



Desarrollo de sistemas portadores de fármacos basados en nanopartículas sólidas lipídicas y de nuevos métodos analíticos para la determinación de principios activos cargados en los sistemas portadores

Lic. Jessica Otarola



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

Desarrollo de sistemas portadores de fármacos basados en nanopartículas sólidas lipídicas y de nuevos métodos analíticos para la determinación de principios activos cargados en los sistemas portadores

Lic. Jessica Otarola

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 7 de agosto de 2012 y el 6 de julio de 2018, bajo la dirección de los Dres. Mariano Garrido y Néstor Mariano Correa, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Lic. Jessica Otarola



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de (.....)

AGRADECIMIENTOS

A mi hija Malena, por haberme mostrado un mundo nuevo lleno de desafíos el cual me impulsa a crecer cada día como persona. Por iluminarme con la paz de su sonrisa ayudándome a frenar y disfrutar de las cosas realmente importantes en la vida. Gracias hija por representar mi logro más importante.

A mi marido Cristian, por su apoyo y paciencia. Por haberme enseñado que el camino se transita más fácil caminando “juntos a la par”. Por ser mi compañero, con todo lo que la palabra involucra, siendo la persona que me escucha, me aconseja y es mi apoyo constante. Gracias por haber llegado para cambiar mi mundo y regalarme lo más importante de mi vida, mi hija.

A mi familia, que es pequeña pero más que suficiente para sentirse contenido. Gracias a mi mamá Cristina, a Oscar que es como un papá para mí, a mis hermanas Débora y Eliana y a mis cuñados Cristian y Nicolás por su amor y su apoyo incondicional a la distancia. Desde diciembre de 2013, cuando me fui de mi ciudad, hasta hoy, nunca los sentí demasiado lejos ya que siempre estuvieron presentes.

A mi amiga Airam, que me ayudo en tantos sentidos. Todos estos años juntas fueron un regalo muy valioso. No solo me brindó su apoyo académicamente y ayudo a que mi tesis quedara linda, sino también me contuvo a nivel emocional, brindándome su amistad.

A mis directores de tesis N. Mariano C. y Mariano G., por haberme guiado todos estos años. Por sus consejos, tiempo, confianza, buen trato, paciencia, libertad para trabajar y dedicación.

A Patricia, que sin tener un lazo directo con mi tesis, estuvo presente apoyando emocional y académicamente. Y a quien agradezco también por darme la oportunidad de seguir trabajando juntas durante el postdoctorado.

A todos los miembros del GSO, por la calidad humana y por sus aportes durante tantos miniseminarios compartidos.

A la UNS por haberme formado como profesional y a la UNRC (Universidad Nacional de Río Cuarto) por brindarme un lugar de trabajo permitiéndome así finalizar mis estudios doctorales.

A CONICET, por otorgarme la beca de posgrado, sin la cual no hubiera sido posible la realización de mi doctorado.

RESUMEN

Los portadores lipídicos nanoestructurados (NLCs) son sistemas organizados actualmente estudiados para el transporte de fármