pendiente (18,866) lo que significa que hay una buena correlación lineal entre la concentración y la respuesta en el intervalo estudiado.

Con la finalidad de estudiar con más detalle la linealidad del método analítico, se aplica una de las aproximaciones que recomienda la AOAC, que consiste en la determinación de la relación entre el factor respuesta y el logaritmo de las concentraciones en cada una de las tres rectas empleadas en el estudio de la linealidad. Los resultados se expresan gráficamente (figuras 5.6 a 5.8) y en el caso de linealidad debería aparecer una línea horizontal en todo el intervalo de concentraciones estudiadas. Se considera un método lineal cuando las respuestas están comprendidas en el intervalo entre el 95 y 105% del valor teórico.

Recta 1			
Concentración (C) mg/mL	Absorbancia	Factor Respuesta	Log C
0,0009975	0,021545	21,60	-3,0010871
0,001995	0,054947	27,54	-2,7000571
0,0039	0,096497	24,18	-2,3990271
0,0079	0,168594	21,13	-2,09799711
0,0159	0,329895	20,67	-1,79696711
0,0319	0,608276	19,06	-1,49593712
0,0479	0,927872	19,38	-1,31984586
0,0638	1,225235	19,19	-1,19490712
0,0798	1,520355	19,05	-1,09799711

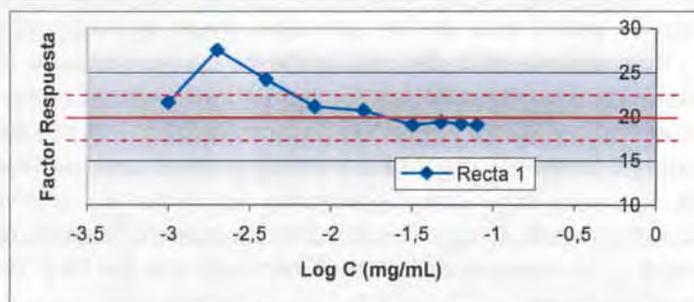
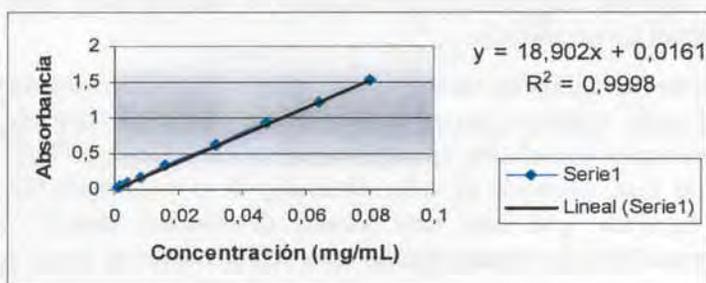


Fig. 5.6. Representaciones gráficas de la linealidad para la recta 1. En la primera gráfica se expresa la sensibilidad del método (respuesta/concentración) mostrando el intervalo de linealidad. La representación gráfica de la concentración en escala logarítmica proporciona información significativa frente a un amplio intervalo de linealidades. La línea roja continua representa una respuesta constante y las discontinuas los márgenes de aceptación  $20,1 \pm 5,0\%$ .

Recta 2			
Concentración (C) mg/mL	Absorbancia	Factor Respuesta	Log C
0,0010	0,027176	27,18	-3
0,0020	0,032425	16,21	-2,69897
0,0040	0,070984	17,75	-2,39794001
0,0080	0,164795	20,60	-2,09691001
0,0160	0,306793	19,17	-1,79588002
0,0320	0,603745	18,87	-1,49485002
0,0480	0,907455	18,91	-1,31875876
0,0640	1,200912	18,76	-1,19382003
0,0800	1,501785	18,77	-1,09691001

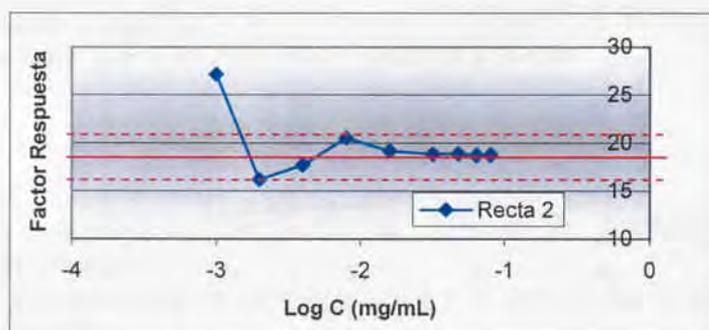
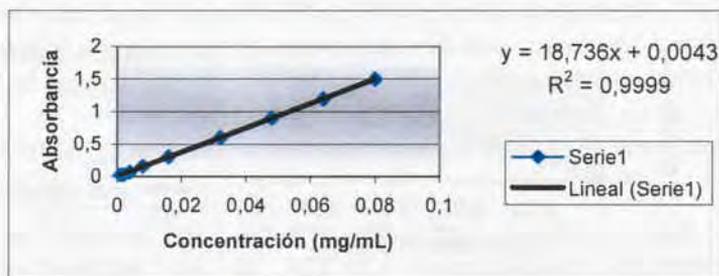


Fig. 5.7. Representaciones gráficas de la linealidad para la recta 2. En la primera gráfica se expresa la sensibilidad del método (respuesta/concentración) mostrando el intervalo de linealidad. La representación gráfica de la concentración en escala logarítmica proporciona información significativa frente a un amplio intervalo de linealidades. La línea roja continua representa una respuesta constante y las discontinuas los márgenes de aceptación  $19,7 \pm 5,0\%$ .

Recta 3			
Concentración (C) mg/mL	Absorbancia	Factor Respuesta	Log C
0,0010375	0,02858	27,55	-2,98401189
0,002075	0,044266	21,33	-2,6829819
0,0041	0,075211	18,12	-2,3819519
0,0083	0,157043	18,92	-2,08092191
0,0166	0,308792	18,60	-1,77989191
0,0332	0,632767	19,06	-1,47886192
0,0498	0,946335	19,00	-1,30277066
0,0664	1,259888	18,97	-1,17783192
0,0830	1,576828	19,00	-1,08092191

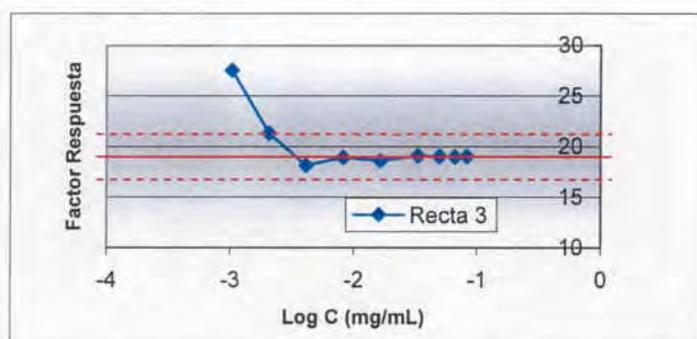
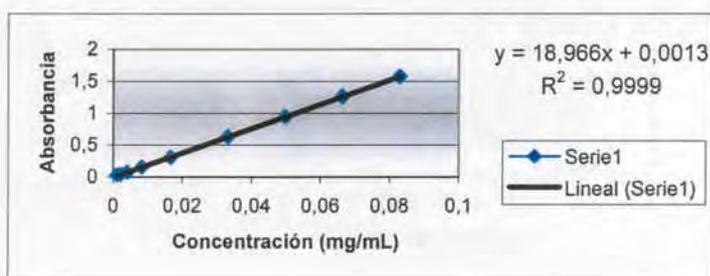


Fig. 5.8. Representaciones gráficas de la linealidad para la recta 3. En la primera gráfica se expresa la sensibilidad del método (respuesta/concentración) mostrando el intervalo de linealidad. La representación gráfica de la concentración en escala logarítmica proporciona información significativa frente a un amplio intervalo de linealidades. La línea roja continua representa una respuesta constante y las discontinuas los márgenes de aceptación  $19,0 \pm 5,0\%$ .

Con todos los datos obtenidos se puede concluir que el método analítico propuesto es lineal en el intervalo de concentraciones entre 0,0040 y 0,080 mg/mL, con un CV inferior al 5%. A concentraciones inferiores a los 0,0040 mg/mL el coeficiente de variación se amplía hasta un valor máximo del 11,35%, por lo que no puede incluirse dicha concentración en el intervalo de linealidad del método.

### 5.6. Límite de detección y de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) es la mínima cantidad de analito presente en una muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. El límite de detección (LD) es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar (aunque no necesariamente cuantificar) bajo dichas condiciones experimentales (ICH Q2A).

Para el cálculo de estos parámetros se han seguido las recomendaciones de la IUPAC, calculándose a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito. Para ello se ha aplicado la siguiente ecuación:

$$C_L = \frac{K * S_{bl}}{b}$$

Siendo:

$C_L$ : concentración de analito en el límite de detección o de cuantificación.

$K$ : constante que se considera igual a 10 para el LC e igual a 3 para el LD.

$S_{bl}$ : desviación estándar correspondiente a la señal del blanco o placebo.

$b$ : pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración de analito. El intervalo de esta recta debe estar cercano a los niveles de cuantificación.

En la figura 5.9 se muestra la absorbancia del placebo y en la tabla 5.10 los valores de absorbancia del medio de disolución (o blanco) y del placebo disuelto en el blanco.

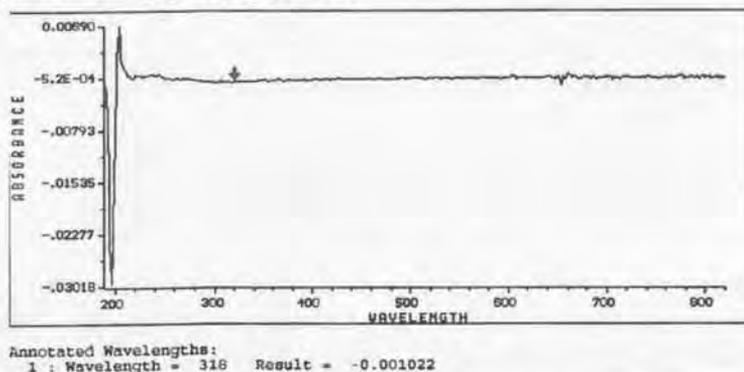


Fig. 5.9. Absorbancia del placebo en solución reguladora de fosfatos a pH 7,4.

BLANCO	PLACEBO
0,000214	-0,001022
-0,000046	-0,003784
-0,001495	-0,002777
-0,000214	-0,000336
$S_{n-1}$ : 0,00070355	$S_{n-1}$ : 0,00153463

Tabla 5.10. Valores de absorbancia del blanco (solución reguladora de fosfatos pH 7,4) y del placebo disuelto en el blanco.

Se emplea como pendiente la de la recta de calibrado ejemplificada como 3ª recta en el cálculo de la linealidad ( $y = 18,966x + 0,0013$ ) en estas concentraciones por ser la que presenta unos valores de  $r$  y  $r^2$  más adecuados. Además, no debe aplicarse ningún factor de corrección al cálculo ya que el ajuste de la recta de calibrado es bueno ( $r = 0,9999$ ). En la tabla 5.11 se esquematizan los resultados obtenidos.

$S_{bl} =$	0,00070355	LC:	0,00037 mg/mL
		LD:	0,00011 mg/mL
$S_{bl} =$	0,00153463	LC:	0,00081 mg/mL
		LD:	0,00024 mg/mL

Tabla 5.11. Valores de LC y LD, en función del blanco empleado.

Según estos cálculos, se establece el LC en 0,00037 ó 0,00081 mg /mL y el LD en 0,00011 ó 0,00024 mg /mL, en función de si se considera como blanco la solución reguladora de fosfatos o una solución de placebo en solución reguladora de fosfatos.

### 5.7. Robustez

La robustez se define como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones distintas a las establecidas. Se expresa como la falta de influencia de las variables "operacionales" sobre los resultados.

En este caso se plantea la robustez con respecto a la variación del pH de la solución reguladora y con respecto a la variación de longitud de onda de lectura.

Para el cálculo de la robustez se han preparado 5 soluciones individuales a 0,06 mg/mL, empleando como disolvente solución reguladora de fosfatos 0,1 M a pH 7, 7,4 y 7,8. Las lecturas al espectrofotómetro se han realizado a tres longitudes de onda: 316, 318 y 320 nm. En la tabla 5.12 se muestran los resultados obtenidos, junto con el factor de respuesta.

SOLUCIÓN REGULADORA A pH 7,0						
Conc. (mg/mL)	316 nm	Factor respuesta	318 nm	Factor respuesta	320 nm	Factor respuesta
0,0604	1,146685	18,9848	1,164215	19,2751	1,170654	19,3816
0,0592	1,120575	18,9286	1,136078	19,1905	1,14122	19,2773
0,0584	1,115845	19,1069	1,132278	19,3883	1,138321	19,4918
0,0608	1,155228	19,0005	1,171936	19,2752	1,177032	19,3591
0,0584	1,113541	19,0675	1,131805	19,3802	1,136856	19,4667
<b>Media</b>		19,0177	<b>Media</b>	19,3018	<b>Media</b>	19,3952
	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,0703	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,0828	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,0863
	<b>CV%</b>	0,3695	<b>CV%</b>	0,4291	<b>CV%</b>	0,4451

SOLUCIÓN REGULADORA A pH 7,4						
Conc. (mg/mL)	316 nm	Factor respuesta	318 nm	Factor respuesta	320 nm	Factor respuesta
0,0592	1,137329	19,2116	1,152725	19,4717	1,157944	19,5599
0,0624	1,186447	19,0136	1,201584	19,2562	1,205154	19,3134
0,0620	1,176239	18,9716	1,194107	19,2598	1,197525	19,3149
0,0608	1,164413	19,1515	1,182114	19,4427	1,185593	19,4999
0,0580	1,107880	19,1014	1,124741	19,3921	1,128098	19,4500
<b>Media</b>		19,0899	<b>Media</b>	19,3645	<b>Media</b>	19,4276
	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,0982	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,1013	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,1106
	<b>CV%</b>	0,5144	<b>CV%</b>	0,5233	<b>CV%</b>	0,5695

SOLUCIÓN REGULADORA A pH 7,8						
Conc. (mg/mL)	316 nm	Factor respuesta	318 nm	Factor respuesta	320 nm	Factor respuesta
0,0608	1,144852	18,8298	1,162247	19,1159	1,167816	19,2075
0,0628	1,198776	19,0888	1,218109	19,3966	1,22377	19,4868
0,0624	1,176926	18,8610	1,193726	19,1302	1,200577	19,2400
0,0620	1,184799	19,1097	1,200363	19,3607	1,208298	19,4887
0,0624	1,180054	18,9111	1,199539	19,2234	1,204071	19,2960
<b>Media</b>		18,9601	<b>Media</b>	19,2454	<b>Media</b>	19,3438
	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,1305	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,1291	<b>S<sub>n-1</sub></b>	0,1352
	<b>CV%</b>	0,6883	<b>CV%</b>	0,6709	<b>CV%</b>	0,6987

Tabla 5.12. Resultado de los ensayos realizados para demostrar la robustez del método analítico frente a las variaciones de pH y longitud de onda.

El análisis estadístico de los resultados de la robustez se analiza con el programa Stagraphics Plus 5.1 construyendo la matriz de diseño correspondiente a un ensayo multi-nivel de 2 factores y 3 respuestas, con 5 replicados totales. Los resultados se han calculado sobre el porcentaje de recuperación.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 5.10 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

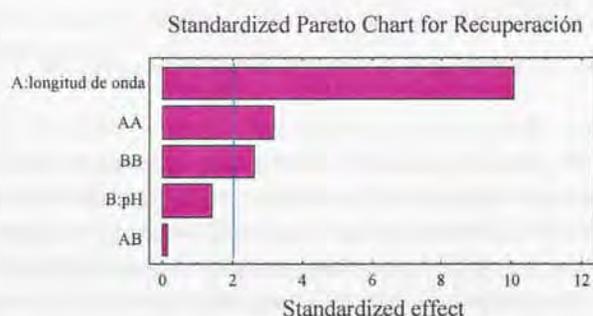


Fig. 5.10. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre los valores de recuperación.

En el gráfico de Pareto de la figura 5.10 se han representado los efectos estandarizados. La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que tres factores son estadísticamente significativos sobre la eficacia de encapsulación: la longitud de onda, la interacción AA y BB.

Para asegurar la significación estadística de los efectos, el programa analiza los resultados del análisis de la varianza. El programa analiza cada efecto de forma independiente y agrupando en cuatro bloques todas las interacciones entre los distintos factores estudiados (tabla 5.13).

Analysis of Variance for recuperación					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:onda	26,6838	1	26,6838	100,20	0,0000
B:ph	0,504806	1	0,504806	1,90	0,1773
AA	2,61969	1	2,61969	9,84	0,0035
AB	0,00224625	1	0,00224625	0,01	0,9273
BB	1,81268	1	1,81268	6,81	0,0133
blocks	1,49516	4	0,373789	1,40	0,2530
Total error	9,32069	35	0,266305		
Total (corr.)	42,4391	44			

R-squared = 78,0375 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 75,2218 percent  
Standard Error of Est. = 0,516048  
Mean absolute error = 0,390944  
Durbin-Watson statistic = 0,764314

**Tabla 5.13.** ANOVA para los resultados de la recuperación.

En la tabla 5.13 se compara la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. Puede observarse tres de los factores (la longitud de onda, la interacción AA y BB) presentan unos valores de probabilidad menor de 0,05%, lo cual implica que son significativamente diferentes de cero con un 95% de probabilidad.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 78,04% de la variabilidad de la respuesta recuperación. El estadístico  $r^2$  (ajustado para los grados de libertad de la experiencia), que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes es 75,22%. El error estándar del ajustado muestra una desviación estándar de los residuales de 0,51. El error absoluto medio de 0,39 es el valor medio de los residuales. El estadístico Durbin-Watson (DW) indica si existe correlación significativa basada en el orden en que se dan los datos. Ya que el valor es menor que 1,4 indica que probablemente existe alguna correlación entre los residuales.

Gráficamente también se pueden valorar los efectos principales (figura 5.11). En este gráfico se muestra la variable estimada como función de cada factor experimental. En cada gráfico el factor de que se trate varía de nivel inferior (-1,0) al superior (+1,0), mientras que los otros factores se mantienen constantes en su valor medio.

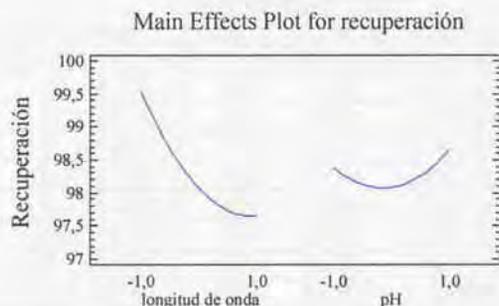


Fig. 5.11. Representación gráfica de los efectos principales sobre el valor de la recuperación.

Como conclusión puede afirmarse que el método analítico empleado es robusto frente a las posibles variaciones de pH en un intervalo de  $\pm 0,4$  sobre un valor medio de 7,4, ya que variaciones de pH en dicho intervalo no afectan a la lectura de la absorbancia de la muestra. En cambio, variaciones en la longitud de onda de  $\pm 0,2$  nm sobre el valor medio de 318 nm influyen en la absorbancia determinada, lo que indica que es necesario efectuar las lecturas a 318 nm, evitando cualquier variación sobre la longitud de onda, ya que podría dar lugar a errores en la determinación de la absorbancia de la muestra.

## 5.8. Estabilidad de la solución

Para el estudio de la estabilidad de la solución patrón y la solución problema se preparan dos muestras a la concentración de trabajo, en solución reguladora fosfatos pH 7,4 y se mantiene una muestra a 25 °C y la otra muestra a 37 °C, siendo ésta última la temperatura a la que se realizan los ensayos de liberación *in vitro*. Las muestras se analizan a distintos tiempos durante un total de seis días.

En la tabla 5.14 y en la figura 5.12 se muestran los resultados de la estabilidad a 25 °C y en la tabla 5.15 y figura 5.13 los resultados a 37 °C.

ESTABILIDAD A 25 °C				
Tiempo (h)	Solución Patrón		Solución problema	
	Absorbancia	%Recuperación	Absorbancia	%Recuperación
0	1,234177	98,52	1,117218	91,92
1	1,236664	98,72	1,137659	93,61
2	1,231842	98,34	1,122360	92,34
3	1,239426	98,95	1,189774	97,93
4	1,234314	98,53	1,130554	93,02
6	1,233826	98,50	1,124756	92,54
20	1,259537	100,56	1,120056	92,15
24	1,268021	101,24	1,160736	95,52
29	1,272736	101,62	1,162186	95,64
45	1,296783	103,55	1,159790	95,44
48	1,289261	102,95	1,173767	96,60
53	1,290237	103,03	1,166931	96,03
69	1,253159	100,05	1,194595	98,32
72	1,208939	96,50	1,180145	97,13
75	1,226852	97,94	1,189651	97,92
6 días	0,914139	75,10	0,923294	75,86

Tabla 5.14. Estabilidad de la solución patrón y problema a 25 °C.



Fig. 5.12. Porcentaje de recuperación de las soluciones de indometacina a 25 °C.

ESTABILIDAD A 37 °C				
Tiempo (h)	Solución Patrón		Solución problema	
	Absorbancia	%Recuperación	Absorbancia	%Recuperación
0	1,234177	98,52	1,117218	91,92
1	1,220322	97,41	1,163757	95,77
2	1,215546	97,03	1,192017	98,11
3	1,220184	97,40	1,138519	93,68
4	1,213638	96,87	1,196884	98,51
6	1,209885	96,57	1,196411	98,48
20	1,217697	97,20	1,204544	99,15
24	1,200760	95,84	1,203629	99,07
29	1,197083	95,54	1,205490	99,23
45	1,196762	95,52	1,188889	97,85
48	1,179718	94,15	1,210480	99,64
53	1,175293	93,79	1,199036	98,69
69	1,190002	94,98	1,227554	101,05
72	1,225723	97,85	1,212585	99,81
75	1,218384	97,26	1,211899	99,76
6 días	0,895508	73,55	0,924072	75,92

Tabla 5.15. Estabilidad de la solución patrón y problema a 37 °C.

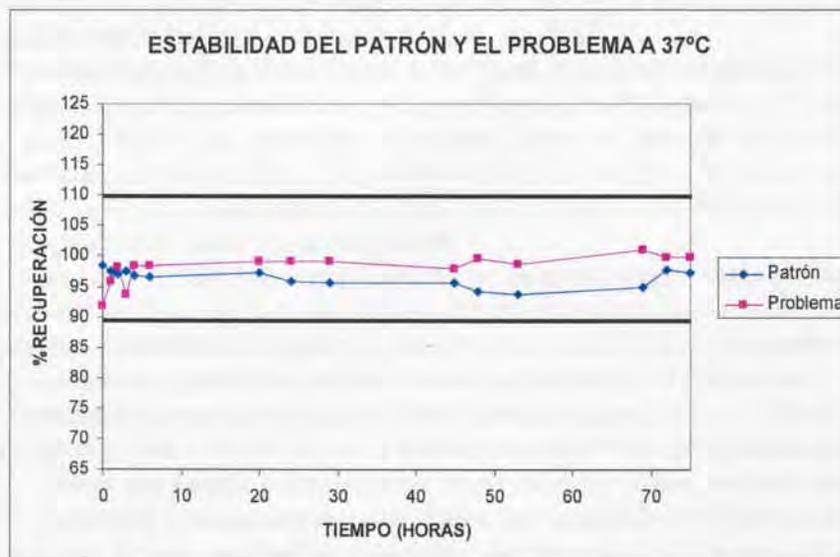


Fig. 5.13. Porcentaje de recuperación de las soluciones de indometacina a 37 °C.

Los resultados muestran que las soluciones de indometacina en solución reguladora fosfatos a pH 7,4 son estables durante un mínimo de 75 horas (3 días) mantenidas a temperatura 25 °C como a 37 °C.

## 6. DISEÑO FACTORIAL SERIE "D"

---

El primer diseño factorial parte con el propósito de estudiar la influencia de los parámetros de proceso en la formulación de nanoesferas por el método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente.

Se plantea un diseño factorial  $2^3$  donde se propone analizar la influencia del tipo de polímero, el tipo de PVA y su concentración. Esto supone la realización de un mínimo de 8 experimentos con el objetivo de conocer los efectos principales de las variables, así como los efectos de las interacciones entre las variables.

El motivo de la elección de estos 3 parámetros resulta del estudio del método de encapsulación descrito por el grupo de Kawashima (Niwa y cols. 1993) y se pretende averiguar como es posible modular, mediante la formulación, parámetros como el tamaño de partícula, velocidad de disolución *in vitro*, así como las eficacias de encapsulación, entre otros parámetros.

Como es conocido, hay otros factores no reseñados en el estudio que podrían influir en los resultados, como son la temperatura del proceso, velocidad de agitación, etc. Para su control, estos parámetros se mantienen constantes durante la realización de los experimentos.

Otros parámetros que potencialmente podrían afectar a la realización de los ensayos son los llamados factores ambientales, cuya influencia se intenta minimizar trabajando en zonas de condiciones ambientales de humedad y temperatura controladas. La variabilidad debida a las materias primas se elimina al trabajar siempre con los mismos lotes. La variabilidad debida a los equipos tampoco existe ya que siempre se utilizan los mismos equipos.

El orden de realización de los experimentos es aleatorio a fin de minimizar el sesgo en los resultados y proporcionar seguridad contra los efectos de las variables ocultas. En las tablas 6.1 y 6.2 se muestran las condiciones experimentales que se contemplan en cada ensayo. La primera columna indica la referencia y número de orden de cada experimento. En las siguientes columnas se asigna el nivel de cada factor, por ejemplo, el nivel + (superior) del factor "polímero" corresponde al PLGA 50/50, según lo descrito a continuación. En la primera parte del capítulo se presentan los resultados de la evaluación de los lotes fabricados en cuanto a las eficacias de encapsulación, características morfométricas y perfiles de liberación *in vitro* y a continuación estos resultados se analizan estadísticamente.

Los experimentos que se proponen se realizan por triplicado.

	A	B	C
D1	-	-	-
D2	+	-	-
D3	-	+	-
D4	+	+	-
D5	-	-	+
D6	+	-	+
D7	-	+	+
D8	+	+	+

Tabla 6.1. Matriz de diseño de experiencias.

A: Tipo de polímero

- + PLGA 50/50 viscosidad inherente: 0,50 dL/g
- PLGA 85/15 viscosidad inherente: 0,66 dL/g

B: Tipo de PVA, con 2 viscosidades extremas

- + Mowiol® 4-88
- Airvol® 540

Mowiol® 4-88  $4 \pm 0,5$  mPa x S,  $87,7 \pm 1$  (% hidrólisis)

Airvol® 540  $50 \pm 5$  mPa x S,  $88 \pm 1$  (% hidrólisis)

C: Concentración PVA

- + 2%
- 4%
-

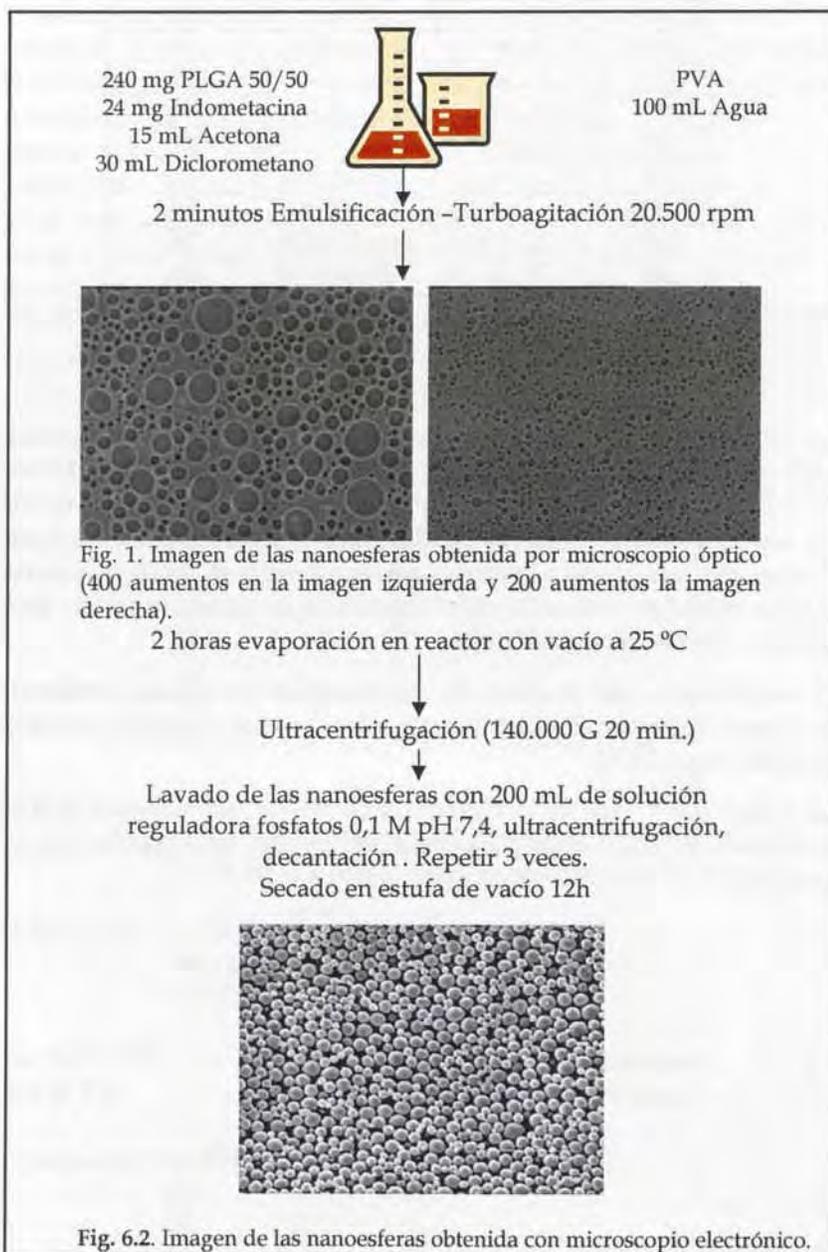
Ensayo	Polímero	PVA	%PVA
D1	PLGA 85/15	Airvol 540	4%
D2	PLGA 50/50	Airvol 540	4%
D3	PLGA 85/15	Mowiol 4-88	4%
D4	PLGA 50/50	Mowiol 4-88	4%
D5	PLGA 85/15	Airvol 540	2%
D6	PLGA 50/50	Airvol 540	2%
D7	PLGA 85/15	Mowiol 4-88	2%
D8	PLGA 50/50	Mowiol 4-88	2%

**Tabla 6.2.** Matriz detallada del diseño de experiencias para el diseño de la serie "D".

En la siguiente página se esquematizan las condiciones de trabajo aplicadas para la realización de los ensayos del diseño factorial serie "D". El método de fabricación que se utiliza es el SESDM (ver detalles en capítulo 1.1.3.1) y las cantidades de principio activo, excipientes, disolventes, así como los parámetros de proceso se han fijado en base a los resultados obtenidos en el capítulo 4 de puesta a punto de los métodos de nanoencapsulación.

El seguimiento del proceso de encapsulación se realiza analizando imágenes del medio de reacción con el microscopio óptico, a distintos tiempos (figura 6.1).

La figura 6.2 ilustra la morfología final de las nanoesferas, una vez terminado el proceso de encapsulación, en una micrografía obtenida por SEM.



### 6.1. Eficacias de encapsulación

En la tabla 6.3 se muestran los resultados individuales de la valoración de los lotes fabricados según el diseño factorial establecido, junto con sus replicados.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
D1	39,77	9,48	3,77	87,60
	42,54	8,91	3,79	91,80
	34,62	9,10	3,15	87,15
D2	41,55	9,29	3,86	71,0
	41,74	9,32	3,89	83,12
	34,61	8,90	3,08	77,06
D3	40,44	9,10	3,68	66,66
	44,93	8,97	4,03	53,86
	40,89	9,22	3,77	85,60
D4	27,50	9,20	2,53	85,80
	22,16	9,25	2,05	98,00
	25,98	8,20	2,13	77,61
D5	53,06	9,63	5,11	76,30
	56,66	9,09	5,15	68,68
	46,59	9,10	4,24	71,97
D6	60,44	9,05	5,47	83,02
	66,03	9,45	6,24	87,80
	72,86	9,10	6,63	85,41
D7	51,07	9,77	4,99	75,18
	52,35	9,13	4,78	81,00
	67,64	8,22	5,56	83,46
D8	52,11	9,02	4,70	86,09
	58,36	9,27	5,41	81,20
	50,66	9,10	4,61	71,97

Tabla 6.3. Resultados de los análisis de los lotes del diseño factorial "D".

En la tabla 6.4 se muestran los resultados promedio del diseño factorial de la serie "D" junto con las desviaciones estándar. Por lo general se observan eficacias de encapsulación entre el 25% y el 66% y unos rendimientos globales de proceso de entre el 68% y el 89%.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación% X ± DS	Contenido en activo% X ± DS	Rendimiento% X ± DS
D1 PROMEDIO ± DS	38,97 ± 4,02	3,57 ± 0,36	88,85 ± 2,56
D2 PROMEDIO ± DS	39,30 ± 4,06	3,61 ± 0,46	77,06 ± 6,06
D3 PROMEDIO ± DS	42,08 ± 2,47	3,82 ± 0,18	68,70 ± 15,97
D4 PROMEDIO ± DS	25,21 ± 2,75	2,23 ± 0,26	87,13 ± 10,26
D5 PROMEDIO ± DS	52,10 ± 5,10	4,83 ± 0,51	72,31 ± 3,82
D6 PROMEDIO ± DS	66,44 ± 6,20	6,11 ± 0,59	85,41 ± 2,39
D7 PROMEDIO ± DS	57,02 ± 9,22	5,11 ± 0,40	79,88 ± 4,25
D8 PROMEDIO ± DS	53,71 ± 4,09	4,90 ± 0,44	79,75 ± 7,17

Tabla 6.4. Resultados promedios del análisis de los lotes del diseño factorial "D", junto con sus desviaciones estándar (X: media aritmética, DS: desviación estándar).

## 6.2. Características morfométricas

El análisis del tamaño de partícula de los 8 lotes del diseño factorial y sus replicados se efectúa mediante la técnica de difracción láser con un equipo Coulter. Los resultados de la tabla 6.5 (y de forma resumida en la tabla 6.6) corresponden a los promedio de 3 replicados de cada lote y son medidas de número de partículas, expresadas en micrómetros. Como puede observarse, el intervalo de tamaño de partícula oscila entre un tamaño medio de 611 nm (ensayo D6) hasta un máximo de 1800 nm (ensayo D1).

	MEDIA $\mu\text{m}$	MEDIANA $\mu\text{m}$	MODA $\mu\text{m}$	DS $\mu\text{m}$	D <sub>90%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>10%</sub>
D1-1	1,686	1,611	1,541	1,381	2,600	2,030	1,611	1,331	1,164
D1-2	1,730	1,649	1,451	1,370	2,629	2,069	1,649	1,375	1,208
D1-3	1,986	1,882	1,748	1,332	2,924	2,287	1,882	1,618	1,454
D2-1	0,872	0,781	0,688	0,363	1,419	1,073	0,781	0,591	0,484
D2-2	0,944	0,847	0,755	0,389	1,522	1,153	0,847	0,644	0,530
D2-3	0,942	0,845	0,755	0,390	1,521	1,152	0,845	0,643	0,529
D3-1	1,380	1,327	1,204	1,379	2,110	1,665	1,327	1,092	0,951
D3-2	1,308	1,261	1,204	1,383	2,010	1,599	1,261	1,031	0,888
D3-3	1,450	1,385	1,321	1,407	2,269	1,767	1,385	1,132	0,978
D4-1	0,831	0,818	0,755	1,507	1,454	1,121	0,818	0,603	0,484
D4-2	0,792	0,769	0,627	1,517	1,413	1,077	0,769	0,566	0,464
D4-3	0,838	0,828	0,829	1,490	1,446	1,122	0,828	0,616	0,494
D5-1	0,980	0,946	0,829	1,544	1,773	1,316	0,946	0,711	0,580
D5-2	0,986	0,953	0,829	1,509	1,779	1,323	0,953	0,716	0,585
D5-3	0,985	0,951	0,829	1,509	1,777	1,321	0,951	0,715	0,584
D6-1	0,588	0,557	0,474	1,355	0,877	0,692	0,557	0,470	0,419
D6-2	0,630	0,579	0,520	1,479	1,049	0,756	0,579	0,476	0,419
D6-3	0,616	0,577	0,520	1,417	0,984	0,742	0,577	0,476	0,419
D7-1	1,306	1,257	1,204	1,396	2,030	1,602	1,257	1,022	0,880
D7-2	1,278	1,229	1,097	1,393	1,983	1,562	1,229	1,001	0,865
D7-3	1,291	1,259	1,204	1,377	1,937	1,574	1,259	1,026	0,874
D8-1	0,707	0,660	0,571	1,682	1,434	0,971	0,660	0,479	0,383
D8-2	0,645	0,534	0,474	1,654	1,644	0,696	0,534	0,457	0,413
D8-3	1,110	1,194	0,688	1,572	1,989	1,675	1,194	0,707	0,622

Tabla 6.5. Caracterización morfométrica detallada de los lotes del diseño factorial "D" (n=3).

	Tamaño medio (nm) $\pm$ DS
D1	1800 $\pm$ 162
D2	919 $\pm$ 41
D3	1378 $\pm$ 69
D4	820 $\pm$ 25
D5	984 $\pm$ 32
D6	611 $\pm$ 21
D7	1292 $\pm$ 14
D8	821 $\pm$ 252

Tabla 6.6. Tamaño medio de los lotes del diseño factorial "D" junto con las DS (n=3).

En las figuras 6.2 y 6.3 se muestran los tamaños promedio de los 8 lotes del diseño factorial.

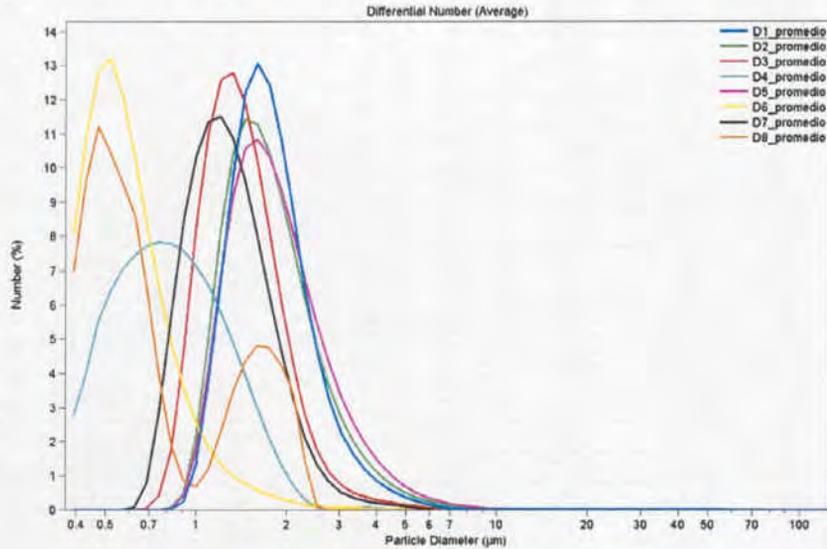


Fig. 6.2. Tamaño promedio de los 8 ensayos del diseño factorial "D".

Como puede observarse, los tamaños de partícula más pequeños se obtienen en los ensayos D4, D6 y D8. En el capítulo correspondiente a la evaluación del análisis del diseño factorial se estudia qué factores son los que afectan más durante la formulación de las nanoesferas para obtener un tamaño de partícula determinado.

Tamaño promedio de las nanoesferas del diseño factorial D

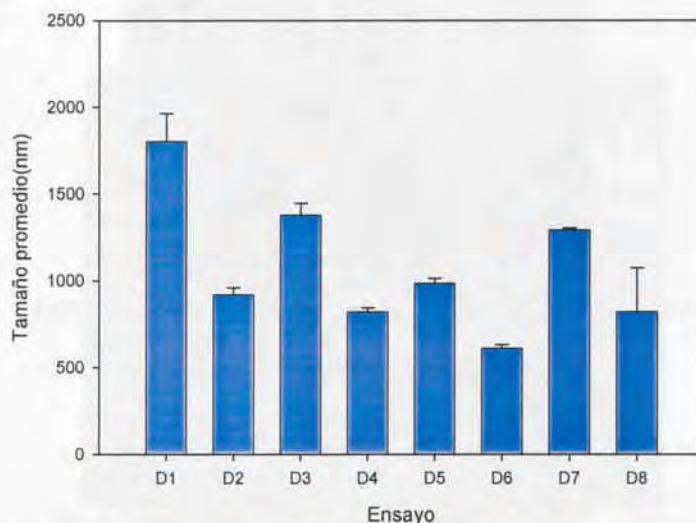


Fig. 6.3. Variación del tamaño promedio de las nanoesferas obtenidas en el diseño factorial "D", representado en figura de histogramas.

La morfología de las nanoesferas se monitoriza durante el proceso de encapsulación por microscopía óptica y las nanoesferas en estado sólido se analizan por microscopía electrónica de barrido. En las figuras 6.4a, 6.4b y 6.4c se puede observar con SEM el detalle de las características morfométricas de las partículas. Si bien se observa la formación de nanoesferas y microesferas dependiendo del ensayo, un aspecto a destacar es la homogeneidad en la forma de las partículas así como la ausencia de cristales visibles o poros en la cubierta de las mismas.

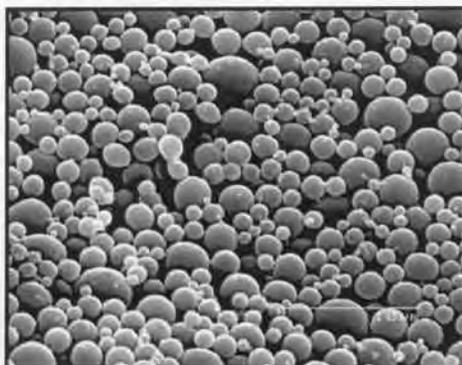


Fig. 6.4a. Imagen de las nanoesferas D2 obtenida con SEM.

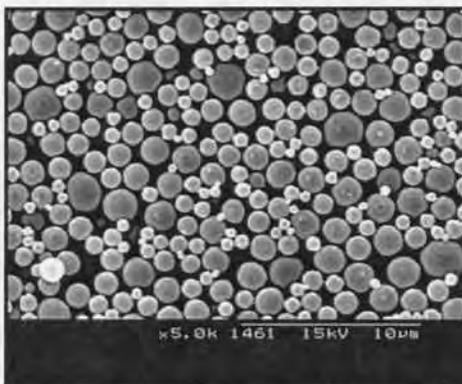


Fig. 6.4b. Imagen de las nanoesferas D5 obtenida con SEM.

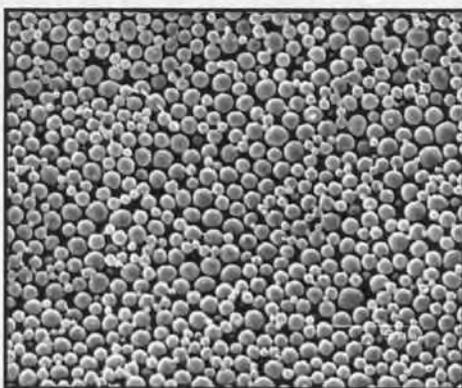


Fig. 6.4c. Imagen de las nanoesferas D6 obtenida con SEM.

Al observar las partículas con detalle se puede observar la esfericidad de las mismas, así como la ausencia de poros visibles en la cubierta (figura 6.5).

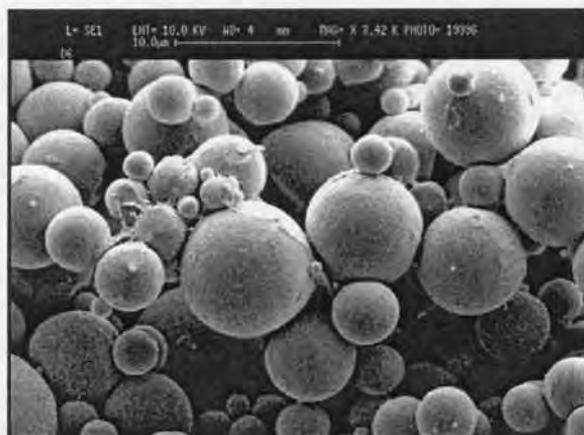


Fig. 6.5. Imagen de las nanoesferas D1 obtenida con SEM.

Con la finalidad de observar con detalle la morfología de las nanoesferas se emplea la técnica de la ultracriomicrotomía. Con este método se consigue observar el interior de las partículas, pudiéndose apreciar con gran detalle la estructura matricial interna (figura 6.6).

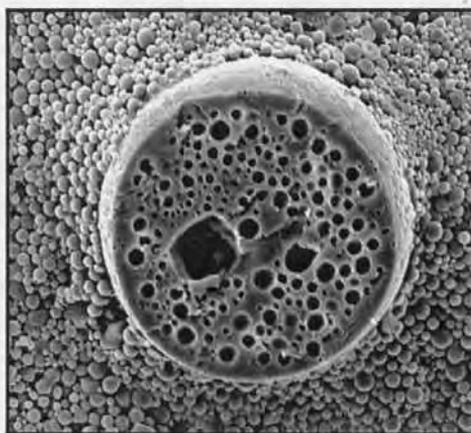


Fig. 6.6. Imagen de las nanoesferas D3 obtenida con SEM.

### 6.3. Ensayos de liberación *in vitro*

Uno de los objetivos del diseño factorial es conseguir averiguar como afectan los distintos factores que intervienen en la formulación de las nanoesferas a los perfiles de liberación *in vitro* del fármaco encapsulado. Con la información obtenida se espera poder obtener los perfiles de liberación requeridos, según convenga. Es decir, una vez identificados los factores que en este diseño factorial permiten obtener unas cinéticas de liberación determinadas, será posible modular la formulación para conseguir un perfil deseado.

Las condiciones de realización de los ensayos de liberación se describen en el capítulo 3.4. Se han realizado 6 replicados de cada uno de los ensayos.

A continuación se adjuntan las tablas 6.7a-d donde se reflejan las concentraciones, el porcentaje liberado y las desviaciones estándar promedio (DS) en cada tiempo de toma de muestra. Para el cálculo del MDT se ha asumido un modelo no compartimental y una administración extravascular. El cálculo se ha realizado con el programa WinNonlin 4.1.

Tiempo (min)	D1 (promedio)			D2 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0012	2,05	0,0099	0,0026	7,93	0,0085
60	0,0031	5,17	0,0148	0,0047	14,40	0,0115
120	0,0057	9,46	0,0088	0,0090	27,49	0,0858
240	0,0096	16,06	0,0341	0,0127	38,79	0,0866
360	0,0101	16,91	0,0274	0,0151	46,09	0,0610
480	0,0096	16,03	0,0085	0,0154	46,93	0,0450
1440	0,0114	18,98	0,0101	0,0159	48,34	0,0372
1920	0,0114	19,09	0,0179	0,0145	44,15	0,0375
2880	0,0114	19,03	0,0188	0,0149	45,51	0,0103
MDT (min)	1547,4548			1489,7287		

Tabla 6.7a. Datos de liberación de las referencias D1 y D2.

Tiempo (min)	D3 (promedio)			D4 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0014	5,42	0,0179	0,0044	18,30	0,0225
60	0,0037	14,08	0,0237	0,0114	47,25	0,0169
120	0,0066	25,02	0,0095	0,0166	68,71	0,0174
240	0,0100	38,36	0,0080	0,0193	79,79	0,0301
360	0,0129	49,43	0,0134	0,0201	83,29	0,0271
480	0,0131	49,89	0,0102	0,0184	76,25	0,0163
1440	0,0170	64,77	0,0055	0,0173	71,51	0,0065
1920	0,0163	62,23	0,0098	0,0168	69,52	0,0137
2880	0,0160	60,89	0,0154	0,0160	66,33	0,0133
MDT (min)	1574,7777			1421,2310		

Tabla 6.7b. Datos de liberación de las referencias D3 y D4.

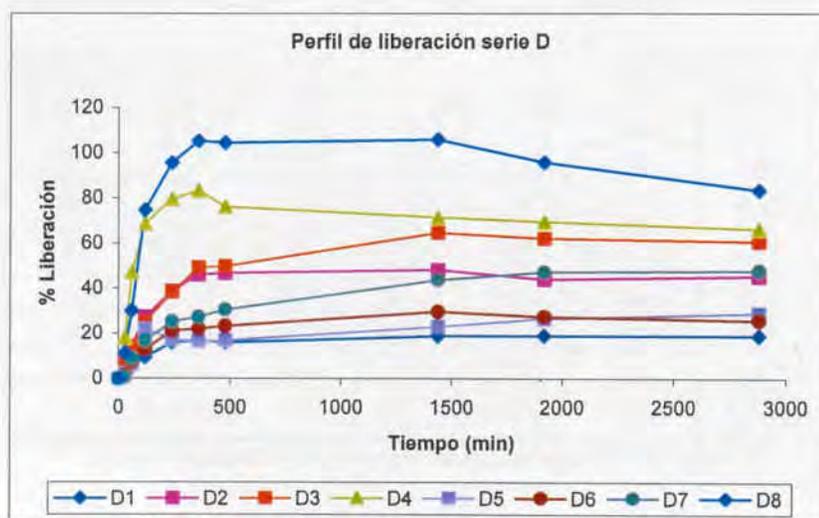
Tiempo (min)	D5 (promedio)			D6 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0009	2,34	0,0036	0,0008	1,50	0,0053
60	0,0025	6,47	0,0147	0,0039	7,65	0,0103
120	0,0086	21,97	0,2294	0,0066	13,04	0,0187
240	0,0069	17,65	0,0016	0,0108	21,32	0,0250
360	0,0065	16,63	0,0082	0,0113	22,25	0,0057
480	0,0067	16,94	0,0056	0,0119	23,46	0,0172
1440	0,0091	23,13	0,0077	0,0151	29,80	0,0225
1920	0,0104	26,59	0,0096	0,0140	27,59	0,0102
2880	0,0115	29,19	0,0134	0,0130	25,79	0,0063
MDT (min)	1635,3278			1537,8427		

Tabla 6.7c. Datos de liberación de las referencias D5 y D6.

Tiempo (min)	D7 (promedio)			D8 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0002	0,60	0,0043	0,0045	11,37	0,0498
60	0,0030	9,02	0,0137	0,0121	30,21	0,1145
120	0,0056	16,79	0,0056	0,0300	74,97	0,0938
240	0,0085	25,43	0,0068	0,0383	95,80	0,0914
360	0,0092	27,45	0,0093	0,0422	105,43	0,1173
480	0,0102	30,61	0,0186	0,0419	104,67	0,0945
1440	0,0147	43,80	0,0198	0,0424	106,05	0,1157
1920	0,0159	47,37	0,0079	0,0384	95,94	0,0950
2880	0,0160	47,86	0,0113	0,0335	83,66	0,0578
MDT (min)	1649,6894			1432,7172		

Tabla 6.7d. Datos de liberación de las referencias D7 y D8.

En la figura 6.7 se representa gráficamente los perfiles de liberación de las nanoesferas de la serie "D".

Fig. 6.7. Perfiles de liberación *in vitro* de las nanoesferas de la serie "D".

En la figura 6.7 pueden observarse los distintos perfiles de liberación *in vitro* de las nanoesferas de la serie "D". Sin entrar en detalle en el análisis de las formulaciones y sus correspondientes perfiles de liberación (esta discusión se detalla en el capítulo del análisis del diseño factorial) se pueden observar grandes diferencias entre formulaciones. Las referencias D4 y D8 son las que más rápidamente liberan el principio activo, presentando un patrón de liberación bifásico, es decir, presencia de una fase de liberación rápida (llamada efecto *burst* o estallido donde se libera alrededor del 80% del principio activo en las primeras 4 horas) seguida de una fase de liberación lenta o prolongada.

En cambio, referencias como D1, D5, D6 y D7 presentan un perfil de liberación mucho más lento, sin apenas presencia del efecto *burst*, si no que durante todo el tiempo de estudio hay una liberación gradual del principio activo.

Esta observación se puede justificar tras el estudio de las micrografías realizadas con microscopía electrónica de barrido, donde no se observa presencia alguna de cristales de principio activo sin encapsular (figuras 6.8-6.11).

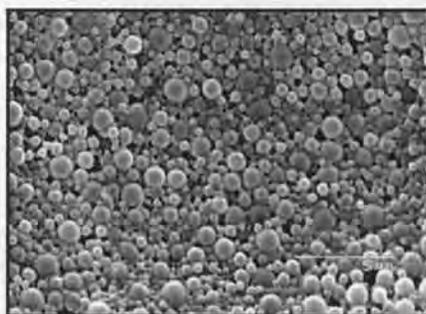


Fig. 6.8. Imagen D1 obtenida con SEM.

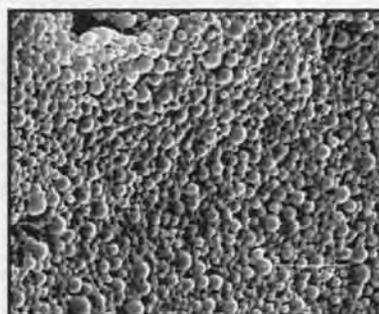


Fig. 6.9. Imagen D2 obtenida con SEM.

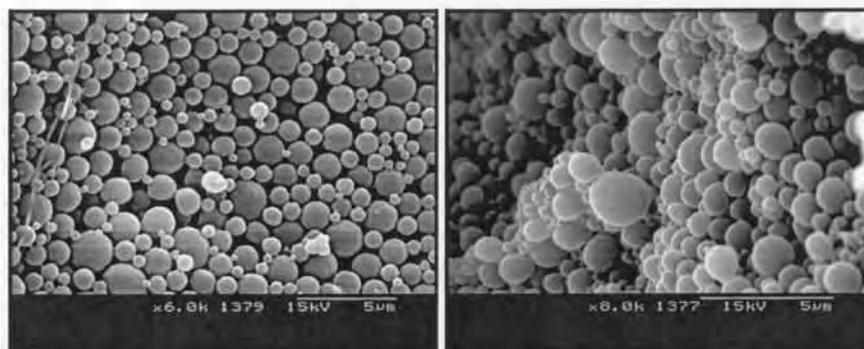


Fig. 6.10. Imagen D7 obtenida con SEM. Fig. 6.11. Imagen D4 obtenida con SEM.

También se puede observar que las nanoesferas presentan una cubierta esférica homogénea y continua, sin que se observen poros de gran tamaño visibles en ella (figura 6.12).

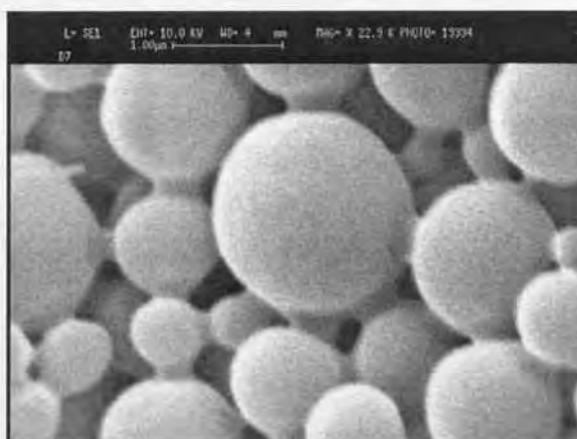


Fig. 6.12. Imagen de las nanoesferas D7 obtenida con SEM.

Según estas observaciones, no se puede atribuir el efecto *burst* inicial observado ni a principio activo sin encapsular ni a grandes poros en la cubierta de las nanoesferas. Las distintas velocidades de liberación están relacionadas con el tamaño de partícula, es decir, para

nanoesferas menores, más rápidas son las velocidades de cesión de principio activo. Pero además del tamaño de partícula, probablemente el pequeño efecto *burst* inicial observado se deba a otro factor, como es la presencia de "nanoporos", es decir, poros de tamaño inferior a 100 nm, que no son visibles ni con la técnica de microscopía electrónica de barrido. Esta afirmación coincide con la teoría postulada por algunos autores (Wang y cols. 2000a y 2000b).

#### 6.4. Análisis estadístico del diseño factorial serie "D"

En la tabla 6.8 se muestra la matriz del diseño factorial.

Ensayo	Factores Principales			Resultados		
	Polimero	PVA	%PVA	Tamaño medio nm	EE %	MDT min
D1	PLGA 85/15	Airvol 540	4%	1800	38,97	1547,4548
D2	PLGA 50/50	Airvol 540	4%	919	39,30	1489,7287
D3	PLGA 85/15	Mowiol 4-88	4%	1378	42,08	1574,7777
D4	PLGA 50/50	Mowiol 4-88	4%	820	25,21	1421,2310
D5	PLGA 85/15	Airvol 540	2%	984	52,10	1635,3278
D6	PLGA 50/50	Airvol 540	2%	611	66,44	1537,8427
D7	PLGA 85/15	Mowiol 4-88	2%	1292	57,02	1649,6894
D8	PLGA 50/50	Mowiol 4-88	2%	821	53,71	1432,7172

Tabla 6.8. Matriz del diseño factorial serie "D".

##### 6.4.1. Matriz de respuesta del tamaño medio de las nanoesferas

En la tabla 6.9 se muestra la matriz de respuesta para el tamaño medio de partícula.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	PVA (B)	% PVA (C)	AB	AC	BC
D1	-1	-1	-1	1	1	1
D2	1	-1	-1	-1	-1	1
D3	-1	1	-1	-1	1	-1
D4	1	1	-1	1	-1	-1
D5	-1	-1	1	1	-1	-1
D6	1	-1	1	-1	1	-1
D7	-1	1	1	-1	-1	1
D8	1	1	1	1	1	1
Valores*	-142,69	-0,19	-75,56	14,06	37,19	64,94

Tabla 6.9. Matriz de respuesta para el tamaño medio de partícula y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

En la tabla 6.9 se muestran los valores de los efectos calculados de los factores, con respecto a la respuesta tamaño medio de partícula. El mayor efecto (magnitud absoluta, puesto que el signo sólo hace referencia al sentido en que afecta la respuesta: un signo positivo indica que la respuesta se ve aumentada por el factor en nivel alto) es el tipo de polímero (-142,69). Esto significa que el utilizar el polímero PLGA 50/50 produciría una disminución del tamaño medio de partícula.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. Este diagrama se construye representando los efectos en las ordenadas y en las abcisas mediante unas barras horizontales que muestran el valor absoluto de cada efecto. En la figura 6.13 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

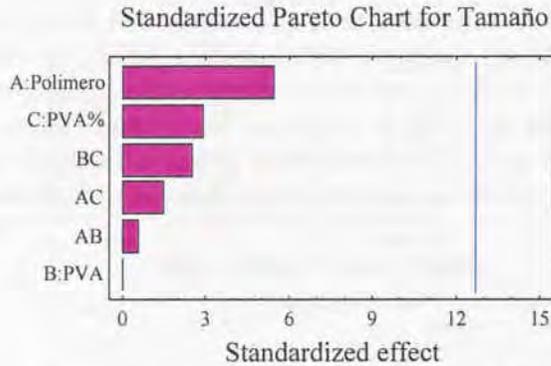


Fig. 6.13. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre el tamaño medio de partícula.

En el gráfico de Pareto de la figura 6.13 se han representado los efectos estandarizados. La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que el factor "tipo de polímero", seguido de muy de cerca del tipo de PVA son los que más afectan a la respuesta tamaño medio de partícula, aunque ninguno de ellos, en las condiciones experimentales elegidas, es significativo con una probabilidad del 95%. Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza. En la tabla 6.10 se compara la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. Puede observarse que ninguno de los factores tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo que implica que ninguno de ellos influye significativamente sobre los resultados obtenidos.

Analysis of Variance for Tamaño

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: Polimero	651511,0	1	651511,0	29,41	0,1161
B: PVA	1,125	1	1,125	0,00	0,9955
C: PVA <sup>1</sup>	182710,0	1	182710,0	8,25	0,2133
AB	6328,13	1	6328,13	0,29	0,6075
AC	44253,1	1	44253,1	2,00	0,3920
BC	134940,0	1	134940,0	6,09	0,2451
Total error	22155,1	1	22155,1		
Total (corr.)	1,0419E6	7			

R-squared = 97,8736 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 85,1151 percent

Standard Error of Est. = 148,846

Mean absolute error = 52,625

Durbin-Watson statistic = 1,5

**Tabla 6.10.** Análisis de la varianza para el tamaño medio de partícula.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 97,87% de la variabilidad de la respuesta tamaño medio de partícula. El estadístico  $r^2$  (ajustado para los grados de libertad de la experiencia), que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes es 85,12%. El error estándar del ajustado muestra una desviación estándar de los residuales de 148,85. El error absoluto medio de 52,63 es el valor medio de los residuales. El estadístico Durbin-Watson (DW) indica si existe correlación significativa basada en el orden en que se dan los datos. Ya que el valor es mayor que 1,4 indica que probablemente no existe ninguna correlación importante entre los residuales.

#### 6.4.2. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tamaño medio de partícula

En la figura 6.14 se representan gráficamente los efectos principales sobre la respuesta tamaño medio de partícula. En este gráfico se muestra la variable estimada como función de cada factor experimental. En cada gráfico el factor de que se trate varía de nivel inferior (-1,0) al superior (+1,0), mientras que los otros factores se mantienen constantes en su valor medio. En la parte izquierda de la gráfica se observa la respuesta del tamaño medio de partícula cuando

el factor A (tipo de polímero) pasa desde un nivel bajo (-1,0) hasta el nivel alto (+1,0). Los factores tipo de polímero y porcentaje de PVA presentan líneas con pendientes negativas, es decir, se mejora la respuesta tamaño medio de partícula (traducido en un descenso del tamaño medio de las nanoesferas) si el factor se mantiene en nivel alto (+1, 0). En cambio, el factor tipo de PVA presenta una recta paralela al eje de abscisas, lo que significa que no tiene efecto sobre la respuesta.

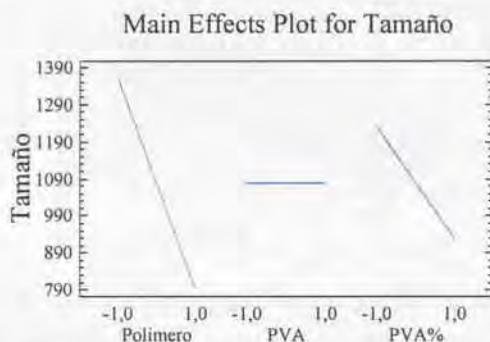
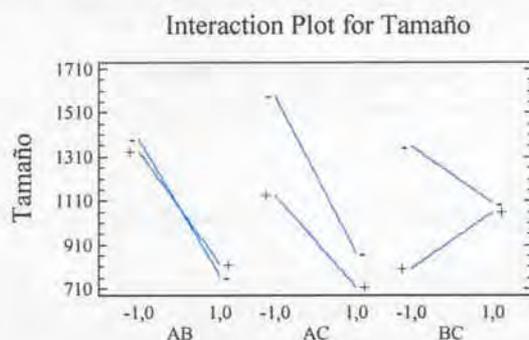


Fig. 6.14. Representación gráfica de los efectos principales sobre el tamaño medio de partícula.

Como se ha observado anteriormente, las interacciones tampoco muestran un efecto significativo sobre la media de la respuesta tamaño de partícula, por lo que no será necesario su análisis. No obstante, se adjunta el gráfico que proporciona el programa estadístico, donde se muestra la variable estimada como una función de un par de factores. En cada representación gráfica figura un factor que varía de un nivel inferior (-1) al superior (+1) y la línea corresponde al tamaño medio de partícula cuando el segundo factor es mantenido en el nivel inferior (marcada en los extremos por el signo -), mientras que en la otra línea el segundo factor se mantiene en nivel alto (indicado por + en los extremos). El resto de los factores, excepto los dos de la interacción, se mantienen constantes en su nivel central. Por ejemplo, para las dos primeras líneas de la figura 6.15 (sobre la parte de las abscisas marcada con AB), la línea superior (marcada con - en sus extremos) corresponde al tamaño medio de las nanoesferas cuando se mantiene el nivel del factor B en el nivel (-) y

el factor A se modifica desde (-1,0) a (+1,0). Si las líneas (-) y (+) no se cruzan entre sí implica que no existe interacción estadísticamente significativa entre ambos factores, como es el caso de las interacciones AC y BC. En cambio, las líneas correspondientes a los factores AB se cruzan entre sí, lo que indica que existe interacción estadísticamente significativa entre ambos.



**Fig. 6.15.** Representación gráfica de las interacciones AB (tipo de polímero y tipo de PVA), AC (tipo de polímero y % de PVA) y BC (tipo de PVA y % de PVA).

#### 6.4.3. Respuesta óptima para el tamaño medio de las nanoesferas

Se fija como objetivo el obtener un tamaño de partícula lo más pequeño posible y según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 6.11). Según estos datos, ninguno de los factores influye significativamente, pero para conseguir un tamaño de partícula pequeña, las condiciones experimentales se deben mantener en los siguientes niveles:

Polímero	+1	PLGA 50/50
PVA	-1	Airvol® 540
PVA%	+1	2%
<b>Valor óptimo</b>		<b>611,0 nm</b>

**Tabla 6.11.** Niveles de los factores para obtener el menor tamaño de nanoesferas posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 6.16), donde se observa que para un porcentaje de PVA determinado (el programa estadístico escoge el valor central de los estudiados), la distribución de la respuesta tamaño medio de nanoesfera, en función del tipo de polímero y el tipo de PVA.

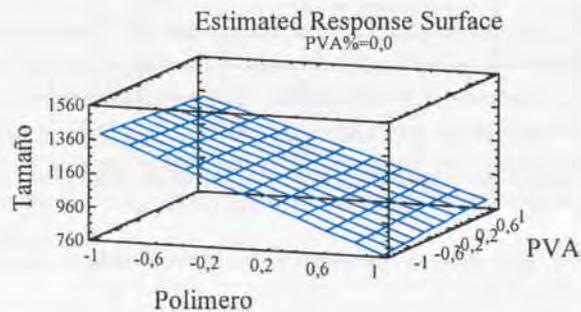


Fig. 6.16. Gráfico de superficie de respuesta para el tamaño medio de las nanoesferas.

Trabajos previos apuntan que al aumentar el porcentaje de PVA aumenta también el tamaño de partícula (Murakami y cols. 1997). En este caso y en las condiciones experimentales ensayadas, los resultados coinciden con los publicados en la bibliografía y se ha comprobado que, aunque no haya una relación estadísticamente significativa, valores bajos de porcentaje de PVA asociados al PLGA 50/50 favorecen la obtención de tamaños de partícula más pequeños.

#### 6.4.4. Matriz de respuesta de la eficacia de encapsulación de las nanoesferas

En la tabla 6.12 se muestra la matriz de respuesta para la eficacia de encapsulación.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	PVA (B)	% PVA (C)	AB	AC	BC
D1	-1	-1	-1	1	1	1
D2	1	-1	-1	-1	-1	1
D3	-1	1	-1	-1	1	-1
D4	1	1	-1	1	-1	-1
D5	-1	-1	1	1	-1	-1
D6	1	-1	1	-1	1	-1
D7	-1	1	1	-1	-1	1
D8	1	1	1	1	1	1
Valores*	-0,34	-1,17	5,23	-2,18	1,72	0,19

Tabla 6.12. Matriz de respuesta para la eficacia de encapsulación y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 6.17 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

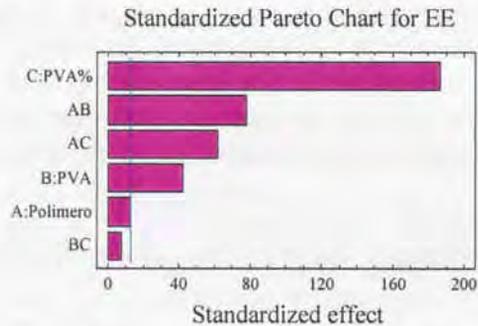


Fig. 6.17. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre la eficacia de encapsulación (EE).

En el gráfico de Pareto de la figura 6.17 se han representado los efectos estandarizados. La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se

comprueba que cuatro factores son estadísticamente significativos sobre la eficacia de encapsulación: en primer lugar el % de PVA, después la interacción AB (tipo de polímero y tipo de PVA), la interacción AC (tipo de polímero y % de PVA) y por último el factor B, tipo de PVA. Además, el factor A, tipo de polímero, está muy próximo a la línea de significación estadística.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 6.13). Puede observarse que los cuatro factores mencionados anteriormente tienen un valor de probabilidad menor de 0,05, lo que implica que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de probabilidad inferior al 5% y, en consecuencia, influyen sobre el parámetro estudiado.

Analysis of Variance for EE

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:polimero	3,79501	1	3,79501	149,93	0,0519
B:PVA	44,133	1	44,133	1743,53	0,0152
C:PVA%	875,921	1	875,921	34604,27	0,0034
AB	151,815	1	151,815	5997,64	0,0082
AC	95,0131	1	95,0131	3753,60	0,0104
BC	1,25611	1	1,25611	49,62	0,0898
Total error	0,0253125	1	0,0253125		
Total (corr.)	1171,96	7			

R-squared = 99,9978 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 99,9849 percent

Standard Error of Est. = 0,159099

Mean absolute error = 0,05625

Durbin-Watson statistic = 1,0

**Tabla 6.13.** Análisis de la varianza para la eficacia de encapsulación.

La  $r^2$  del ajustado es 99,99%, mientras que la  $r^2$  más adecuada para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,98%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 0,16. El error absoluto medio de 0,056 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es inferior a 1,4 con lo que se puede concluir que probablemente existe alguna correlación entre los residuales. Finalmente puede afirmarse que el factor porcentaje de PVA es el que más influye sobre la eficiencia de encapsulación de las nanoesferas,

siendo la concentración del 2% la que proporciona valores más altos de la respuesta, seguida del tipo de PVA, Airvol® 540.

#### 6.4.5. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre la eficacia de encapsulación

En la figura 6.18 se muestran gráficamente los efectos principales sobre la respuesta eficacia de encapsulación. En este gráfico se muestra la variable estimada como función de cada factor experimental. En cada gráfico el factor de que se trate varía de nivel inferior (-1,0) al superior (+1,0), mientras que los otros factores se mantienen constantes en su valor medio.

El factor tipo de polímero presenta una recta casi paralela al eje de abscisas, lo que significa que no tiene efecto sobre la eficacia de encapsulación. Parecido es el caso del factor tipo de PVA, puesto que su efecto no es muy pronunciado. En cambio, para el factor % de PVA se observa que influye de manera importante, viéndose favorecida la eficacia de encapsulación con el aumento del % de PVA, con lo cual interesará mantenerlo en el nivel alto (+1,0) del mismo, para obtener una elevada eficacia de encapsulación.

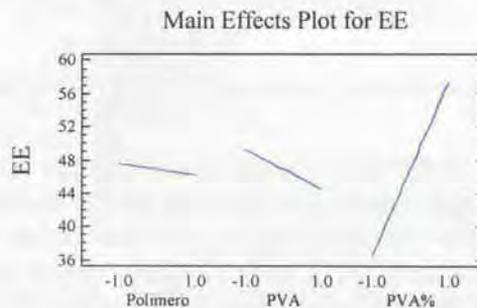


Fig. 6.18. Representación gráfica de los efectos principales sobre la eficacia de encapsulación.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor de la eficacia de encapsulación, según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso se observa interacción entre los factores AB, representado por el cruce de las líneas (-) y (+) en la figura 6.19.

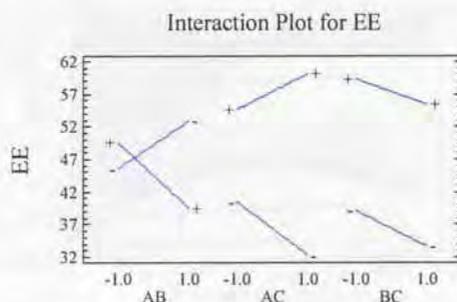


Fig. 6.19. Representación gráfica de las interacciones AB (tipo de polímero y tipo de PVA), AC (tipo de polímero y % de PVA) y BC (tipo de PVA y % de PVA).

#### 6.4.6. Respuesta óptima para la eficacia de encapsulación

Se fija como objetivo el obtener una eficacia de encapsulación lo más alta posible a fin de asegurar la rentabilidad del proceso de encapsulación. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 6.14). Según estos datos, para conseguir una eficacia de encapsulación lo mayor posible, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Polímero	+1	PLGA 50/50
PVA	-1	Airvol® 540
PVA%	+1	2%
<b>Valor óptimo</b>		<b>66,44 %</b>

Tabla 6.14. Niveles de los factores para obtener el mayor valor de eficacia de encapsulación posible.

Estos datos coinciden con los obtenidos en la respuesta óptima para el tamaño medio de partícula y reafirman la necesidad de trabajar con

el PLGA 50/50 y el Airvol® 540 al 2% para obtener tanto tamaño a de partícula pequeños como altos valores de EE. En la figura 6.20 se representa gráficamente los valores de la EE mediante las superficies de respuesta y se observa que para un porcentaje de PVA determinado (el programa estadístico escoge el valor central de los estudiados), la eficacia de encapsulación aumenta para el PVA al 2%.

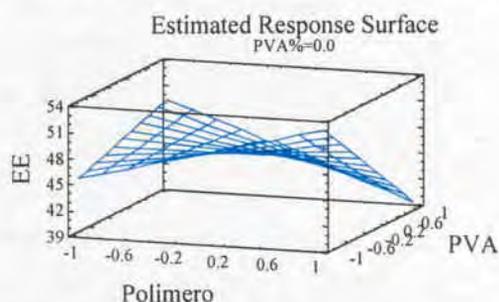


Fig. 6.20. Gráfico de superficie de respuesta para la eficacia de encapsulación.

#### 6.4.7. Matriz de respuesta para el tiempo medio de disolución de las nanoesferas (MDT)

En la tabla 6.15 se muestra la matriz de respuesta para el MDT.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	PVA (B)	% PVA (C)	AB	AC	BC
D1	-1	-1	-1	1	1	1
D2	1	-1	-1	-1	-1	1
D3	-1	1	-1	-1	1	-1
D4	1	1	-1	1	-1	-1
D5	-1	-1	1	1	-1	-1
D6	1	-1	1	-1	1	-1
D7	-1	1	1	-1	-1	1
D8	1	1	1	1	1	1
Valores*	-32,85	-8,24	13,89	-13,45	6,44	-3,09

Tabla 6.15. Matriz de respuesta para el tiempo medio de disolución y cálculos relacionados. \* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tiempo medio de disolución se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 6.21 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

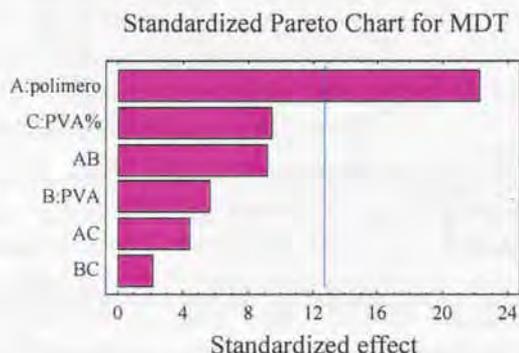


Fig. 6.21. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre el tiempo medio de disolución (MDT).

En el gráfico de Pareto de la figura 6.21 se han representado los efectos estandarizados. La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que tan sólo el tipo de polímero posee un efecto estadísticamente significativo sobre los resultados del MDT, ya que supera el límite marcado como estadísticamente significativo, lo que coincide con los datos publicados en la bibliografía.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 6.16). Puede observarse que sólo el factor "tipo de polímero" tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo cual implica que es *significativamente* diferente de cero con un 95% de probabilidad, es decir, no cumple con la hipótesis nula y en consecuencia puede afirmarse que influye significativamente sobre los resultados del MDT.

Analysis of Variance for MDT					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:polimero	34549,0	1	34549,0	493,47	0,0286
B:PVA	2175,98	1	2175,98	31,08	0,1130
C:PVA	6181,88	1	6181,88	88,30	0,0675
AB	5794,68	1	5794,68	82,77	0,0697
AC	1330,88	1	1330,88	19,01	0,1435
BC	307,385	1	307,385	4,39	0,2835
Total error	70,0129	1	70,0129		
Total (corr.)	50409,8	7			

R-squared = 99,8611 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 99,0278 percent  
Standard Error of Est. = 8,36737  
Mean absolute error = 2,95831  
Durbin-Watson statistic = 2,0

**Tabla 6.16.** Análisis de la varianza para el tiempo medio de disolución de las nanoesferas.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 99,86% de la variabilidad de la respuesta tiempo de vida media. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 99,03%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 8,37. El error absoluto medio de 2,96 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que probablemente no existe ninguna correlación importante entre los residuales.

Se puede concluir que el factor tipo de polímero es el único que da lugar a diferencias estadísticamente significativas al nivel de probabilidad del 2,8% ( $p < 0,05$ ), lo que indica que influye sobre los resultados que puedan obtenerse del MDT. En este caso es el polímero PLGA 85/15 el que da lugar a cinéticas de liberación del fármaco más lentas y prolongadas.

#### 6.4.8. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tiempo medio de disolución

Se valoran los efectos principales gráficamente en la figura 6.22, mostrando la variable estimada como función de cada factor experimental. En cada gráfico el factor de que se trate varía de nivel inferior (-1,0) al superior (+1,0), mientras que los otros factores se mantienen constantes en su valor medio.

La primera parte de la gráfica muestra la respuesta tiempo medio de disolución cuando el factor tipo de polímero pasa desde un nivel bajo (-1, 0) hasta el nivel alto (+1,0). Esta recta presenta una pendiente negativa, es decir, que la respuesta tiempo de vida media mejora si el factor se mantiene en nivel bajo (-1,0). Es decir, aumenta el tiempo medio de disolución si se mantiene el polímero en el nivel bajo, o sea, con el PLGA 85/15, lo que coincide con los datos esperados, según composición química del polímero. El factor tipo de PVA presenta una recta casi paralela al eje de las abcisas y el factor % de PVA presenta una recta de pendiente positiva muy poco pronunciada, lo que significa que estos dos factores no influyen significativamente sobre la respuesta tiempo medio de disolución.

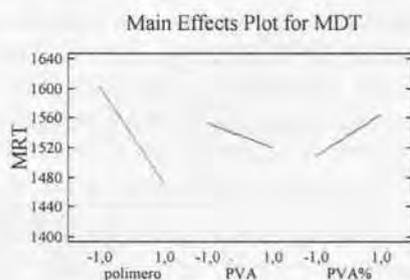


Fig. 6.22. Representación gráfica de los efectos principales sobre el tiempo medio de disolución.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor del tiempo medio de disolución, según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso se observa

interacción entre los factores AB, representado por el cruce de las líneas (-) y (+) en la figura 6.23.

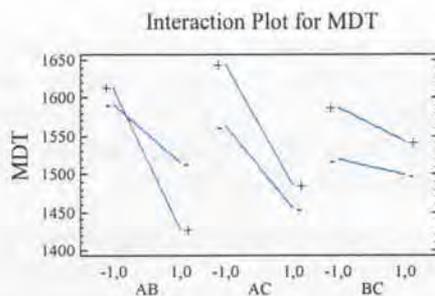


Fig. 6.23. Representación gráfica de las interacciones AB (tipo de polímero y tipo de PVA), AC (tipo de polímero y % de PVA) y BC (tipo de PVA y % de PVA).

#### 6.4.9. Respuesta óptima para el tiempo medio de disolución

Se fija como objetivo el obtener una tiempo medio de disolución lo más prolongado posible a fin de asegurar una lenta cesión de la indometacina encapsulada. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 6.17). Según estos datos, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Polímero	-1	PLGA 85/15
PVA	+1	Mowiol® 4-88
PVA%	+1	2%
<b>Valor óptimo</b>		<b>1649,6894 minutos</b>

Tabla 6.17. Niveles de los factores para obtener el mayor valor del tiempo medio de disolución posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 6.24), en el que se observa que para un % de PVA determinado (el programa estadístico escoge el valor central de los

estudiados), el tiempo medio de disolución disminuye para el polímero PLGA 50/50 y para el PVA Airvol® 540. Con ello se demuestra que el polímero debe permanecer en nivel bajo (-) y el PVA en el nivel alto para optimizar la respuesta.

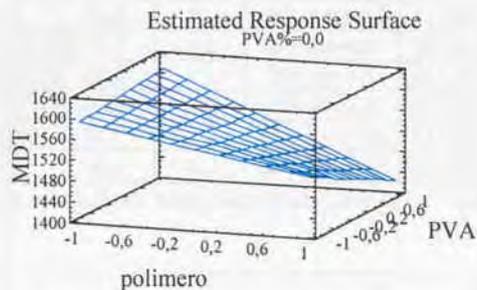


Fig. 6.24. Gráfico de superficie de respuesta para el tiempo medio de disolución.

### 6.5. Análisis estadístico de la robustez del diseño factorial serie "D"

Para facilitar los cálculos y la interpretación de los datos del análisis del diseño factorial serie "D", todos los valores analizados en el capítulo 6.4 corresponden a valores promedio. Con la finalidad de garantizar la robustez de los ensayos, se analizan los valores de las desviaciones estándar de los distintos ensayos.

En la tabla 6.18 se muestra la matriz del diseño factorial construida para evaluar la robustez, así como los resultados que se han analizado.

Ensayo	Factores Principales			Resultados		
	Polímero	PVA	%PVA	DS de EE (%)	DS de MDT (min)	DS de tamaño (nm)
D1	PLGA 85/15	Airvol 540	4%	4,02	0,0166	162
D2	PLGA 50/50	Airvol 540	4%	4,06	0,0426	41
D3	PLGA 85/15	Mowiol 4-88	4%	2,47	0,0126	69
D4	PLGA 50/50	Mowiol 4-88	4%	2,75	0,0182	25
D5	PLGA 85/15	Airvol 540	2%	5,10	0,0326	32
D6	PLGA 50/50	Airvol 540	2%	6,20	0,0135	21
D7	PLGA 85/15	Mowiol 4-88	2%	9,22	0,0108	14
D8	PLGA 50/50	Mowiol 4-88	2%	4,09	0,0922	252

Tabla 6.18. Matriz del diseño factorial para evaluar la robustez de la serie "D".

### 6.5.1. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tamaño medio de las nanoesferas

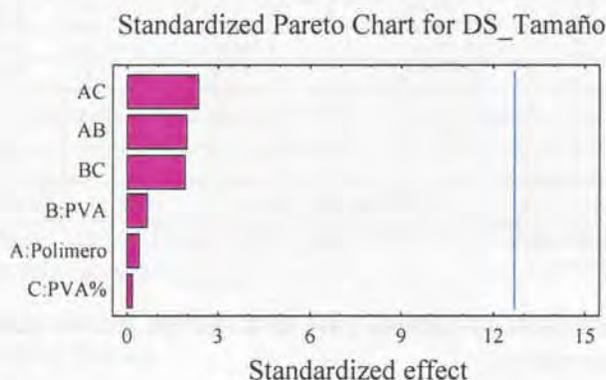
En la tabla 6.19 se muestra la matriz de respuesta para la robustez del tamaño medio de partícula.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	PVA (B)	% PVA (C)	AB	AC	BC
D1	-1	-1	-1	1	1	1
D2	1	-1	-1	-1	-1	1
D3	-1	1	-1	-1	1	-1
D4	1	1	-1	1	-1	-1
D5	-1	-1	1	1	-1	-1
D6	1	-1	1	-1	1	-1
D7	-1	1	1	-1	-1	1
D8	1	1	1	1	1	1
Valores*	3,87	6,50	1,38	20,37	24,50	20,13

Tabla 6.19. Matriz de respuesta para la DS del tamaño medio de las nanoesferas y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto (figura 6.25).



**Fig. 6.25.** Diagrama de Pareto para el efecto sobre de los factores sobre la DS del tamaño medio de partícula.

La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que ninguno de los factores es estadísticamente significativo sobre la desviación estándar de los datos del tamaño de partícula.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 6.20). Puede observarse que todos los factores son diferentes de cero con una probabilidad del 95%, ya que ninguno presenta una probabilidad menor del 0,05.

Analysis of Variance for DS\_Tamaño

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polímero	480,5	1	480,5	0,13	0,7798
B:PVA	1352,0	1	1352,0	0,37	0,6538
C:PVA1	60,5	1	60,5	0,02	0,9190
AB	13284,5	1	13284,5	3,59	0,3091
AC	19208,0	1	19208,0	5,19	0,2632
BC	12960,5	1	12960,5	3,50	0,3123
Total error	3698,0	1	3698,0		
Total (corr.)	51044,0	7			

R-squared = 92,7553 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 49,2869 percent  
Standard Error of Est. = 60,8112  
Mean absolute error = 21,5  
Durbin-Watson statistic = 1,5

**Tabla 6.20.** Análisis de la varianza para la DS de los valores de tamaño medio de las nanoesferas.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 92,76% de la variabilidad de la respuesta tiempo de vida media. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 49,29%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 60,81. El error absoluto medio de 21,50 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación de los residuales.

### 6.5.2. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos de la eficacia de encapsulación

En la tabla 6.21 se muestra la matriz de respuesta para la robustez de la eficacia de encapsulación.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	PVA (B)	% PVA (C)	AB	AC	BC
D1	-1	-1	-1	1	1	1
D2	1	-1	-1	-1	-1	1
D3	-1	1	-1	-1	1	-1
D4	1	1	-1	1	-1	-1
D5	-1	-1	1	1	-1	-1
D6	1	-1	1	-1	1	-1
D7	-1	1	1	-1	-1	1
D8	1	1	1	1	1	1
Valores*	-0,23	-0,05	0,70	-0,37	-0,27	0,30

Tabla 6.21. Matriz de respuesta para DS de la eficacia de encapsulación y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta eficacia de encapsulación se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto (figura 6.26).

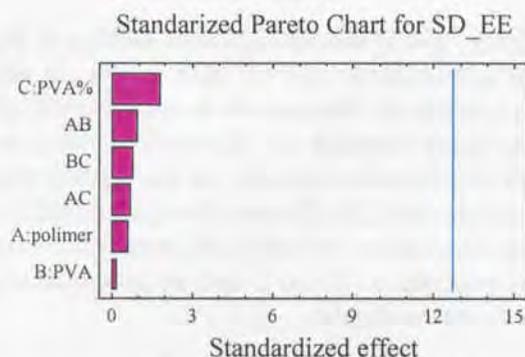


Fig. 6.26. Diagrama de Pareto para el efecto sobre de los factores sobre la DS de la eficacia de encapsulación.

La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que ninguno de los factores es estadísticamente significativo sobre la desviación estándar de los datos del tamaño de partícula.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 6.22). Puede observarse que todos los factores son diferentes de cero con una probabilidad del 95%, ya que ninguno presenta una probabilidad menor del 0,05.

Analysis of Variance for SD\_EE

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	F-Value
A:polimer	1,72051	1	1,72051	0,33	0,6685
B:PVA	0,0903125	1	0,0903125	0,02	0,9168
C:PVA%	15,9895	1	15,9895	3,06	0,3308
AB	4,48501	1	4,48501	0,86	0,5245
AC	2,36531	1	2,36531	0,45	0,6232
BC	2,96461	1	2,96461	0,57	0,5892
Total error	5,23261	1	5,23261		
Total (corr.)	32,8479	7			

R-squared = 84,0702 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent  
 Standard Error of Est. = 2,28749  
 Mean absolute error = 0,80875  
 Durbin-Watson statistic = 3,0

**Tabla 6.22.** Análisis de la varianza para la DS de los valores de la eficacia de encapsulación.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 84,07% de la variabilidad de la respuesta tiempo de vida media. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 2,29. El error absoluto medio de 0,81 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación de los residuales.

### 6.5.3. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tiempo medio de disolución

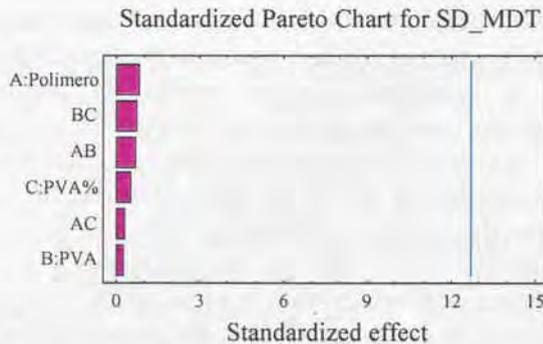
En la tabla 6.23 se muestra la matriz de respuesta para la robustez del tiempo medio de disolución.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	PVA (B)	% PVA (C)	AB	AC	BC
D1	-1	-1	-1	1	1	1
D2	1	-1	-1	-1	-1	1
D3	-1	1	-1	-1	1	-1
D4	1	1	-1	1	-1	-1
D5	-1	-1	1	1	-1	-1
D6	1	-1	1	-1	1	-1
D7	-1	1	1	-1	-1	1
D8	1	1	1	1	1	1
Valores*	0,005	0,002	0,004	0,005	0,002	0,005

**Tabla 6.23.** Matriz de respuesta para DS del tiempo medio de disolución MDT y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tiempo medio de disolución MDT se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto (figura 6.27).



**Fig. 6.27.** Diagrama de Pareto para el efecto sobre de los factores sobre la DS del tiempo medio de disolución MDT.

La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que ninguno de los factores es estadísticamente significativo sobre la desviación estándar de los datos del tiempo medio de disolución.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 6.24). Puede observarse que todos los factores son diferentes de cero con una probabilidad del 95%, ya que ninguno presenta una probabilidad menor del 0,05.

Analysis of Variance for SD\_MDT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:polimer	0,00110086	1	0,00110086	0,60	0,5800
B:PVA	0,000101229	1	0,000101229	0,06	0,8529
C:PVA	0,000436693	1	0,000436693	0,24	0,7107
AB	0,000802947	1	0,000802947	0,44	0,6276
AC	0,000116988	1	0,000116988	0,06	0,8423
BC	0,00090975	1	0,00090975	0,50	0,6090
Total error	0,00183	1	0,00183		
Total (corr.)	0,00529847	7			

R-squared = 65,4617 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent  
Standard Error of Est. = 0,0427785  
Mean absolute error = 0,0151245  
Durbin-Watson statistic = 3,0

**Tabla 6.24.** Análisis de la varianza para la DS de los valores del tiempo medio de disolución MDT.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 65,46% de la variabilidad de la respuesta tiempo medio de disolución. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 0,04. El error absoluto medio de 0,015 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación de los residuales.

## 7. DISEÑO FACTORIAL SERIE "S"

---

El segundo diseño factorial parte con el propósito de estudiar la influencia de los parámetros de proceso en la formulación de nanoesferas por el método de salificación.

Se plantea un diseño factorial  $2^3$  donde se propone analizar la influencia de la viscosidad del polímero, el tipo de sal y el pH de la fase acuosa. Esto supone la realización de un mínimo de 8 experimentos con el objetivo de conocer los efectos principales de las variables, así como los efectos de las interacciones entre las variables.

El motivo de la elección de estos 3 parámetros resulta del estudio del método de encapsulación descrito por el grupo de Doelker (Binsdchaedler y cols. 1990) y con ellos se pretende estudiar con profundidad hasta qué punto es importante la viscosidad del medio en el éxito de la encapsulación del activo y como afecta este parámetro a las características de las nanoesferas. El estudio del pH de la fase acuosa parte de la teoría de que podría afectar a la eficacia de encapsulación del principio activo, puesto que el disolvente empleado en este diseño es acetona. Se cree que cierta cantidad de principio activo podría ser arrastrada fuera de las nanoesferas durante la difusión de la acetona. Se pretende averiguar si controlando el pH del medio acuoso a un valor inferior al del pKa de la indometacina (que es de 4,5) puede impedirse en cierta medida el arrastre del principio activo. Por este motivo se trabaja ajustando el pH a 3,5 (valor elegido por ser inferior al pKa) y sin controlar el pH (lo que supone un pH inicial de aproximadamente 5,3 para las

soluciones de cloruro cálcico y de 4,3 las de cloruro magnésico). Como es conocido, hay otros factores no reseñados en el estudio que podrían influir en los resultados, como son la temperatura, velocidad de agitación, etc. Para su control, estos parámetros se mantienen constantes durante la realización de los experimentos. Otros parámetros que potencialmente podrían afectar a la realización de los ensayos son los llamados factores ambientales, cuya influencia se intenta minimizar trabajando en zonas de condiciones ambientales de humedad y temperatura controladas. La variabilidad debida a las materias primas se elimina al trabajar siempre con los mismos lotes. La variabilidad debida a los equipos tampoco existe ya que siempre se utilizan los mismos equipos. El orden de realización de los experimentos es aleatorio a fin de minimizar el sesgo en los resultados y proporcionar seguridad contra los efectos de las variables ocultas.

En las tablas 7.1 y 7.2 se muestran las condiciones experimentales que se contemplan en cada ensayo. La primera columna indica la referencia y número de orden de cada experimento. En las siguientes columnas se asigna el nivel de cada factor, por ejemplo, el nivel + (superior) del factor "polímero" corresponde al PLGA 50/50 de viscosidad alta 0,58 dL/g, según lo descrito a continuación.

Los experimentos que se proponen se realizan por triplicado.

	A	B	C
S1	-	-	-
S2	+	-	-
S3	-	+	-
S4	+	+	-
S5	-	-	+
S6	+	-	+
S7	-	+	+
S8	+	+	+

Tabla 7.1. Matriz de diseño de experiencias

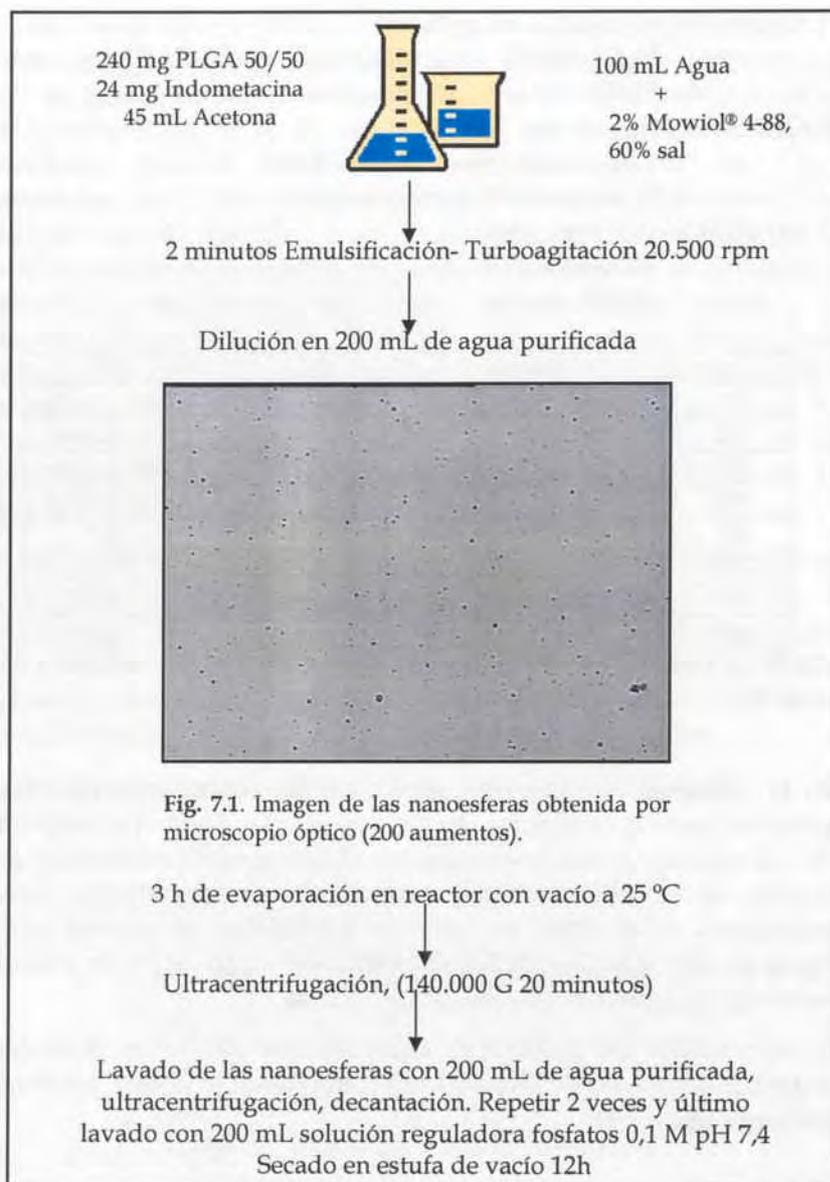
- A: Cambio de viscosidad del polímero
- + PLGA 50/50 viscosidad inherente: 0,58 dL/g
  - PLGA 50/50 viscosidad inherente: 0,20 dL/g
- B: Cambio del tipo de sal
- + Cloruro magnésico hexahidrato
  - Cloruro cálcico hexahidrato
- C: pH final de la fase acuosa
- + pH ajustado a 3,5
  - pH sin ajustar

Ensayo	Polímero	Sal	pH
S1	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar
S2	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar
S3	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar
S4	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar
S5	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5
S6	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5
S7	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5
S8	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5

Tabla 7.2. Matriz detallada del diseño de experiencias para el diseño de la serie "S".

En la siguiente página se esquematizan las condiciones de trabajo aplicadas para la realización de los ensayos del diseño factorial serie "S". El método de fabricación que se utiliza es el de salificación (ver detalles en capítulo 1.1.3.2) y las cantidades de principio activo, excipientes, disolventes, así como los parámetros de proceso se han fijado en base a los resultados obtenidos en el capítulo 4 de puesta a punto de los métodos de nanoencapsulación.

El seguimiento del proceso de encapsulación se realiza analizando imágenes del medio de reacción con el microscopio óptico, a distintos tiempos (figura 7.1).



### 7.1. Eficacias de encapsulación

En la tabla 7.3 se muestran los resultados individuales de la valoración de los lotes fabricados según el diseño factorial establecido, junto con sus replicados.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
S1	78,87	9,04	7,13	66,73
	88,62	10,55	9,35	78,75
	91,21	11,04	10,07	82,95
S2	89,64	10,23	9,17	78,18
	81,25	9,28	7,54	87,18
	90,46	10,07	9,11	84,96
S3	73,40	8,91	6,54	68,64
	88,92	9,21	8,19	72,99
	91,70	10,48	9,61	85,47
S4	74,70	9,79	6,65	75,84
	85,18	9,38	7,99	75,10
	91,51	9,19	8,41	96,88
S5	90,19	9,18	8,28	81,66
	90,99	9,11	8,29	69,66
	90,08	9,58	8,63	66,52
S6	83,44	9,06	7,56	63,14
	96,89	9,35	9,06	59,04
	95,05	9,91	9,42	74,60
S7	86,83	9,04	7,85	80,93
	84,40	9,17	7,74	71,47
	87,37	9,03	7,89	65,33
S8	87,10	9,07	7,90	81,47
	87,35	9,17	8,01	84,53
	92,82	10,03	9,31	88,11

Tabla 7.3. Resultados de los análisis de los lotes del diseño factorial "S".

En la tabla 7.4 se muestran los resultados promedio del diseño factorial de la serie "S" junto con las desviaciones estándar. Por lo general se observan eficacias de encapsulación entre el 83% y el 91% y unos rendimientos globales de proceso de entre el 65% y el 84%.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación% X ± DS	Contenido en activo% X ± DS	Rendimiento% X ± DS
S1 PROMEDIO ± DS	86,23 ± 6,50	8,85 ± 1,53	76,14 ± 8,42
S2 PROMEDIO ± DS	87,12 ± 5,09	8,61 ± 0,92	83,44 ± 4,68
S3 PROMEDIO ± DS	84,67 ± 9,86	8,11 ± 1,53	75,70 ± 8,74
S4 PROMEDIO ± DS	83,79 ± 8,49	7,68 ± 0,92	82,60 ± 12,36
S5 PROMEDIO ± DS	90,42 ± 0,49	8,60 ± 0,31	72,61 ± 7,99
S6 PROMEDIO ± DS	91,79 ± 7,29	8,68 ± 0,98	65,59 ± 8,06
S7 PROMEDIO ± DS	86,20 ± 1,58	7,82 ± 0,07	72,57 ± 7,86
S8 PROMEDIO ± DS	89,09 ± 3,23	8,41 ± 0,78	84,70 ± 3,32

Tabla 7.4. Resultados promedios del análisis de los lotes del diseño factorial "S", junto con sus desviaciones estándar (X: media aritmética, DS: desviación estándar).

## 7.2. Viscosidad

En la tabla 7.5 se muestran los valores de las viscosidades de los distintos lotes del diseño factorial serie "S" y en la figura 7.2 puede observarse gráficamente los resultados en forma de histogramas. Los análisis se realizan con un viscosímetro Brookfield, empleando el *spindle* E. Todos los análisis se realizan a temperatura ambiente.

Como puede observarse, existen diferencias entre los resultados de las viscosidades de los distintos lotes. Los valores más altos en la viscosidad coinciden con los lotes fabricados con cloruro magnésico hexahidrato como electrolito.

LOTE	VISCOSIDAD (cps)
S1	3,005
S2	3,053
S3	3,342
S4	3,423
S5	2,989
S6	3,006
S7	3,257
S8	3,422

Tabla 7.5. Valores de viscosidad de los lotes del diseño factorial "S".

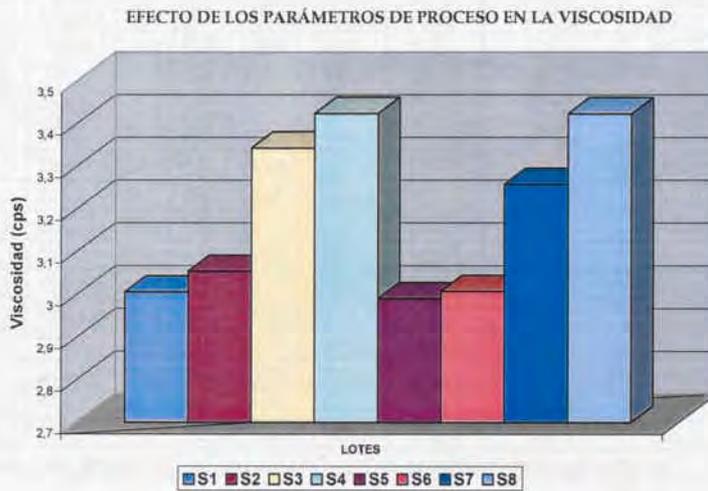


Fig. 7.2. Representación gráfica de la viscosidad de los lotes del diseño serie "S".

### 7.3. Características morfométricas

El análisis del tamaño de partícula de los 8 lotes del diseño factorial y sus replicados se efectúa mediante la técnica de difracción láser con un equipo Coulter. Los resultados que se muestran en la tabla 7.6 (y de forma resumida en la tabla 7.7) corresponden al promedio de 3 replicados de cada lote y son medidas de número de partículas, expresadas en micrómetros. Como puede observarse, el intervalo de tamaño de partícula oscila entre un tamaño medio de 726 nm (ensayo S4) hasta un máximo de 1733 nm (ensayo S1).

	MEDIA $\mu\text{m}$	MEDIANA $\mu\text{m}$	MODA $\mu\text{m}$	DS $\mu\text{m}$	D <sub>90%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>10%</sub>
S1-1	1,719	1,590	1,321	1,553	3,031	2,140	1,590	1,259	1,073
S1-2	1,746	1,619	1,451	1,536	3,035	2,165	1,619	1,289	1,100
S1-3	1,733	1,606	1,451	1,542	3,031	2,153	1,606	1,276	1,088
S2-1	1,560	1,471	1,321	1,470	2,593	1,928	1,471	1,181	1,009
S2-2	1,497	1,408	1,204	1,507	2,546	1,863	1,408	1,119	0,948
S2-3	1,604	1,522	1,451	1,437	2,548	1,937	1,522	1,244	1,068
S3-1	0,789	0,708	0,520	1,696	1,631	1,057	0,708	0,529	0,442
S3-2	0,998	0,917	0,755	1,643	1,938	1,305	0,917	0,705	0,589
S3-3	0,729	0,654	0,520	1,632	1,408	0,935	0,654	0,509	0,433
S4-1	0,645	0,576	0,520	1,543	1,235	0,771	0,576	0,473	0,418
S4-2	0,702	0,621	0,520	1,616	1,420	0,892	0,621	0,491	0,426
S4-3	0,831	0,736	0,520	1,757	1,848	1,187	0,736	0,531	0,442
S5-1	0,876	0,797	0,627	1,763	1,873	1,218	0,797	0,569	0,459
S5-2	0,981	0,939	0,910	1,681	1,939	1,359	0,939	0,670	0,516
S5-3	0,978	0,962	0,910	1,595	1,869	1,365	0,962	0,692	0,526
S6-1	1,648	1,539	1,321	1,504	2,784	2,031	1,539	1,232	1,057
S6-2	1,574	1,473	1,321	1,525	2,711	1,967	1,473	1,165	0,987
S6-3	1,607	1,500	1,321	1,522	2,755	1,994	1,500	1,192	1,014
S7-1	1,468	1,361	1,204	1,626	2,711	1,884	1,361	1,043	0,862
S7-2	1,388	1,277	1,097	1,485	2,318	1,680	1,277	1,045	0,920
S7-3	1,508	1,405	1,204	1,568	2,704	1,919	1,405	1,092	0,914
S8-1	1,584	1,473	1,321	1,605	2,957	2,050	1,473	1,126	0,930
S8-2	1,669	1,546	1,321	1,586	3,068	2,137	1,546	1,196	0,999
S8-3	1,765	1,635	1,451	1,556	3,143	2,213	1,635	1,287	1,090

Tabla 7.6. Caracterización morfométrica detallada de los lotes del diseño factorial "S" (n=3).

	Tamaño medio (nm) $\pm$ DS (n=3)
S1	1733 $\pm$ 13
S2	1554 $\pm$ 54
S3	839 $\pm$ 141
S4	726 $\pm$ 95
S5	945 $\pm$ 60
S6	1609 $\pm$ 37
S7	1455 $\pm$ 61
S8	1673 $\pm$ 90

Tabla 7.7. Tamaño medio de los lotes del diseño factorial "S" junto con las DS (n=3).

En las figuras 7.3 y 7.4 se muestran los tamaños promedio de los 8 lotes del diseño factorial.

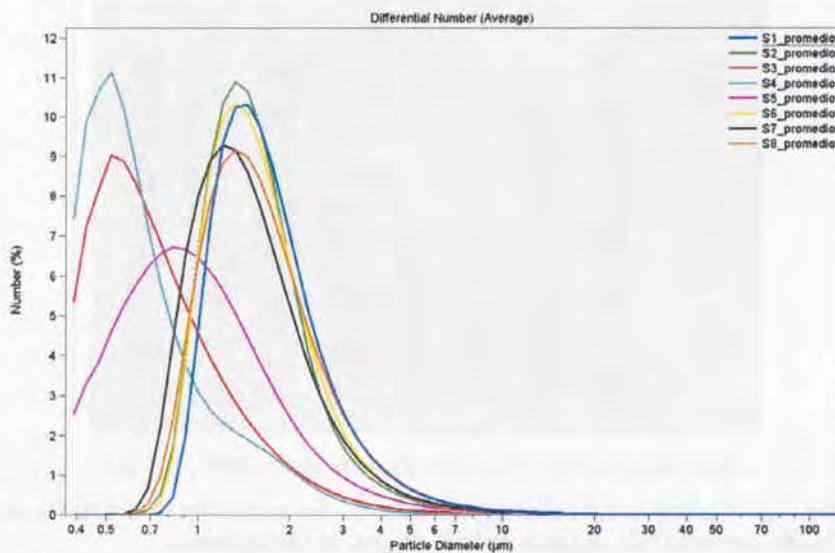


Fig. 7.3. Tamaño promedio de los 8 ensayos del diseño factorial "S".

Como puede observarse, los tamaños de partícula más pequeños aparecen en los ensayos S3, S4 y S5. En el capítulo correspondiente a la evaluación del análisis del diseño factorial se estudia qué factores son los que afectan más durante la formulación de las nanoesferas en la obtención de un tamaño de partícula determinado.

Tamaño promedio de las nanoesferas del diseño factorial S

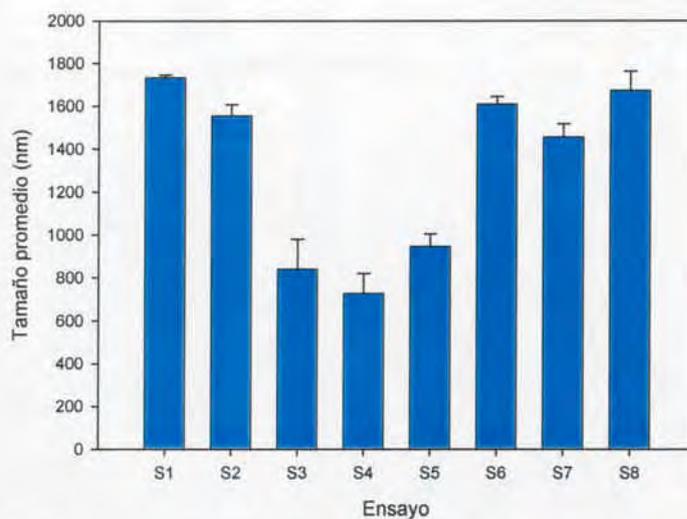


Fig. 7.4. Variación del tamaño promedio de las nanoesferas obtenidas en el diseño factorial "S", representado en figura de histogramas.

La morfología de las nanoesferas se monitoriza durante el proceso de encapsulación por microscopía óptica y las nanoesferas en estado sólido se analizan por microscopía electrónica de barrido (SEM). En las figuras 7.5a y 7.5b se puede observar con SEM el detalle de las características morfométricas de las partículas. Un aspecto a destacar es la homogeneidad en la forma de las partículas, su pequeño tamaño, así como la ausencia de cristales visibles o poros en la cubierta de las mismas.

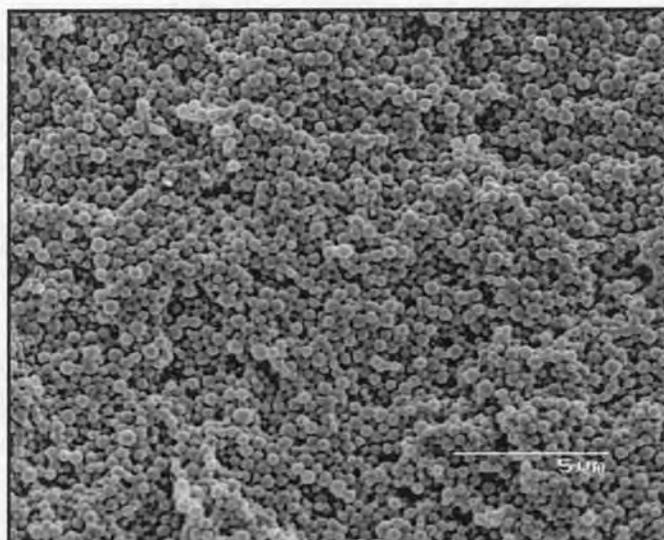


Fig. 7.5a. Imagen de las nanoesferas S5 obtenida con SEM.

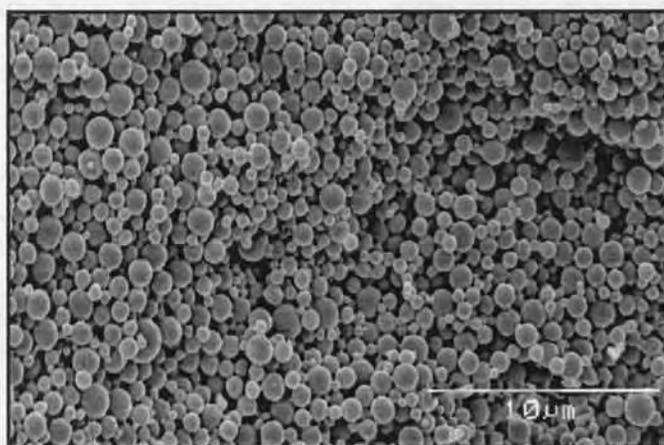


Fig. 7.5b. Imagen de las nanoesferas S6 obtenida con SEM.

#### 7.4. Ensayos de liberación *in vitro*

Las condiciones de realización de los ensayos de liberación *in vitro*, se describen en el capítulo 3.4. Se realizan 6 replicados de cada uno de los ensayos.

A continuación se adjuntan las tablas 7.8a-d donde se reflejan las concentraciones, el porcentaje liberado y las desviaciones estándar (DS) promedio en cada tiempo de toma de muestra.

Para el cálculo del MDT se ha asumido un modelo no compartimental y una administración extravascular. El cálculo se ha realizado con el programa WinNonlin 4.1.

Tiempo (min)	S1 (promedio)			S2 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0100	13,98	0,0389	0,0038	5,79	0,0142
60	0,0208	29,15	0,0182	0,0078	11,96	0,0348
120	0,0284	39,86	0,0138	0,0145	22,37	0,0784
240	0,0341	47,82	0,0533	0,0198	30,51	0,1142
360	0,0342	47,91	0,0628	0,0235	36,28	0,1428
480	0,0341	47,82	0,0581	0,0227	35,02	0,1124
1440	0,0288	40,40	0,0499	0,0208	32,12	0,0639
1920	0,0253	35,53	0,0563	0,0197	30,38	0,0633
2880	0,0238	33,33	0,0308	0,0177	27,25	0,0518
MDT (min)	1354,3386			1422,2143		

Tabla 7.8a. Datos de liberación de las referencias S1 y S2.

Tiempo (min)	S3 (promedio)			S4 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0026	3,88	0,0388	0,0038	7,05	0,0254
60	0,0085	12,64	0,0705	0,0104	19,34	0,0102
120	0,0133	19,86	0,0772	0,0172	32,02	0,0143
240	0,0195	29,08	0,0639	0,0207	38,45	0,0074
360	0,0215	32,03	0,0613	0,0227	42,31	0,0187
480	0,0221	32,92	0,0531	0,0221	41,05	0,0230
1440	0,0222	33,03	0,0388	0,0220	40,90	0,0237
1920	0,0209	31,07	0,0559	0,0215	40,02	0,0418
2880	0,0196	29,16	0,0293	0,0206	38,34	0,0238
MDT (min)	1464,8533			1464,2500		

Tabla 7.8b. Datos de liberación de las referencias S3 y S4.

Tiempo (min)	S5 (promedio)			S6 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0013	2,07	0,0161	0,0027	3,90	0,0197
60	0,0049	7,62	0,0405	0,0068	9,85	0,0173
120	0,0095	14,76	0,0422	0,0101	14,67	0,0274
240	0,0108	16,71	0,0873	0,0138	19,92	0,0219
360	0,0142	22,07	0,1131	0,0153	22,19	0,0285
480	0,0137	21,28	0,0857	0,0157	22,72	0,0159
1440	0,0138	21,41	0,1014	0,0143	20,66	0,0156
1920	0,0129	20,00	0,0840	0,0135	19,55	0,0121
2880	0,0125	19,38	0,0534	0,0145	21,03	0,0170
MDT (min)	1469,7415			1461,4704		

Tabla 7.8c. Datos de liberación de las referencias S5 y S6.

Tiempo (min)	S7 (promedio)			S8 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0,0000	0,00	0,0000	0	0	0
30	0,0026	4,48	0,0010	0,0040	6,28	0,0120
60	0,0061	10,58	0,0008	0,0097	15,22	0,0268
120	0,0106	18,21	0,0025	0,0194	30,32	0,0755
240	0,0157	26,91	0,0041	0,0297	46,48	0,0852
360	0,0174	30,00	0,0037	0,0332	51,96	0,0644
480	0,0195	33,57	0,0014	0,0345	53,94	0,0550
1440	0,0232	39,95	0,0014	0,0328	51,30	0,0563
1920	0,0236	40,73	0,0020	0,0299	46,73	0,0475
2880	0,0244	42,08	0,0020	0,0287	44,96	0,0539
MDT (min)	1582,0586			1447,4890		

Tabla 7.8d. Datos de liberación de las referencias S7 y S8.

En la figura 7.6 se representan gráficamente los perfiles de liberación de nanoesferas de la serie "S".

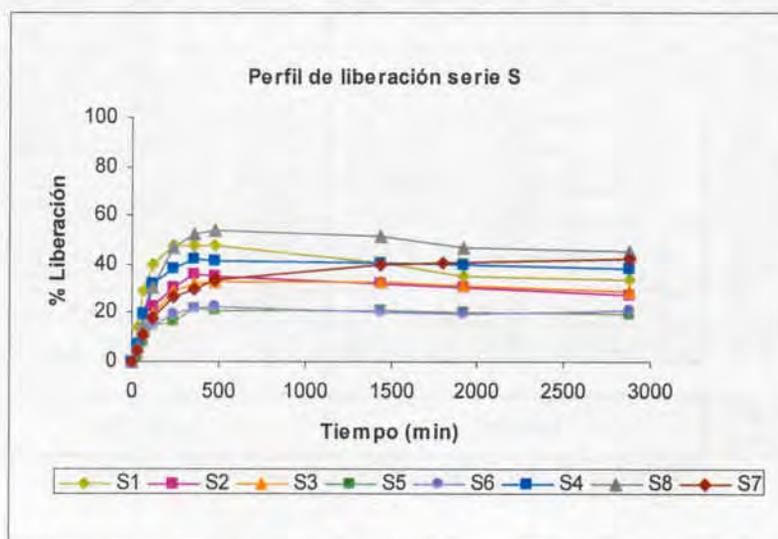


Fig. 7.6. Perfiles de liberación *in vitro* de las nanoesferas de la serie "S".

En la figura 7.6 pueden observarse los distintos perfiles de liberación *in vitro* de las nanoesferas de la serie "S". Sin entrar en detalle en el análisis de las formulaciones y sus correspondientes perfiles de liberación (esta discusión se detalla en el capítulo del análisis del diseño factorial) se puede observar que todas las referencias presentan un perfil de liberación *in vitro* muy parecido. Las referencias presentan un patrón de liberación bifásico, es decir, presencia de una fase de liberación rápida (llamada efecto *burst* o estallido) seguida de una fase de liberación lenta o prolongada. En este diseño factorial destaca que el efecto *burst* está muy disminuido respecto al diseño factorial de la serie "D". Se puede considerar que la fase de liberación rápida tiene lugar durante las 4 primeras horas, pero cediendo solamente un promedio de un 30% de principio activo. En cambio, el resto de referencias presentan un perfil de liberación mucho más lento, sin apenas presencia del efecto *burst*, si no que durante todo el tiempo de estudio hay una liberación gradual del principio activo.

Esta afirmación se corrobora tras el estudio de las micrografías realizadas con microscopía electrónica de barrido, donde no se observa presencia alguna de cristales de principio activo sin encapsular (figuras 7.5a y 7.5.b), causantes del citado efecto *burst*.

### 7.5. Análisis estadístico del diseño factorial serie "S"

En la tabla 7.9 se muestra la matriz del diseño factorial para la serie "S".

Ensayo	Factores Principales			Resultados		
	Polímero	Sal	pH	Tamaño medio nm	EE %	MDT min
S1	PLGA 50/50 η: 0,20	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	1733	86,23	1354,3386
S2	PLGA 50/50 η: 0,58	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	1554	87,12	1422,2143
S3	PLGA 50/50 η: 0,20	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	839	84,67	1464,8533
S4	PLGA 50/50 η: 0,58	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	726	83,79	1464,2500
S5	PLGA 50/50 η: 0,20	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	945	90,42	1469,7415
S6	PLGA 50/50 η: 0,58	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	1609	91,79	1461,4704
S7	PLGA 50/50 η: 0,20	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	1455	86,20	1442,4018
S8	PLGA 50/50 η: 0,58	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	1673	89,09	1447,4890

Tabla 7.9. Matriz del diseño factorial serie "S".

#### 7.5.1. Matriz de respuesta del tamaño medio de las nanoesferas

En la tabla 7.10 se muestra la matriz de respuesta para el tamaño medio de partícula.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	sal (B)	pH (C)	AB	AC	BC
S1	-1	-1	-1	1	1	1
S2	1	-1	-1	-1	-1	1
S3	-1	1	-1	-1	1	-1
S4	1	1	-1	1	-1	-1
S5	-1	-1	1	1	-1	-1
S6	1	-1	1	-1	1	-1
S7	-1	1	1	-1	-1	1
S8	1	1	1	1	1	1
Valores*	36,87	-71,75	51,87	-23,75	73,37	143,5

Tabla 7.10. Matriz de respuesta para el tamaño medio de partícula y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 7.6 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

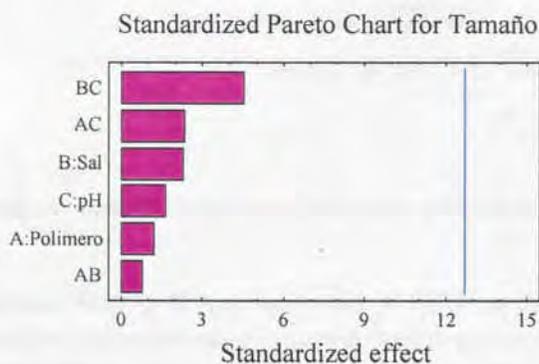


Fig. 7.6. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre el tamaño medio de partícula.

En el gráfico de Pareto de la figura 7.6 se han representado los efectos estandarizados. La línea vertical representa el límite de significación estadística para el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que ninguno de los factores estudiados parece que afecten de una forma estadísticamente significativa al tamaño medio de partícula.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 7.11). En esta tabla se asigna la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. En este caso ninguno de los efectos tiene un valor de probabilidad menor del 0,05, lo que implica que todos son significativamente diferentes de cero con un 95% de probabilidad.

Analysis of Variance for tamaño					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polimero	43512,5	1	43512,5	1,33	0,4550
B:Sal	164738,0	1	164738,0	5,03	0,2671
C:pH	86112,5	1	86112,5	2,63	0,3519
AB	18050,0	1	18050,0	0,55	0,5935
AC	172285,0	1	172285,0	5,26	0,2618
BC	658952,0	1	658952,0	20,11	0,1397
Total error	32768,0	1	32768,0		
Total (corr.)	1,17642E6	7			

R-squared = 97,2146 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 80,5022 percent  
Standard Error of Est. = 181,019  
Mean absolute error = 64,0  
Durbin-Watson statistic = 1,5

**Tabla 7.11.** Análisis de la varianza para el tamaño medio de partícula.

La  $r^2$  del ajustado es 97,21%, mientras que la  $r^2$  más adecuada para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 80,50%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 181,02. El error absoluto medio de 64,0 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es mayor de 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales.

Tras el estudio estadístico realizado, puede afirmarse que ninguno de los parámetros estudiados influye significativamente en el tamaño medio de las nanoesferas.

### 7.5.2. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tamaño medio de partícula

En la figura 7.7 se representan gráficamente los efectos principales sobre la respuesta tamaño medio de partícula. En este gráfico se observa que para los factores tipo de polímero y pH la pendiente es positiva, es decir, se mejora la respuesta tamaño de partícula si el factor pasa a su nivel alto. El programa estadístico entiende por mejorar la respuesta el aumentar el tamaño de partícula, por lo que en este caso, la respuesta deseada es en sentido inverso, a fin de obtener el tamaño medio de nanoesfera más pequeño posible. Para el tercer factor, tipo de sal, la recta presenta una pendiente negativa, lo cual indica que es un factor que influye en la respuesta en sentido contrario, es decir, manteniendo el factor tipo de sal en su nivel alto (+1,0), menor tamaño de nanoesfera.

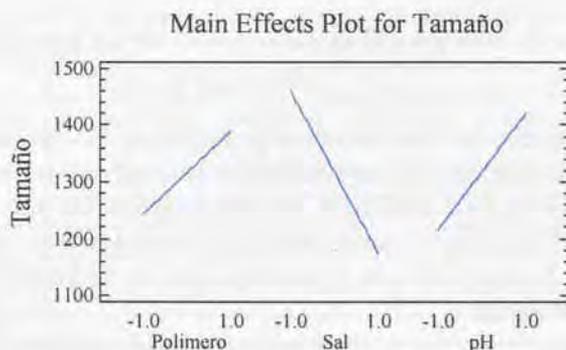


Fig. 7.7. Representación gráfica de los efectos principales sobre el tamaño medio de partícula.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor del tamaño medio de partícula según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso dos de las líneas (+) y (-) se cruzan entre sí, las correspondientes a la interacción entre el tipo de polímero y el pH y la interacción entre el tipo de sal y pH. Este resultado indica que existe interacción estadísticamente significativa entre los factores (figura 7.8).

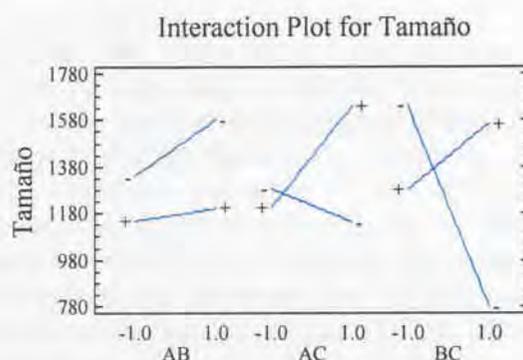


Fig. 7.8. Representación gráfica de las interacciones AB (tipo de polímero y tipo de sal), AC (tipo de polímero y pH) y BC (tipo de sal y pH).

### 7.5.3. Respuesta óptima para el tamaño medio de las nanoesferas

Se fija como objetivo el obtener tamaño medio de las nanoesferas lo más pequeño posible. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 7.12.). Según estos datos, para conseguir un tamaño lo menor posible, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Polímero	+1	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58 dL/g
Sal	+1	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
pH	-1	Sin ajustar
<b>Valor óptimo</b>		<b>662,0 nm</b>

Tabla 7.12. Niveles de los factores para obtener el mínimo valor de tamaño medio de nanoesferas posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 7.9).

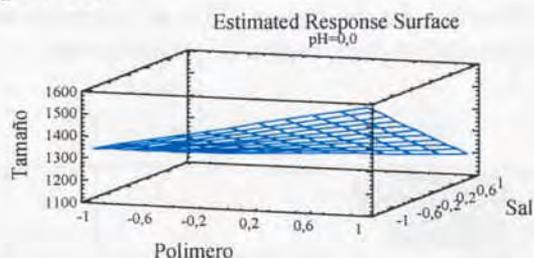


Fig. 7.9. Gráfico de superficie de respuesta para el tamaño medio de las nanoesferas.

Al igual que para el diseño factorial de la serie "D", en este estudio no se puede constatar ninguna relación clara entre los factores y la respuesta tamaño medio de las nanoesferas, en las condiciones experimentales estudiadas.

#### 7.5.4. Matriz de respuesta de la eficacia de encapsulación de las nanoesferas

En la tabla 7.13 se muestra la matriz de respuesta para la eficacia de encapsulación.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	sal (B)	pH (C)	AB	AC	BC
S1	-1	-1	-1	1	1	1
S2	1	-1	-1	-1	-1	1
S3	-1	1	-1	-1	1	-1
S4	1	1	-1	1	-1	-1
S5	-1	-1	1	1	-1	-1
S6	1	-1	1	-1	1	-1
S7	-1	1	1	-1	-1	1
S8	1	1	1	1	1	1
Valores*	0,26	-0,74	0,98	-0,01	0,26	-0,13

Tabla 7.13. Matriz de respuesta para la eficacia de encapsulación y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta eficacia de encapsulación se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 7.10 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

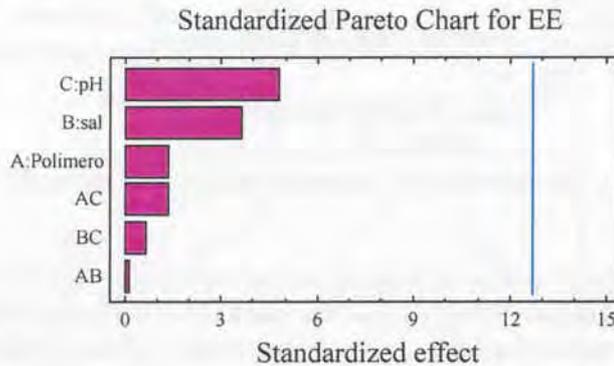


Fig. 7.10. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre la eficacia de encapsulación (EE).

En este caso se comprueba que ninguno de los factores estudiados parece que afecten de una forma estadísticamente significativa a la eficacia de encapsulación, ya que todos los factores están muy alejados de la línea vertical, que representa el límite de significación estadística.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 7.14). En esta tabla se asigna la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. En este caso, ninguno de los efectos tiene un valor de probabilidad menor del 0,05, lo que implica que todos son significativamente diferentes de cero con un 95% de probabilidad.

## Analysis of Variance for EE

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polimero	2,27911	1	2,27911	1,68	0,4179
B:sal	17,4345	1	17,4345	12,89	0,1730
C:pH	30,772	1	30,772	22,74	0,1316
AB	0,0078125	1	0,0078125	0,01	0,9517
AC	2,25781	1	2,25781	1,67	0,4194
BC	0,515113	1	0,515113	0,38	0,6481
Total error	1,35301	1	1,35301		
Total (corr.)	54,6194	7			

R-squared = 97,5228 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 82,6598 percent

Standard Error of Est. = 1,16319

Mean absolute error = 0,41125

Durbin-Watson statistic = 2,0

**Tabla 7.10.** Análisis de la varianza para la eficacia de encapsulación.

La  $r^2$  del ajustado es 97,52%, mientras que la  $r^2$  más adecuada para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 82,66%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 1,16. El error absoluto medio de 0,41 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es mayor de 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales.

Tras el estudio estadístico realizado puede afirmarse que ninguno de los parámetros estudiados influye significativamente en la respuesta eficacia de encapsulación.

### 7.5.5. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre la eficacia de encapsulación

En la figura 7.11 se muestran gráficamente los efectos principales sobre la respuesta eficacia de encapsulación. En este gráfico se muestra la variable estimada como función de cada factor experimental. El factor tipo de polímero presenta una recta casi paralela al eje de abscisas, lo que significa que no tiene efecto sobre la eficacia de encapsulación. En cambio, el factor tipo de sal influye de

manera importante, viéndose favorecida la eficacia de encapsulación en el nivel bajo, es decir, empleando como sal el cloruro cálcico hexahidrato. En cambio para el tipo de pH la pendiente es negativa, es decir, se mejora la respuesta eficacia de encapsulación si el factor se mantiene en el nivel alto, ajustando el pH a 3,5 lo que coincide con lo publicado en la bibliografía (Niwa y cols. 1993).

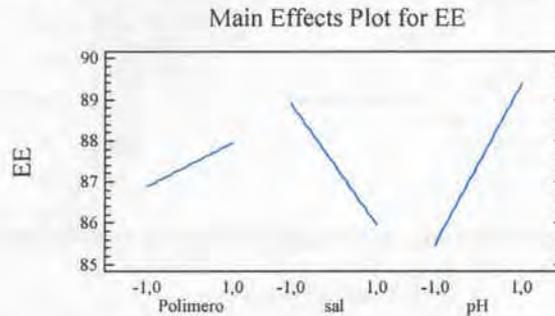


Fig. 7.11. Representación gráfica de los efectos principales sobre la eficacia de encapsulación.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor de la eficacia de encapsulación, según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso ninguna de las líneas (-) y (+) se cruzan entre sí, lo que implica que no existe interacción estadísticamente significativa entre los distintos factores (figura 7.12).

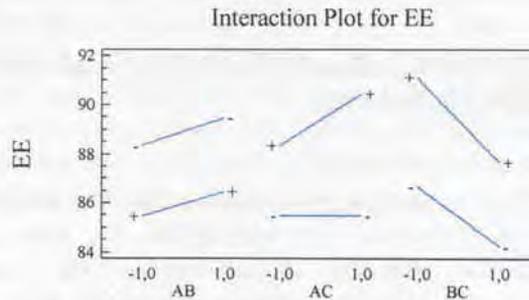


Fig. 7.12. Representación gráfica de las interacciones AB (tipo de polímero y tipo de sal), AC (tipo de polímero y pH) y BC (tipo de sal y pH).

### 7.5.6. Respuesta óptima para la eficacia de encapsulación

Se fija como objetivo el obtener una eficacia de encapsulación lo más alta posible a fin de asegurar la rentabilidad del proceso de encapsulación. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 7.15). Según estos datos, para conseguir una eficacia de encapsulación lo mayor posible, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Polímero	+1	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58 dL/g
Sal	-1	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
pH	+1	3,5
Valor óptimo		92,20 %

Tabla 7.15. Niveles de los factores para obtener el mayor valor de eficacia de encapsulación posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 7.13) y se observa que para un pH determinado (el programa estadístico escoge el valor central de los estudiados), la eficacia de encapsulación disminuye cuando se emplea el cloruro magnésico hexahidrato.

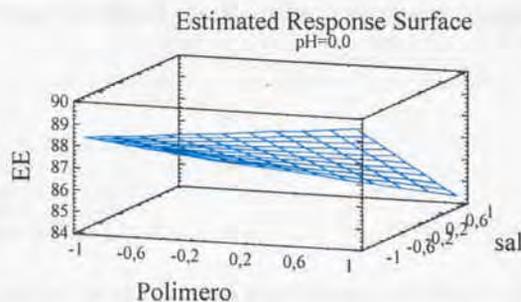


Fig. 7.13. Gráfico de superficie de respuesta para la eficacia de encapsulación.

### 7.5.7. Matriz de respuesta para el tiempo medio de disolución de las nanoesferas

En la tabla 7.16 se muestra la matriz de respuesta para el MDT.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	sal (B)	pH (C)	AB	AC	BC
S1	-1	-1	-1	1	1	1
S2	1	-1	-1	-1	-1	1
S3	-1	1	-1	-1	1	-1
S4	1	1	-1	1	-1	-1
S5	-1	-1	1	1	-1	-1
S6	1	-1	1	-1	1	-1
S7	-1	1	1	-1	-1	1
S8	1	1	1	1	1	1
Valores*	4,00	6,95	7,21	-3,44	4,40	-12,12

Tabla 7.16. Matriz de respuesta para el tiempo medio de disolución y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tiempo medio de disolución se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 7.14 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

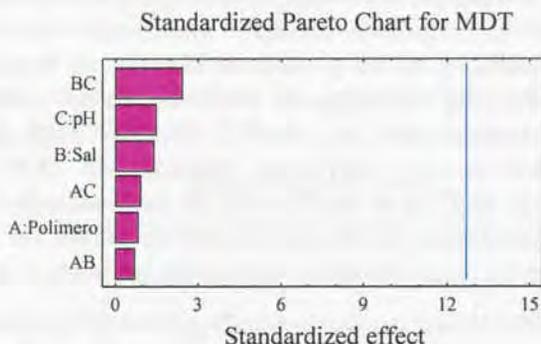


Fig. 7.14. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre el tiempo medio de disolución (MDT).

En este caso parece que ninguno de los factores afecta de forma estadísticamente significativa al tiempo medio de disolución. Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 7.17). Puede observarse que ninguno de los factores tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo cual implica que todos son significativamente diferentes de cero con un 95% de probabilidad.

Analysis of Variance for MDT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polimero	513,417	1	513,417	0,61	0,5771
B:Sal	1546,49	1	1546,49	1,85	0,4038
C:pH	1665,99	1	1665,99	1,99	0,3926
AB	379,786	1	379,786	0,45	0,6226
AC	620,511	1	620,511	0,74	0,5475
BC	4698,27	1	4698,27	5,61	0,2543
Total error	837,168	1	837,168		
Total (corr.)	10261,6	7			

R-squared = 91,8418 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 42,8924 percent  
 Standard Error of Est. = 28,9339  
 Mean absolute error = 10,2297  
 Durbin-Watson statistic = 1,5

Tabla 7.17. Análisis de la varianza para tiempo medio de disolución de las nanoesferas.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 91,84% de la variabilidad de la respuesta tiempo medio de disolución. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 42,89%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 28,93. El error absoluto medio de 10,23 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es mayor de 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales.

Tras el estudio estadístico realizado puede afirmarse que ninguno de los parámetros estudiados influye significativamente en la respuesta tiempo medio de disolución.

#### 7.5.8. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tiempo medio de disolución

Se valoran gráficamente los efectos principales en la figura 7.15 En este caso los tres factores presentan líneas con pendientes positivas, es decir que mejora la respuesta si el valor se mantiene en nivel alto.

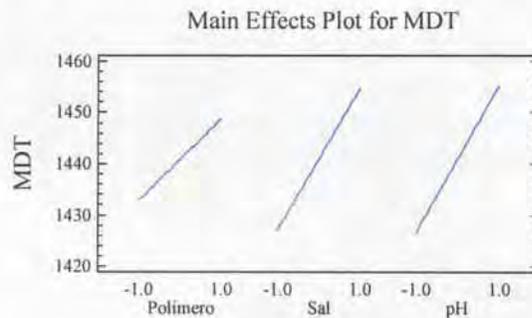


Fig. 7.15. Representación gráfica de los efectos principales sobre el tiempo medio de disolución.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor del tiempo medio de disolución, según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso se observa interacción entre los factores BC, representado por el cruce de las líneas (-) y (+) en la figura 7.16.

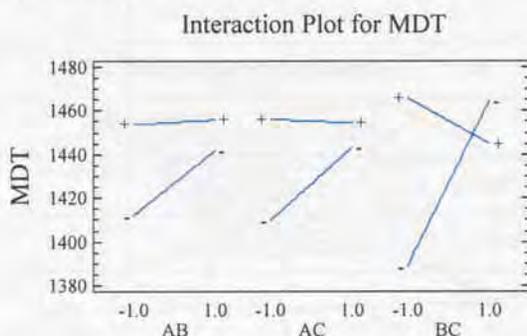


Fig. 7.16. Representación gráfica de las interacciones AB (tipo de polímero y tipo de sal), AC (tipo de polímero y pH) y BC (tipo de sal y pH).

### 7.5.9. Respuesta óptima para el tiempo medio de disolución

Se fija como objetivo el obtener tiempo medio de disolución lo más prolongado posible a fin de asegurar una lenta cesión de la indometacina encapsulada. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 7.18). Según estos datos, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Polímero	+1	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58
Sal	+1	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
pH	-1	sin ajustar
<b>Valor óptimo</b>		<b>1474,48 minutos</b>

Tabla 7.18. Niveles de los factores para obtener el mayor valor del tiempo medio de disolución.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 7.17), en el que se observa que a un pH determinado (el programa estadístico escoge el valor central de los estudiados), el tiempo medio de disolución aumenta al emplear el polímero de mayor viscosidad y también al utilizar como sal  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ .

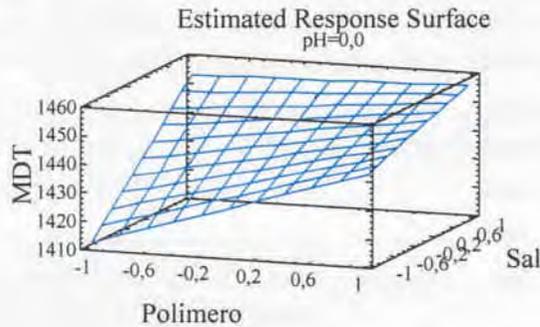


Fig. 7.17. Gráfico de superficie de respuesta para el tiempo medio de disolución.

## 7.6. Análisis estadístico de la robustez del diseño factorial serie "S"

Al igual que en el diseño factorial de la serie "D", para facilitar los cálculos y la interpretación de los datos del análisis todos los valores analizados en el capítulo 7.5 corresponden a valores promedio. Con la finalidad de garantizar la robustez de los ensayos, a continuación se analizan brevemente los valores de las desviaciones estándar de los distintos ensayos.

En la tabla 7.19 se muestra la matriz del diseño factorial construida para evaluar la robustez, así como los resultados que se han analizado.

Ensayo	Factores Principales			Resultados		
	Polímero	Sal	pH	DS de EE (%)	DS de MDT (min)	DS de tamaño (nm)
S1	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	6,50	0,0424	13
S2	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	5,09	0,0750	54
S3	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	9,86	0,0543	141
S4	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sin ajustar	8,49	0,0209	95
S5	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	0,49	0,0693	60
S6	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	7,29	0,0195	37
S7	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,20	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	1,58	0,0833	61
S8	PLGA 50/50 $\eta$ : 0,58	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,5	3,23	0,0529	90

Tabla 7.19. Matriz del diseño factorial para evaluar la robustez de la serie "S".

### 7.6.1. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tamaño medio de las nanoesferas

En la tabla 7.20 se muestra la matriz de respuesta para la robustez del tamaño medio de partícula.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	sal (B)	pH (C)	AB	AC	BC
S1	-1	-1	-1	1	1	1
S2	1	-1	-1	-1	-1	1
S3	-1	1	-1	-1	1	-1
S4	1	1	-1	1	-1	-1
S5	-1	-1	1	1	-1	-1
S6	1	-1	1	-1	1	-1
S7	-1	1	1	-1	-1	1
S8	1	1	1	1	1	1
Valores*	0,06	13,91	-3,43	-2,18	0,69	-7,19

Tabla 7.20. Matriz de respuesta para la robustez de los datos del tamaño medio de las nanoesferas y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto (figura 7.18).

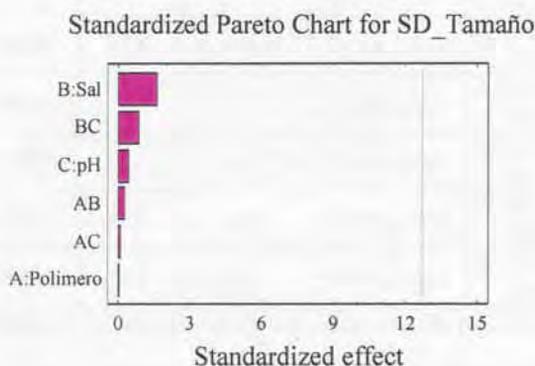


Fig. 7.18. Diagrama de Pareto para el efecto sobre de los factores sobre la DS del tamaño de partícula.

La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso se comprueba que el tipo de pH es un factor estadísticamente significativo sobre la desviación estándar del tamaño de partícula.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 7.21). Puede observarse que el factor tipo de pH se demuestra como estadísticamente significativo sobre la desviación estándar del tamaño de partícula, puesto que presenta una probabilidad menor del 0,05.

Analysis of Variance for SD\_Tamaño

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polimero	0,125	1	0,125	0,00	0,9954
B:Sal	6216,13	1	6216,13	2,57	0,3548
C:pH	378,125	1	378,125	0,16	0,7601
AB	153,125	1	153,125	0,06	0,8430
AC	15,125	1	15,125	0,01	0,9497
BC	1653,13	1	1653,13	0,68	0,5600
Total error	2415,13	1	2415,13		
Total (corr.)	10830,9	7			

R-squared = 77,7015 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent  
Standard Error of Est. = 49,1439  
Mean absolute error = 17,375  
Durbin-Watson statistic = 2,0

**Tabla 7.21.** Análisis de la varianza para la DS de los valores de tamaño medio de las nanoesferas.

La  $r^2$  del ajustado es 77,70% mientras la  $r^2$  más adecuada para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 0%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 49,14. El error absoluto medio de 17,37 es la media de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales.

### 7.6.2. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos de la eficacia de encapsulación

En la tabla 7.22 se muestra la matriz de respuesta para la robustez de la eficacia de encapsulación.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	sal (B)	pH (C)	AB	AC	BC
S1	-1	-1	-1	1	1	1
S2	1	-1	-1	-1	-1	1
S3	-1	1	-1	-1	1	-1
S4	1	1	-1	1	-1	-1
S5	-1	-1	1	1	-1	-1
S6	1	-1	1	-1	1	-1
S7	-1	1	1	-1	-1	1
S8	1	1	1	1	1	1
Valores*	0,70	0,47	-2,16	-0,63	1,40	-1,20

Tabla 7.22. Matriz de respuesta para la robustez de los datos de la eficacia de encapsulación y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 7.19 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

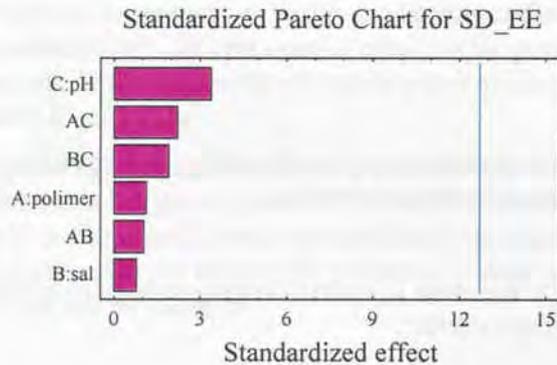


Fig. 7.19. Diagrama de Pareto para el efecto sobre de los factores sobre la DS de la eficacia de encapsulación.

Del diagrama de Pareto parece deducirse que ninguno de los factores estudiados afecta de forma estadísticamente significativa la desviación estándar de la eficacia de encapsulación. Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 7.23).

Analysis of Variance for SD\_EE

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:polimer	4,01861	1	4,01861	1,19	0,4719
B:sal	1,79551	1	1,79551	0,53	0,5985
C:pH	37,6278	1	37,6278	11,18	0,1850
AB	3,26401	1	3,26401	0,97	0,5049
AC	15,7641	1	15,7641	4,68	0,2756
BC	11,8341	1	11,8341	3,51	0,3120
Total error	3,36701	1	3,36701		
Total (corr.)	77,6712	7			

R-squared = 95,665 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 69,6553 percent  
Standard Error of Est. = 1,83494  
Mean absolute error = 0,64875  
Durbin-Watson statistic = 2,0

**Tabla 7.23.** Análisis de la varianza para la DS de los valores de la eficacia de encapsulación.

Ninguno de los factores tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo que indica que todos son significativamente diferentes de cero con una probabilidad del 95%.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 95,66% de la variabilidad de la respuesta tiempo de vida media. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia es 69,65%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 1,83. El error absoluto medio de 0,64 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación de los residuales.

### 7.6.3. Matriz de respuesta para la evaluación de la robustez en los datos del tiempo medio de disolución

En la tabla 7.24 se muestra la matriz de respuesta para la robustez del tiempo medio de disolución.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Polímero (A)	sal (B)	pH (C)	AB	AC	BC
S1	-1	-1	-1	1	1	1
S2	1	-1	-1	-1	-1	1
S3	-1	1	-1	-1	1	-1
S4	1	1	-1	1	-1	-1
S5	-1	-1	1	1	-1	-1
S6	1	-1	1	-1	1	-1
S7	-1	1	1	-1	-1	1
S8	1	1	1	1	1	1
Valores*	-0,005	0,003	0,002	-0,002	-0,004	0,005

Tabla 7.24. Matriz de respuesta para la robustez de los datos del tiempo medio de disolución y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tiempo medio de disolución se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 7.20 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

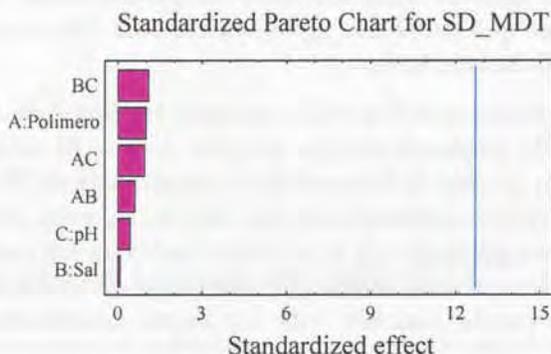


Fig. 7.20. Diagrama de Pareto para el efecto sobre de los factores sobre la DS del tiempo medio de disolución MDT.

Del diagrama de Pareto parece deducirse que ninguno de los factores estudiados afecta de forma estadísticamente significativa la desviación estándar del tiempo medio de disolución. Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 7.25).

Analysis of Variance for SD\_MDT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polimero	0,000820125	1	0,000820125	0,90	0,5168
B:Sal	0,00000338	1	0,00000338	0,00	0,9613
C:pH	0,00013122	1	0,00013122	0,14	0,7692
AB	0,000271445	1	0,000271445	0,30	0,6820
AC	0,000788045	1	0,000788045	0,86	0,5232
BC	0,00100352	1	0,00100352	1,10	0,4847
Total error	0,000911645	1	0,000911645		
Total (corr.)	0,00392938	7			

R-squared = 76,7993 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent  
 Standard Error of Est. = 0,0301935  
 Mean absolute error = 0,010675  
 Durbin-Watson statistic = 2,0

Tabla 7.25. Análisis de la varianza para la DS de los valores del tiempo medio de disolución MDT.

Ninguno de los factores tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo que indica que todos son significativamente diferentes de cero con una probabilidad del 95%.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 76,74% de la variabilidad de la respuesta tiempo de vida media. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia es 0%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 0,03. El error absoluto medio de 0,01 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es superior a 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación de los residuales.

## **8. DISEÑO FACTORIAL SERIE "F"**

---

Con la experiencia adquirida con los ensayos realizados para la serie de emulsificación espontánea-difusión de disolvente y de salificación, se plantea un tercer diseño factorial con varios objetivos.

- En primer lugar se pretende comparar las dos distintas técnicas de nanoencapsulación entre sí.
- El segundo y principal objetivo es la disminución de la cantidad del coadyuvante habitual, PVA, por otros biodegradables o de fácil eliminación fisiológica.
- El tercer objetivo, al igual que en el segundo diseño factorial, consiste en evitar el uso de disolventes organoclorados en la fase orgánica, por lo que se elige la acetona como disolvente.

### **8.1. Elección de las condiciones y factores del diseño factorial serie "F"**

Se plantea un diseño factorial  $2^3$  donde se propone analizar la influencia de la técnica de nanoencapsulación, del tipo de coadyuvante y su concentración.

Como ya se ha comentado, se van a comparar las 2 técnicas de encapsulación elegidas en los anteriores diseños factoriales: la emulsificación espontánea-difusión de disolvente y el de salificación. Una vez comprobada su gran versatilidad frente a distintas variables de proceso, su sencilla realización y la facilidad de la posible transposición de escala del proceso, entre otras ventajas, se decide compararlas entre sí, con el fin de comprobar cuál de las dos es la más adecuada para la obtención de nanoesferas de indometacina.

El segundo objetivo del diseño factorial es el estudio del empleo de nuevos coadyuvantes, el poloxámero 188 y el quitosano. El racional de la elección de estos dos compuestos se describe con detalle en el capítulo 4.

## 8.2. Realización experimental del diseño factorial serie "F"

Tras los estudios para elegir las mejores condiciones experimentales (descritas en el capítulo 4), se diseña la matriz del nuevo diseño factorial.

Se elige estudiar los coadyuvantes poloxámero 188 y quitosano con un 1% de PVA (Mowiol® 4-88) y ajustar el pH de la fase acuosa a un pH final de 3,5. Como polímero se escoge el PLGA 50/50 de viscosidad inherente 0,20dL/g y como disolvente de la fase orgánica la acetona. Estas condiciones se establecen tras los resultados obtenidos en el capítulo 4 y capítulo 7.

Otros factores no reseñados en el estudio que podrían influir en los resultados, como son la temperatura, velocidad de agitación, etc. se han mantenido constantes durante la realización de los experimentos. Otros parámetros que potencialmente también podrían afectar a la realización de los ensayos son los llamados factores ambientales, cuya influencia se intenta minimizar trabajando en zonas de condiciones ambientales de humedad y temperatura controladas. La variabilidad debida a las materias primas se ha eliminado al trabajar siempre con los mismos lotes. La variabilidad debida a los equipos tampoco no existe ya que siempre se utilizan los mismos equipos. El orden de

realización de los experimentos es aleatorio a fin de minimizar el sesgo en los resultados y proporcionar seguridad contra los efectos de las variables ocultas.

En las tablas 8.1 y 8.2 se muestran las condiciones experimentales que se contemplan en cada ensayo. La primera columna indica la referencia y número de orden de cada experimento. En las siguientes columnas se asigna el nivel de cada factor, por ejemplo, el nivel + (superior) del factor "método de encapsulación" corresponde al método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente, según lo descrito a continuación.

Los experimentos que se proponen se han realizado por triplicado.

	A	B	C
F1	-	-	-
F2	+	-	-
F3	-	+	-
F4	+	+	-
F5	-	-	+
F6	+	-	+
F7	-	+	+
F8	+	+	+

Tabla 8.1. Matriz de diseño de experiencias

**A: Método de encapsulación**

- + Emulsificación espontánea-difusión de disolvente
- Salificación

**B: Tipo de coadyuvante**

- + Poloxámero 188 + PVA (Mowiol® 4-88)
- Quitosano + PVA (Mowiol® 4-88)

**C: % Coadyuvante**

- + % alto { Poloxámero 4% p/v y 1% Mowiol® 4-88  
o bien  
Quitosano 0,08%p/v y 1% Mowiol® 4-88
- % bajo { Poloxámero 2% p/v y Mowiol® 4-88 1%  
o bien  
Quitosano 0,03%p/v y 1% Mowiol® 4-88

Ensayo	Método	Coadyuvante	% Coadyuvante
F1	Salificación	Quitosano : PVA	bajo
F2	SESDM	Quitosano : PVA	bajo
F3	Salificación	Poloxámero : PVA	bajo
F4	SESDM	Poloxámero : PVA	bajo
F5	Salificación	Quitosano : PVA	alto
F6	SESDM	Quitosano : PVA	alto
F7	Salificación	Poloxámero : PVA	alto
F8	SESDM	Poloxámero : PVA	alto

Tabla 8.2. Matriz detallada del diseño de experiencias para el diseño de la serie "F".

En las siguientes páginas se esquematizan las condiciones de trabajo aplicadas para la realización de los ensayos del diseño factorial serie "F". La figura 8.1 esquematiza el proceso de elaboración de nanoesferas según el método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente y la figura 8.2 esquematiza el proceso de salificación. Las cantidades de principio activo, excipientes, disolventes, así como los parámetros de proceso se han fijado en base a los resultados obtenidos en el capítulo 4 de puesta a punto de los métodos de elaboración de nanosferas.

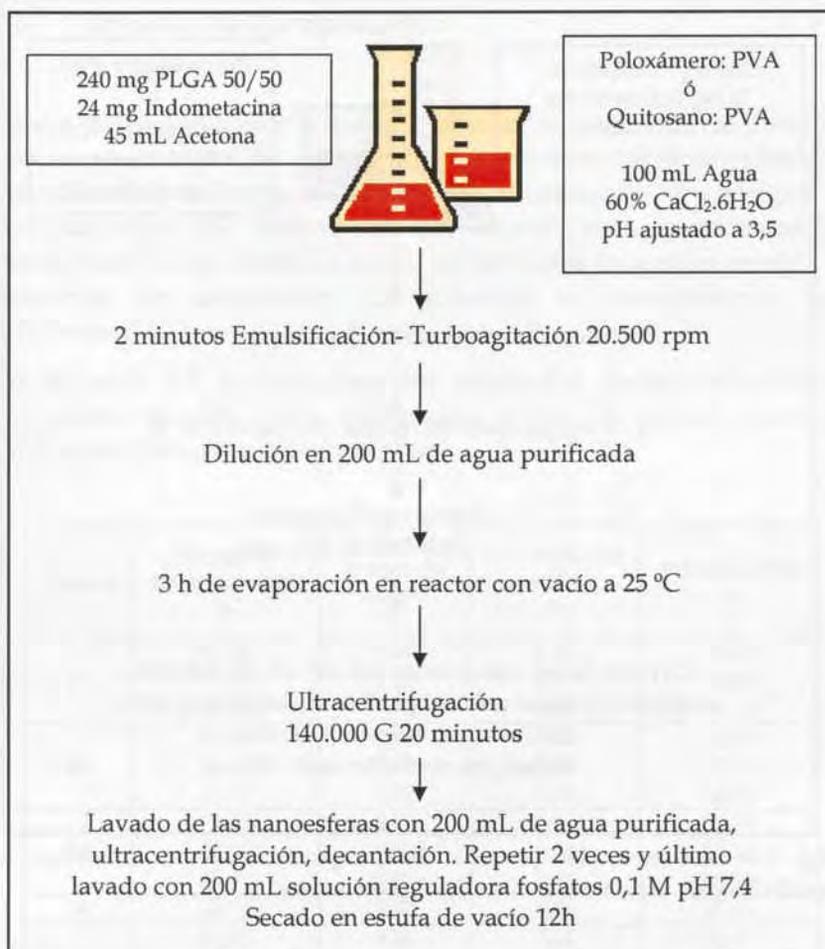


Fig. 8.1. Esquema del proceso de encapsulación con el método de salificación.

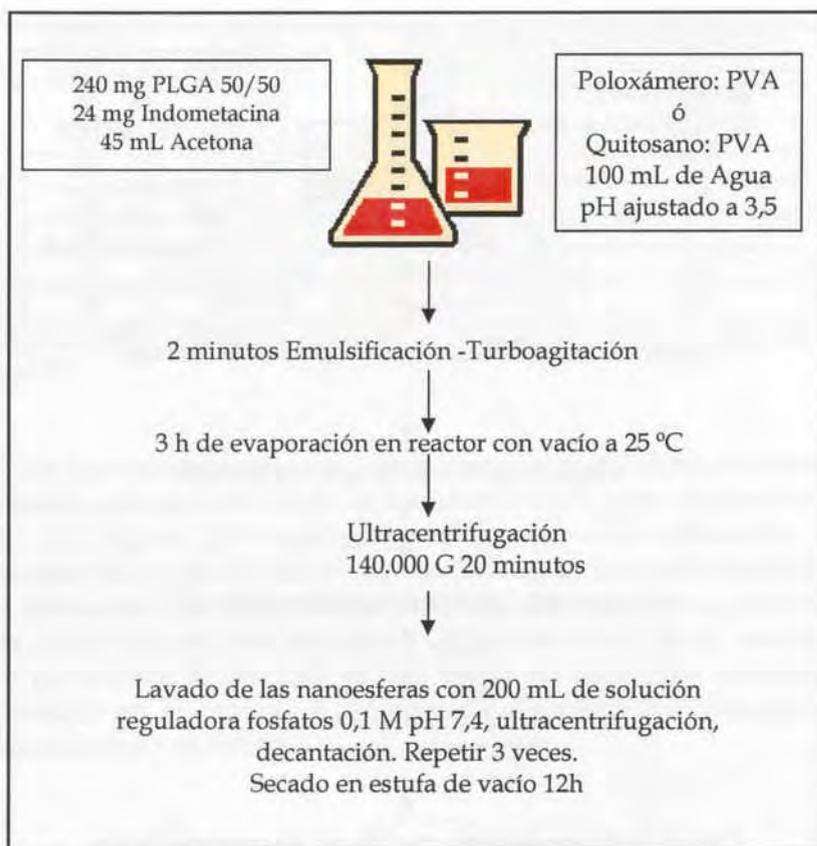


Fig. 8.2. Esquema del proceso de encapsulación con el método de emulsificación espontánea-difusión de disolvente.

### 8.3. Eficacias de encapsulación

Pese a todos los estudios de preformulación realizados, se constata que en los ensayos F4 y F8 (correspondientes a los elaborados con poloxámero y el método de SESDM) difícilmente se consigue la encapsulación del activo, en las condiciones experimentales establecidas en el diseño factorial. En los casos en que es posible la obtención de nanoesferas, las eficacias de encapsulación son inferiores al 20%.

En la tabla 8.3 se muestran los resultados individuales de la valoración de los lotes fabricados según el diseño factorial establecido, junto con sus replicados.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
F1	92,04	9,09	8,37	84,60
	90,58	9,22	8,35	73,36
	93,89	9,76	9,16	94,14
F2	54,68	9,65	5,28	56,72
	59,81	9,77	5,84	53,80
	65,36	9,76	6,38	66,35
F3	78,93	9,07	7,16	65,38
	57,60	9,96	5,74	59,38
	85,01	9,81	8,34	65,78
F4	18,71	9,77	1,83	17,40
F5	86,91	9,00	7,82	82,61
	91,00	9,72	8,85	74,77
	89,60	9,95	8,91	68,71
F6	79,81	9,64	7,70	43,22
	53,23	9,68	5,15	72,17
	57,63	9,77	5,63	49,50
F7	59,07	9,83	5,80	64,58
	54,44	9,24	5,03	59,28
	78,92	9,86	7,78	65,06
F8	20,44	9,92	2,03	75,33

Tabla 8.3. Resultados del análisis de los lotes del diseño factorial "F".

En la tabla 8.4 se muestran los resultados promedio del diseño factorial de la serie "F" junto con las desviaciones estándar.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación% X ± DS	Contenido en activo% X ± DS	Rendimiento% X ± DS
F1 PROMEDIO ± DS	92,17 ± 1,66	8,63 ± 0,46	84,03 ± 10,40
F2 PROMEDIO ± DS	59,95 ± 5,34	5,83 ± 0,55	58,96 ± 6,57
F3 PROMEDIO ± DS	73,85 ± 14,39	7,08 ± 1,30	63,51 ± 3,59
F4 PROMEDIO	18,71	1,83	17,40
F5 PROMEDIO ± DS	89,17 ± 2,08	8,53 ± 0,61	82,21 ± 11,87
F6 PROMEDIO ± DS	63,56 ± 14,25	6,16 ± 1,36	54,96 ± 15,23
F7 PROMEDIO ± DS	64,14 ± 13,00	6,20 ± 1,42	62,97 ± 3,21
F8 PROMEDIO	20,44	2,03	75,33

Tabla 8.4. Resultados promedios del análisis de los lotes del diseño factorial "F", junto con sus desviaciones estándar (X: media aritmética, DS: desviación estándar).

#### 8.4. Características morfométricas

El análisis del tamaño de partícula de los 8 lotes del diseño factorial se efectúa mediante la técnica de difracción láser con un equipo Coulter. Los resultados que se muestran en la tabla 8.5 (y de forma resumida en la tabla 8.6) y corresponden al promedio de 3 replicados de cada lote (exceptuando en el caso de las referencias F4 y F8, como ya se ha comentado) y son medidas de número de partículas, expresadas en micrómetros. Se observa que el intervalo de tamaño de partícula oscila entre un tamaño medio de 707 nm (ensayo F7) hasta un máximo de 1797 nm (ensayo F2).

	MEDIA $\mu\text{m}$	MEDIANA $\mu\text{m}$	MODA $\mu\text{m}$	DS $\mu\text{m}$	D <sub>90%</sub>	D <sub>75%</sub>	D <sub>50%</sub>	D <sub>25%</sub>	D <sub>10%</sub>
F1-1	0,715	0,671	0,520	1,495	1,278	0,938	0,671	0,519	0,442
F1-2	0,887	0,858	0,829	1,554	1,589	1,180	0,858	0,639	0,506
F1-3	0,665	0,608	0,520	1,480	1,215	0,847	0,608	0,490	0,428
F2-1	2,002	1,833	1,592	1,485	3,290	2,340	1,833	1,535	1,356
F2-2	1,739	1,607	1,451	1,569	3,068	2,164	1,607	1,269	1,078
F2-3	1,651	1,521	1,321	1,622	3,091	2,124	1,521	1,169	0,973
F3-1	1,464	1,346	1,204	1,657	2,800	1,897	1,346	1,021	0,841
F3-2	1,574	1,446	1,204	1,641	2,972	2,016	1,446	1,108	0,920
F3-3	1,403	1,296	1,097	1,665	2,692	1,828	1,296	0,975	0,798
F4-1	1,894	1,575	1,321	1,210	2,989	2,110	1,575	1,256	1,075
F5-1	1,686	1,576	1,451	1,490	2,804	2,059	1,576	1,273	1,095
F5-2	1,632	1,524	1,321	1,515	2,840	2,043	1,524	1,208	1,025
F5-3	2,012	1,958	1,748	1,272	2,842	2,348	1,958	1,686	1,508
F6-1	1,839	1,686	1,451	1,605	3,456	2,351	1,686	1,307	1,098
F6-2	1,744	1,600	1,321	1,602	3,211	2,201	1,600	1,247	1,053
F6-3	1,607	1,562	1,321	1,522	3,093	2,139	1,562	1,221	1,030
F7-1	0,768	0,695	0,520	1,666	1,514	1,013	0,695	0,525	0,440
F7-2	0,633	0,633	0,520	1,569	1,257	0,872	0,633	0,500	0,430
F7-3	0,720	0,635	0,520	1,638	1,462	0,931	0,635	0,499	0,432
F8-1	0,883	0,672	0,520	0,961	1,467	0,971	0,672	0,516	0,436

Tabla 8.5. Caracterización morfométrica detallada de los lotes del diseño factorial "F" (n=3).

	Tamaño medio (nm) $\pm$ DS (n=3)
F1	755 $\pm$ 116
F2	1797 $\pm$ 183
F3	1480 $\pm$ 86
F4	1894
F5	1777 $\pm$ 205
F6	1730 $\pm$ 116
F7	707 $\pm$ 68
F8	883

Tabla 8.6. Tamaño medio de los lotes del diseño factorial "F" junto con las DS (n=3).

En las figuras 8.3 y 8.4 se muestran los tamaños promedio de los 8 lotes del diseño factorial.

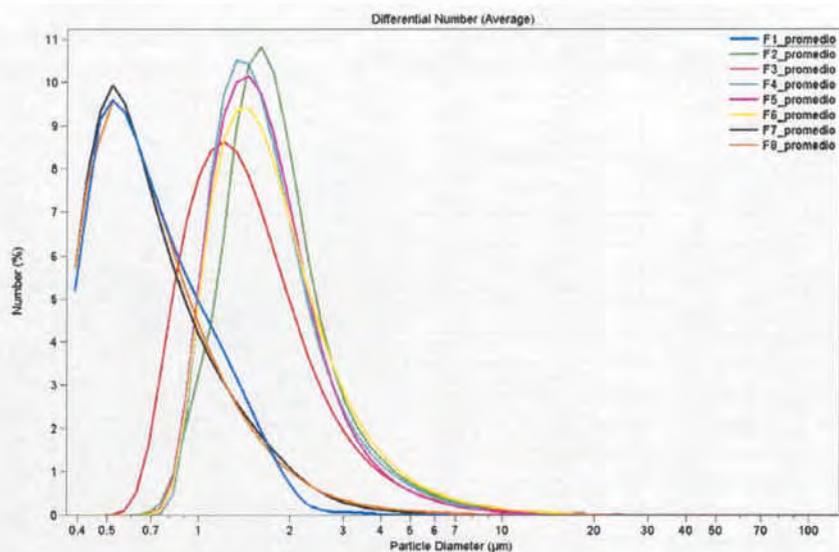
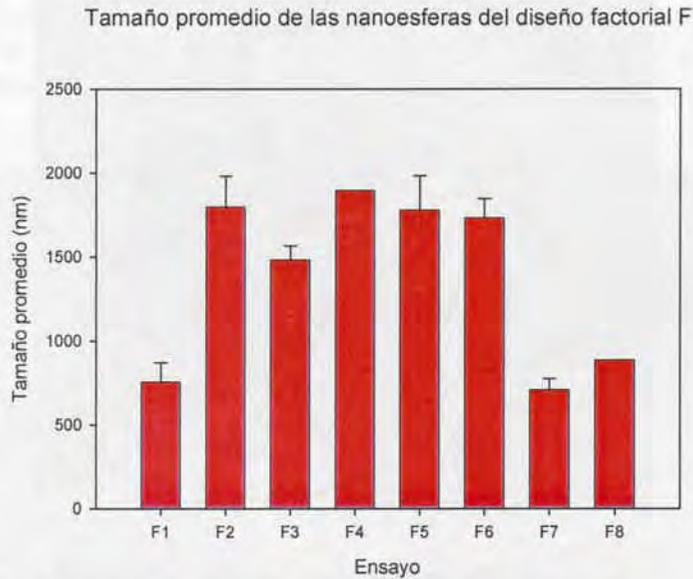


Fig. 8.3. Tamaño promedio de los 8 ensayos del diseño factorial "F".

Como puede observarse, los tamaños de partícula más pequeños se observan en los ensayos F1, F7 y F8. En el capítulo correspondiente a la evaluación del análisis del diseño factorial se estudia qué factores son los que afectan más durante la formulación de las nanoesferas en la obtención de un tamaño de partícula determinado.



**Fig. 8.4.** Variación del tamaño promedio de las nanoesferas obtenidas en el diseño factorial "S", representado en figura de histogramas.

La morfología de las nanoesferas se monitoriza durante el proceso de encapsulación por microscopía óptica y las nanoesferas en estado sólido se analizan por microscopía electrónica de barrido (SEM). En las figuras 8.5a y 8.5b se puede observar con SEM el detalle las características morfométricas de las partículas. Al observar con detalle las imágenes se observa que la superficie de las nanoesferas aparece un poco más rugosa. A pesar de haber filtrado las muestras y de observar por microscopio óptico la ausencia de cristales en el medio, en las imágenes de SEM se observa la presencia de pequeños cristales, de tamaño nanométrico, presentes entre las nanoesferas.

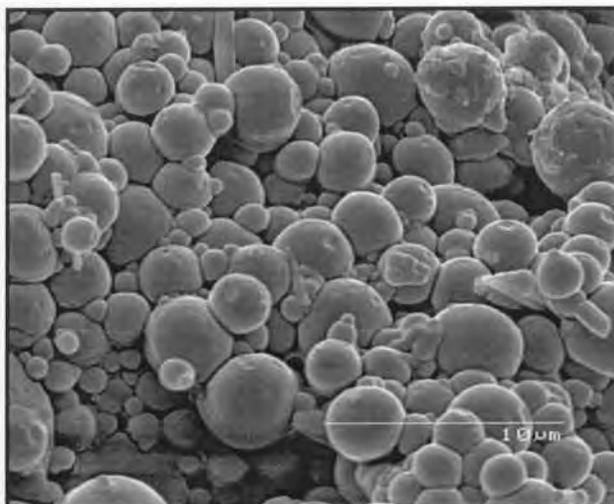


Fig. 8.5a. Imagen de las nanoesferas F1 obtenida con SEM.

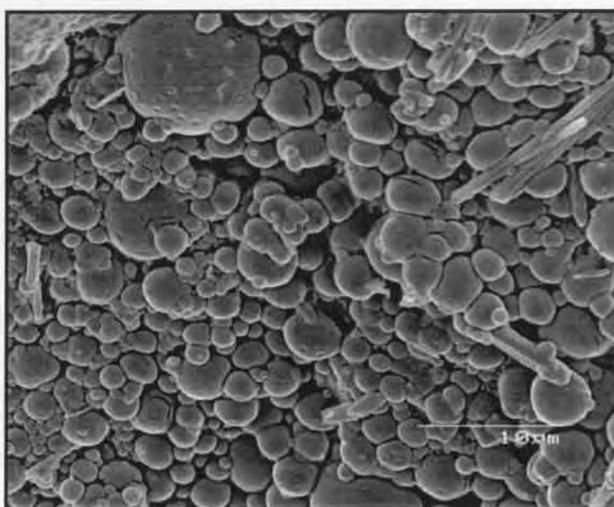


Fig. 8.5b. Imagen de las nanoesferas F1 obtenida con SEM.

Según se aprecia en la figura 8.5c, correspondiente a otro lote del ensayo F1, aparecen algunas nanoesferas con grietas en la cubierta.

Al observar imágenes de microscopía electrónica correspondientes al lote F4 se comprueba que la formación de nanoesferas no se ha podido completar con éxito (figura 8.5c).

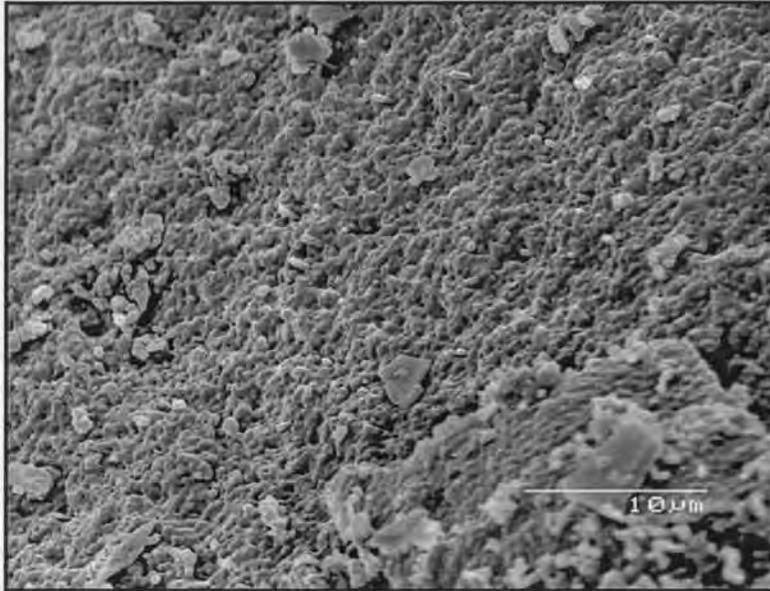


Fig. 8.5c. Imagen de las nanoesferas F4 obtenida con SEM.

### 8.5. Ensayo de liberación *in vitro*

Las condiciones de realización de los ensayos de liberación se describen en el capítulo 3.4. Se realizan 6 replicados de cada uno de los ensayos.

A continuación se adjuntan las tablas 8.7a-c donde se reflejan las concentraciones, el porcentaje liberado y las desviaciones estándar (DS) promedio en cada tiempo de toma de muestra.

Para el cálculo del MDT se ha asumido un modelo no compartimental y una administración extravascular. El cálculo se ha realizado con el programa WinNonlin 4.1.

Tiempo (min)	F1 (promedio)			F2 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0044	8,92	0,0219	0,0046	11,74	0,0615
60	0,0090	18,25	0,0224	0,0108	27,40	0,0675
120	0,0130	26,37	0,0383	0,0194	49,31	0,1037
240	0,0133	27,01	0,0412	0,0250	63,55	0,1125
360	0,0134	27,20	0,0344	0,0261	66,32	0,0987
480	0,0139	28,23	0,0339	0,0241	61,27	0,1001
1440	0,0153	30,99	0,0343	0,0256	64,87	0,0645
1920	0,0153	31,01	0,0271	0,0225	56,99	0,0587
2880	0,0147	29,77	0,0327	0,0210	53,18	0,0334
MDT (min)	1494,6901			1433,3850		

Tabla 8.7a. Datos de liberación de las referencias F1 y F2.

Tiempo (min)	F3 (promedio)			F5 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0043	11,38	0,0129	0,0132	32,64	0,0463
60	0,0081	21,35	0,0530	0,0214	53,10	0,0909
120	0,0135	35,65	0,0779	0,0389	96,27	0,1822
240	0,0216	57,28	0,1481	0,0496	122,74	0,2411
360	0,0251	66,60	0,1715	0,0496	122,84	0,1621
480	0,0258	68,45	0,1697	0,0430	106,40	0,1671
1440	0,0246	65,15	0,1277	0,0413	102,20	0,1046
1920	0,0248	65,63	0,1222	0,0357	88,40	0,1044
2880	0,0218	57,70	0,0775	0,0340	84,11	0,0928
MDT (min)	1463,3303			1381,4978		

Tabla 8.7b. Datos de liberación de las referencias F3 y F5.

Tiempo (min)	F6 (promedio)			F7 (promedio)		
	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS
0	0	0	0	0	0	0
30	0,0026	5,08	0,0054	0,0011	2,0692	0,0155
60	0,0042	8,36	0,0183	0,0018	3,3523	0,0124
120	0,0075	14,69	0,0177	0,0033	6,2040	0,0126
240	0,0127	24,98	0,0609	0,0030	5,5743	0,0338
360	0,0126	24,86	0,0739	0,0043	8,1021	0,0068
480	0,0135	26,66	0,0599	0,0037	7,0576	0,0118
1440	0,0137	26,88	0,0411	0,0048	8,9491	0,0036
1920	0,0130	25,62	0,0669	0,0038	7,1469	0,0025
2880	0,0136	26,71	0,0573	0,0045	8,3785	0,0095
MDT (min)	1497,6193			1518,6401		

Tabla 8.7c. Datos de liberación de las referencias F6 y F7.

A continuación se representan gráficamente los perfiles de liberación de las nanoesferas de la serie "F" (figura 8.6).

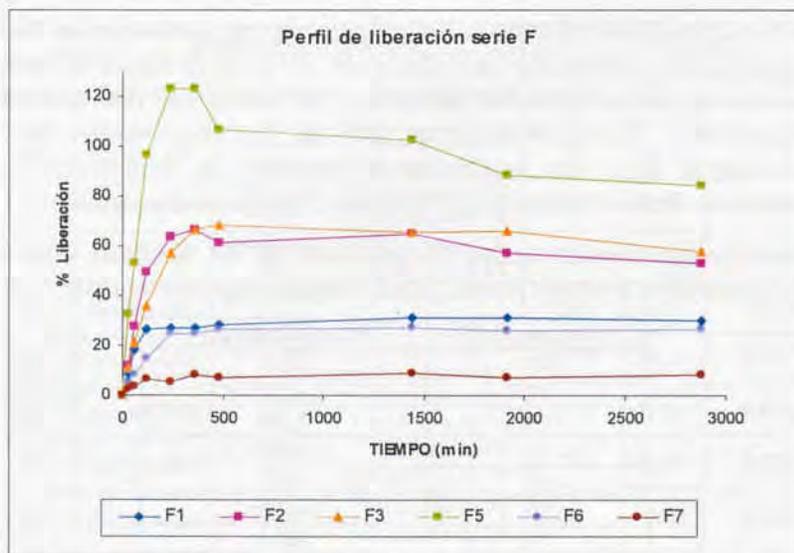


Fig. 8.6. Perfiles de liberación *in vitro* de las nanoesferas de la serie "F".

En la figura 8.6 pueden observarse los distintos perfiles de liberación *in vitro* de las nanoesferas de la serie "F". Sin entrar en detalle en el análisis de las formulaciones y sus correspondientes perfiles de liberación (esta discusión se detalla en el capítulo del análisis del diseño factorial) se puede observar que hay distintos grupos de perfiles de liberación. La referencia F5 presenta el perfil más rápido y el más lento es el correspondiente a la referencia F3. Todas las referencias presentan un patrón de liberación bifásico, es decir, presencia de una fase de liberación rápida (llamada efecto *burst* o estallido) seguida de una fase de liberación lenta o prolongada a excepción de la F7, donde hay muy poca liberación de fármaco. Salvo en la referencia F5, en las demás experiencias el efecto *burst* está muy disminuido respecto al diseño factorial de la serie "D".

No se estudian los perfiles de liberación *in vitro* de las referencias F4 y F8 por descartarse su viabilidad.

## 8.6. Viscosidad

En la tabla 8.8 se muestran los valores de las viscosidades de los distintos lotes del diseño factorial serie "F" y en la figura 8.7 puede observarse gráficamente los resultados. Los análisis se realizan con el viscosímetro Epprecht-Rheomat 15 en la suspensión de las nanoesferas una vez finalizado el proceso de evaporación del disolvente. Todos los análisis se realizan a temperatura ambiente.

Como puede observarse, las viscosidades de los distintos lotes son muy parecidas, a excepción del lote F6 que es superior al resto.

Referencia	Viscosidad (cps)
F1	3,135
F2	4,277
F3	3,198
F4	3,910
F5	3,147
F6	6,830
F7	3,810
F8	4,197

Tabla 8.8. Valores de viscosidad de los lotes del diseño factorial "F".

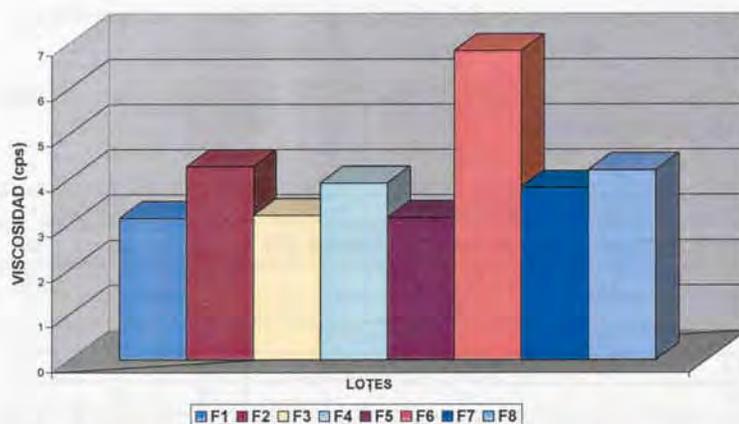


Fig. 8.7. Representación gráfica de la viscosidad de los lotes del diseño serie "F".

### 8.7. Análisis estadístico del diseño factorial "serie F"

En la tabla 8.9 se muestra la matriz del diseño factorial para la serie "S".

Ensayo	Factores Principales			Resultados		
	Método	Coadyuvante	Coadyuvante %	Tamaño medio nm	EE %	Viscosidad cps
F1	Salificación	Quitosano : PVA	Quitosano 0,03% Mowiol 4-88 1%	755	92,17	3,135
F2	Evaporación	Quitosano : PVA	Quitosano 0,03% Mowiol 4-88 1%	1797	59,95	4,277
F3	Salificación	Poloxámero : PVA	Poloxámero 2% Mowiol 4-88 1%	1480	73,85	3,198
F4	Evaporación	Poloxámero : PVA	Poloxámero 2% Mowiol 4-88 1%	1894	18,71	3,910
F5	Salificación	Quitosano : PVA	Quitosano 0,08% Mowiol 4-88 1%	1777	89,17	3,147
F6	Evaporación	Quitosano : PVA	Quitosano 0,08% Mowiol 4-88 1%	1730	63,56	6,830
F7	Salificación	Poloxámero : PVA	Poloxámero 4% Mowiol 4-88 1%	707	64,14	3,810
F8	Evaporación	Quitosano : PVA	Poloxámero 4% Mowiol 4-88 1%	883	20,44	4,197

Tabla 8.9. Matriz del diseño factorial serie "F".

### 8.7.1. Matriz de respuesta del tamaño medio de las nanoesferas

En la tabla 8.10 se muestra la matriz de respuesta para el tamaño medio de partícula.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Método (A)	Coad.(B)	% Coad. (C)	AB	AC	BC
F1	-1	-1	-1	1	1	1
F2	1	-1	-1	-1	-1	1
F3	-1	1	-1	-1	1	-1
F4	1	1	-1	1	-1	-1
F5	-1	-1	1	1	-1	-1
F6	1	-1	1	-1	1	-1
F7	-1	1	1	-1	-1	1
F8	1	1	1	1	1	1
Valores*	99,06	-68,44	-51,81	-25,31	-82,94	-171,18

Tabla 8.10. Matriz de respuesta para el tamaño medio de partícula y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 8.8 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

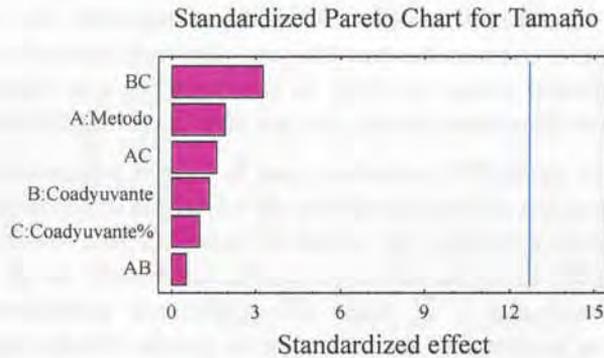


Fig. 8.8. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre el tamaño medio de partícula.

En el gráfico de Pareto de la figura 8.8 se han representado los efectos estandarizados. La línea vertical representa el límite de significación estadística con el 95% de probabilidad. En este caso ninguno de los factores parece afectar significativamente al tamaño medio de partícula.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 8.11).

Analysis of Variance for Tamaño

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Metodo	314028,0	1	314028,0	3,47	0,3137
B:Coadyuvante	149878,0	1	149878,0	1,66	0,4206
C:Coadyuvante%	85905,1	1	85905,1	0,95	0,5083
AB	20503,1	1	20503,1	0,23	0,7172
AC	220116,0	1	220116,0	2,43	0,3630
BC	937765,0	1	937765,0	10,36	0,1918
Total error	90525,1	1	90525,1		
Total (corr.)	1,81872E6	7			

R-squared = 95,0226 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 65,1582 percent  
 Standard Error of Est. = 300,874  
 Mean absolute error = 106,375  
 Durbin-Watson statistic = 2,5

Tabla 8.11. Análisis de la varianza para el tamaño medio de partícula.

En esta tabla se asigna la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. Puede observarse que ninguno de los factores tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo cual implica que todos son significativamente diferentes de cero con un 95% de probabilidad.

La  $r^2$  del ajustado es 95,02%, mientras que la  $r^2$  más adecuada para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 65,16%. El error estándar del ajustado muestra una desviación estándar de 300,87. El error absoluto medio de 106,37 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es mayor de 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales. En consecuencia, tras el estudio estadístico realizado puede afirmarse que ninguno de los parámetros estudiados influye significativamente en el tamaño medio de las nanoesferas.

### 8.7.2. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre el tamaño medio de partícula

En la figura 8.9 se representan gráficamente los efectos principales sobre la respuesta tamaño medio de partícula. En este gráfico se muestra la variable estimada como función de cada factor experimental. En cada gráfico el factor de que se trate varía de nivel inferior (-1,0) al superior (+1,0), mientras que los otros factores se mantienen constantes en su valor medio. Se observa que para el factor método de encapsulación la pendiente es positiva, es decir, se mejora la respuesta tamaño de partícula si el factor pasa a su nivel alto. El programa estadístico entiende por mejorar la respuesta el aumentar el tamaño de partícula, por lo que en este caso, la respuesta deseada es en sentido inverso. A fin de obtener el tamaño medio de nanoesfera más pequeño posible se deberá mantener este factor en su nivel bajo (-1,0). Para los factores tipo de coadyuvante y % de coadyuvante la recta presenta una pendiente negativa, lo cual indica que son factores que influyen en la respuesta en sentido contrario, es decir, manteniendo el factor % de coadyuvante en el nivel alto, menor tamaño de nanoesfera.

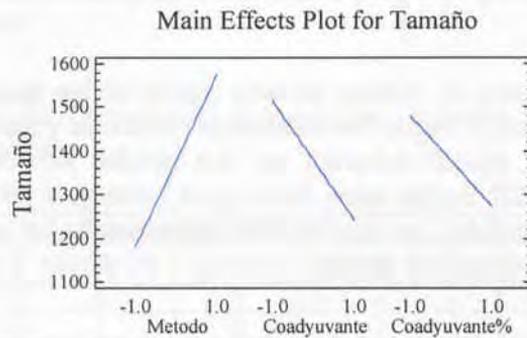


Fig. 8.9. Representación gráfica de los efectos principales sobre el tamaño medio de partícula.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor del tamaño medio de partícula según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso las líneas (+) y (-) de la interacción AC y BC se cruzan entre sí, lo que implica que existe interacción estadísticamente significativa entre ambos factores (figura 8.10).

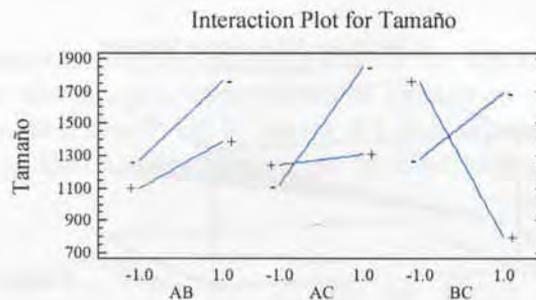


Fig. 8.10. Representación gráfica de las interacciones AB (método de encapsulación y tipo de coadyuvante), AC (método de encapsulación y % de coadyuvante) y BC (tipo de coadyuvante y su %).

### 8.7.3. Respuesta óptima para el tamaño medio de las nanoesferas

Se fija como objetivo el obtener tamaño medio de las nanoesferas lo más pequeño posible. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 8.12). Según estos datos, para conseguir un tamaño lo más pequeño posible, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Método	-1	Salificación
Coadyuvante	+1	Poloxámero-PVA
% de Coadyuvante	+1	Poloxámero 4% y PVA 1%
<b>Valor óptimo</b>		<b>707,0 nm</b>

Tabla 8.12. Niveles de los factores para obtener el mínimo valor de tamaño medio de nanoesferas posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 8.11).

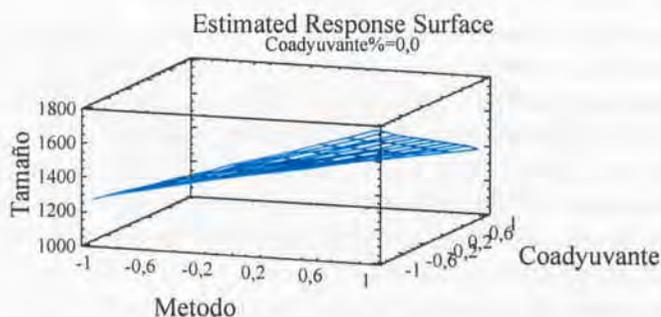


Fig. 8.11. Gráfico de superficie de respuesta para el tamaño medio de las nanoesferas.

#### 8.7.4. Matriz de respuesta de la eficacia de encapsulación de las nanoesferas

En la tabla 8.13 se muestra la matriz de respuesta para la eficacia de encapsulación.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Método (A)	Coad.(B)	% Coad. (C)	AB	AC	BC
F1	-1	-1	-1	1	1	1
F2	1	-1	-1	-1	-1	1
F3	-1	1	-1	-1	1	-1
F4	1	1	-1	1	-1	-1
F5	-1	-1	1	1	-1	-1
F6	1	-1	1	-1	1	-1
F7	-1	1	1	-1	-1	1
F8	1	1	1	1	1	1
Valores*	-9,79	-7,98	-0,46	-2,56	1,12	-0,53

Tabla 8.13. Matriz de respuesta para la eficacia de encapsulación y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta eficacia de encapsulación se analiza en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 8.12 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia.

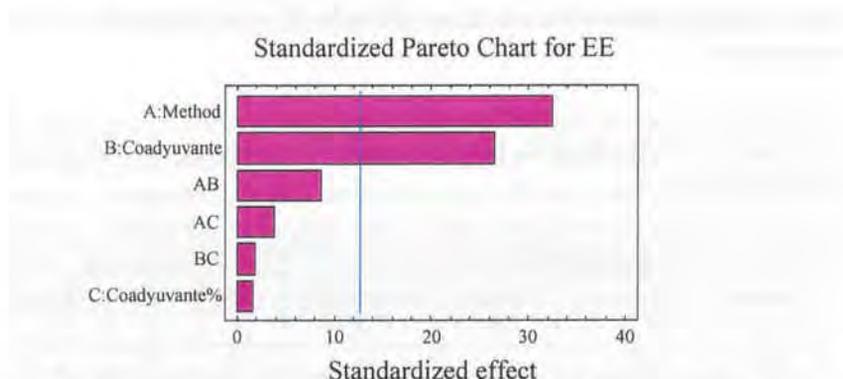


Fig. 8.12. Diagrama de Pareto para el efecto de los factores sobre la eficacia de encapsulación (EE).

Del gráfico de Pareto de la figura 8.12 se puede concluir que dos factores son estadísticamente significativos sobre la eficacia de encapsulación, el método de encapsulación elegido y el tipo de coadyuvante.

Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 8.14). En este caso dos factores se muestran como estadísticamente significativos sobre la eficacia de encapsulación con un 95% de probabilidad, el método de encapsulación y el tipo de coadyuvante.

Analysis of Variance for EE

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Metodo	3068,19	1	3068,19	1052,15	0,0196
B:Coadyuvante	2038,73	1	2038,73	699,13	0,0241
C:Coadyuvante%	6,78961	1	6,78961	2,33	0,3693
AB	210,228	1	210,228	72,09	0,0746
AC	40,7253	1	40,7253	13,97	0,1665
BC	9,22351	1	9,22351	3,16	0,3261
Total error	2,91611	1	2,91611		
Total (corr.)	5376,8	7			

R-squared = 99,9458 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 99,6204 percent  
 Standard Error of Est. = 1,70766  
 Mean absolute error = 0,60375  
 Durbin-Watson statistic = 3,9

Tabla 8.14. Análisis de la varianza para la eficacia de encapsulación.

La  $r^2$  del ajustado es 99,95%, mientras que la  $r^2$  más adecuada para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,62%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 1,71. El error absoluto medio de 0,60 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es mayor de 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales. En consecuencia, puede afirmarse que el método de encapsulación y el tipo de coadyuvante influyen de forma estadísticamente significativa en la eficiencia de encapsulación. De esta forma pueden establecerse el uso del método de salificación y el uso de quitosano como los que proporcionan una mayor eficacia de encapsulación de la indometacina.

#### 8.7.5. Interpretación de los efectos principales y las interacciones sobre la eficacia de encapsulación

En la figura 8.13 se muestran gráficamente los efectos principales sobre la respuesta eficacia de encapsulación. El factor porcentaje de coadyuvante presenta una recta casi paralela al eje de abscisas, lo que significa que no tiene efecto sobre la eficacia de encapsulación. En cambio, los factores método de encapsulación y tipo de coadyuvante influyen de manera importante, viéndose favorecida la eficacia de encapsulación cuando se mantienen los dos factores en el nivel bajo (-1,0).

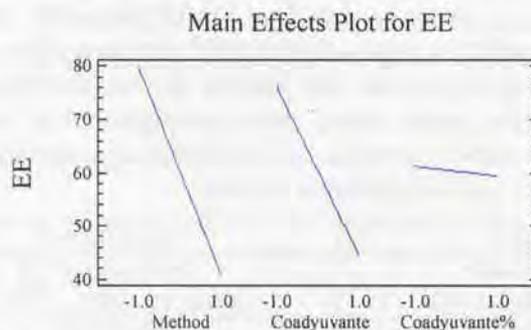


Fig. 8.13. Representación gráfica de los efectos principales sobre la eficacia de encapsulación.

Gráficamente también se pueden representar las líneas correspondientes al valor de la eficacia de encapsulación, según el nivel en que se encuentren los factores. En este caso dos de las líneas (-) y (+) se cruzan entre sí, las correspondientes a las interacciones AC y BC, lo que implica que existe interacción entre ambos factores (figura 8.14).

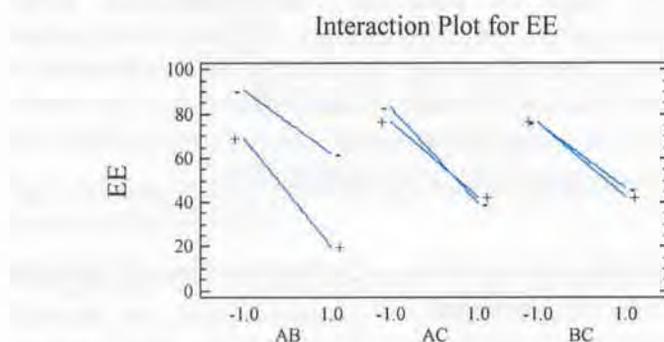


Fig. 8.14. Representación gráfica de las interacciones AB (método de encapsulación y tipo de coadyuvante), AC (método de encapsulación y % de coadyuvante) y BC (tipo de coadyuvante y su %).

### 8.7.6. Respuesta óptima para la eficacia de encapsulación

Se fija como objetivo el obtener una eficacia de encapsulación lo más alta posible a fin de asegurar la rentabilidad del proceso de encapsulación. Según los resultados obtenidos y su análisis, se puede proponer cuáles deberían ser los niveles de los distintos factores (tabla 8.15). Según estos datos, para conseguir una eficacia de encapsulación lo mayor posible, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Método	-1	Salificación
Coadyuvante	-1	Quitosano-PVA
% de Coadyuvante	-1	Quitosano 0,03%- PVA 1%
<b>Valor óptimo</b>		<b>92,17 %</b>

Tabla 8.15. Niveles de los factores para obtener el mayor valor de eficacia de encapsulación posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta donde se observa que para un porcentaje de coadyuvante determinado (el programa estadístico escoge el valor central de los estudiados), la eficacia de encapsulación disminuye con el método de evaporación de disolvente y empleando el poloxámero-PVA como coadyuvante (figura 8.15).

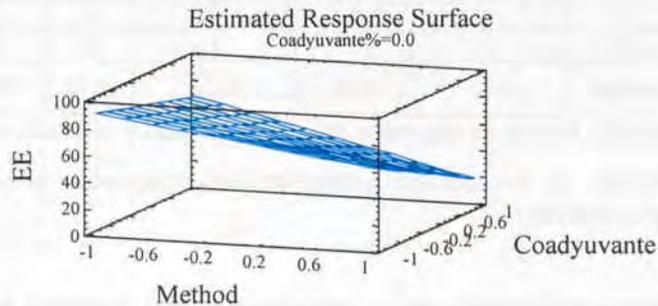


Fig. 8.15. Gráfico de superficie de respuesta para la eficacia de encapsulación

#### 8.7.7. Matriz de respuesta de la viscosidad

En este capítulo se analizan brevemente los resultados de las viscosidades de los distintos ensayos con la finalidad de comprobar si para este método de encapsulación también hay correlación entre los valores de viscosidad y los tamaños de las nanoesferas. En la tabla 8.16 se muestra la matriz de respuesta para la viscosidad.

Ensayo	Factores Principales			Interacciones		
	Método (A)	Coad.(B)	%Coad. (C)	AB	AC	BC
F1	-1	-1	-1	1	1	1
F2	1	-1	-1	-1	-1	1
F3	-1	1	-1	-1	1	-1
F4	1	1	-1	1	-1	-1
F5	-1	-1	1	1	-1	-1
F6	1	-1	1	-1	1	-1
F7	-1	1	1	-1	-1	1
F8	1	1	1	1	1	1
Valores*	0,37	-0,14	0,22	-0,23	0,14	-0,104

Tabla 8.16. Matriz de respuesta para la viscosidad y cálculos relacionados.

\* Valores de los efectos estimados proporcionados por el programa Statgraphics Plus 5.1.

La representatividad de la influencia de los distintos factores en la respuesta tamaño medio de partícula se analizan en el correspondiente diagrama de Pareto. En la figura 8.16 se representan los efectos estandarizados en orden decreciente de importancia

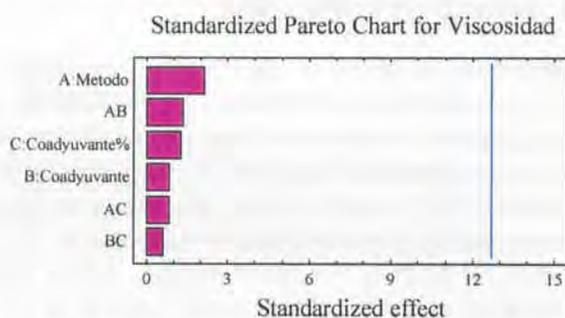


Fig. 8.16. Diagrama de Pareto respecto a la viscosidad.

En este caso parece que ninguno de los factores afecta de forma estadísticamente significativa al valor de la viscosidad. Para asegurar la significación de los efectos se analizan los resultados del análisis de la varianza (tabla 8.17). Puede observarse que ninguno de los factores tiene un valor de probabilidad menor de 0,05, lo cual implica que

todos son significativamente diferentes de cero con un 95% de probabilidad.

Analysis of Variance for Viscosidad

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Metodo	4,38672	1	4,38672	4,27	0,2869
B:Coadyuvante	0,646385	1	0,646385	0,63	0,5730
C:Coadyuvante <sup>2</sup>	1,49991	1	1,49991	1,46	0,4400
AB	1,73538	1	1,73538	1,69	0,4174
AC	0,613832	1	0,613832	0,60	0,5810
BC	0,346945	1	0,346945	0,34	0,6648
Total error	1,02674	1	1,02674		
Total (corr.)	10,2559	7			

R-squared = 89,9888 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 29,9214 percent

Standard Error of Est. = 1,01328

Mean absolute error = 0,35825

Durbin-Watson statistic = 3,5

**Tabla 8.17.** Análisis de la varianza de los resultados de la viscosidad.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo ajustado explica el 89,98% de la variabilidad de la respuesta tiempo de vida media. El estadístico  $r^2$  ajustado para los grados de libertad de la experiencia, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 29,92%. El error estándar de los valores estimados da una desviación estándar de 1,01. El error absoluto medio de 0,36 es el valor medio de los residuales y el valor del coeficiente estadístico de Durbin-Watson es mayor de 1,4 con lo que se puede concluir que no existe correlación entre los residuales.

En consecuencia, tras el estudio estadístico realizado puede afirmarse que ninguno de los parámetros estudiados influye significativamente en la viscosidad del medio de reacción.

### 8.7.8. Respuesta óptima para la viscosidad

Se fija como objetivo el obtener una viscosidad lo más alta posible a fin comprobar si está correlacionado con un tamaño pequeño de nanoesfera (tabla 8.18). Según estos datos, para conseguir la viscosidad mayor posible, las condiciones experimentales se deberán mantener en los siguientes niveles:

Método	+1	SESDM
Coadyuvante	-1	Quitosano-PVA
% de Coadyuvante	+1	Quitosano 0,08% y PVA 1%
<b>Valor óptimo</b>		<b>6,47175%</b>

Tabla 8.18. Niveles de los factores para obtener el mayor valor del tiempo de vida media posible.

Estos valores se representan gráficamente mediante las superficies de respuesta (figura 8.18).

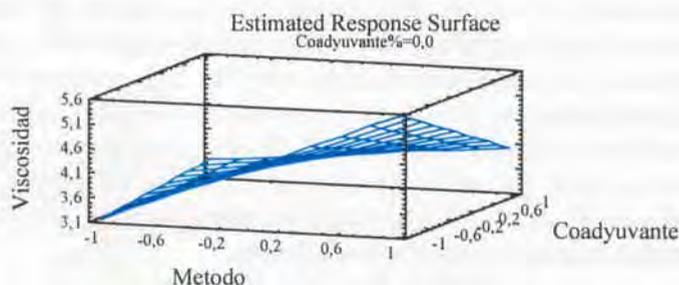


Fig. 8.18. Gráfico de superficie de respuesta para la viscosidad.

Analizando estos datos conjuntamente con los obtenidos en la evaluación de la respuesta óptima del tamaño de partícula, se puede concluir que no se observa ninguna relación directa entre los valores de la viscosidad del medio y los tamaños medios de nanoesferas obtenidos, en las condiciones experimentales ensayadas.

## **9. PROCESO DE FABRICACIÓN VERDE APLICADO A LA OBTENCIÓN DE NANOESFERAS DE INDOMETACINA**

---

Siguiendo el razonamiento expuesto en la parte bibliográfica, se procede a la repetición de los ensayos empleando como disolvente único el acetato de etilo. De cada serie de diseños factoriales se eligen las referencias D6, S5 y F1 por ser las que proporcionan eficacias de encapsulación más altas, mayores rendimientos de proceso, tamaño de partícula más pequeño y MDT prolongado, sin efecto *burst*.

Los métodos de encapsulación son exactamente los mismos que se describen en cada capítulo correspondiente, a excepción de que se sustituye el diclorometano y/o acetona por el acetato de etilo como disolvente único.

El principal problema que se evidencia al emplear acetato de etilo es su lenta velocidad de evaporación, en comparación con el diclorometano y con la acetona. Para conseguir un proceso de encapsulación eficaz y rentable, que proporcione nanoesferas de calidad y con altas eficacias de encapsulación es necesario optimizar el proceso de evaporación de disolvente. A continuación se resumen las pruebas realizadas para tal fin (tabla 9.1).

A fin de acortar el tiempo de la fase de evaporación del disolvente orgánico se ensayan distintos métodos, lográndose finalmente acortar el proceso inicial de más de 10 horas a 5 horas si se realiza calentando y a 2 horas si se aplican las dos condiciones: calor y vacío.

La elección de la temperatura de evaporación se define tras elegir un intervalo de temperaturas que favorezcan la evaporación del disolvente, sin llegar a la ebullición del sistema. Tras comprobar la morfología de las nanoesferas formadas, por microscopía óptica, se escoge como temperatura de trabajo la de 40 °C puesto que se comprueba que el proceso es suficientemente rápido y eficaz, en términos de formación de nanoesferas de tamaño pequeño, con altos rendimientos y eficacias de encapsulación. Las pruebas se realizan empleando como formulación tipo la referencia D6 (ver detalles en el capítulo 6).

Disolvente	Condiciones	Tiempo de evaporación
Diclorometano y acetona	Evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25 °C)	4 horas
Diclorometano y acetona	Evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25 °C) y vacío	2 horas
Acetona	Evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25 °C)	6 horas
Acetona	Evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25 °C) y vacío	3 horas
Acetato de etilo	Evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25 °C)	10 horas y evaporación incompleta
Acetato de etilo	Evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25 °C) y vacío	5 horas
Acetato de etilo	Evaporación del disolvente calentando a 40 °C	4 horas
Acetato de etilo	Evaporación del disolvente calentando a 40 °C y vacío	2 horas

**Tabla 9.1.** Resumen de las condiciones ensayadas para optimizar el método de elaboración de las nanoesferas con acetato de etilo.

En la figura 9.1 se esquematizan las condiciones experimentales elegidas para la nueva serie experiencias.

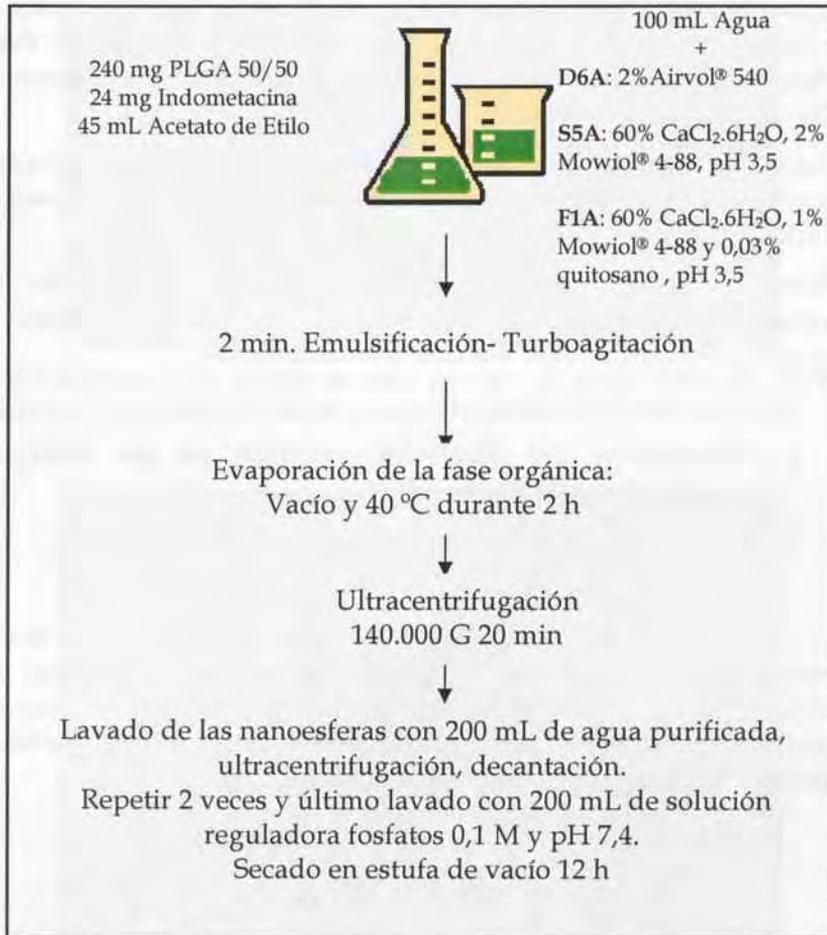


Fig. 9.1. Esquema general del proceso de encapsulación.

### 9.1. Optimización del método de elaboración de nanoesferas en la serie "F" / acetato de etilo

Tal y como se describe en el capítulo 8, durante la elaboración de las nanoesferas aparecen cristales aciculares, que se atribuyen a restos de indometacina en exceso que precipitan en el medio de reacción. Estos cristales se consiguen separar fácilmente mediante la filtración con un filtro de acetato de celulosa.

Cuando se sustituye la acetona por acetato de etilo, se comprueba que continúan apareciendo los mencionados cristales, de mismo tamaño y morfología.

Dentro de los experimentos diseñados para la optimización del proceso de encapsulación con acetato de etilo se estudia la encapsulación empleando dos condiciones distintas:

- 1- Evaporación del disolvente orgánico en un vaso de precipitados, calentando a 40 °C.
- 2- Evaporación en un reactor calentando a 40 °C y en vacío.

Tras el análisis de los medios de reacción con el microscopio óptico se observa que (a parte de las diferencias en las velocidades de evaporación ya comentadas anteriormente), cuando la reacción transcurre en el reactor cerrado herméticamente y aplicando vacío no aparecen cristales en el medio (figuras 9.2 y 9.3).

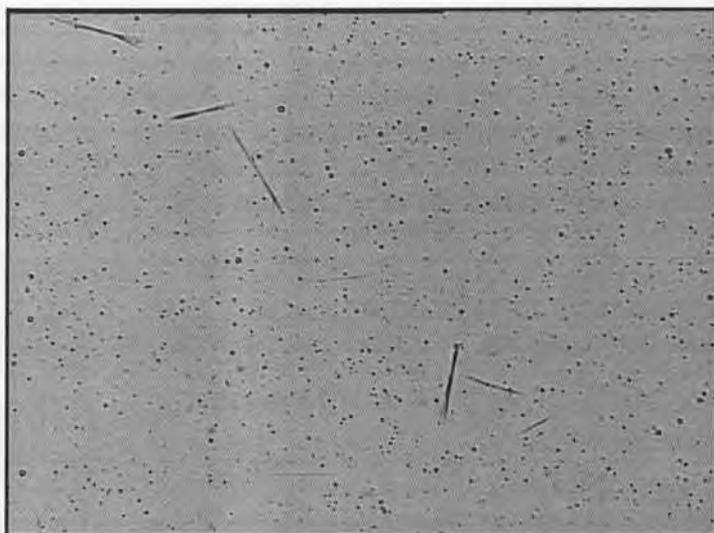


Fig 9.2. Ensayo F1/ acetato de etilo, en vaso de precipitados. Se observa presencia de cristales aciculares en el medio de reacción (200 aumentos).

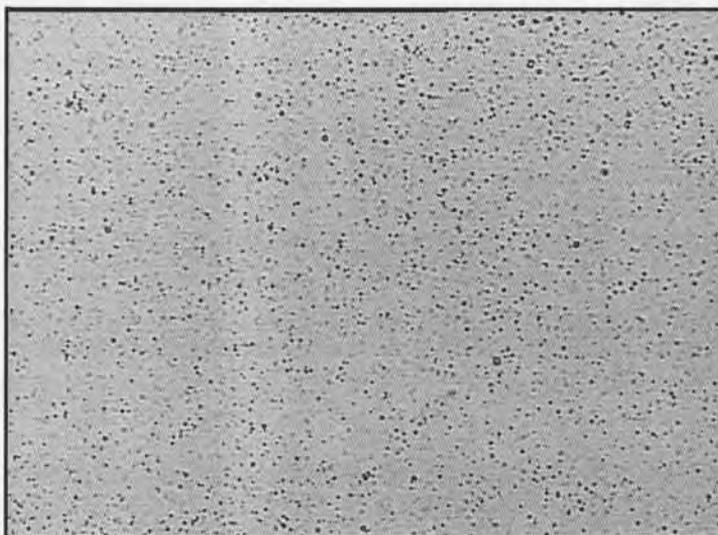


Fig 9.3. Ensayo F1/ acetato de etilo, en reactor. No se observa presencia de cristales aciculares en el medio de reacción (200 aumentos).

Se puede concluir, por lo tanto, que la aparición de los cristales de indometacina en el medio de reacción es dependiente de la velocidad de reacción. Al realizar la encapsulación en el reactor con ayuda de temperatura y vacío se reduce el tiempo de encapsulación hasta un mínimo de 2 horas, evitando así la formación de los cristales y la consecuente necesidad de filtración de la muestra.

## 9.2. Eficacias de encapsulación

En la tabla 9.2 se muestran los resultados de la valoración de los lotes fabricados con acetato de etilo, junto con sus replicados.

Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido teórico en activo %	Contenido en activo %	Rendimiento %
D6A-1	48,54	8,97	4,35	79,85
D6A-2	56,24	8,67	4,88	91,43
D6A-3	60,96	9,14	5,57	82,74
S5A-1	96,23	9,10	8,75	73,90
S5A-2	87,75	9,51	8,35	78,61
S5A-3	87,72	9,36	8,22	75,48
F1A-1	88,15	9,06	7,99	86,82
F1A-2	92,96	9,47	8,80	75,50
F1A-3	87,93	9,21	8,09	77,95

Tabla 9.2. Resultados del análisis de los lotes fabricados con acetato de etilo como único disolvente.

En la tabla 9.3 se resumen los resultados obtenidos y se comparan con sus homólogos en el disolvente original (diclorometano/acetona para la serie "D", y acetona para las series "S" y "F").

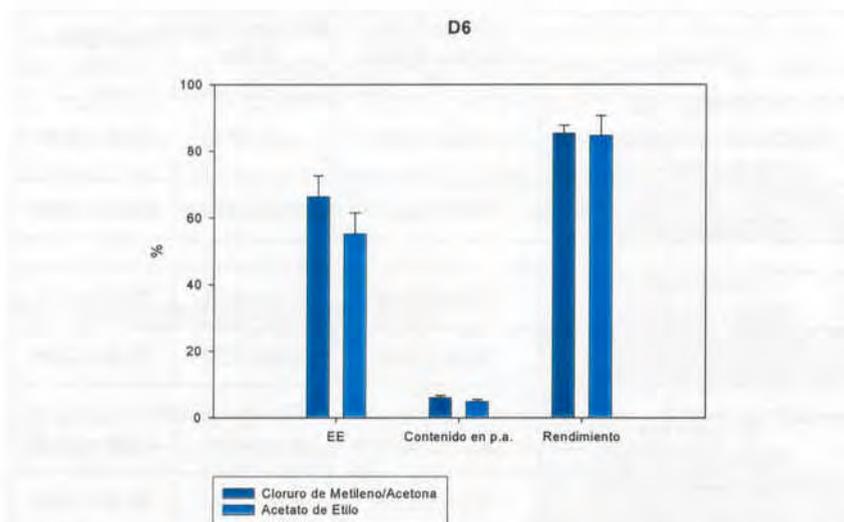
Ensayo	Eficacia de Encapsulación %	Contenido en activo %	Rendimiento %
D6 Diclorometano/Acetona PROMEDIO ± DS	66,44 ± 6,20	6,11 ± 0,59	85,41 ± 2,39
D6A Acetato de etilo PROMEDIO ± DS	55,24 ± 6,27	4,93 ± 0,61	84,67 ± 6,02
S5 Acetona PROMEDIO ± DS	90,42 ± 0,49	8,60 ± 0,31	72,61 ± 7,99
S5A Acetato de etilo PROMEDIO ± DS	90,56 ± 4,00	8,44 ± 0,27	75,99 ± 2,39
F1 Acetona PROMEDIO ± DS	92,17 ± 1,66	8,63 ± 0,46	84,03 ± 10,40
F1A Acetato de etilo PROMEDIO ± DS	89,68 ± 2,84	8,29 ± 0,44	80,09 ± 5,95

**Tabla 9.3.** Resultados comparativos del análisis de los lotes fabricados con acetato de etilo como único disolvente respecto a sus homólogos con el disolvente original.

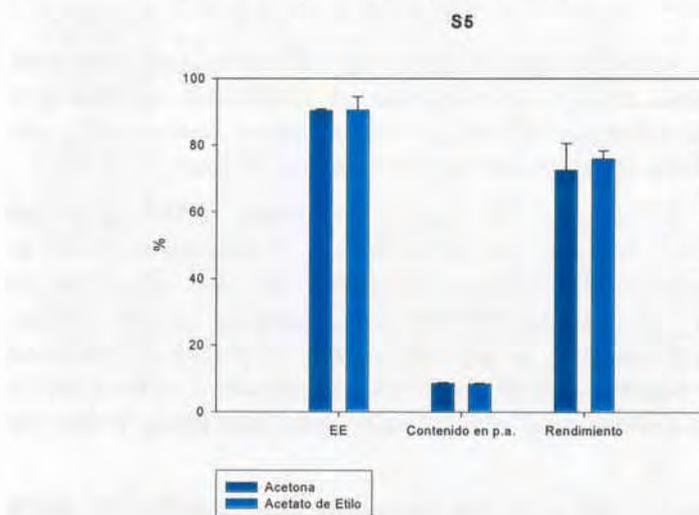
Por lo general, se puede afirmar que no hay diferencias significativas entre un mismo ensayo sustituyendo el disolvente original por acetato de etilo, sobretodo al sustituir acetona por acetato de etilo, por lo que se confirma la idoneidad del disolvente propuesto.

En el ensayo de la serie "D", donde se utiliza como disolvente original la mezcla formada por diclorometano y acetona es donde se observan mayores diferencias, sobretodo en las eficacias de encapsulación y en el contenido en indometacina de las nanoesferas. Estos datos posiblemente se explican debido a la mayor velocidad con que tiene lugar la formación de las nanoesferas en presencia de diclorometano-acetona y al efecto Marangoni (Sterling y Scriven 1959).

En las figuras 9.4, 9.5 y 9.6 se muestran gráficamente los datos comparativos para el mismo ensayo con el disolvente original y tras sustituirlo por acetato de etilo.



**Fig. 9.4.** Comparación de los resultados de eficacia de encapsulación (EE), contenido en principio activo y rendimiento del proceso de los ensayos D6 al cambiar el disolvente original por acetato de etilo.



**Fig. 9.5.** Comparación de los resultados de eficacia de encapsulación (EE), contenido en principio activo y rendimiento del proceso de los ensayos S5 al cambiar el disolvente original por acetato de etilo.

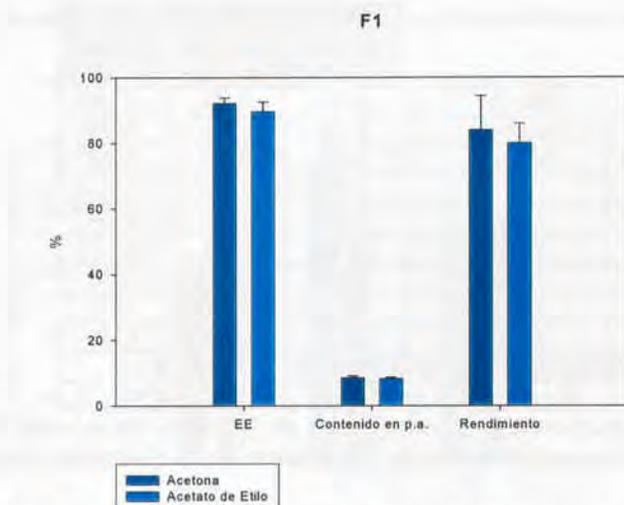


Fig. 9.6. Comparación de los resultados de eficacia de encapsulación (EE), contenido en principio activo y rendimiento del proceso de los ensayos F1 al cambiar el disolvente original por acetato de etilo.

### 9.3. Características morfométricas

El tamaño de partícula se analiza mediante la técnica de difracción láser con un equipo Coulter. Los resultados que se muestran en las tablas 9.4, 9.5 y 9.6 se expresan en número de partículas y se comparan respecto el valor obtenido con el disolvente original.

	D6A-1 Acetato de Etilo	D6A-2 Acetato de Etilo	D6A-3 Acetato de Etilo
Media	0,592	0,599	0,652
Mediana	0,552	0,570	0,648
Moda	0,474	0,520	0,571
DS	1,390	1,531	1,341
D <sub>10%</sub>	0,418	0,422	0,437
D <sub>25%</sub>	0,468	0,477	0,516
D <sub>50%</sub>	0,552	0,570	0,648
D <sub>75%</sub>	0,690	0,714	0,828
D <sub>90%</sub>	0,908	0,910	0,989
D6A (promedio) Acetato de Etilo	614 ± 33 nm		
D6 (promedio) Diclorometano/Acetona	611 ± 21 nm		

Tabla 9.4. Caracterización morfométrica de los lotes de la serie D6A en acetato de etilo y tamaño medio de la referencia con el disolvente original.

	S5A-1 Acetato de Etilo	S5A-2 Acetato de Etilo	S5A-3 Acetato de Etilo
Media	0,707	0,681	0,725
Mediana	0,700	0,623	0,736
Moda	0,627	0,520	0,829
DS	1,394	1,536	1,372
D <sub>10%</sub>	0,450	1,214	0,465
D <sub>25%</sub>	0,543	0,851	0,564
D <sub>50%</sub>	0,700	0,623	0,736
D <sub>75%</sub>	0,918	0,496	0,944
D <sub>90%</sub>	1,129	0,428	1,112
S5A (promedio) Acetato de Etilo	704 ± 22 nm		
S5 (promedio) Acetona	945 ± 60 nm		

Tabla 9.5. Caracterización morfométrica de los lotes de la serie S5A en acetato de etilo y tamaño medio de la referencia con el disolvente original.

	F1-1 Acetato de Etilo	F1-2 Acetato de Etilo	F1-3 Acetato de Etilo
Media	0,742	0,770	0,675
Mediana	0,717	0,689	0,634
Moda	0,520	0,520	0,520
DS	1,488	1,676	1,463
D <sub>10%</sub>	0,447	0,441	0,432
D <sub>25%</sub>	0,533	0,523	0,503
D <sub>50%</sub>	0,717	0,689	0,634
D <sub>75%</sub>	1,009	1,015	0,855
D <sub>90%</sub>	1,304	1,564	1,157
F1(promedio) Acetato de Etilo	729 ± 49 nm		
F1 (promedio) Acetona	755 ± 116 nm		

Tabla 9.6. Caracterización morfométrica de los lotes de la serie F1A en acetato de etilo y tamaño medio de la referencia con el disolvente original.

En la figura 9.7 se representa gráficamente en histogramas las diferencias en los tamaños de partícula al sustituir el disolvente original por acetato de etilo. Como puede observarse, no hay diferencias significativas al efectuar el cambio de disolvente, aunque se constata un ligero descenso general en los valores del tamaño medio de partícula en los lotes elaborados con acetato de etilo.

Diferencias en el tamaño de partícula al sustituir el disolvente original por acetato de etilo

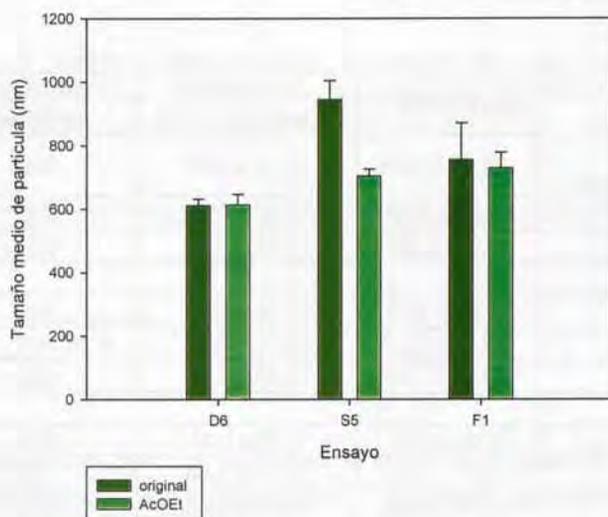


Figura 9.7. Diferencias en el tamaño de las nanoesferas formuladas con acetato de etilo con respecto al disolvente original.

#### 9.4. Potencial Zeta

En la tabla 9.7 se incluyen los resultados obtenidos tras la evaluación del potencial zeta de las nanoesferas.

Se observa que todas las referencias (excepto la F1 formulada con acetona) presentan una carga negativa.

A pesar de que las referencias F1 contienen quitosano como coadyuvante en el método de elaboración, su concentración teórica es muy baja (0,03%) y posteriormente las nanoesferas sufren varios lavados, por lo que se considera que la cantidad remanente de quitosano es muy baja y no es de esperar que las nanoesferas presenten carga positiva. Esta afirmación se ratifica tras la evaluación del potencial zeta en las diferentes muestras, donde se observa que el quitosano empleado en la elaboración de las nanoesferas

prácticamente no afecta a su potencial zeta, con respecto a las referencias de las series "D" y "S".

	$\zeta(\text{mV} \pm \text{DS})$	Movilidad ( $\mu\text{mcm/Vs} \pm \text{DS}$ )	Conductividad ( $\text{mS/cm}$ )
D6 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /acetona	-22,08 ± 0,85	-1,74 ± 0,07	0,02
D6A AcOEt	-8,29 ± 0,36	-0,65 ± 0,03	0,02
D6A Placebo	-9,46 ± 0,24	-0,75 ± 0,02	0,01
S5 Acetona	-8,37 ± 1,92	-0,66 ± 0,15	0,05
S5A AcOEt	-12,12 ± 1,80	-0,96 ± 0,14	0,01
S5A Placebo	-18,11 ± 1,07	-1,43 ± 0,08	0,02
F1Acetona	2,14 ± 0,51	0,17 ± 0,04	0,06
F1A AcOEt	-12,77 ± 0,84	-1,01 ± 0,06	0,03
F1A Placebo	-17,78 ± 2,80	-1,40 ± 0,22	0,02

Tabla 9.7. Resultados de potencial zeta, movilidad y conductividad de los distintos lotes de las series D6, S5 y F1.

### 9.5. Calorimetría diferencial de barrido

Con el objetivo de estudiar la forma en que la indometacina interacciona con el polímero se analizan los termogramas de las distintas muestras (figuras 9.8-9.13).

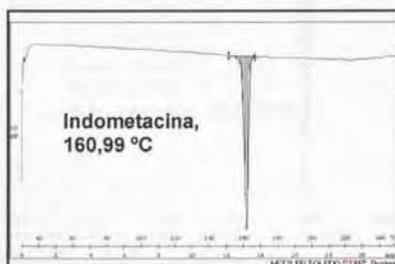


Fig.9.8. Termograma indometacina.

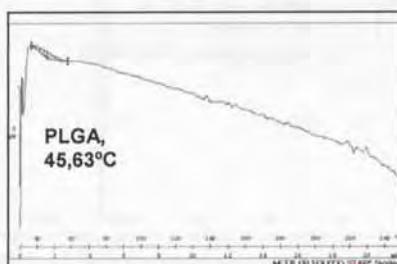


Fig. 9.9. Termograma PLGA 50/50.

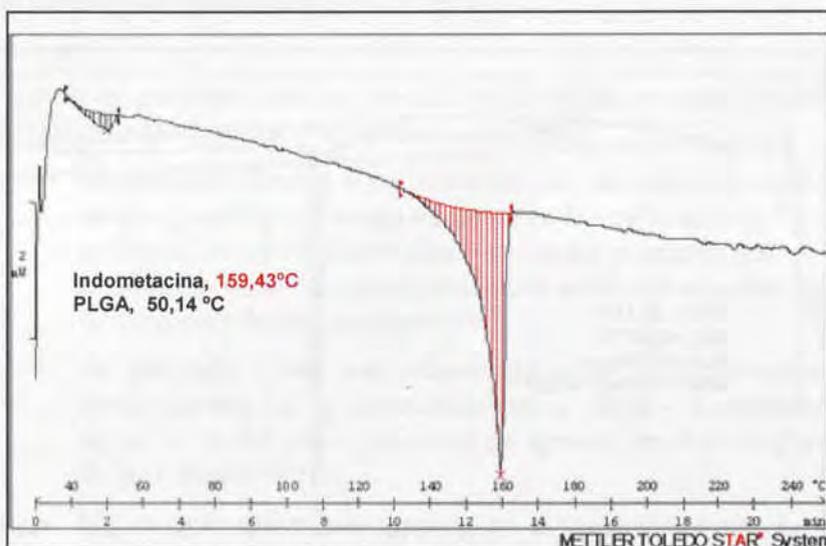


Fig.9.10. Termograma de la mezcla física de indometacina y PLGA 50/50 viscosidad 0,20 dL/g a la proporción 11:120 (1:10,9).

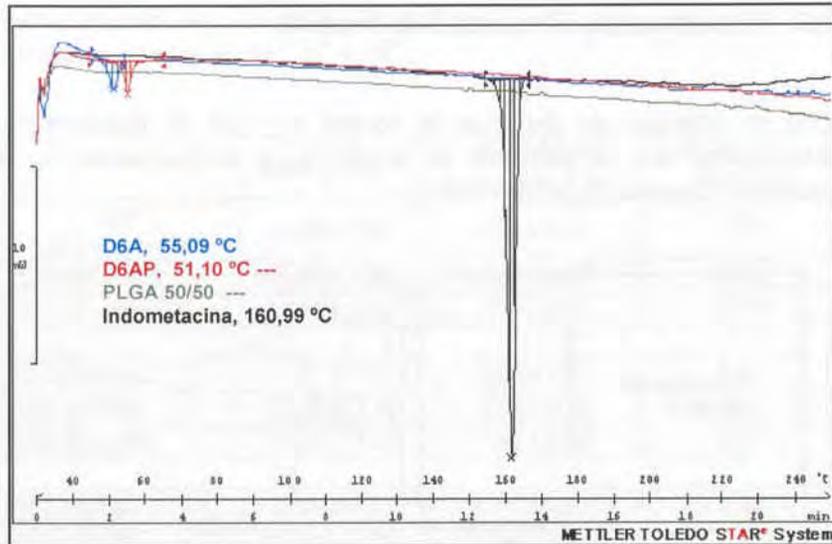


Fig. 9.11. Termogramas de las nanoesferas D6A y D6AP placebo junto con los patrones de indometacina y PLGA 50/50.

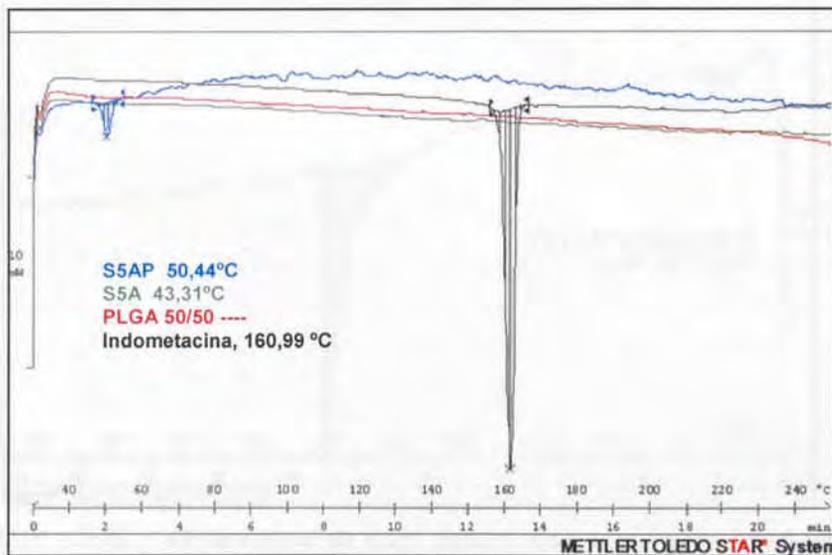


Fig. 9.12. Termogramas de las nanoesferas S5A y S5AP placebo, junto con los patrones de indometacina y PLGA 50/50.

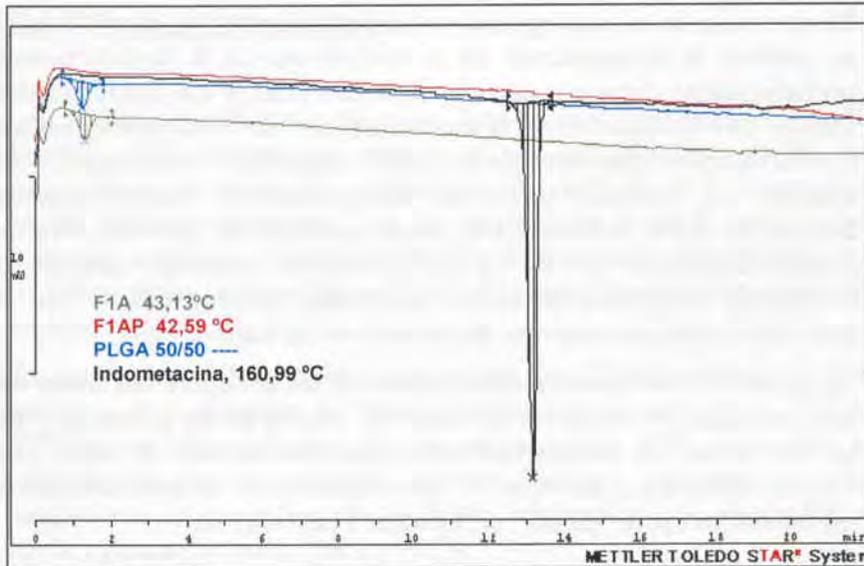


Fig. 9.13. Termogramas de las nanoesferas F1A y F1AP placebo, junto con los patrones de indometacina y PLGA 50/50.

Cuando un principio activo se mezcla con un polímero pueden existir tres situaciones distintas (Pamujula y cols. 2004):

- 1- El principio activo y el polímero forman una solución sólida y en este caso hay un desplazamiento en la posición de la Tg del polímero debido al efecto plastificante del principio activo. La endoterma de la fusión del principio activo no aparece en el termograma de las nanopartículas.
- 2- El principio activo está dispersado en el polímero en una forma amorfa. La Tg del polímero no se afecta y la endoterma de la fusión del principio activo no aparece en el termograma de las nanopartículas.
- 3- El principio activo está disperso en el polímero en una forma cristalina. No hay cambio en la posición de la Tg del polímero ni de la endoterma de fusión del activo.

En este caso, en el termograma de las nanoesferas (figuras 9.11-9.13) se observa la desaparición de la endoterma de la indometacina, probablemente debido a que el polímero PLGA y los coadyuvantes inhiben la cristalización de la indometacina. Por lo tanto, esto indica que la indometacina pasa de un estado cristalino a uno amorfo. Al analizar las distintas series de nanoesferas se observa que la interacción de la indometacina con el polímero no provoca ningún cambio sustancial en la Tg del polímero, pero en cambio la endoterma de la indometacina desaparece, lo que indica que el principio activo se encuentra dispersado en las nanoesferas.

En la tabla 9.8 se muestran los valores de las entalpías, así como las temperaturas de transición de fusión (o vítrea) de los patrones y de las tres series de nanoesferas fabricadas con acetato de etilo. Los valores señalados como "pico 1" son atribuibles a la indometacina y los señalados como "pico 2" al polímero PLGA 50/50.

Muestra	$\Delta H$ (mJ)		Tg (°C)	
	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
Indometacina	---	-334,69	---	160,99
PLGA 50/50	-8,88	---	45,63	---
Mezcla indometacina y PLGA	-9,75	-153,59	50,14	159,43
D6A	-27,72	---	55,09	---
D6AP placebo	-26,42	---	51,10	---
S5A	-1,79	---	43,31	---
S5AP placebo	-25,96	---	50,44	---
F1A	-27,69	---	43,13	---
F1AP placebo	-25,76	---	42,59	---

Tabla 9.8. Valores de entalpía y temperatura de transición de fusión / vítrea.

Los resultados obtenidos también permiten afirmar que no existe ninguna incompatibilidad entre los componentes de las nanoesferas, puesto que no se observa la aparición de ningún pico nuevo.

## 9.6. Difracción de Rayos X

Los análisis de difracción de rayos X se realizan con la finalidad de obtener más información estructural de las distintas series de nanoesferas, así como para determinar el estado de la indometacina en las distintas muestras. Con los análisis de rayos X también se pretende evaluar la posible existencia de nuevas fases presentes en las nanoesferas, que se hayan podido formar durante el proceso de encapsulación.

En las figuras 9.14 y 9.15 se muestran los difractogramas de los precursores principales de las nanoesferas (indometacina y PLGA 50/50). Los difractogramas de los coadyuvantes PVA, quitosano y poloxámero se han omitido puesto que su presencia en las nanoesferas se considera despreciable, afirmación que se confirma con los espectros de IR, RMN y ESCA.

Los difractogramas se expresan en función de la intensidad relativa (unidades arbitrarias) a cada ángulo  $2\theta$ . La escala de la intensidad se ha modificado para facilitar la observación de las fases amorfas y poder observar posibles nuevas transiciones.

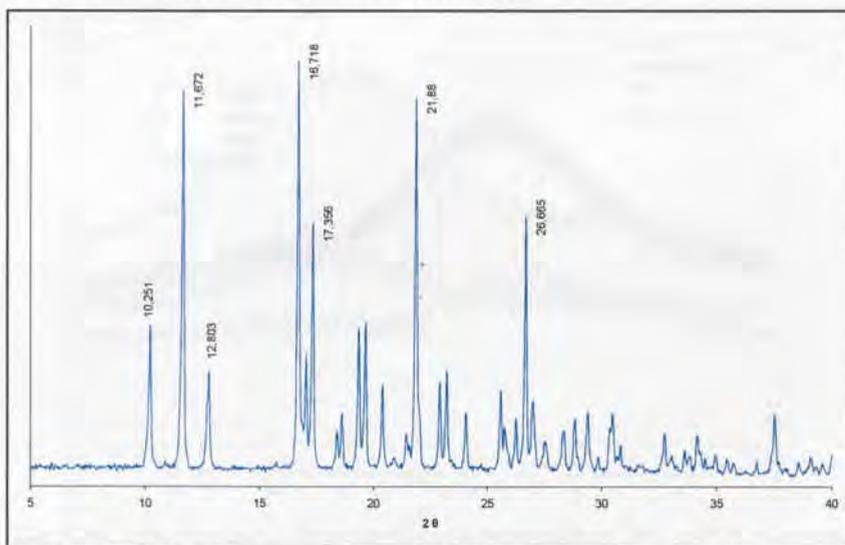


Fig. 9.14. Difractograma de rayos X de indometacina, polimorfo  $\gamma$ .

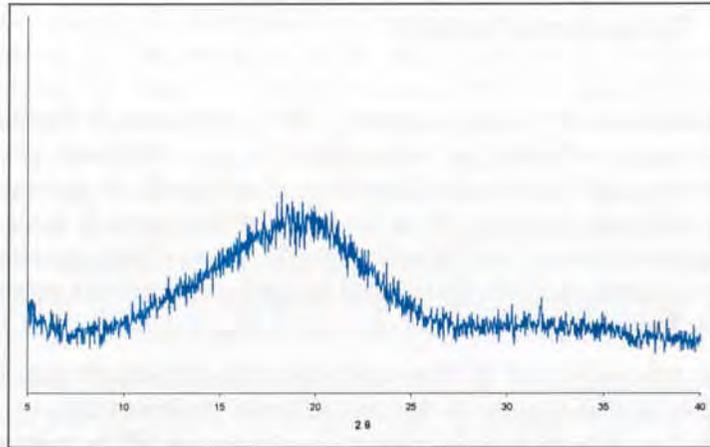


Fig. 9.15. Difractograma de rayos X del PLGA 50/50.

A continuación en las figuras 9.16 a 9.18 se muestran los difractogramas de rayos X de las distintas series de nanoesferas y se comparan con el correspondiente placebo, el patrón de polímero y de un difractograma elaborado con los datos de la combinación del activo (a la proporción teórica en la nanoesfera) y el polímero.

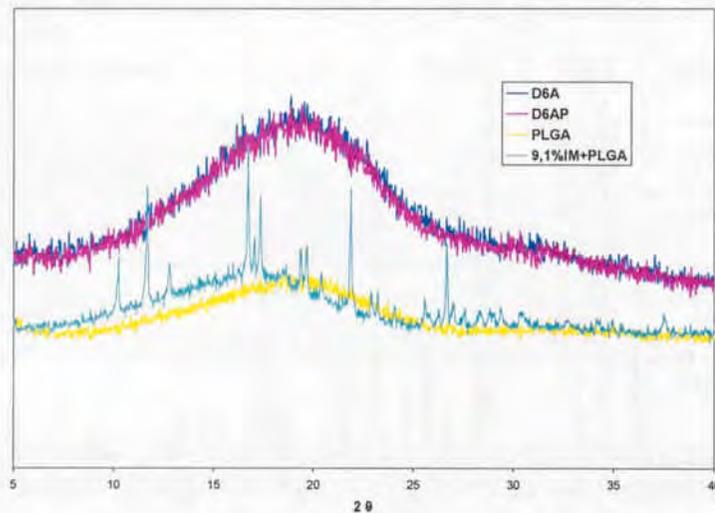


Fig. 9.16. Difractograma de rayos X de las nanoesferas D6A y D6AP placebo.

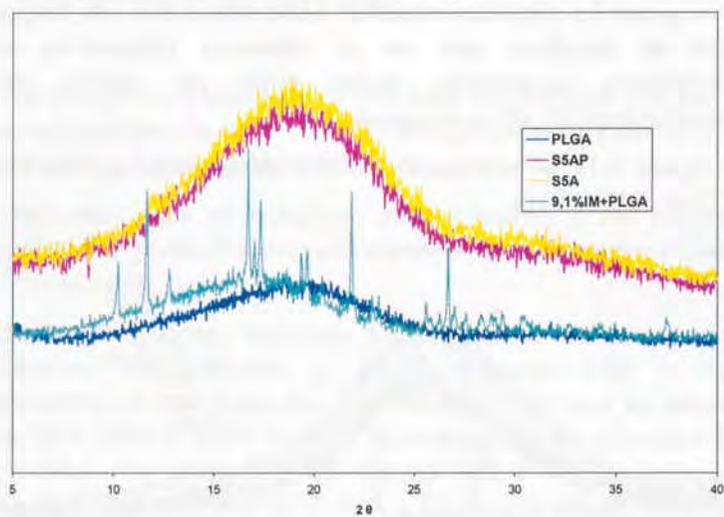


Fig. 9.17. Difractograma de rayos X de las nanoesferas S5A y S5AP placebo.

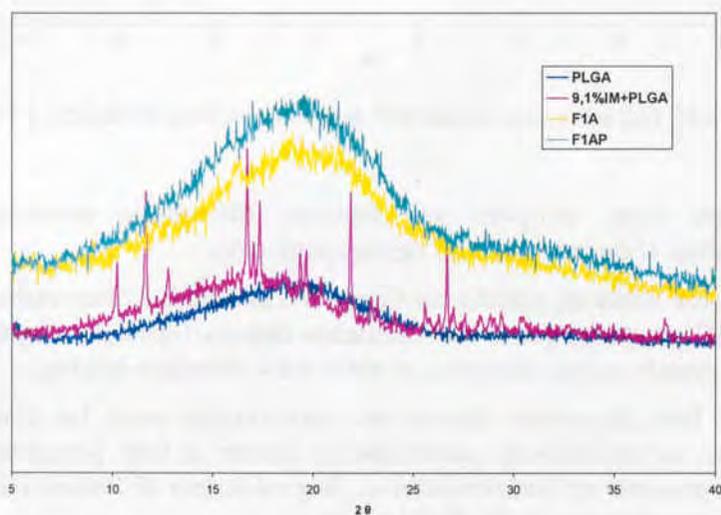


Fig. 9.18. Difractograma de rayos X de las nanoesferas F1A y F1A placebo.

Tras comparar las distintas series de nanoesferas con sus respectivos placebos se concluye que no se observan diferencias en los difractogramas, mostrando todos ellos un patrón amorfo, independientemente de su composición.

En la figura 9.19 se comparan los difractogramas de las distintas series D6A, SA5 y F1A.

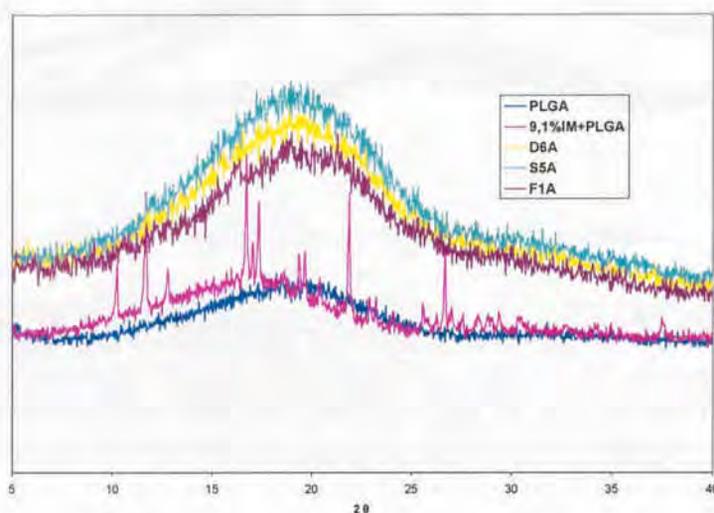


Fig. 9.19. Difractograma de rayos X de las nanoesferas DA6, S5A y F1A.

En este caso, tampoco se observan diferencias estructurales atribuibles al distinto método de encapsulación.

Con estos datos es posible confirmar los resultados observados con los DSC, es decir, que la indometacina está en forma de dispersión sólida puesto que no conserva su estructura cristalina original.

No se han observado diferencias estructurales entre las distintas familias de nanoesferas, posiblemente debido al bajo porcentaje de activo presente en las nanoesferas. Se profundiza al respecto en los siguientes capítulos de IR, RMN y XPS.

---

### 9.7. Espectroscopía de infrarrojo

En esta sección se presentan los resultados obtenidos tras los análisis de espectroscopía de infrarrojo en transformada de Fourier (FTIR) de los lotes de nanoesferas D6A, S5A y F1A.

Los espectros que se muestran corresponden a los espectros de absorción y se presentan como el número de onda frente al porcentaje de transmitancia.

En primer lugar se incluyen los espectros de los precursores principales, indometacina y PLGA (figuras 9.20 y 9.21). A continuación se comparan los espectros de cada una de las nanoesferas (lotes D6A, S5A y F1A) con sus correspondientes placebos (figuras 9.22 a 9.24). Por último, en las figuras 9.25 y 9.26 se comparan los espectros de los tres lotes D6A, S5A y F1A con la finalidad de intentar evidenciar diferencias atribuibles al método de encapsulación.

Las asignaciones de las bandas de absorción se han realizado de acuerdo con los datos publicados en la bibliografía (Simon y cols. 1980, Florey 1984, Sócrates 1994, Kiremitci y cols. 1999).

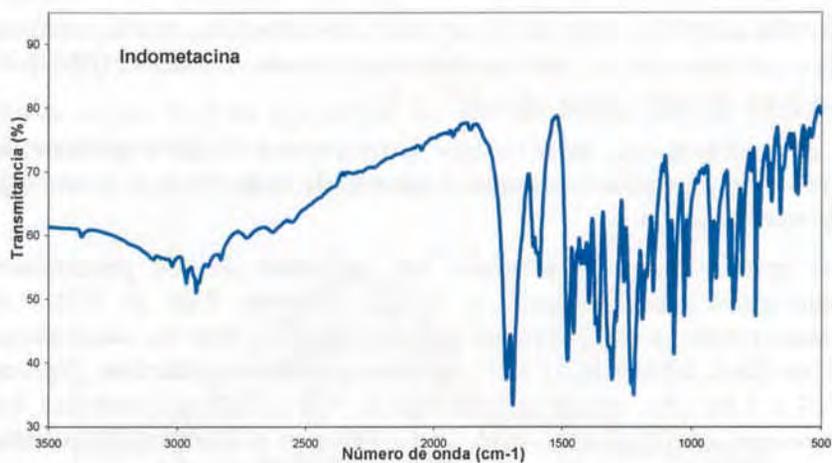


Fig. 9.20. Espectro de FTIR de indometacina.

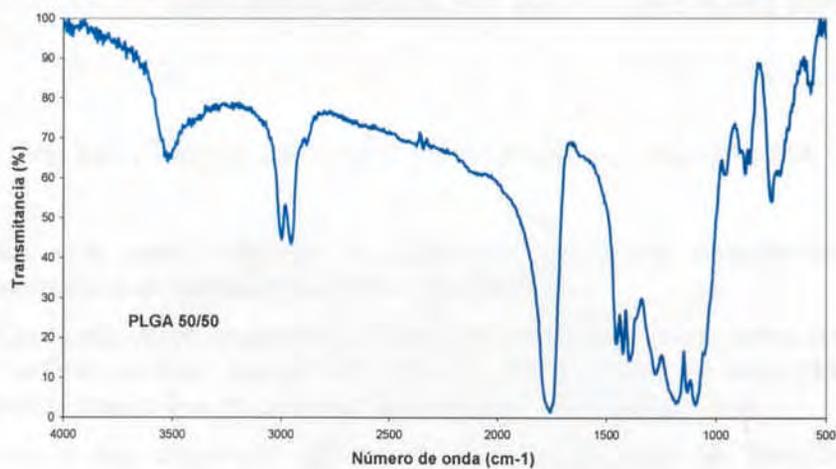


Fig. 9.21. Espectro de FTIR de PLGA 50/50 viscosidad 0,20 dL/g.

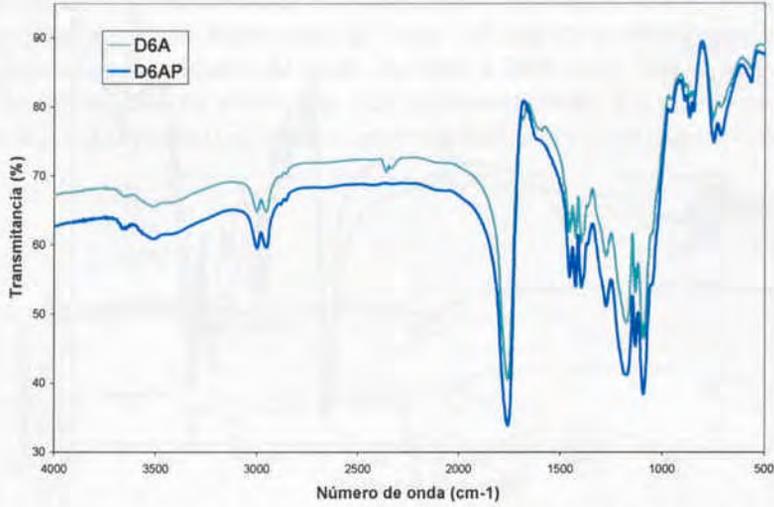


Fig. 9.22. Superposición de los espectros de FTIR de las nanoesferas D6A y su correspondiente placebo D6AP.

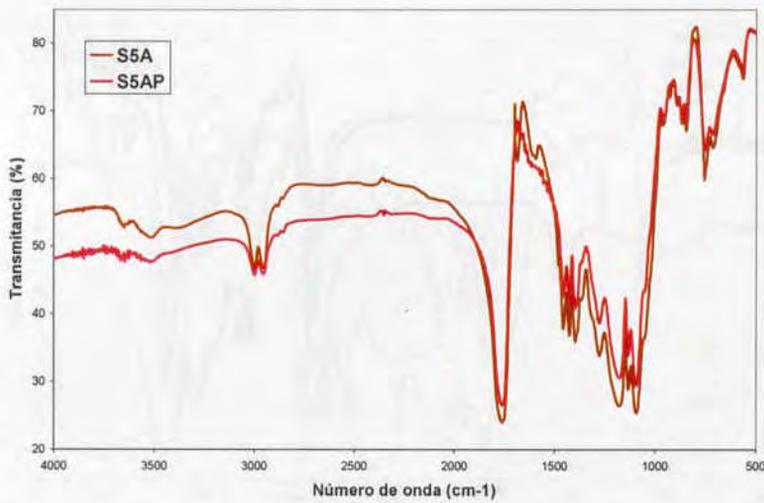


Fig. 9.23. Superposición de los espectros de FTIR de las nanoesferas S5A y su correspondiente placebo S5AP.

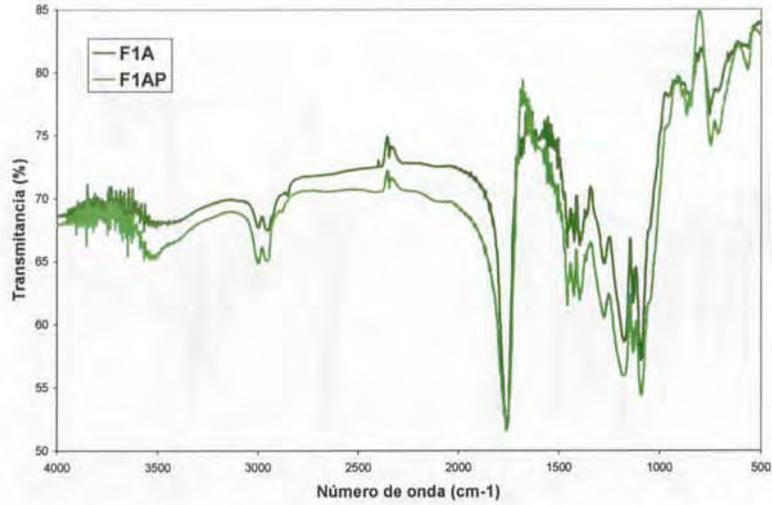


Fig. 9.24. Superposición de los espectros de FTIR de las nanoesferas F1A y su correspondiente placebo F1AP.

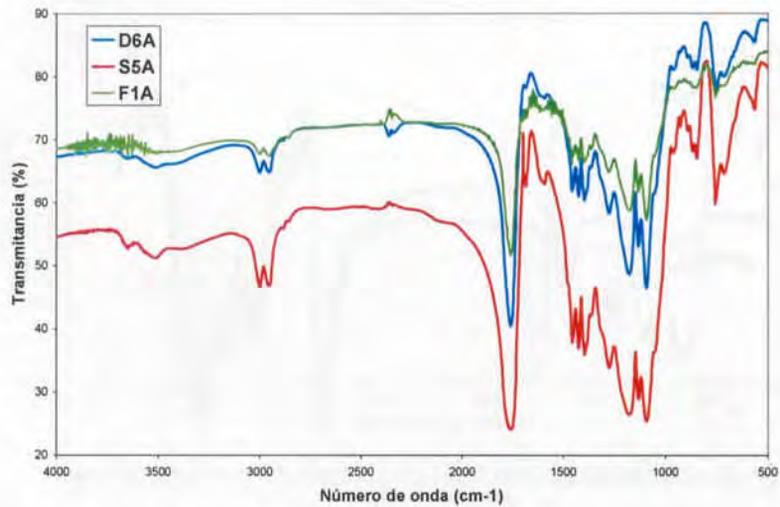


Fig. 9.25. Superposición de los espectros de FTIR de los representantes de los distintos métodos de encapsulación D6A, S5A y F1A.

Para facilitar su análisis, a continuación se amplia la figura 9.25. En primer lugar se representa la zona del espectro correspondiente al intervalo de número de onda de 3500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ , con la asignación de las bandas de absorción más representativas, y a continuación la zona del espectro correspondiente de 2000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (figura 9.26).

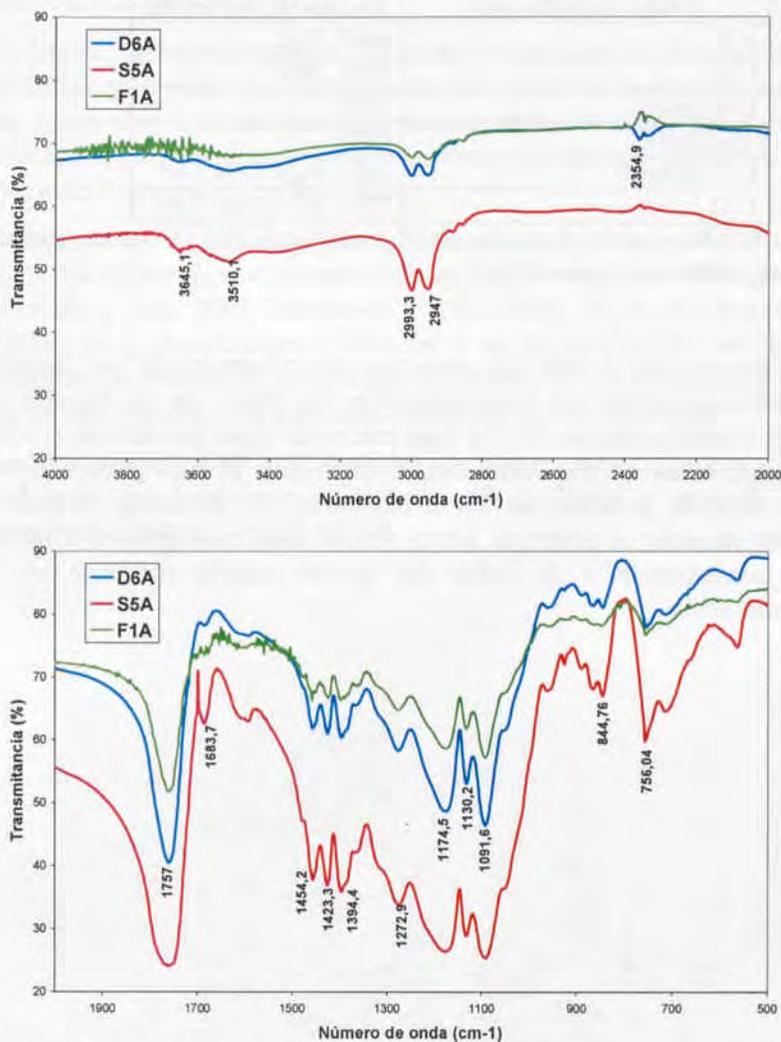


Fig. 9.26. Imagen ampliada de la superposición de los espectros FTIR de las referencias D6A, S5A y F1A en acetato de etilo.

En la tabla 9.9 se detallan las principales bandas de absorción identificadas en los espectros de FTIR y los grupos funciones asignados.

Grupos funcionales	Bandas de absorción
-OH	3645, 3510
CH <sub>3</sub>	2993, 2947
C=O éster	1757
R-CO-NR <sub>2</sub>	1683
C-H alifático	1454, 1423, 1394, 756
C-O	1273, 1174, 1130, 1091

Tabla 9.9. Bandas de absorción de IR de los espectros de las nanoesferas representados en la figura 9.26.

Al comparar en detalle los espectros de infrarrojo de las distintas muestras, se observan principalmente los picos de las bandas de absorción del polímero PLGA. Este hecho, al igual que sucede con los difractogramas correspondientes, es atribuible al bajo porcentaje de indometacina presente en las nanoesferas. No obstante, sí que es posible detectar el principio activo con la señal que aparece a 1683 y que corresponde a la señal del grupo amida presente en la indometacina.

## 9.8. $^1\text{H}$ -Resonancia magnética nuclear

En esta sección se presentan los resultados obtenidos tras los análisis de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) de los lotes de nanoesferas D6A, S5A y F1A.

En base a los espectrogramas obtenidos se han podido caracterizar las distintas moléculas que están formando parte de la composición de las nanoesferas. A continuación se muestran los distintos espectros obtenidos para las nanoesferas y sus correspondientes placebos, junto con el de los productos de partida.

La asignación de los desplazamientos químicos de los protones en las distintas moléculas se ha realizado en base a los datos bibliográficos (Pretsch y cols. 2001, Horisawa y cols. 2002). No se ha entrado en detalle en la descripción de señales ni en la descripción del tipo de protones (presentes en la bibliografía) puesto que el principal objetivo era la identificación de los componentes de las nanoesferas.

En la figura 9.27 se muestra la estructura química de la indometacina, junto con su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN y en la 9.28 las correspondientes al PLGA 50/50.

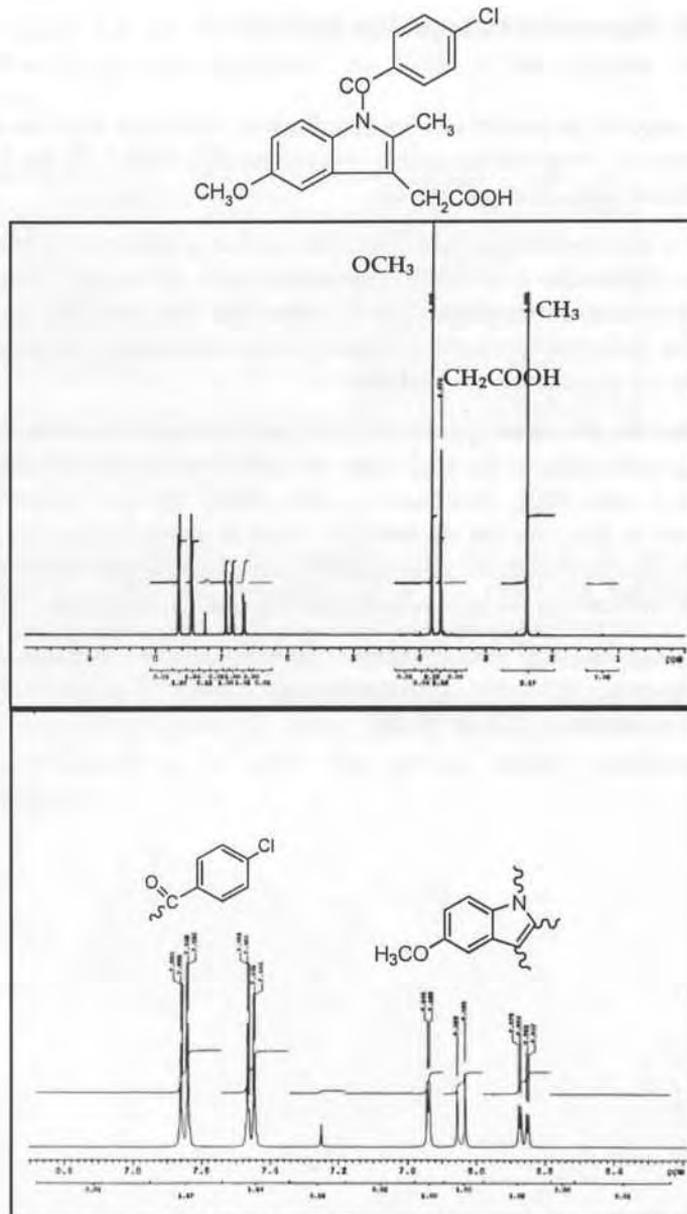


Fig. 9.27. Espectros <sup>1</sup>H-RMN de la indometacina y estructura química en la parte superior.

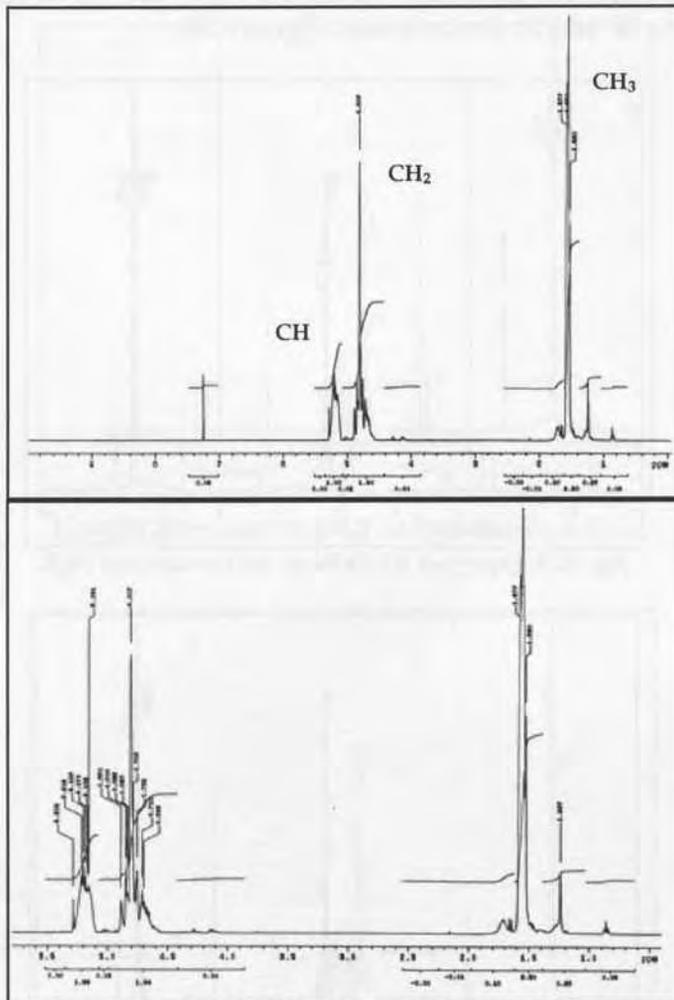
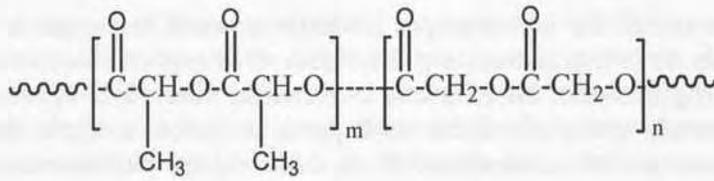


Fig. 9.28. Espectros <sup>1</sup>H-RMN del PLGA y estructura química en la parte superior. "m" son las unidades de PLA y "n" las de PGA.

El análisis de las muestras por  $^1\text{H}$ -RMN muestra la presencia de las señales de la indometacina y del PLGA en el espectro de la muestra D6A (figura 9.29). En el mismo espectro se observa la aparición de una banda ancha alrededor de 2 ppm, atribuible a trazas de PVA presente en las nanoesferas. El espectro de las nanoesferas D6AP placebo presentan las señales típicas del PLGA sin que se observe la presencia de ningún pico adicional (figura 9.30).

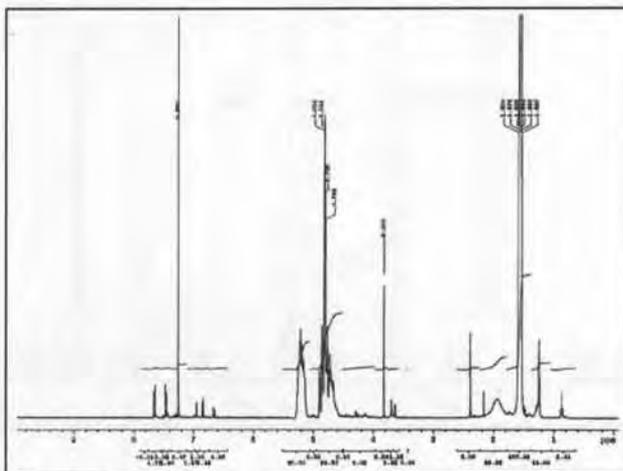


Fig. 9.29. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas D6A.

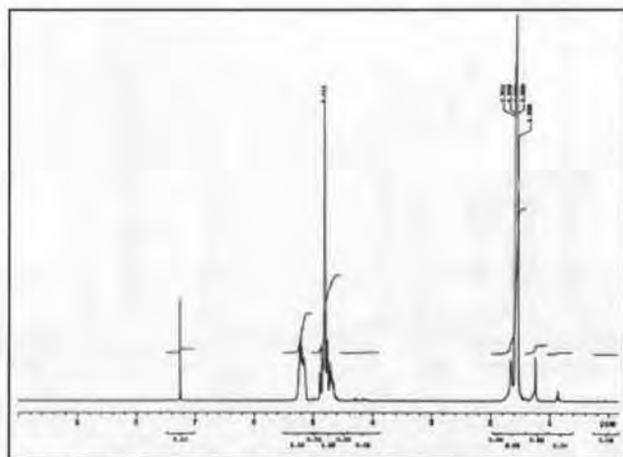


Fig. 9.30. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas D6AP

En la figura 9.31 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas S5A. Se puede observar que es muy parecido al de la muestra D6A, si bien en este caso el pico a 2 ppm es muy pequeño. El espectro de las nanoesferas de la referencia S5AP placebo (figura 9.32) es idéntico al del placebo D6AP, es decir, sólo aparecen las señales del PLGA.

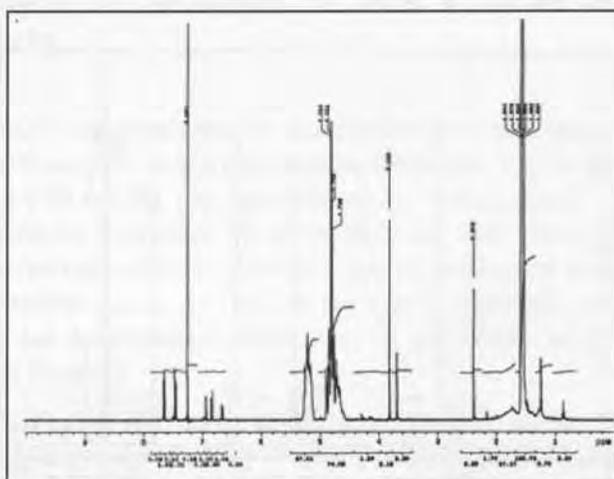


Fig. 9.31. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas S5A.

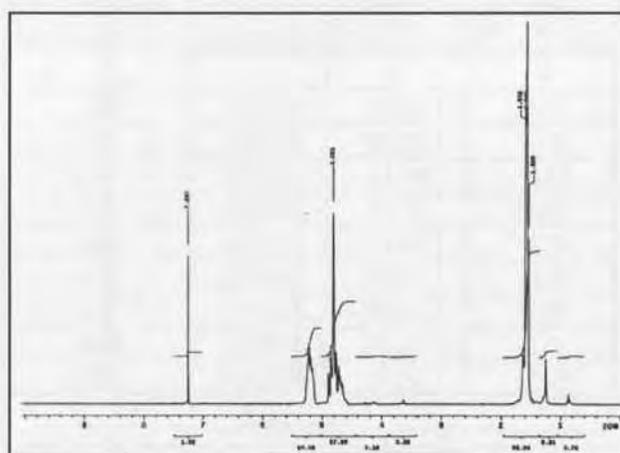


Fig. 9.32. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas S5AP.

En la figura 9.33 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas F1A. Se puede observar que es muy parecido al de la muestra D6A y S5A, si bien en este caso no se observa la aparición de la banda del alcohol del PVA. El espectro de las nanoesferas de la referencia F1AP placebo (figura 9.34) es idéntico al del placebo D6AP y S5AP, es decir, sólo aparecen las señales del PLGA.

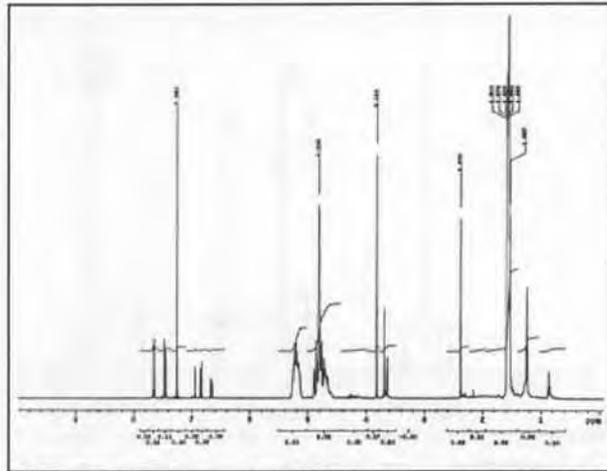


Fig. 9.33. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas F1A.

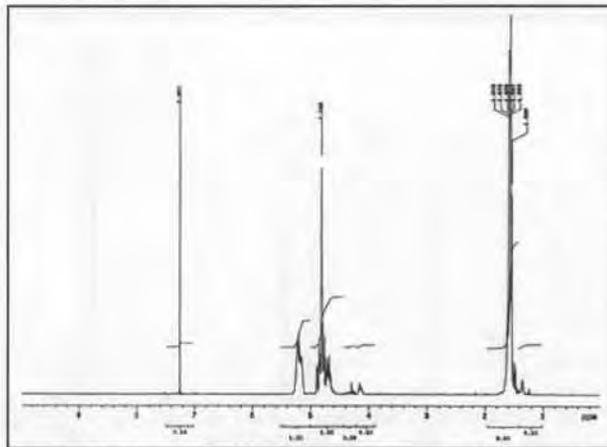


Fig. 9.34. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las nanoesferas F1AP.

Como conclusión se puede afirmar que el RMN resulta ser una herramienta fundamental para caracterizar los diferentes grupos funcionales que están formando parte de la composición de las nanoesferas.

### 9.9. Ensayos de liberación *in vitro* y ajuste a modelos matemáticos

A continuación se presentan los resultados obtenidos tras los ensayos de liberación *in vitro* de las nanoesferas D6A, S5A y F1A (tablas 9.10a-c y figuras 9.35 y 9.36). Las condiciones de realización de los ensayos de liberación se describen en el capítulo 3.4. Los resultados que se presentan corresponden al promedio de 12 replicados y aparecen en forma de tablas donde se reflejan las concentraciones, el porcentaje liberado y las desviaciones estándar (DS) promedio, en cada tiempo de toma de muestra.

Para el cálculo del MDT se ha asumido un modelo no compartimental y una administración extravascular. El cálculo se ha realizado con el programa WinNonlin 4.1.

D6A (promedio 12 replicados)			
Tiempo (min)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS %
0	0	0	0
30	0,0044	11,51	3,37
60	0,0105	28,28	1,35
120	0,0151	41,38	2,13
240	0,0197	53,98	1,99
360	0,0204	55,87	3,26
480	0,0209	58,54	11,86
1440	0,0197	54,74	9,28
1800	0,0187	51,94	8,54
2880	0,0186	52,02	10,73
MDT (min)	1449,1280		

Tabla 9.10a. Datos de liberación de la referencia D6A.

S5A (promedio 12 replicados)			
Tiempo (min)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS %
0	0	0	0
30	0,0094	14,46	9,41
60	0,0200	31,10	12,03
120	0,0255	39,90	7,45
240	0,0319	50,13	3,96
360	0,0314	49,42	2,71
480	0,0299	46,97	1,49
1440	0,0292	45,97	0,03
1800	0,0281	44,24	0,73
2880	0,0278	43,79	0,13
MDT (min)	1442,3395		

Tabla 9.10b. Datos de liberación de la referencia S5A.

F1A (promedio 12 replicados)			
Tiempo (min)	Conc (mg/mL)	Liberación %	DS %
0	0	0	0
30	0,0096	16,91	3,64
60	0,0152	26,54	1,62
120	0,0192	33,35	0,41
240	0,0205	35,89	2,18
360	0,0202	35,32	2,59
480	0,0193	33,83	3,37
1440	0,0199	35,05	6,60
1800	0,0198	34,90	6,78
2880	0,0233	40,74	3,23
MDT (min)	1505,1883		

Tabla 9.10c. Datos de liberación de la referencia F1A.

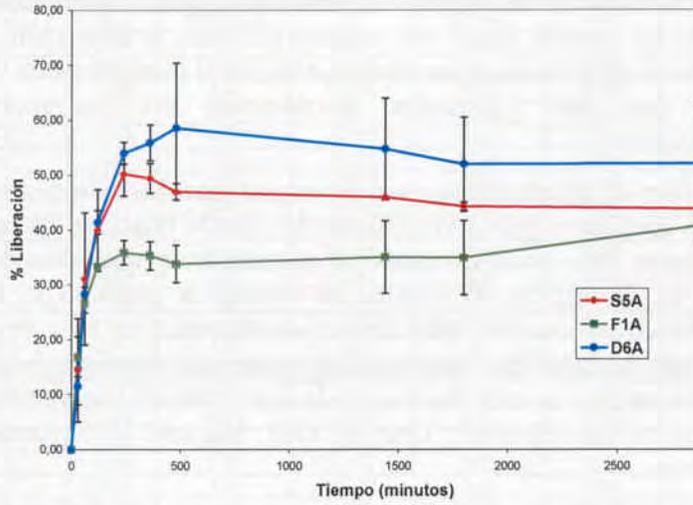


Fig. 9.35. Perfil de liberación *in vitro* de las nanoesferas D6A, S5A y F1A.

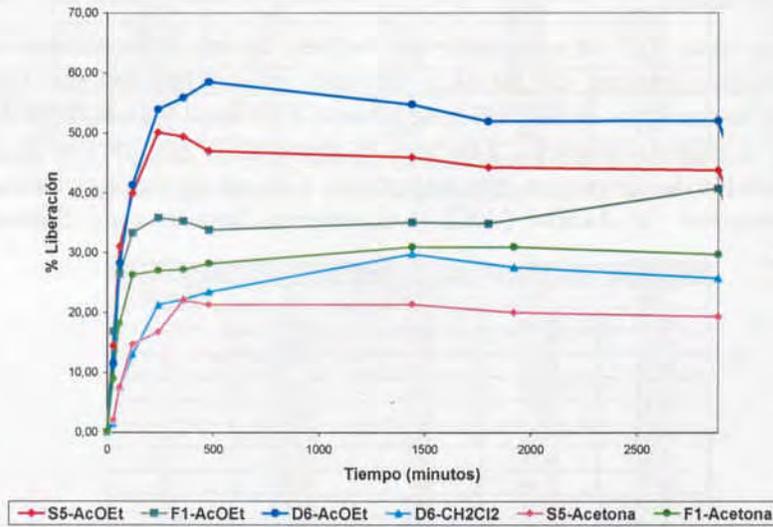


Fig. 9.36. Comparación del perfil de liberación *in vitro* de las nanoesferas D6A, S5A y F1A elaboradas con acetato de etilo y comparación con sus homólogos elaborados con los disolventes originales.

Según se observa en los perfiles de liberación, junto con los valores de MDT de las nuevas series con acetato de etilo, la liberación de las nanoesferas de indometacina elaboradas con el método verde es más rápida que las elaboradas inicialmente con acetona y/o diclorometano.

Los perfiles de liberación *in vitro* de las tres referencias estudiadas se analizan con el programa WinNonlin 4.1. con la finalidad de intentar ajustarlos a tres posibles modelos matemáticos que describan el patrón de liberación. Teniendo en cuenta la morfología de las nanoesferas, así como el hecho de que son sistemas matriciales que no se disgregan, se eligen tres posibles modelos: ecuación de primer orden, Higuchi o de raíz cuadrada y la ecuación de Hixson y Crowell o de raíz cúbica (Hixson y Crowell 1931, Higuchi 1963, Karasulu y cols. 2003).

El ajuste se realiza en las primeras ocho horas del ensayo de liberación, que corresponde al intervalo de liberación rápida de indometacina.

En la tabla 9.11 se muestran los valores de las estimaciones del porcentaje máximo de fármaco liberado en las nanoesferas D6A, según la ecuación de orden 1 y de Hixson y Crowell y en la tabla 9.12 para el modelo Higuchi. También se muestra la estimación de las constantes de liberación, sus respectivos CV, así como el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio Bayesano de Schwarz (SBC).

D6A, ajuste de primer orden						
Muestra	$Q_{max}$	CV ( $Q_{max}$ )	$K_1$	CV ( $K_1$ )	AIC	SBC
1	63,10	8,08	0,0079	23,47	39,16	39,05
2	63,45	9,31	0,0077	26,6	40,71	40,60
3	64,73	4,34	0,0094	13,53	32,90	32,79
4	63,82	3,92	0,0099	12,45	31,80	31,69
5	68,59	4,97	0,0073	13,86	32,27	32,16
6	68,82	6,13	0,0071	16,85	34,80	34,69
7	51,38	5,84	0,0092	18,05	33,57	33,46
8	51,05	5,51	0,0096	17,32	33,14	33,03
9	53,16	3,5	0,0137	12,31	30,10	29,99
10	52,59	3,22	0,0142	11,47	29,01	28,90
11	55,09	2,33	0,0141	8,28	25,09	24,98
12	55,01	2,43	0,0138	8,58	25,54	25,43
<b>Promedio</b>	59,23	<b>Promedio</b>	0,0103	<b>Promedio</b>	32,34	32,23
<b>DS</b>	6,79	<b>DS</b>	0,028	<b>DS</b>	4,67	4,67
D6A, ajuste de Hixson y Crowell						
Muestra	$Q_{max}$	CV ( $Q_{max}$ )	$K_2$	CV ( $K_2$ )	AIC	SBC
1	54,18	6,06	0,0123	6,35	36,00	35,90
2	54,48	7,53	0,0121	8,80	38,86	38,75
3	57,56	3,35	0,0127	3,27	28,72	28,61
4	57,53	3,35	0,0127	3,35	28,70	28,59
5	64,57	4,56	0,0092	11,73	34,48	34,37
6	64,67	5,14	0,0089	13,08	36,11	36,00
7	49,62	4,75	0,0098	11,55	30,14	30,03
8	49,52	4,96	0,0100	11,61	30,52	30,41
9	53,76	8,57	0,0110	15,90	39,27	39,16
10	53,35	8,84	0,0111	15,82	39,67	39,56
11	55,81	8,14	0,0112	14,65	39,14	39,03
12	55,64	7,91	0,0112	14,37	38,67	38,56
<b>Promedio</b>	55,89	<b>Promedio</b>	0,0110	<b>Promedio</b>	35,02	34,91
<b>DS</b>	5,00	<b>DS</b>	0,0013	<b>DS</b>	4,37	4,38

Tabla 9.11. Valores individuales de  $Q_{max}$ ,  $K$ , sus CV, valores de AIC y SBC para la serie de experimentos D6A, según el modelo de orden 1 y Hixson y Crowell.

D6A, ajuste de Higuchi				
Muestra	$K_3$	CV ( $K_3$ )	AIC	SBC
1	3,0886	6,72	42,66	42,56
2	3,0702	7,40	43,93	41,58
3	3,3217	4,42	37,83	42,85
4	3,3135	4,34	37,53	44,51
5	3,2860	4,44	37,74	42,93
6	3,2672	4,99	39,29	43,33
7	2,5966	7,64	42,04	45,85
8	2,6062	7,68	42,15	47,06
9	2,9063	7,87	44,02	51,60
10	2,8945	7,90	44,02	51,77
11	3,0236	7,89	44,61	49,19
12	3,0100	7,90	44,56	48,75
<b>Promedio</b>	3,0320	<b>Promedio</b>	41,70	41,65
<b>DS</b>	0,2512	<b>DS</b>	2,820	2,820

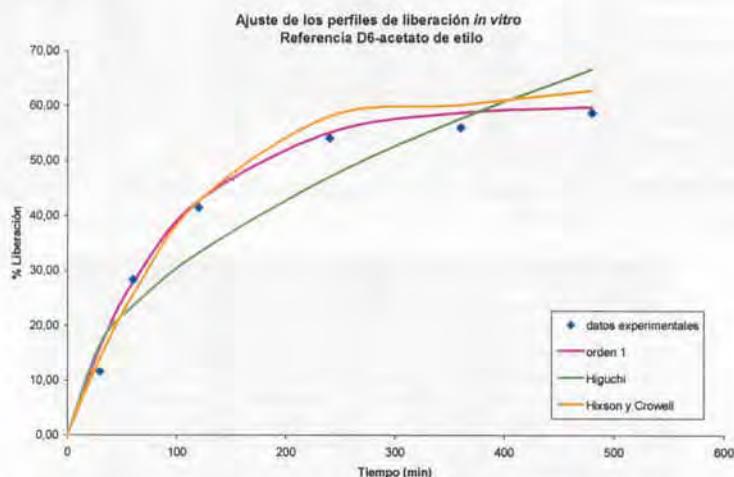
Tabla 9.12. Valores individuales de  $K_3$  y su CV, junto con los valores de AIC y SBC, para la serie de experimentos D6A, según el modelo de Higuchi.

En la tabla 9.13 se comparan los datos experimentales de porcentaje de fármaco liberado con los valores teóricos, según los distintos modelos ajustados en las nanoesferas D6A.

Referencia D6A				
Tiempo (min)	% liberado	Predicción orden 1	Predicción Hixson y Crowell	Predicción Higuchi
0	0	0	0	0
30	11,51	15,98	13,95	16,61
60	28,28	27,71	25,55	23,49
120	41,38	42,62	42,57	33,21
240	53,98	54,97	57,95	46,97
360	55,87	58,54	60,00	57,53
480	58,54	59,58	62,60	66,43

**Tabla 9.13.** Comparación de los valores experimentales y teóricos de la serie D6A tras el ajuste a los modelos de orden 1, Hixson y Crowell e Higuchi.

En la figura 9.36 se muestran los perfiles de liberación experimentales y los estimados para los modelos de orden 1, Hixson y Crowell e Higuchi, en la referencia D6A.



**Fig. 9.36.** Comparación de los perfiles de liberación estimados y observados en las nanoesferas de la serie D6A.

En la tabla 9.14 se muestran los valores de las estimaciones del porcentaje máximo de fármaco liberado en las nanoesferas S5A, según la ecuación de orden 1 y de Hixson y Crowell y en la tabla 9.15 para el modelo Higuchi. También se muestra la estimación de las constantes de liberación, sus respectivos CV, así como los criterios AIC y SBC.

S5A, ajuste de primer orden						
Muestra	$Q_{max}$	CV ( $Q_{max}$ )	$K_1$	CV ( $K_1$ )	AIC	SBC
1	50,55	14,68	0,0057	35,95	38,85	38,74
2	49,91	12,54	0,0059	31,46	37,30	37,19
3	51,07	5,07	0,0111	16,76	33,32	33,21
4	50,26	5,12	0,0133	17,86	34,48	34,37
5	48,01	2,50	0,0134	8,72	23,81	23,70
6	47,90	2,90	0,0137	10,20	26,01	25,90
7	53,45	4,90	0,0133	17,07	34,70	34,59
8	52,62	4,40	0,0163	16,32	34,06	33,96
9	48,12	2,85	0,0324	13,71	28,83	28,73
10	48,00	2,68	0,0337	13,20	28,06	27,95
11	52,21	2,07	0,0212	8,37	24,40	24,30
12	52,10	2,14	0,0199	8,47	24,64	24,53
<b>Promedio</b>	50,35	5,15	0,0167	<b>Promedio</b>	30,70	30,60
<b>DS</b>	2,00	4,13	0,0089	<b>DS</b>	5,35	5,35
S5A, ajuste de Hixson y Crowell						
Muestra	$Q_{max}$	CV ( $Q_{max}$ )	$K_2$	CV ( $K_2$ )	AIC	SBC
1	45,72	8,40	0,0070	19,94	36,91	36,80
2	45,53	7,16	0,0072	17,25	34,95	34,84
3	50,14	6,76	0,0106	13,39	34,86	34,75
4	50,39	9,11	0,0109	15,99	39,34	39,24
5	48,11	7,08	0,0108	12,22	35,19	35,08
6	48,13	7,66	0,0108	13,08	36,33	36,22
7	53,65	8,73	0,0111	15,54	39,59	39,48
8	53,95	11,18	0,0114	17,98	43,38	43,27
9	51,98	19,66	0,0116	27,29	51,18	51,07
10	51,94	20,04	0,0116	27,65	51,45	51,35
11	54,79	13,88	0,0116	20,62	46,85	46,74
12	54,47	13,13	0,0115	20,03	45,91	45,81
<b>Promedio</b>	50,73	11,07	0,0105	<b>Promedio</b>	41,33	41,22
<b>DS</b>	3,02	4,71	0,0016	<b>DS</b>	6,23	6,23

Tabla 9.14. Valores individuales de  $Q_{max}$ ,  $K$ , sus CV, valores de AIC y SBC para la serie de experimentos S5A, según el modelo de orden 1 y Hixson y Crowell.

S5A, ajuste de Higuchi				
Muestra	$K_3$	CV ( $K_3$ )	AIC	SBC
1	2,2067	9,37	42,61	42,56
2	2,2161	8,70	41,63	41,58
3	2,6884	7,85	42,91	42,85
4	2,7294	8,71	44,57	44,51
5	2,6088	8,14	42,98	42,93
6	2,6111	8,37	43,38	43,33
7	2,8951	9,03	45,90	45,85
8	2,9402	9,70	47,12	47,06
9	2,8660	13,77	51,66	51,60
10	2,8666	13,92	51,82	51,77
11	3,0035	11,05	49,24	49,19
12	2,9761	10,81	48,81	48,75
Promedio	2,7173	Promedio	46,05	46,00
DS	0,2715	DS	3,61	3,61

Tabla 9.15. Valores individuales de  $K_3$  y su CV, junto con los valores de AIC y SBC, para la serie de experimentos S5A, según el modelo de Higuchi.

En la tabla 9.16 se comparan los datos experimentales de porcentaje de fármaco liberado con los valores teóricos, según los distintos modelos ajustados en las nanoesferas S5A.

Referencia S5A				
Tiempo (min)	% liberado	Predicción orden 1	Predicción Hixson y Crowell	Predicción Higuchi
0	0	0	0	0
30	14,46	19,66	13,36	14,88
60	31,10	31,59	24,57	21,05
120	39,90	43,22	41,31	29,76
240	50,13	49,08	57,30	42,09
360	49,42	49,88	60,00	51,56
480	47,18	49,98	61,44	59,53

Tabla 9.16. Comparación de los valores experimentales y teóricos de la serie S5A tras el ajuste a los modelos de orden 1, Hixson y Crowell e Higuchi.

En la figura 9.37 se muestran los perfiles de liberación experimentales y los estimados para los modelos de orden 1, Hixson y Crowell e Higuchi, en la referencia S5A.

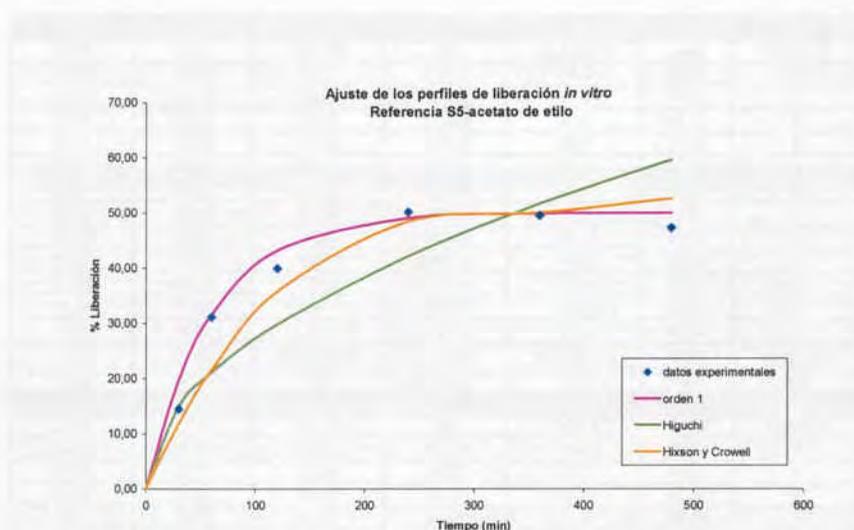


Fig. 9.37. Comparación de los perfiles de liberación estimados y observados en las nanoesferas de la serie S5A.

En la tabla 9.17 se muestran los valores de las estimaciones del porcentaje máximo de fármaco liberado en las nanoesferas F1A, según la ecuación de orden 1 y de Hixson y Crowell y en la tabla 9.18 para el modelo Higuchi. También se muestra la estimación de las constantes de liberación, sus respectivos CV, así como los criterios AIC y SBC.

F1A, ajuste de primer orden						
Muestra	$Q_{max}$	CV ( $Q_{max}$ )	$K_1$	CV ( $K_1$ )	AIC	SBC
1	42,86	2,64	0,0133	9,23	23,01	22,90
2	42,57	2,31	0,0143	8,24	21,43	21,32
3	34,15	2,94	0,0241	12,44	23,73	23,62
4	34,15	2,86	0,0242	12,11	23,36	23,25
5	34,22	1,54	0,0474	9,43	16,26	16,15
6	34,00	1,22	0,0577	8,86	13,20	13,09
7	39,49	6,26	0,0164	23,22	34,99	34,88
8	39,33	5,48	0,0169	20,56	33,22	33,11
9	29,38	4,26	0,0206	17,04	26,35	26,24
10	29,33	4,27	0,0211	17,21	26,43	26,32
11	32,55	2,04	0,0334	10	18,79	18,68
12	32,34	2,21	0,0405	12,13	20,24	20,13
Promedio	35,36	Promedio	0,0275	Promedio	23,42	23,31
DS	4,63	DS	0,0142	DS	6,32	6,32
F1A, ajuste Hixson y Crowell						
Muestra	$Q_{max}$	CV ( $Q_{max}$ )	$K_2$	CV ( $K_2$ )	AIC	SBC
1	42,95	6,95	0,0104	12,00	33,34	33,23
2	42,99	7,93	0,0105	13,18	35,32	35,21
3	36,25	14,89	0,0102	21,14	42,17	42,06
4	36,28	14,96	0,0102	21,39	42,23	42,12
5	37,15	23,05	0,0106	27,06	49,16	49,05
6	37,14	24,49	0,0107	28,37	50,04	49,93
7	40,46	12,96	0,0103	20,81	41,43	41,32
8	40,43	12,77	0,0104	20,17	41,25	41,15
9	30,70	14,54	0,0096	21,23	39,44	39,33
10	30,74	14,99	0,0096	22,08	39,86	39,75
11	35,08	20,20	0,0102	27,13	46,14	46,03
12	35,22	22,08	0,0102	29,23	47,48	47,37
Promedio	37,11	Promedio	0,0102	Promedio	42,32	42,21
DS	3,80	DS	0,0003	DS	5,16	5,16

Tabla 9.17. Valores individuales de  $Q_{max}$ ,  $K$ , sus CV, valores de AIC y SBC para la serie de experimentos F1A, según el modelo de orden 1 y Hixson y Crowell.

F1A, ajuste de Higuchi				
Muestra	$K_3$	CV ( $K_3$ )	AIC	SBC
1	2,3265	8,26	41,60	41,54
2	2,3362	8,61	42,23	42,18
3	2,0081	10,40	42,76	42,70
4	2,0077	10,48	42,86	42,81
5	2,0804	15,57	48,90	48,84
6	2,0848	16,22	49,50	49,44
7	2,1888	11,67	45,58	45,52
8	2,1919	11,47	45,36	45,30
9	1,6835	11,50	41,69	41,64
10	1,6827	11,79	42,04	41,98
11	1,9351	14,34	46,73	46,68
12	1,9463	15,22	47,65	47,59
Promedio	2,0393	Promedio	44,74	44,69
DS	0,2122	DS	2,92	2,92

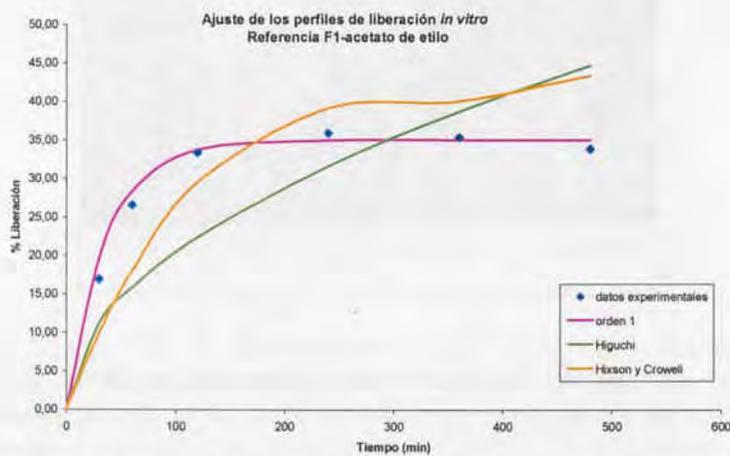
Tabla 9.18. Valores individuales de  $K_3$  y su CV, junto con los valores de AIC y SBC, para la serie de experimentos F1A, según el modelo de Higuchi.

En la tabla 9.19 se comparan los datos experimentales de porcentaje de fármaco liberado con los valores teóricos, según los distintos modelos ajustados en las nanoesferas F1A.

Referencia F1A				
Tiempo (min)	% liberado	Predicción orden 1	Predicción Hixson y Crowell	Predicción Higuchi
0	0	0	0	0
30	16,91	19,66	9,84	11,17
60	26,54	28,28	17,92	15,80
120	33,35	33,71	29,49	22,34
240	35,89	34,95	39,11	31,59
360	35,32	35,00	40,02	38,69
480	33,83	35,00	43,36	44,68

**Tabla 9.19.** Comparación de los valores experimentales y teóricos de la serie F1A tras el ajuste a los modelos de orden 1, Hixson y Crowell e Higuchi.

En la figura 9.38 se muestran los perfiles de liberación experimentales y los estimados para los modelos de orden 1, Hixson y Crowell e Higuchi, en la referencia F1A.



**Fig. 9.38.** Comparación de los perfiles de liberación estimados y observados en las nanoesferas de la serie F1A.

### 9.10. Microscopía de fuerza atómica

En este capítulo se muestran los resultados del estudio topográfico de las nanoesferas de las series D6A, S5A y F1A elaboradas con acetato de etilo y analizadas con la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM).

En la figura 9.39 se muestra la imagen de las nanoesferas D6A donde se puede observar con detalle la forma esférica de las partículas.

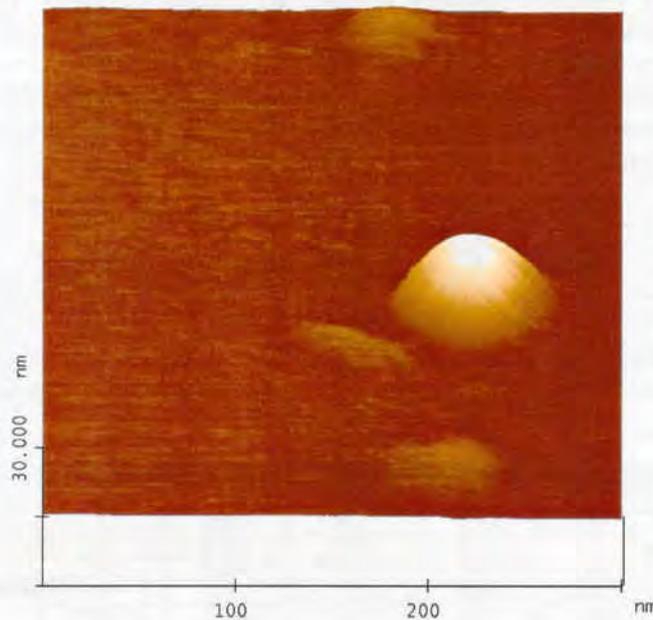
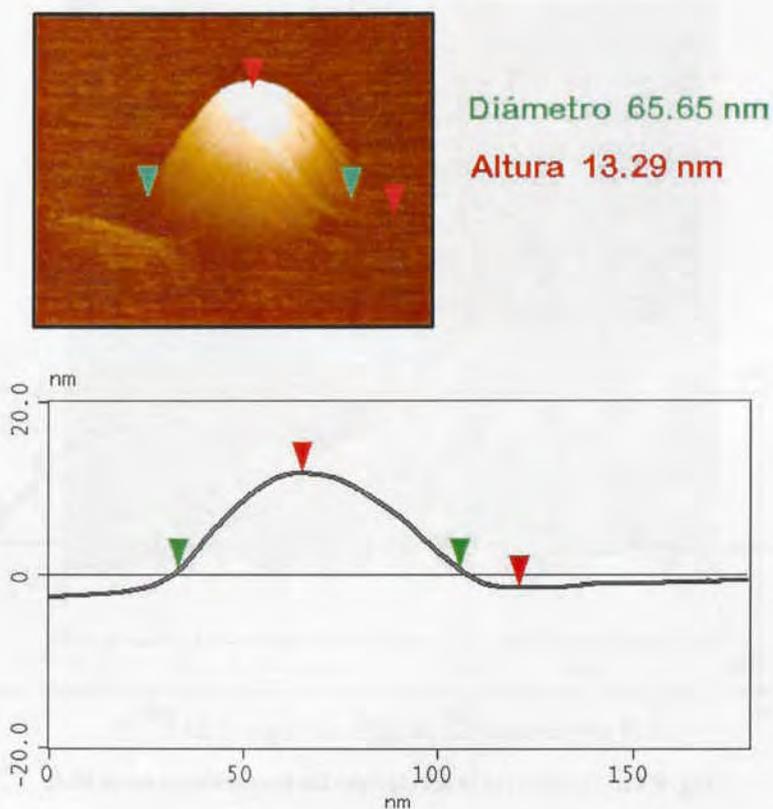


Fig. 9.39. Imagen de AFM de las nanoesferas D6A.

Las determinaciones de tamaño de partícula se muestran en la figura 9.40. El diámetro medio de las partículas ( $n=6$ ) corresponde a un valor de  $38,615 \pm 16,97$  nm, y la altura media es de  $5,53 \pm 3,45$  nm.



**Fig. 9.40.** Análisis de la sección de las nanoesferas serie D6A.

En la figura 9.41 se muestra en detalle la imagen de sección topográfica de dos nanoesferas de la serie S5A. Los valores promedios ( $n=12$ ) de las medidas del diámetro de partícula son  $36,18 \pm 9,51$  nm y los valores de altura corresponden a  $3,86 \pm 0,43$  nm.

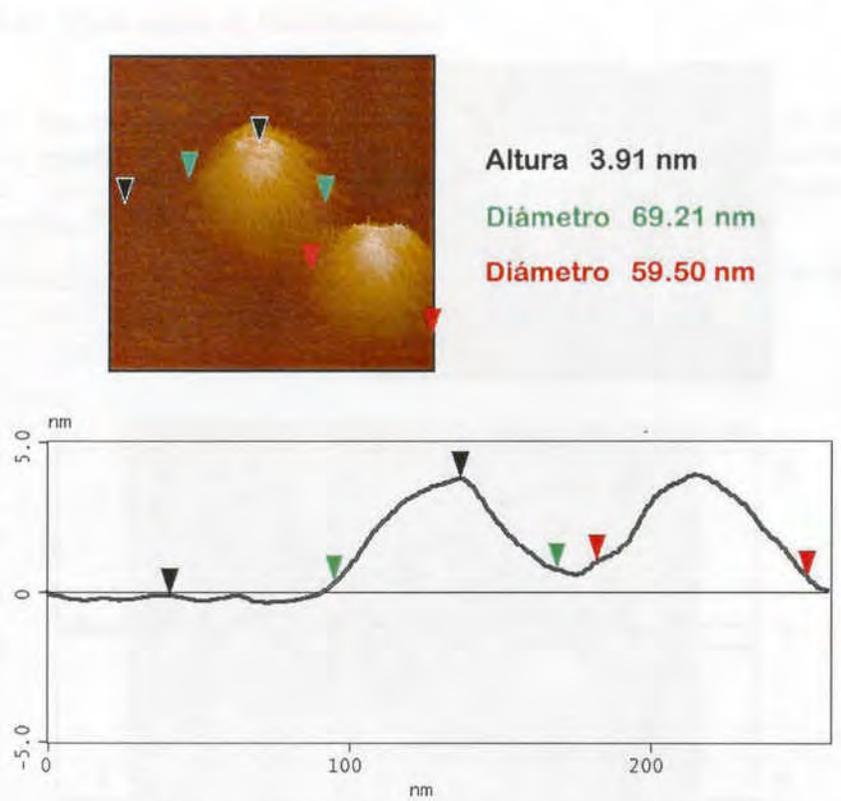


Fig. 9.41. Análisis de la sección de las nanoesferas serie S5A.

La imagen topográfica de las partículas de la serie F1A muestra que las nanoesferas se agrupan en forma de racimos (figura 9.42).

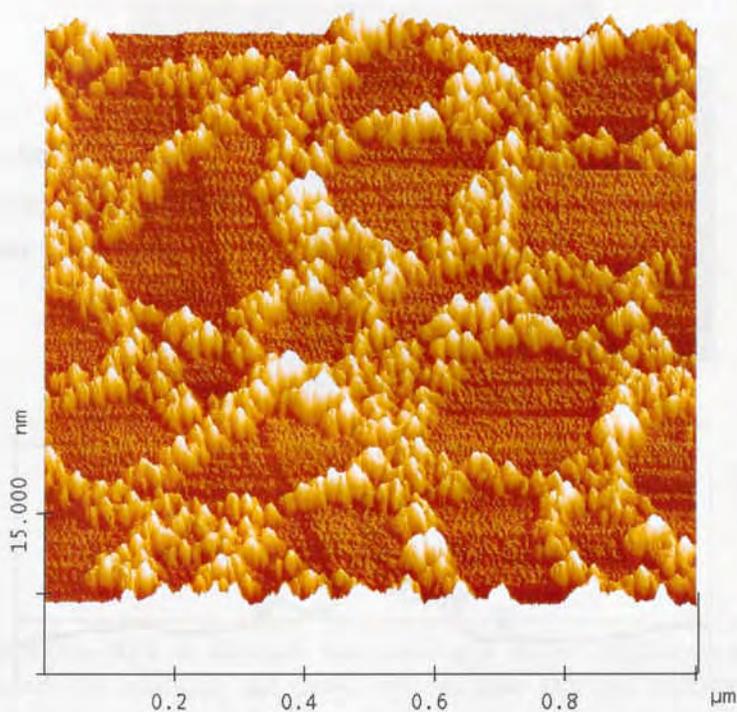


Fig. 9.42. Imagen de AFM de las nanoesferas F1A.

El análisis de la sección de una partícula se muestra en la figura 9.43. El diámetro medio de las partículas ( $n=18$ ) corresponde a un valor de  $14,58 \pm 2,93$  nm y la altura media es de  $1,22 \pm 0,20$  nm.

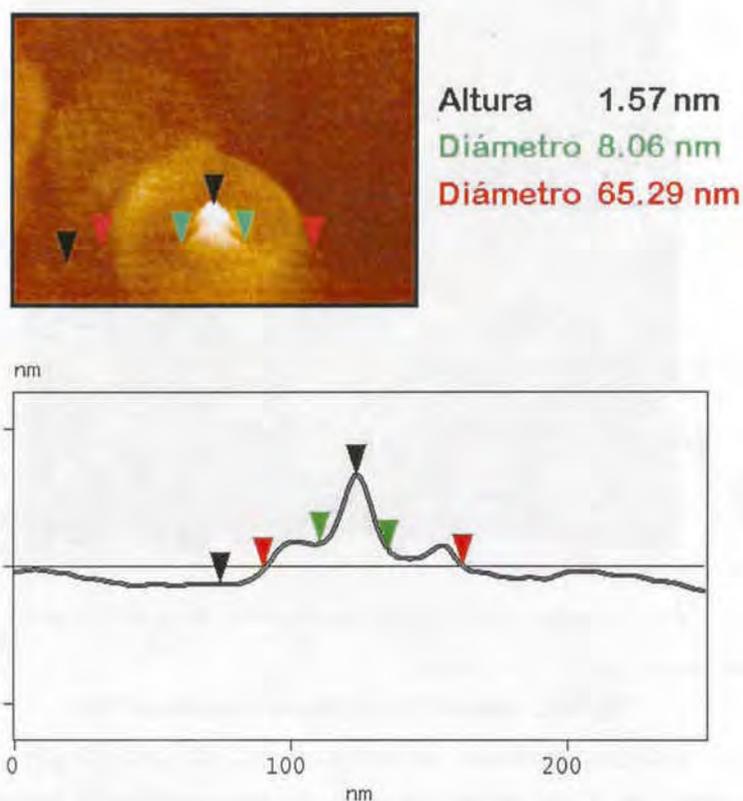


Fig. 9.43. Análisis de la sección de las nanoesferas serie F1A.

Es de destacar el nivel de detalle que se consigue observar con esta imagen, puesto que se observa el halo alrededor de la nanoesfera, probablemente originado por el quitosano que forma parte de la cubierta.

Con la finalidad de identificar posibles diferencias en la superficie de las nanoesferas de la serie F se analizan también las muestras del lote F5A. La topografía de la muestra F5A se presenta en la figura 9.44.

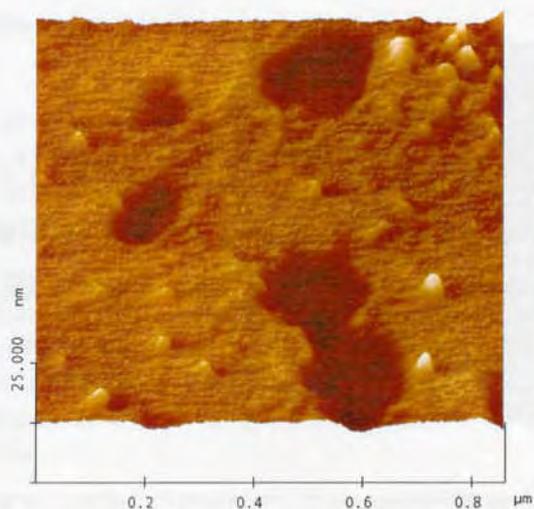


Fig. 9.44. Análisis de AFM de las nanoesferas F5A.

En la figura 9.44 se observa una capa que cubre prácticamente la totalidad del sustrato, así como nanoesferas aisladas distribuidas uniformemente sobre dicha capa.

El análisis de la sección de una partícula se muestra en la figura 9.45. El diámetro medio de las partículas ( $n=24$ ) corresponde a un valor de  $19,68 \pm 9,88$  nm, y la altura media de  $2,58 \pm 0,94$  nm.

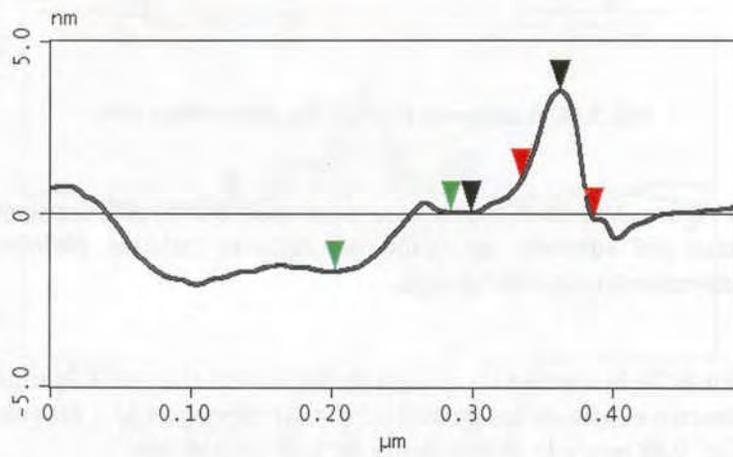


Fig. 9.45. Análisis de la sección de las nanoesferas serie F5A.

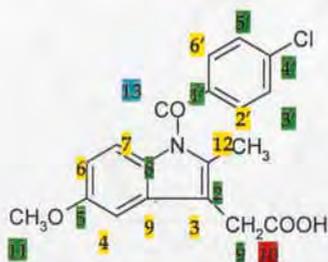
### 9.11. Espectroscopía de fotoelectrones X

Los análisis de XPS se realizan con la finalidad de entender mejor los mecanismos de interacción del principio activo y el polímero de las nanoesferas y también se pretende cuantificar la cantidad de PVA presente en las nanoesferas.

En primer lugar se realiza un análisis sistemático del espectro completo de los precursores que intervienen en la formación de las nanoesferas (PLGA, indometacina y PVA) y a continuación se compara con los espectros de las nanoesferas D6A, S5A, F1A y sus respectivos placebos D6AP, S5AP y F1AP, todos ellos elaborados con acetato de etilo.

Los espectros generales muestran el porcentaje de distribución de la composición atómica superficial, excluyendo al hidrógeno. Los porcentajes que se refieren se expresan en número de átomos.

Con la finalidad de simplificar el tratamiento de los resultados, se asume que algunas posiciones cercanas son equivalentes. Por este motivo, el C1s del espectro de la indometacina se ha dividido en cuatro grupos, con los porcentajes de composición teóricos que se describen a continuación:



Grupo	Carbono	Porcentaje (%)
1	C3, C4, C6, C7, C2', C2', C6', C9, C12	42,11
2	C2, C5, C8, C1', C3', C4', C5', C9, C11	47,37
3	C13	5,26
4	C10	5,26

En la figura 9.46 se muestra la composición atómica superficial de la indometacina y el espectro general del análisis de XPS. Las asignaciones de los grupos funcionales se describen en la figura 9.47.

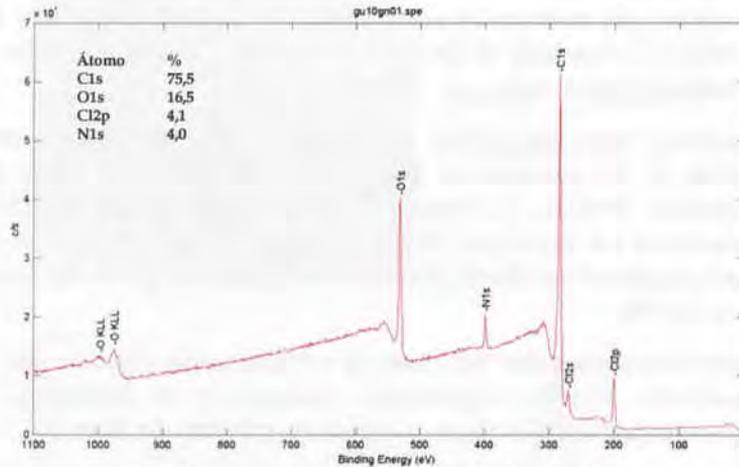


Fig.9.46. Espectro general de la indometacina.

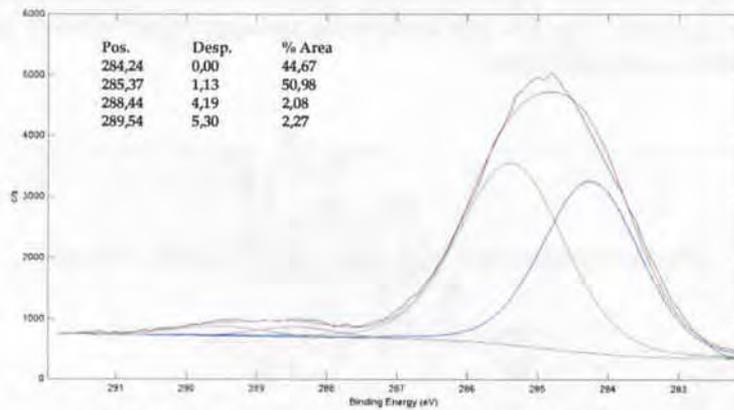


Fig.9.47. Curva de ajuste del C1s en la indometacina.

Según se puede observar, los carbonos alifáticos y aromáticos aparecen a 284,24 eV, los carbonos de éter, C aromáticos  $\alpha$  a N, C aromáticos  $\alpha$  ó  $\beta$  a Cl, y C alifáticos  $\alpha$  a C=O a 285,37 eV, el carbono amídico a 288,44 eV, y el carbono carboxílico a 289,54 eV.

En la figura 9.47 se muestra la composición atómica superficial del PLGA 50/50 y el espectro general del análisis de XPS. Las asignaciones de los grupos funcionales se describen en la figura 9.48.

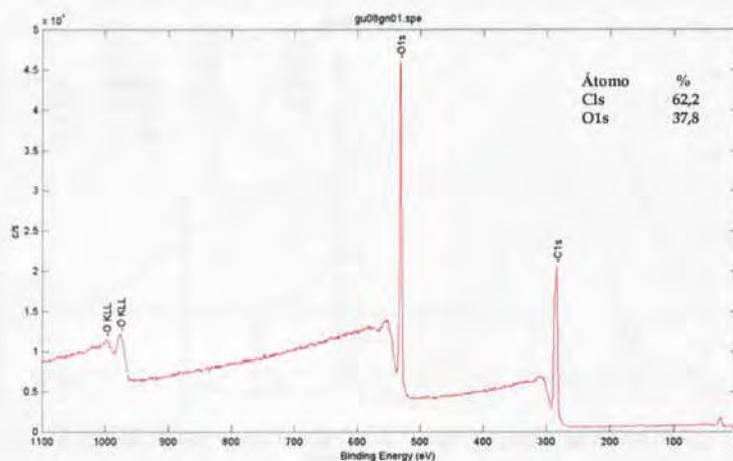


Fig.9.47. Espectro general del PLGA 50/50.

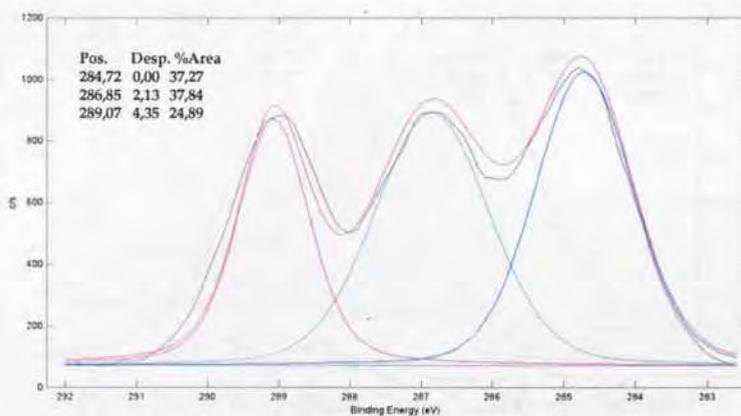


Fig.9.48. Curva de ajuste del C1s en el PLGA 50/50.

Según se puede observar, los carbonos metílicos y la contaminación espúrea aparecen a 284,72 eV, los carbonos de éter y  $\alpha$  a C=O a 286,85 eV, y los carbonos carboxílicos a 289,07 eV.

En la figura 9.49 se muestra la composición atómica superficial del PVA y el espectro general del análisis de XPS. Las asignaciones de los grupos funcionales se describen en la figura 9.50.

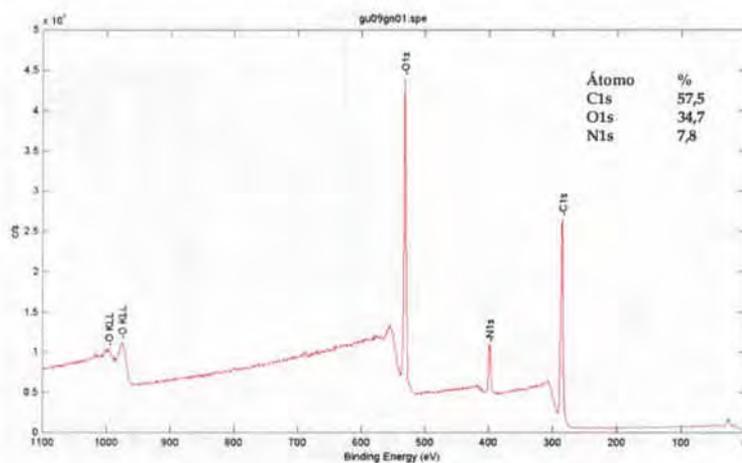


Fig.9.49. Espectro general del PVA.

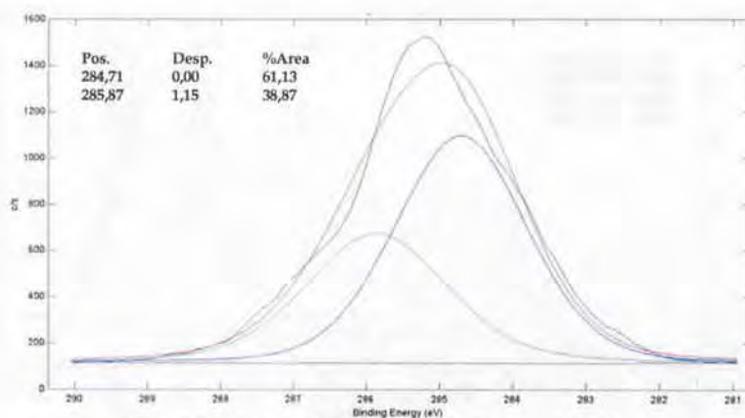


Fig.9.50. Curva de ajuste del C1s en el PVA.

Según se puede observar, los carbonos metílicos y la contaminación espúrea aparecen a 284,71 eV, y los carbonos hidroxílicos a 285,87 eV.

En las figura 9.51 y 9.52 se muestran los espectros de XPS para las nanoesferas D6A y D6AP (placebo), respectivamente.

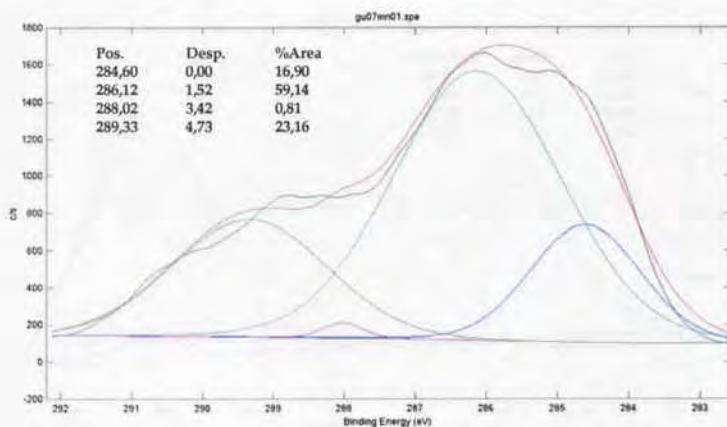


Fig.9.51. Curva de ajuste del C1s en las nanoesferas D6A.

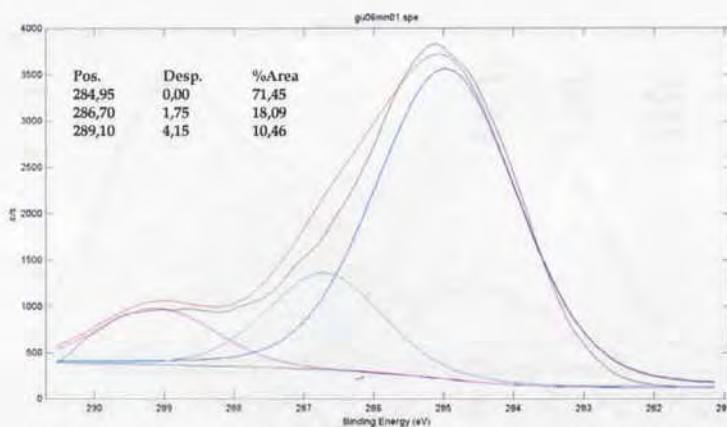


Fig.9.52. Curva de ajuste del C1s en las nanoesferas D6AP.

Se observa que a diferencia de las nanoesferas placebo, en las nanoesferas con indometacina aparece la señal de los C aromáticos  $\alpha$  a N, C aromáticos  $\alpha$  ó  $\beta$  a Cl, y C alifáticos  $\alpha$  a C=O a 286,12 eV y el carbono amídico a 288,02 eV.

En las figura 9.53 y 9.54 se muestran los espectros de XPS para las nanoesferas S5A y S5AP (placebo), respectivamente.

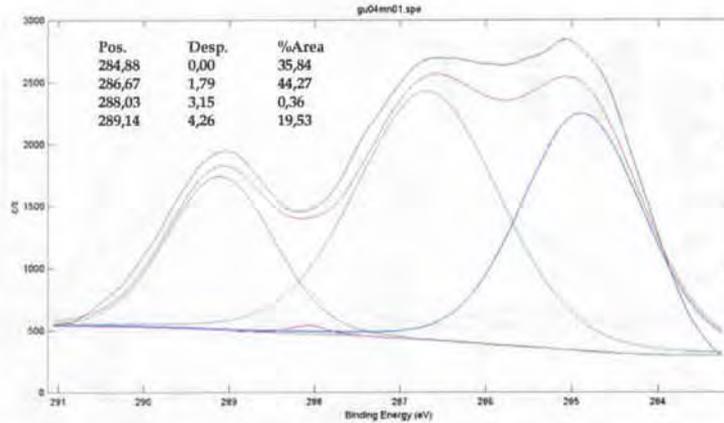


Fig.9.53. Curva de ajuste del C1s en las nanoesferas S5A.

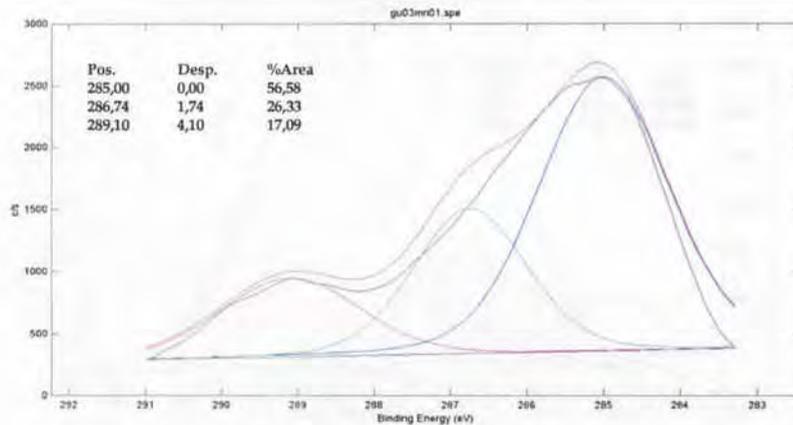


Fig.9.54. Curva de ajuste del C1s en las nanoesferas S5AP.

Se observa que a diferencia de las nanoesferas placebo, en las nanoesferas con indometacina aparece la señal de los C aromáticos  $\alpha$  a N, C aromáticos  $\alpha$  ó  $\beta$  a Cl, y C alifáticos  $\alpha$  a C=O a 286,67 eV y el carbono amídico a 288,03 eV.

En las figura 9.55 y 9.56 se muestran los espectros de XPS para las nanoesferas F1A y F1AP (placebo), respectivamente.

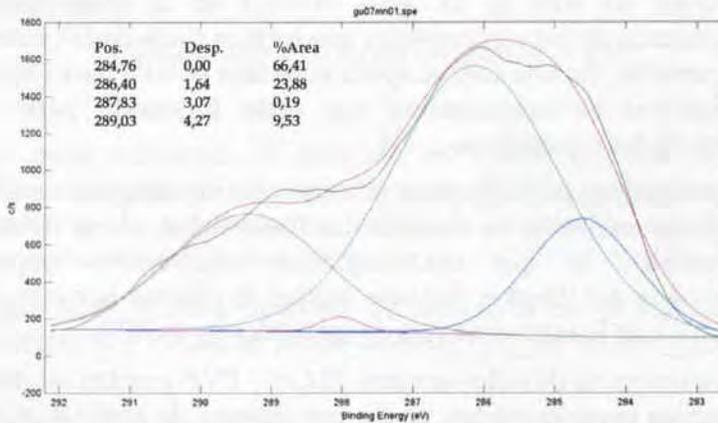


Fig.9.55. Curva de ajuste del C1s en las nanoesferas F1A.

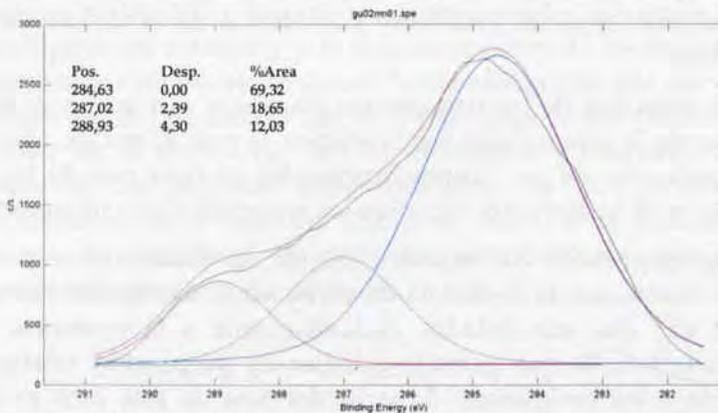


Fig.9.56. Curva de ajuste del C1s en las nanoesferas F1AP.

Se observa que a diferencia de las nanoesferas placebo, en las nanoesferas con indometacina aparece la señal de los C aromáticos  $\alpha$  a N, C aromáticos  $\alpha$  ó  $\beta$  a Cl, y C alifáticos  $\alpha$  a C=O a 286,40 eV y el carbono amídico a 287,83 eV.

### 9.11.1. Cuantificación del material de cubierta por XPS

La técnica de XPS es de gran utilidad en la identificación y cuantificación de los componentes que forman parte de la cubierta de las superficies. En este caso se aplica la técnica de XPS para identificar y cuantificar los componentes que están formando parte de la cubierta de las nanoesferas.

La consideración de los valores porcentuales de composición frente a los valores analíticos en masa de las nanoesferas revela diferencias substanciales, lo que evidencia una composición superficial diferenciada del interior. Por este motivo se plantea la conveniencia del análisis de la estructura fina de los espectros de XPS.

Con los espectros de indometacina, PLGA y PVA pueden establecerse las razones experimentales, en las condiciones de análisis, entre los carbonos de los distintos grupos, para cada componente, a través de las relaciones entre las áreas correspondientes. Las razones citadas permiten evaluar la contribución de cada compuesto en un determinado espectro realizado, por cálculo de la diferencia entre espectros.

En los espectros de las nanoesferas placebo y con activo se aprecia claramente la presencia de indometacina, la cual se evalúa a partir de la contribución de sus grupos funcionales en cada uno de los picos obtenidos en la descomposición de los espectros de las nanoesferas.

La descomposición del espectro de las nanoesferas con principio activo cuenta con la presencia de carbonos amídicos (con un pico a 288,44 eV) que son debidos exclusivamente a la presencia de la indometacina, lo que permite calcular su proporción relativa con respecto a los excipientes. A partir del área de este pico se puede calcular el área correspondiente a los otros grupos, empleando las proporciones calculadas a partir de los espectros.

Según la descomposición del espectro de la indometacina (figura 9.46) se pueden establecer las proporciones siguientes:

Carbono carboxílico / Carbono amídicos = 1,09

Carbono de éter / Carbono carboxílico = 22,46

y para el PLGA:

Carbono éter / Carbono carboxílico = 1,52

Según estas relaciones, y teniendo en cuenta que los carbonos amídicos presentes en las nanoesferas son debidos exclusivamente a la presencia de indometacina, se puede calcular la composición superficial relativa de indometacina.

Por diferencia de la proporción de indometacina en los carbonos carboxílicos del PLGA, se puede calcular la composición relativa de PLGA.

Finalmente, por diferencia de la proporción de PLGA en los carbonos de éter, se calcula la proporción relativa superficial de PVA.

En la tabla 9.20 se resumen los valores teóricos (calculados a partir de la fórmula molecular) y los valores experimentales correspondientes a la composición atómica y a la descomposición de los carbonos de los precursores de las nanoesferas. Puede observarse que los valores obtenidos en los precursores son muy parecidos, lo que demuestra la fiabilidad de la técnica de XPS en el análisis y cuantificación de compuestos. Las pequeñas diferencias entre los valores teóricos y experimentales en el caso del PLGA se deben a la dificultad de establecer con exactitud el grado de polimerización real de los monómeros formadores del polímero.

Indometacina				
Composición atómica	% Teórico		% Experimental	
C 1s	76%		75,5%	
O 1s	16%		16,5%	
N 1s	4%		4,1%	
Cl 2p	4%		4,0%	
Tipo de carbono	B.E. (eV)	Desp. (eV)	% Teórico	% Experimental
Carbono metilénico y adventicio	284,24	0,00	42,11	44,67
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	285,37	1,13	47,37	50,98
Carbono de amida	288,44	4,20	5,26	2,08
Carbono carboxílico	289,54	5,30	5,26	2,27
PLGA				
Composición atómica	% Teórico		% Experimental	
C 1s	55,6%		62,2%	
O 1s	44,4%		37,8%	
Tipo de carbono	B.E. (eV)	Desp. (eV)	% Teórico	% Experimental
Carbono metilénico y adventicio	284,72	0,00	20%	37,27
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	286,85	2,13	40%	37,84
Carbono de amida	---	---	---	---
Carbono carboxílico	289,07	4,35	40%	24,89
PVA				
Composición atómica	% Teórico		% Experimental	
C 1s	66,6%		57,5%	
O 1s	33,3%		34,7%	
N 1s	---		7,8%	
Tipo de carbono	B.E. (eV)	Desp. (eV)	% Teórico	% Experimental
Carbono metilénico y adventicio	284,71	0,00	50%	61,13
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	285,87	1,16	50%	38,87
Carbono de amida	---	---	---	---
Carbono carboxílico	---	---	---	---

Tabla 9.20. Análisis de la composición atómica y del espectro del C1S de XPS para los precursores de las nanoesferas.

En la tabla 9.21 se resumen los valores experimentales correspondientes a la descomposición de los carbonos de las nanoesferas con activo y las nanoesferas placebo.

Tipo de carbono	B.E. (eV)	Desp. (eV)	% Experimental
<b>Nanoesferas D6A</b>			
Carbono metilénico y adventicio	284,60	0,00	16,90
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	286,12	1,52	59,14
Carbono de amida	288,02	3,42	0,81
Carbono carboxílico	289,33	4,73	23,16
<b>Nanoesferas D6AP</b>			
Carbono metilénico y adventicio	284,95	0,00	71,45
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	286,70	1,75	18,09
Carbono de amida	---	---	---
Carbono carboxílico	289,10	4,15	10,46
<b>Nanoesferas SA5</b>			
Carbono metilénico y adventicio	284,88	0,00	35,84
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	286,67	1,79	44,27
Carbono de amida	288,03	3,15	0,36
Carbono carboxílico	289,14	4,26	19,53
<b>Nanoesferas S5AP</b>			
Carbono metilénico y adventicio	285,00	0,00	56,58
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	286,74	1,74	26,33
Carbono de amida	---	---	---
Carbono carboxílico	289,10	4,10	17,09
<b>Nanoesferas F1A</b>			
Carbono metilénico y adventicio	284,76	0,00	66,41
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	286,40	1,64	23,88
Carbono de amida	287,83	3,07	0,19
Carbono carboxílico	289,03	4,27	9,53
<b>Nanoesferas F1AP</b>			
Carbono metilénico y adventicio	284,63	0,00	69,32
Carbono de éter y $\alpha$ carboxílico	287,02	2,39	18,65
Carbono de amida	---	---	---
Carbono carboxílico	288,93	4,30	12,03

Tabla 9.21. Análisis del espectro del CIS de XPS.

En base a estos datos es posible establecer una proporcionalidad de los distintos componentes en la superficie de las nanoesferas (tabla 9.22).

	% Indom. en éter	% PLGA en éter	% PVA en éter	% Indom. superficial	% PLGA superficial	% PVA superficial	Proporción PLGA:PVA
D6A	18,19	33,87	7,08	30,8	57,3	12,0	1:0,21
D6AP	—	15,9	2,19	—	87,9	12,1	1:0,14
S5A	8,08	29,09	7,09	18,03	65,7	16,0	1:0,24
S5AP	—	25,98	0,35	—	98,7	1,3	1:0,01
F1A	4,27	14,27	5,34	17,9	59,8	22,4	1:0,37
F1AP	—	18,29	0,36	—	98,1	1,9	1:0,02

Tabla 9.22. Composición superficial de las nanoesferas.

Según los valores obtenidos, se observa que la indometacina se encuentra distribuida por la superficie de las nanoesferas, en un porcentaje que oscila entre el 57,3 y 65,7%. Esto confirma que la indometacina se halla distribuida homogéneamente por la superficie y el interior de las nanoesferas.

## 9.12. Liofilización de las muestras

Como paso final en la formulación de las nanoesferas se procede a su estabilización mediante el proceso de liofilización. Los lotes escogidos para liofilizar han sido los que inicialmente presentaban (de cada referencia) el tamaño medio de partícula más pequeño, es decir, los lotes D6A-1, S5A-2 y F1A-2.

Las condiciones de liofilización se describen en el capítulo 3.5.

Tras la liofilización de las muestras se procede a su caracterización. En la tabla 9.23 se muestran los valores de pH de los lotes antes y después de liofilizar.

Ensayo	pH antes de liofilizar	pH después de liofilizar
D6A-1	4,8	4,9
S5A-2	4,7	4,8
F1A-2	4,6	4,5

Tabla 9.23. Valores de pH antes y después de liofilizar.

Como puede observarse, durante el proceso de liofilización el pH de las muestras no se ve afectado.

En la tabla 9.24 y en la figura 9.57 se muestran los valores de tamaño medio de partícula obtenidos en los lotes liofilizados tras ser rehidratados con agua Milli-Q y se compara con los valores antes de liofilizar (tabla 9.25 y figura 9.58). Los análisis se han realizado por difracción láser y son valores promedio de tres medidas.

	D6A-1	S5A-2	F1A-2
Media ( $\mu\text{m}$ )	0,630	0,680	0,609
Mediana ( $\mu\text{m}$ )	0,562	0,590	0,543
Moda ( $\mu\text{m}$ )	0,520	0,520	0,474
DS ( $\mu\text{m}$ )	0,256	0,302	0,237
D <sub>10%</sub>	0,419	0,425	0,416
D <sub>25%</sub>	0,471	0,485	0,464
D <sub>50%</sub>	0,562	0,590	0,543
D <sub>75%</sub>	0,703	0,770	0,668
D <sub>90%</sub>	0,907	1,047	0,850

Tabla 9.24. Caracterización morfométrica de los lotes en acetato de etilo antes de liofilizar.

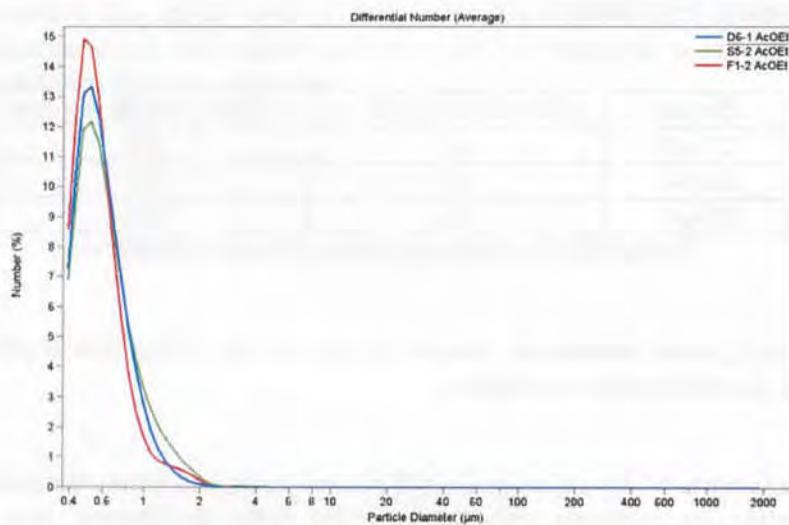


Fig.9.57. Superposición de los tamaños promedio de los lotes D6A-1, S5A-2 y F1A-2 antes de liofilizar.

	D6A-1 liofilizado	S5A-2 liofilizado	F1A-2 liofilizado
Media (μm)	1,741	1,338	1,153
Mediana (μm)	1,578	1,219	1,071
Moda (μm)	1,321	1,097	0,910
DS (μm)	1,624	1,651	1,778
D <sub>10%</sub>	1,051	0,788	0,607
D <sub>25%</sub>	1,237	0,944	0,775
D <sub>50%</sub>	1,578	1,219	1,071
D <sub>75%</sub>	2,179	1,683	1,567
D <sub>90%</sub>	3,309	2,545	2,383

Tabla 9.25. Caracterización morfométrica de los lotes en acetato de etilo tras la liofilización y posterior rehidratación con agua Milli-Q.

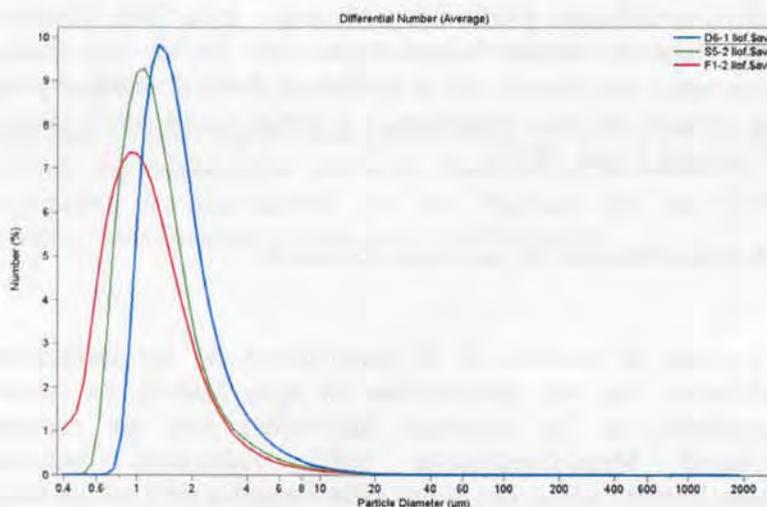


Fig.9.58. Superposición de los tamaños promedio de los lotes D6A-1, S5A-2 y F1A-2 después de liofilizar.

Como puede observarse por los valores de tamaño de partícula obtenidos, durante el proceso de liofilización se produce un incremento de tamaño, que en la tabla 9.26 se muestra en valores porcentuales.

	Tamaño medio de partícula antes de liofilizar ( $\mu\text{m}$ )	Tamaño medio de partícula de las partículas rehidratadas ( $\mu\text{m}$ )	Incremento de tamaño (%)
D6-1 AcOEt	$0,630 \pm 0,26$	$1,741 \pm 1,62$	176,35
S5-2 AcOEt	$0,680 \pm 0,30$	$1,338 \pm 1,65$	96,76
F1-2 AcOEt	$0,609 \pm 0,24$	$1,153 \pm 1,78$	89,33

Tabla 9.26. Incremento en el tamaño medio de partícula tras la liofilización.

Este incremento en el tamaño medio de las nanoesferas se atribuye a la formación de agregados, afirmación que se ha podido comprobar con las imágenes obtenidas por SEM y AFM. Por otro lado, se ha podido corroborar en la bibliografía que es un resultado habitual después de la liofilización e incluso secado de las nanoesferas (Quintanar-Guerrero y cols. 1998, Bozdag y cols. 2004, Choi y cols. 2004). Algunos autores afirman que este hecho se encuentra íntimamente relacionado con el porcentaje de PVA residual presente en la cubierta de las nanoesferas. (Alléman y cols. 1993, Lee y cols. 1999, Konan y cols. 2002).

### 9.13. Osmolalidad de las formulaciones

Se procede al análisis de la osmolalidad de las formulaciones liofilizadas, una vez rehidratadas en agua Milli-Q. Se calcula la osmolalidad de las muestras liofilizadas con un osmómetro Advanced Micro-Osmometer 3MO, Advanced Instruments (Massachussets, USA). Los viales están cargados de 3 mL de solución de muestra junto con 2 mL de solución de manitol (al 2% p/v), por lo que la concentración teórica de indometacina es de 0,96 mg/mL, es decir, de 2,88 mg/vial. A continuación se muestra un resumen de las cantidades de vehículo que se requieren para conseguir obtener un valor de osmolalidad cercano a 290 mOsm (tabla 9.27).

Lote	Osmolalidad en 1 mL de agua Milli-Q	Osmolalidad en 1,2 mL de agua Milli-Q	Osmolalidad en 2 mL de agua Milli-Q
D6A-1	210 mOsm	---	---
S5A-2	383 mOsm	311 mOsm	---
F1A-2	605 mOsm	---	297 mOsm

**Tabla 9.27.** Valores de osmolalidad de los distintos lotes de nanoesferas, una vez reconstituidos en las cantidades de agua Milli-Q que se describen.

Se puede concluir que viales liofilizados con una concentración teórica de 2,88 mg de indometacina por vial son isotónicos tras su reconstitución con 1 ó 2 mL de agua Milli-Q como vehículo.

Se confirma así también la idoneidad del manitol como agente crioprotector, puesto que las soluciones resultantes de la reconstitución de los liofilizados son prácticamente isotónicas al adicionar agua como único vehículo.

Este hecho también supone una gran ventaja, puesto que se consigue mediante los parámetros ajustados durante la formulación una composición de nanoesferas que no requiere que el vehículo reconstituyente lleve excipientes adicionales al agua.

## *DISCUSIÓN*

---

## DISCUSIÓN

---

El análisis estadístico del diseño factorial de la serie "D" pone de manifiesto:

- Ninguno de los factores estudiados (composición del polímero, viscosidad del coadyuvante PVA ni porcentaje de coadyuvante) influye significativamente sobre el parámetro tamaño de partícula, en las condiciones experimentales realizadas, si bien los valores de tamaño de partícula más pequeños se obtienen utilizando el PLGA 50/50 y el PVA Airvol® 540 al 2%.
- Todos los factores estudiados afectan significativamente la eficacia de encapsulación, obteniéndose los valores de eficacia de encapsulación más elevados cuando se utiliza PLGA 50/50 y el PVA Airvol® 540 al 2%.
- El tipo de polímero es el factor que más influye en el tiempo medio de disolución.
- Las distintas velocidades de liberación se atribuyen a los distintos tamaños de partícula, es decir, para nanoesferas de menor tamaño, más rápida es la velocidad de cesión de principio activo. Pero además del tamaño de partícula, probablemente el pequeño efecto *burst* inicial observado se deba a otro factor, como es la presencia de "nanoporos" o poros de tamaño nanométrico, que no son visibles ni aplicando la técnica de microscopía electrónica de barrido. Esta afirmación coincide con la teoría postulada por algunos autores, en su caso haciendo referencia a micropartículas (Wang y cols. 2000a y 2000b).

Se elige como mejor referencia de la serie "D" la número D6 porque (coincidiendo con el estudio estadístico de la respuesta óptima para el tamaño medio de partícula y EE), es la referencia que presenta un menor tamaño medio de partícula, junto un alto porcentaje de encapsulación de indometacina y rendimiento global de encapsulación. Además, se consigue una lenta liberación de la indometacina, sin efecto "burst". Esta referencia corresponde a la que emplea como polímero al PLGA 50/50 y como coadyuvante PVA Airvol 540 al 2%.

El análisis estadístico del diseño factorial de la serie "S" pone de manifiesto que ninguno de los factores estudiados (viscosidad del polímero, tipo de sal y pH de la fase acuosa) influye significativamente sobre la respuesta del tamaño medio de partícula, eficacia de encapsulación ni tiempo medio de disolución, en las condiciones experimentales realizadas.

Se elige como mejor referencia de la serie "S" la número S5 por ser la que presenta uno de los menores tamaños de partícula y máxima eficacia de encapsulación. El rendimiento global del proceso de encapsulación también es satisfactorio con un 73% y además presenta el perfil de cesión de indometacina más lento, sin efecto "burst".

El análisis estadístico del diseño factorial de la serie "F" pone de manifiesto:

- Ninguno de los factores estudiados (método de encapsulación, tipo de coadyuvante ni porcentaje del mismo) influye significativamente sobre tamaño medio de partícula ni sobre la viscosidad de la suspensión de nanoesferas (medida tras la evaporación de la fase orgánica), en las condiciones experimentales realizadas.
- El método de encapsulación y el tipo de coadyuvante afectan significativamente la eficacia de encapsulación.

Se elige como mejor referencia de la serie "F" la número F1 por ser una de las que presenta un tamaño medio de partícula más pequeño, además del valor más alto de eficacia de encapsulación. También es la referencia con la que se consigue un mayor rendimiento del proceso global de encapsulación, además de unos tiempos medio de liberación más lentos.

En ninguno de los 3 diseños factoriales estudiados (series D, S y F) no se haya relación directa entre la viscosidad del medio y el tamaño medio de las nanoesferas, en las condiciones experimentales ensayadas.

De cada serie de diseños factoriales se eligen como mejores las referencias D6, S5 y F1 por ser las que proporcionan eficacias de encapsulación más altas, mayores rendimientos de proceso, tamaño de partícula más pequeño y MDT prolongado, sin efecto *burst*.

Para solucionar el problema ambiental y de impacto en la salud humana que provoca el uso de disolventes organoclorados en la elaboración convencional de nanoesferas, se elige el acetato de etilo como disolvente *verde* alternativo.

La sustitución de los disolventes originales por acetato de etilo provoca la aparición de cristales aciculares en el medio de reacción. Se consiguen aislar e identificar dichos cristales, que resultan ser indometacina y se relaciona su aparición con la disminución en la velocidad de encapsulación que ocasiona el empleo de acetato de etilo. Al realizar la encapsulación en un reactor hermético con ayuda de temperatura y vacío se reduce el tiempo de encapsulación de 10 horas a un mínimo de 2 horas, evitando así la formación de los cristales y la consecuente necesidad de filtrar la muestra para separarlos del medio.

Optimizando las condiciones de reacción se evita la necesidad de filtrar la muestra, lo que supone un aumento del rendimiento del proceso y un ahorro de costes, además del ya comentado beneficio medioambiental que todo ello conlleva.

El análisis comparativo de las EE, contenido en indometacina y rendimiento del proceso de los lotes D6, S5 y F1 pone de manifiesto que no hay diferencias significativas entre un mismo ensayo sustituyendo el disolvente original por acetato de etilo, por lo que se confirma la idoneidad del disolvente propuesto.

El análisis comparativo de los tamaños medio de partícula pone de manifiesto que no hay diferencias significativas al efectuar el cambio de disolvente, si bien se observa un ligero descenso de los tamaños promedio de partícula en las referencias elaboradas con acetato de etilo.

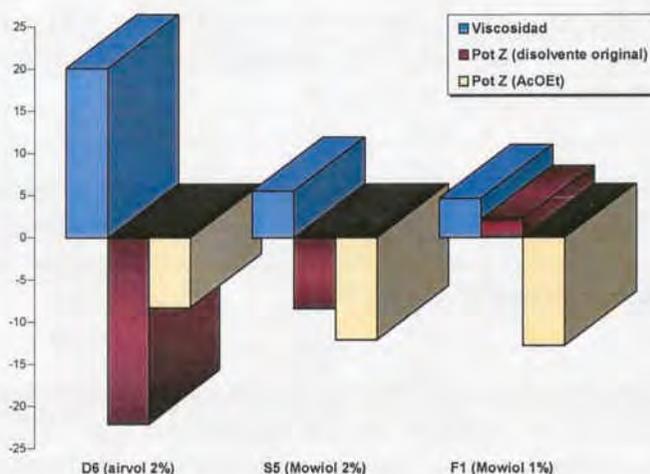
La presencia o ausencia de indometacina no supone una modificación de los valores del potencial zeta en las nanoesferas preparadas con acetato de etilo. La presencia de quitosano en la composición de las nanoesferas de la serie F1 tampoco se traduce en cambios en los valores de potencial zeta, probablemente debido a que está presente en concentraciones muy bajas (la concentración teórica es del 0,03%).

Algunos autores relacionan el porcentaje de PVA empleado en la fabricación de las nanoesferas con los valores de potencial Z (Maia y cols. 2004). En el caso de las nanoesferas D6A, S5A y F1A elaboradas con acetato de etilo los resultados que se obtienen son desiguales, en función del tipo de disolvente empleado (tabla 10.1)

	Viscosidad (cps)	Potz Z (disolvente original)	Potencial Z (AcOEt)
D6 (Airvol 2%)	20,0896	-22,08	-8,29
S5 (Mowiol 2%)	5,5589	-8,37	-12,12
F1 (Mowiol 1%)	4,6434	2,14	-12,77

Tabla 10.1. Valores de potencial Z y de viscosidad de las nanoesferas.

Los tipos y porcentajes de PVA se muestran en la figura 10.1 en función de la viscosidad (ver detalles en el capítulo 8).



**Fig. 10.1.** Relación entre los valores de potencial zeta y el tipo y la concentración de PVA.

Los análisis de DSC de las referencias D6A, S5A y F1A preparadas en acetato de etilo muestran que la indometacina pasa de un estado cristalino a uno amorfo.

Los termogramas indican que la indometacina se haya dispersada en las nanoesferas y también confirman que no existe incompatibilidad entre los componentes de las nanoesferas.

Los análisis de RX de las muestras D6A, S5A y F1A preparadas con acetato de etilo muestran un patrón amorfo de la indometacina, en todos los casos.

Tras el análisis de los difractogramas se concluye que no se observan diferencias estructurales en las distintas referencias de nanoesferas, ni comparando los distintos métodos de encapsulación entre sí.

Los difractogramas muestran que la indometacina está presente en las distintas referencias de nanoesferas en forma de dispersión sólida.

Los análisis por FTIR de las referencias D6A, S5A y F1A preparadas con acetato de etilo permiten identificar señales atribuibles a la indometacina y al polímero PLGA.

A través de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se ha podido caracterizar con detalle la composición química de los lotes de nanoesferas D6A, S5A y F1A elaboradas con acetato de etilo, observándose las señales atribuibles a indometacina y a PLGA.

Los resultados obtenidos en los espectros de RMN, junto con los resultados de los análisis de las nanoesferas con DSC, RX e IR, permiten obtener una valiosa información estructural de las nanoesferas. Con los datos obtenidos con el DSC, IR y los RX se confirma que se ha formado una entidad nueva, que es la nanoesfera, puesto que se observan diferencias en el punto de fusión de la indometacina, de transición vítrea en el PLGA (DSC) y en el estado cristalino de la indometacina (RX). Con los espectros de IR se identifica por primera vez en la composición de las nanoesferas una banda de absorción correspondiente a la indometacina, entre todas las bandas del PLGA. Sin embargo, no es hasta el análisis de los espectros de RMN que se confirma con claridad la presencia de la indometacina formando parte de las distintas series de nanoesferas.

Los ensayos de liberación *in vitro* muestran que en las referencias preparadas con acetato de etilo se libera un 10-25% más de indometacina que en las elaboradas con los disolventes originales, comparando los últimos tiempos de muestreo (tabla 10.2). Este hecho se atribuye a que las nanoesferas preparadas con acetato de etilo presentan una cubierta más porosa.

Tiempo (min)	D6 Liberación %	D6A Liberación %	S5 Liberación %	S5 A Liberación %	F1 Liberación %	F1A Liberación %
0	0	0	0	0	0	0
30	1,50	11,51	2,07	14,46	8,92	16,91
60	7,65	28,28	7,62	31,10	18,25	26,54
120	13,04	41,38	14,76	39,90	26,37	33,35
240	21,32	53,98	16,71	50,13	27,01	35,89
360	22,25	55,87	22,07	49,42	27,20	35,32
480	23,46	58,54	21,28	46,97	28,23	33,83
1440	29,80	54,74	21,41	45,97	30,99	35,05
1800	27,59	51,94	20,00	44,24	31,01	34,90
2880	25,79	52,02	19,38	43,79	29,77	40,74

Tabla 10.2. Porcentajes de liberación de las referencias elaboradas con los disolventes originales, con respecto a las elaboradas en acetato de etilo.

Los perfiles de liberación *in vitro* de las referencias D6A, S5A y F1A preparadas con acetato de etilo se ajustan a los modelos de primer orden, Hixson y Crowell e Higuchi y se comprueba que en todos los casos se obtienen unos valores más bajos de AIC y SBC (criterios que valoran la bondad de los ajustes, basados en la máxima probabilidad) en los ajustes al modelo de primer orden. Los coeficientes de correlación entre los valores observados y los predichos ( $r^2$ ) también corroboran la bondad de los ajustados (tabla 10.3).

		Primer orden	Hixson y Crowell	Higuchi
D6A	AIC	32,34	35,02	41,70
	SBC	32,23	34,91	41,65
	$r^2$	0,9903	0,9875	0,9543
S5A	AIC	30,70	41,33	46,05
	SBC	30,60	41,22	46,00
	$r^2$	0,9890	0,9515	0,8972
F1A	AIC	23,42	42,32	44,74
	SBC	23,31	42,21	44,69
	$r^2$	0,9904	0,8984	0,8396

Tabla 10.3. Valores de AIC y SBC de los ajustes de los perfiles de liberación de las nanoesferas a los modelos de primer orden, Hixson y Crowell e Higuchi.

Por lo tanto, se puede proponer la ecuación que describe los perfiles de liberación de las distintas series de nanoesferas:

Nanoesferas D6A:

$$\% \text{ liberado} = 100 (1 - e^{-0,0103t})$$

$$r^2 = 0,9903$$

Nanoesferas S5A

$$\% \text{ liberado} = 100 (1 - e^{-0,0166t})$$

$$r^2 = 0,9890$$

Nanoesferas F1A

$$\% \text{ liberado} = 100 (1 - e^{-0,0275t})$$

$$r^2 = 0,9904$$

Los análisis de las nanoesferas por AFM muestran un tamaño de partícula muy por debajo de los valores obtenidos con técnicas como la microscopía óptica y la difracción láser, siendo posible discriminar entre partículas aisladas y agregados. Se confirma la idoneidad de la aplicación de la técnica de AFM en la obtención de medidas fiables del tamaño de nanoesferas.

La aplicación de la técnica de XPS en la caracterización y cuantificación de los componentes en la superficie de las nanoesferas pone de manifiesto que la indometacina se distribuye homogéneamente entre el interior y la superficie de las mismas.

Se observa que en las nanoesferas con indometacina, las referencias que presentan mayor porcentaje residual de PVA en superficie corresponden a las que tienen un mayor tamaño de partícula según la técnica de difracción láser, pero menor tamaño según la técnica de AFM (tabla 10.4).

Referencia	% PVA residual medido por XPS	Tamaño (nm) $\pm$ DS Coulter	Tamaño (nm) $\pm$ DS AFM
D6A	12,0%	614 $\pm$ 33	38,615 $\pm$ 16,97
S5A	15,0%	704 $\pm$ 22	36,18 $\pm$ 9,51
F1A	22,4%	729 $\pm$ 49	14,58 $\pm$ 2,93

**Tabla 10.4.** Relación entre el porcentaje de PVA residual y el tamaño medio de las nanoesferas.

La explicación en la discrepancia de tamaños se haya en la presencia de agregados, que con la técnica de difracción láser no es posible diferenciar. Esta afirmación se corrobora tras la observación de las micrografías de SEM y las imágenes de AFM, que evidencian la presencia de aglomerados de nanoesferas. Por lo tanto, se puede concluir que a más cantidad de PVA, más pequeñas son las nanoesferas resultantes. Este hecho se puede explicar porque en el método de elaboración verde no hay acetona que produzca las turbulencias del efecto Marangoni y en este caso, cantidades crecientes de PVA provocan una estabilización de las gotas de la emulsión, evitando su coalescencia, lo que se traduce en un tamaño final de nanoesfera más pequeño.

Es de destacar que se ha conseguido cuantificar el porcentaje residual de PVA en las nanoesferas por un método alternativo al convencional y de forma precisa y mucho más fácil.

Se elige como método de secado de las nanoesferas la liofilización.

Se ha puesto a punto un método de liofilización satisfactorio para todo tipo de nanoesferas.

Se ha constatado la necesidad de incorporar un agente crioprotector para favorecer la reconstitución de las muestras liofilizadas.

En el estudio de la escala de agregación y resuspensión de los distintos liofilizados se observan diferencias en función del crioprotector ensayado. En los liofilizados donde se emplea el manitol como agente crioprotector no se observa formación de agregados y es posible la reconstitución de los mismos mediante agitación manual.

Se observa que tras la liofilización de las nanoesferas preparadas con acetato de etilo, el pH del medio no varía. En cambio, se detecta un aumento del tamaño medio de partícula, que se atribuye a la formación de agregados. Esta observación coincide con datos publicados en la bibliografía y se explica por la presencia residual de PVA en la cubierta de las nanoesferas.

Los viales liofilizados con una concentración teórica de 2,88 mg de indometacina por vial son isotónicos tras su reconstitución con 1 ó 2 mL (dependiendo de la referencia) de agua Milli-Q como único vehículo.

Se confirma la idoneidad del manitol como agente crioprotector, puesto que las soluciones resultantes de la reconstitución de los liofilizados son prácticamente isotónicas al adicionar agua como único vehículo.

Se puede concluir que con el riguroso estudio de los parámetros de proceso se ha conseguido una composición de nanoesferas que no requiere que el vehículo reconstituyente lleve excipientes adicionales al agua para obtener una formulación para inyección segura.

## ***CONCLUSIONES***

---

## ***CONCLUSIONES***

---

1. Los métodos de elaboración de nanoesferas desarrollados y optimizados mediante diseño factorial de experimentos han demostrado ser métodos eficaces, reproducibles, industrialmente escalables y rentables.
2. Se ha demostrado la viabilidad de las técnicas de elaboración de nanoesferas de indometacina con los métodos de emulsificación espontánea-difusión de disolvente (SESDM) y de salificación, aplicando un proceso de fabricación de *química verde*, es decir, sin impacto negativo sobre la salud humana ni el medioambiente.
3. Los métodos de elaboración de nanoesferas desarrollados permiten una encapsulación eficaz de la indometacina (eficacias de encapsulación superiores al 90%) y rendimientos de proceso superiores al 80%.
4. Los resultados de los ensayos de liberación *in vitro* permiten concluir que las nanoesferas presentan unos perfiles de liberación prolongada durante más de ocho horas y responden a la ecuación de primer orden.
5. Las nanoesferas elaboradas con acetato de etilo liberan entre un 10 y un 25% más de indometacina que las elaboradas con los disolventes originales diclorometano y/o acetona.

6. En ninguno de los 3 diseños factoriales estudiados (series D, S y F de nanoesferas) se halla relación directa entre la viscosidad del medio y el tamaño de las nanoesferas. Queda por lo tanto demostrado que, en las condiciones experimentales ensayadas, la viscosidad del medio no influye en el tamaño de las nanoesferas.
7. Puede concluirse que el acetato de etilo es una buena alternativa al uso de disolventes organoclorados y que es de óptima aplicación como disolvente único en los dos métodos de elaboración de nanoesferas.
8. El empleo de acetato de etilo supone una ventaja económica puesto que el tratamiento de los residuos generados por disolventes oxigenados es inferior al de los disolventes organoclorados.
9. Se ha demostrado la aplicabilidad de técnicas instrumentales de alta resolución, ampliamente difundidas en el campo de la caracterización de materiales, y de novedosa aplicación en la caracterización de nanoesferas de uso farmacéutico.
10. El análisis de las nanoesferas con las técnicas de DSC, IR, RMN, RX y XPS confirman que se ha formado una entidad nueva, que es la nanoesfera, puesto que se observan claras diferencias con los resultados de los análisis de los productos de partida.
11. La caracterización de las muestras pone de manifiesto que la indometacina está formando parte de la estructura matricial de las nanoesferas en estado amorfo y en forma de dispersión sólida.
12. Se confirma la idoneidad de la aplicación de la técnica de AFM en la medición de los tamaños de partícula, puesto que permite discriminar partículas individuales de los agregados.

- 
13. Por primera vez en el campo de la microencapsulación y nanoencapsulación se ha desarrollado un método de valoración de la cantidad de PVA residual en las nanoesferas mediante la técnica de XPS. Este método se presenta como una alternativa muy práctica y eficaz al convencional método de valoración.
  14. Las nanoesferas de indometacina desarrolladas permiten la formulación de un inyectable liofilizado de preparación extemporánea, reconstituyéndose con agua p.i. como vehículo único.
  15. La formulación desarrollada del inyectable es adecuada para su correcta administración, presentando unas características idóneas de pH e isotonicidad.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Al Khouri- Fallouh N, Roblot-Treupel L, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F.** Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Int J Pharm*, 1986; 28: 125-132.
- Allémann E, Gurny R, Doelker E.** Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int J Pharm*, 1992; 87: 247-254.
- Allémann E, Leroux JC, Gurny R.** Biodegradable nanoparticles of poly (lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. En: Lieberman HA., Rieger MM., Banker GS, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems. Marcel Dekker. New York, 1998: 163-193.
- Allémann E, Leroux JC, Gurny R, Doelker E.** In vitro extended-release properties of drug loaded poly (D,L-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res*, 1993; 10: 1732-1737.
- Allen TM, Ryan J, Papahadjopoulos D.** Gangliosides reduce leakage of aqueous space markers from liposomes in the presence of human plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 818: 205-210.
- Alonso MJ, Blanco J, Vila Jato JL.** Las nanoparticulas como sistemas de liberación de medicamentos. *A. E. H.* IX, 1985; 4: 205-218.
- Alonso MJ, Sánchez A.** The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2003; 55 (11): 1451-1463.
- Ammoury N, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F, Benita S.** In vitro release kinetic pattern of indomethacin from poly (D,L-lactide) nanocapsules. *J Pharm Sci*, 1990; 79 (9): 763-767.
- Anastas PT, Warner JC.** Green Chemistry. Theory and Practice. Ed. Oxford University Press. Oxford, 1998.

- Anderson JM, Langone JJ.** Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. *J Control Rel*, 1999; 57 (2): 107-113.
- AOAC Peer- Verified Method Program** "Manual on policies and procedures" Arlington, USA, November, 1993.
- APHA, AWWA, WPCF.** Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid, 1992 : 4-78.
- Arshady R.** Microspheres and microcapsules. A survey of manufacturing techniques: I suspension crosslinking. *Polym Eng Sci*, 1989; 29: 1746-1752.
- Arshady R.** Preparation of biodegradable microspheres: 2: polylactides and related polyesters. *J Control Rel*, 1991; 17: 1-22.
- Autian H.** Fundamental aspects of biocompatibility. Marcel Dekker, New York, 351-364, 1978.
- Auvillan M, Cavé H, Fessi H, Devissaguet JP.** Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. *STP Pharma*, 1989; 5: 738-744.
- Bakan, JA.** Microencapsulation using coacervation phase separation techniques. En *Controlled Release Technology: methods, theory and applications*. CRC Press. Boca Ratón, 1980; 2 (4): 83-105.
- Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T.** Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*, 1999; 25 (4): 471-476.
- Beck LR, Pope VZ.** Controlled-release delivery systems for hormones. A review of their properties and current therapeutic. *Drugs*, 1984; 27: 528-532.
- Benita S, Benoit JP, Puisieux F, Thies C.** Characterization of drug loaded poly (DL-lactide) microspheres. *J Pharmacol Sci*, 1984; 73: 1721-1724.
- Benoit JP, Couveur P, Devissaguet JP, Fessi H, Puisieux F, Roblot-Treup L.** Les formes vectorisées où a distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration médicaments. *J Pharm Belg*, 1986; 41 (5): 319-329.
- Birrenbach G, Speiser P.** Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci*, 1976; 65: 1763-1766.
- Bindschaedler C, Gurny R, Doelker E.** US Patent 4,968,350 , November 6, 1990.

- Bodmeier R, Chen H.** Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization. *J Control Rel*, 1990; 12: 223-233.
- Bogdansky S.** Natural polymers as drug delivery systems. En: Chasin M. y Langer R., eds. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York, 1990: 231-251.
- Bovey FA, Jelinski L, Mirau PA.** Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Academic Press. New York, 1988.
- Bozdag S, Calis S, Kas HS, Ercan MT, Peksoy I, Hincal AA.** In vitro evaluation and intra-articular administration of biodegradable microspheres containing naproxen sodium. *J Microencapsul*, 2001; 18: 443-456.
- Bozdag S, Pillen K, Vandervoort J, Ludwig A.** Influence of Cryoprotectants and Gamma Irradiation on the Properties of Ciprofloxacin HCl-loaded Poly (D,L-lactide-glycolide) Nanoparticles. *Proceedings del European Conference on Drug delivery and Pharmaceutical Technology*. Sevilla, 2004.
- Brooks PM, Day RO.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs: differences and similarities. *New Engl J Med*, 1991; 324: 1716-1725.
- Brooks P, Emery P, Evans J, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C.** Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of ciclooxigenase-2. *Br J Rheumatol*, 1999; 38: 779-788.
- Burgenber de Jong H G, y Kruit HR.** Colloid Science. Vol. II. Ed. Elsevier. New York, 1929.
- Calanchi M, Maccari M.** Pharmaceutical applications of microencapsulation using coacervation/phase separation techniques. En *Controlled Release Technology: methods, theory and applications*. CRC Press. Boca Ratón, 1980; 2 (4): 107-120.
- Castelli F, Conti B, Maccarrone DE, Conte U, Puglisi G.** Comparative study of in vitro release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres. *Int J Pharm*, 1998; 176: 85-98.
- Choi MJ, Briançon S, Andrieu J, Min SG, Fessi H.** Effect of freeze-drying process conditions on the stability of nanoparticles. *Drying Technology*, 2004; 22(1&2): 335-346.
- Clarke's Isolation and Identification of Drugs.** 2ª ed. The Royal Pharmaceutical Press. Londres, 1986: 681-682.

- Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE. Eds. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy. 3rd ed., Academic Press. New York, 1990.
- Conti B, Genta I, Modena T, Pavanetto F. Investigation on process parameters involved in poly lactide-co-glycolide microspheres preparation. *Drug Dev Ind Pharm*, 1995 ; 21 : 615-622.
- Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm*, 1995 ; 41 (1): 2-13.
- Couvreur P, Kante B, Roland M. Les perspectives d'utilisation des formes microdispersées comme vecteurs intracellulaires. *Pharm Acta Helv*, 1978; 53: 341-347.
- Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Baudhuin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol*, 1979; 31: 331-332.
- Couvreur P, Roland M, Speiser P. Biodegradable submicroscopic particles containing a biologically active substance and composition containing them. US Patent 4,329,332. 1982.
- Craig DQM, Kett VL, Andrews CS, Royall PG. Pharmaceutical applications of micro-thermal analysis. *J Pharm Sci*, 2002; 91 (5): 1201-1213.
- Dash AK, Khin-Khin A, Suryanarayanan. X-Ray powder diffractometric method for quantification of crystalline drug in microparticle system. I. Microspheres. *J Pharm Sci*, 2002; 91 (4): 983-990.
- De Chasteigner S, Cavé H, Fessi H, Devissaguet JP, Pusieux F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions : a feasibility study. *Drug Dev Res*, 1996; 38: 116-124
- De Chasteigner S, Fessi H, Cavé H, Devissaguet JP, Pusieux F. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. *STP Pharma Sci*, 1995; 5: 242-246.
- De Jaeghere F, Doelker E, Gurny R. Nanoparticles. En Encyclopedia of controlled drug delivery, vol. 2, E. Mathiowitz (Ed) John Wiley & Sons Inc, New York, 1999: 641-664.
- Delgado A, Evora CM, Llabrés M. Degradación de microesferas de DL-PLA- Metadona base. *Proceedings del I Congreso Hispano-Luso de Liberación Controlada de Medicamentos*. Santiago de Compostela, 1995.

- DeLuca PP, Mehta RC, Hausberger AG, Thanoo BC.** Biodegradable polyesters for drug and polypeptide delivery. En El-Nokaly MA, Piatt DM, Charpentier BA, eds. *Polymer Delivery Systems, Properties and Applications*. ACS Symposium Series 520. Washington, DC: American Chemical Society; 1994:53-79.
- DeWitt DL, Meade EA, Smith WL.** PGH synthase isoenzyme selectivity: the potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med*, 1993; 95 (suplemento 2a): 40S-44S.
- Doelker E, Binschaedler C, Gurny R.** Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be dispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof. Patente Europea EP0363549. Enschede, Switzerland 1990.
- Dubernet C, Rouland J, Benoit JP.** Ibuprofen-loaded ethylcellulose microspheres: analysis of the matrix structure by thermal analysis. *J Pharm Sci*, 1991; 80 (1): 1029-1033.
- Duun SE, Coombes AG, Garnett MC, Davis SS, Davis MC, Illum L.** In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J Control Rel*, 1997; 44: 65-76.
- Edman P.** Solid microspheres as drug delivery systems. *Methods of drug delivery*. Sartoreli AC, ed, Pergamon Press, New York, 1985: 23-40.
- EMEA: CPMP/QWP/604/96.** Note for guidance on quality of modified release products. A: oral dosage forms, B: Transdermal dosage forms, section I (quality). 29 Julio de 1999.
- European Pharmacopoeia.** 5th Ed. Council of Europe. Strasbourg (France), 2005.
- Fessi H, Devissaguet P, Puisieux F, Thies C.** Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. French Patent 8,618,446, 1986.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet P.** Patente Europea EP274961, 1987.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet P.** Patente Europea EP 0274961 A1, 1988.
- Fiachionen EM, Fischer CH.** Lactic Acid Condensation Polymers. *Ind Eng Chem*, 1994; 36: 223-230.
- Finley J.** Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings. *Analytical Chemistry*, 1961; 33 (13): 1925-1927.

- Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res*, 1997; 14: 259-266.
- Flu K, Harrell R, Zinski K, Um C, Jaklenec A, Frazier J, Lotan N, Burke P, Klibanov A, Langer R. A potential approach for decreasing the burst effect of protein from PLGA microspheres. *J Pharm Sci*, 2003; 92 (8): 1582-1591.
- Frölich JC. Prostaglandin endoperoxide synthetase isoenzyme: clinical relevance of selective inhibitors. *Ann Reumathol Dis*, 1995; 54: 942-943.
- Gabor F, Ertl B, Wirth M, Mallinger R. Ketoprofen-poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. *J Microencapsul*, 1999; 16 (1): 1-12.
- Gómez E, Vallés E, Gorostiza P, Sanz F. Electrodeposition of Zinc-Cobalt Alloys. Tapping Mode AFM Technique Applied to Study the Initial Stages of Deposition. *J Electrochem Soc*, 1995; 142(12): 4091-4096.
- Goodman-Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª Edición. Vol I. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, 1996.
- Guerrero M, Orriols A, Miñarro M, Ticó JR, Suñé-Negre JM. Microencapsulación: aplicaciones en la industria alimentaria. *Ibérica*, 1999; 415: 49-53.
- Guiziou B, Armstrong DJ, Elliott PN, Ford JL, Rostron C. Investigation of in vitro release characteristics of NSAID-loaded polylactic acid microspheres. *J Microencapsul*, 1996; 13 (6): 701-708.
- Gurny R, Peppas N, Harrington DD, Banker GS. Development of biodegradable injectable lattices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev Ind Pharm*, 1981; 7: 1-25.
- Gu ZW, Ye W, Yang J. Biodegradable block copolymer matrices for long acting contraceptive with constant release. *J Control Rel*, 1992; 22 (1): 3-14.
- Heller J. Bioerodible systems, en Medical applications of controlled release, Vol.1 (R.S. Langer and D.L. Wise, eds.). CRC Press. Boca Raton, 1984: 70-98.
- Heller J. Biodegradable polymers in controlled drug delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1985; 1: 39-90.

- Hernández-Díaz S, García Rodríguez L.** Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper gastrointestinal tract bleeding and perforation: An overview of epidemiological studies published in the 1990s. *Arch Inter Med*, 2000; 160: 2093-2099.
- Heya T, Okada H, Ogawa Y, Toguchi H.** Factors influencing the profiles of TRH release from poly (D,L-lactic/glycolic acid) microspheres. *Int J Pharm*, 1991; 72: 199-205.
- Higuchi T.** Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of solid drug dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci*, 1963; 52: 1145-1149.
- Hixson AW, Crowell JH.** Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. I. Theoretical consideration. *Ind Eng Chem*, 1931, 23: 923-931.
- Hollander D.** Gastrointestinal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Prophylactic and therapeutic strategies. *Am J Med*, 1994; 96: 274-281.
- Horisawa E, Hirota T, Kawazoe S, Yamada J, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y.** Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing beta-methasone sodium phosphate for intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit. *Pharm Res*, 2002; 19: 403-410.
- Horisawa E, Kubota K, Tuboi I, Sato K, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y.** Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm Res*, 2002; 19 (2): 132-139.
- Hutchison FG, Furr BA.** Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides. *J Control Rel*, 1990; 13: 279-282.
- Ibrahim H, Bindschaedler C, Doelker E, Buri P, Gurny R.** Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int J Pharm*, 1992; 87: 239-246.
- ICH Topic Q2A** Step 5 Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95 - adopted Nov. 94).
- ICH Topic Q2B** Step 4 Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95 - adopted December 96).

- ICH Topic Q3C. Step 4 Note for Guidance on Impurities in New Medicinal Products (CPMP/ICH/282/95 adopted December 96).
- Ike O, Shimizu Y, Ikada Y. Degradation and antitumor effect of adriamycin containing poly (L-lactic acid) microspheres. *Biomaterials*, 1991; 12: 757-762.
- Ike O, Shimizu Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Controlled cisplatin delivery system using poly (DL lactic acid). *Biomaterials*, 1992; 13: 230-234.
- Illum L, Davis SS, Wilson CG, Frier M, Hardy JG, Thomas NW. Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles: the effects of particle size, nature and shape. *Int J Pharm*, 1982; 12: 135-146.
- Jalil R, Nixon R. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul*, 1990; 7 (3): 297-325.
- Jeong Y, Shim Y, Rhee Y. The effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly (DL-lactide-co-glycolide). *Proceedings del 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the Controlled Release Society. Glasgow, 2003.*
- Julienne MC, Alonso MJ, Gómez JL, Benoit JP. Preparation of poly (DL lactide/glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: application of experimental designs. *Drug Dev Ind Pharm*, 1992; 18: 1063-1073.
- Karasulu E, Karasulu HY, Ertan G, Kirilmaz L, Güneri T. Extended release lipophilic indomethacin microspheres: formulation factors and mathematical equations fitted drug release rates. *Eur J Pharm Sci*, 2003; 19: 99-104.
- Kawashima Y, Niwa T, Handa T, Takeuchi H, Iwamoto T, Itoh Y. Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi emulsion solvent diffusion method. *J Pharm Sci*, 1989; 78: 68-72.
- Kiremitci G, Umusderelio G, Deniz M. Synthesis, characterization and in vitro degradation of Poly(DL-Lactide) /Poly(DL-lactide-co-glycolide) films. *Turk J Chem*, 1999; 23: 153 -161.
- Koehler AB, Murphree ES. A comparison of the Akaike and Schwarz Criteria for selecting model order. *Appl Statist* 1988; 37: 187-195.

- Konan Y, Gurny R, Allémann E.** Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int J Pharm*, 2002; 233: 239-252.
- Kondo A.** Microencapsulation processing and technology. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 1979.
- Krause HJ, Schwartz A, Rohdewald P.** Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system for lipophilic drugs. *Int J Pharm*, 1985; 27: 145-155.
- Krause HJ, Schwartz A, Rohdewald P.** Interfacial polymerization, a useful method for the preparation of polymethylcyanoacrylate nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, 1986; 12: 527-552.
- Kreuter J, Speise P.** In vitro studies of poly (methylmethacrylate) adjuvants. *J Pharm Sci*, 1976; 65: 1624-1627.
- Kreuter J.** Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv*, 1983; 58: 242-249.
- Kreuter J.** en Kreuter J. ed., Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, 1994: 219-343.
- Kulkarni V, Kulkarni A, Aminabhavi T.** Development of microparticles using a new stabilizer. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the Controlled Release Society, Glasgow (Scotland), 2003.
- Langer RS, Peppas NA.** Present and future applications of biomaterials in controlled delivery systems. *Biomaterials*, 1984; 2: 201-214.
- Le Bourlais CA, Treupel-Acar L, Rhodes CT, Sado PA, Leverage R.** New ophthalmic drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 1995; 21 (1): 19-59.
- Lee SC, Oh JT, Jang MH, Chung SI.** Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J Control Rel*, 1999; 59: 123-132.
- Lenaerts V, Couvreur P, Grislain L, Maincent P.** en Lenaerts V, Gurny R. eds., Bioadhesive Drug Delivery Systems. CRC Press. Boca Raton, 1990: 93-104.

- Leroux JC, Doelker E, Gurny R.** en Benita S. ed., *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. Marcel Dekker. New York, 1996: 535-575.
- Lewis H.** Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. En: *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. (M. Chasin and R.S. Langer, eds.). Marcel Dekker. New York, 1990: 1-41.
- Li J, Revol JF, Marchessault RH.** Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. *J Appl Polym Sci*, 1997; 65: 373-380.
- Liang LS, Jackson J, Min W, Risovic V, Wasan KM, Burt H.** Methotrexane loaded poly (L-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexane to the joint. *J Pharm Sci*, 2004; 93 (4): 943-956.
- Löbenberg R, Mass J, Kreuter J.** Improved Body Distribution of <sup>14</sup>C-Labelled AZT Bound to Nanoparticles in Rats Determined by Radioluminography *Proceedings del 23<sup>th</sup> Int Symp Controlled Release Bioact Mater*, 1996; 23: 657-658.
- Lorenzo-Lamosa ML, Remunan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ.** Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Control Rel*, 1998; 52 (1): 109-118.
- Lourenco C, Teixeira M, Simoes S, Gaspar R.** Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. *Int J Pharm*, 1996; 138: 1-12.
- Lukowski G, Müller RH, Müller BW, Dittgen M.** Acrylic acid copolymer nanoparticles for drug delivery: I. Characterization of the surface properties relevant for in vivo organ distribution. *Int J Pharm*, 1992; 84: 23-31.
- Maia JL, Santana MH, Re M. I.** The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Braz J Chem Eng*, Jan./Mar. 2004, 21 (1): 1-12.
- McGee JP, Singh M, Li XM, Qiu H, O'Hagan DT.** The encapsulation of a model protein in poly (D,L lactide-co-glycolide) microparticles of various sizes: an evaluation of process reproducibility. *J Microencapsul*, 1997; 14 (2): 197-210.
- Magenheim B, Benita S.** Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sci*, 1991; 1: 221-241.

- Magill M.** Microencapsulation for the personal care industry. *Cosmetic and Toiletries*, 1990; 105: 59-62.
- Mathiowitz E, Dor Ph, Amato C, Langer R.** Polyanhydride microspheres as drug carriers. III Morphological characterization of microspheres by solvent removal. *Polymer*, 1990; 31: 547-555.
- Muir IS, Moghimi SM, Illum L, Davis SS, Davies MC.** The effect of block copolymers on the uptake of model polystyrene microspheres by Kupffer cells: in vitro and in vivo studies. *Biochem Soc Trans*, 1991; 19: 329S.
- Murakami H, Kawashima Y, Niwa T, Hino T, Takeuchi H, Kobayashi M.** Influence of the degree of hydrolyzation and polymerization of PVA on the preparation and properties of PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, 1997; 149: 43-49.
- Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y.** Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behaviour. *J Control Rel*, 1993; 25: 89-98.
- Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y.** In vitro drug release behaviour of D,L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. *J Pharm Sci*, 1994; 83: 727-732.
- O'Brien M, McCauley J, Cohen E.** Indomethacin. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 1984; 13: 211-238.
- Okada H, Ogawa Y, Yashiki T.** US Patent 4,652,441, 1987.
- Okada H, Yamamoto M, Heya T, Inove Y, Kamei S, Ogawa Y, Toguchi H.** Drug delivery using biodegradable microspheres. *J Control Rel*, 1994; 28: 121-130.
- Oliva M, Caramella C, Díez-Pérez I, Gorostiza P, Lastra CF, Oliva I, Mariño EL.** Sequential atomic force microscopy imaging of spontaneous nanoencapsulation process. *Int J Pharm*, 2002; 242(1-2): 291-294.
- Oliva M, Díez-Pérez I, Gorostiza P, Lastra CF, Oliva I, Caramella C, Mariño EL.** Self-assembly of drug-polymer complexes: A spontaneous nanoencapsulation process monitored by atomic force microscopy. *J Pharm Sci*, 2003; 92 (1): 77-83.

- Pamujula S, Graves RA, Freeman T, Srinivasan V, Bostanian TA, Kishore V, Mandal T. Oral delivery of spray dried PLGA/amifostine nanoparticles. *J Pharmacy and Pharmacology*, 2004; 56: 119-1125.
- Peracchia MT, Gref R, Minamitake Y, Domb A, Lotan N, Langer. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *J Control Rel*, 1997; 46: 223-231.
- Pérez JA, Pujol M. Validación de métodos analíticos. Monografías de AEFI, Barcelona, 2001.
- Perugini P, Simeón S, Scalia S, Genta I, Modena T, Conti B, Pavanetto F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate. *Int J Pharm*, 2002; 246: 37-45.
- Pitt CG. The controlled parenteral delivery of polypeptides and proteins. *Int J Pharm*, 1990; 59: 173-196.
- Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (E caprolactone) and their Copolymers in vivo. *Biomaterials*, 1981; 2: 215-220.
- Poste G. Liposome targeting in vivo: problems and opportunities, *Biol Cell*, 1983; 47: 19-38.
- Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C, Herrera A, Martínez R. Determinación estructural de compuestos orgánicos. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 2001.
- Prieto-Yerro C, Vargas-Castrillón E. Problemas de uso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en pacientes con patología crónica asociada. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 2000; 24 (4).
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. Study of the mechanism of formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Polym Colloid Sci*, 1997; 275: 640-647.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*, 1998; 24: 1113-1128.

- Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. French Patent, 9709672, París 1997.
- Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *J Microencapsul*, 1998; 15 (1): 107-119.
- Radomsky ML, Brouwer G, Floy BJ, Loury DJ, Chu F, Tipton AJ, Sanders LM. The controlled release of Ganirelix from the ATRIGEL injectable implant system. *Proceedings del 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Controlled Release Society*. Washington, 1993.
- Rege PR, Shukla DJ, Block LH. Chitinosans as tableting excipients for modified release systems. *Int J Pharm*, 1999; 18 (1): 49-60.
- Reich G. Use of DSC to study the degradation behaviour of PLA and PLGA microparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, 1997; 23 (12): 1177-1189.
- Riegelman S, Collier P. The application of statistical moment theory to the evaluation of in vivo dissolution time and absorption time. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1980; 8: 509-512.
- Rivera R, Alvarado G, Aldaba S, Flores C, Hernández A. Esteroides microencapsulados como una alternativa en anticoncepción de acción prolongada. En: Pérez Palacios G, ed. *Avances recientes en la regulación de la fertilidad*. Piensa, México, 1987: 149-170.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. American Pharmaceutical Association 4<sup>a</sup> ed. The Pharmaceutical Press, London, 2003.
- Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Rel*, 2002; 82: 105-114.
- Sánchez A, Tobio N, Alonso MJ. Los copolímeros de ácido láctico y glicólico. *Industria farmacéutica*, Enero/febrero 1995: 69-76.
- Scholes PD, Coombes AGA, Illum L, Davis SS, Vert M, Davies MC. The preparation of sub-200 nm poly(lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J Control Rel*, 1993; 25: 145-153.

- Scholes PD, Coombes AGA., Illum L, Davis SS, Watts JF, Ustariz C, Vert M, Davies MC. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *J Control Rel*, 1999; 59(3): 261-278.
- Schwarz G. Estimating the dimension of a model. *Ann Stat*. 1978; 6: 461-464.
- Shah SS, Cha Y, Pitt CG. Poly (glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery? *J Control Rel*, 1992; 18: 261-270.
- Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G. The influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from circulation: studies with poly (ethylene glycol) coated vesicles, *Biochim Biophys Acta*, 1991; 1062: 77-82.
- Simon W, Clero T. Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Tomo I. Ed. Alambra. Barcelona, 1980.
- Sing G. Recent considerations in NSAID gastropathy. *Am J Med*, 1998; 105: 31s-38s.
- Sjövall J, Sjöquist R, Huitfeldt B, Nyquist H. Correlation between the bioavailability of microencapsulated bacampicillim hydrochloride in suspension and in vitro microcapsule dissolution. *J Pharm Sci*, 1984; 73: 141-145.
- Skoog D, West D, Holler F. Química Analítica. Ed. Mc Graw Hill. México, 1995: 227-234.
- Socrates G. Infrared Characteristic Group Frequencies. John Wiley & Sons. New York, 1994.
- Spenlehauer G, Vert M, Benoit JP, Chabot F, Veillard M. Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morfology and release characteristic. *J Control Rel*, 1988; 7: 217-229.
- Sternling CV, Scriven LE. Interfacial turbulence: Hydrodynamic instability and the Marangoni effect. *A I Ch E J*, 1959; 5: 514-523.
- Sturesson C, Carlfors J, Edsman K, Andersson M. Preparation of biodegradable poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres and their in vitro release of timolol maleate. *Int J Pharm*, 1993; 89: 235-244.
- Sukukara Ch, Takahashi T, Hagiwara A. Controlled release of cisplatin from lactic acid oligomer microspheres incorporating cisplatin: in vitro studies. *J. Control. Rel*, 1992; 22: 69-73.

- Suñé-Negre JM.** Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. Formación continuada para farmacéuticos de hospital. Tomo 3. Fundación Promoción Médica. Barcelona, 2002: 27-65.
- Swift P.** Adventitious carbon - the panacea for energy referencing? *Surf Interface Anal*, 1982; 4:47.
- Tanaka M, Ogawa Y, Miyagawa T.** Copolymer and Method for producing the same. US patent 4677191, 1987.
- Thies C.** Microcapsules as Drug Delivery Devices. *CRC Crit Rev Biomed Eng.* 1983; 8: 335-350.
- Thies C, Ribeiro Dos Santos I, Richard J, Vande Velde V, Rolland H, Benoit JP.** A supercritical fluid-based coating technology 1: Process considerations. *J Microencapsul*, 2003; 20 (1): 87-96.
- Tice TR, Gilley RM.** Preparation of injectable controlled release microcapsules by a solvent evaporation process. *J Control Rel*, 1985; 2: 343-352.
- Tice TR, Gilley RM.** Preparation of injectable controlled release microcapsules by a solvent evaporation process. En: *Advances in Drug Delivery Systems*. Ed Elsevier Science Publishers BV. New York, 1986: 343-373.
- Tice TR, Lewis DH.** US Patent 4,389,330, 1983.
- Tice TR, Tabibi SE.** Parenteral drug delivery: injectables, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, 1992: 315-339.
- USP 28, NF 23.** United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2005.
- Van Noort SJ, van Der Werf KO, de Grooth BG, Van Hulst NF, Greve J.** Height anomalies in tapping mode atomic force microscopy in air caused by adhesion. *Ultramicroscopy*, 1997; 69(2): 117-127.
- Vane JR.** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature*, 1971; 231: 232-235.
- Vesenka J, Guthold M, Tang CL, Keller D, Delaine E, Bustamante C.** Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. *Ultramicroscopy*, 1992; 42-44 (Part 2): 1243-1249.

- Visscher GE, Robinson RL, Maulding HV, Fong JW, Pearson JE, Argentieri GJ. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res*, 1985; 19: 349-365.
- Wang J, Wang BM, Schwendeman SP. Characterization of the initial burst drug release from PLGA microspheres I: multiphasic release behaviour uncovered by continuous monitoring. *Proceedings del AAPS Annual Meeting*, Indianapolis, 2000a.
- Wang J, Wang BM, Schwendeman SP. Characterization of the initial burst drug release from PLGA microspheres II: alterations in surface permeability implicated in cessation of burst release. *Proceedings del AAPS Annual Meeting*, Indianapolis, 2000b.
- Watts PJ, Tudor A, Church SJ, Hendra PJ, Turner P, Melia CD, Davies MC. Fourier transform-Raman spectroscopy for the qualitative and quantitative characterization of sulfasalazine-containing polymeric microspheres. *Pharm Res*, 1991; 8(10): 1323-1328.
- Wehrle P, Magenheimer B, Benita S. The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. *J Pharm Biopharm*, 1995; 41: 19-26.
- Westesen K, Siekmann B. Biodegradable colloidal drug carrier systems based on solid lipids. En Benita S. (ed.), *Microencapsulation*. Marcel Dekker, New York, 1996: 213-258.
- Wolfe MM, Lichtenstein DR, Sing G. Gastrointestinal toxicity of non-steroidal antiinflammatory drugs. *N Eng J Med*, 1990; 340 (24): 1888-1898.
- Wood DA. Biodegradable drug delivery systems. *Int J Pharm*, 1980; 7: 1-18.
- Yu-Shung O, Sang-Yu L, Jong-Hoon R, Gio-Bin L. Preparation of 5-FU-loaded poly(L-lactide) microparticles using a supercritical anti-solvent process. *Proceedings del 31<sup>th</sup> Annual Meeting of the Controlled Release Society*, Honolulu, 2004.
- Zolnik BS, Asandei AD, Raton JL, Chen ML, Hussain A, Burgess DJ. In vitro testing methods for dexamethasone release from PLGA microspheres. *Proceedings del AAPS Annual Meeting*, Baltimore, 2004.
- Zweers ML, Grijpma DW, Engbers GH, Feijen J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J Biomed Mater Res, Part B: Appl. Biomater*, 2003; 66B: 559-566.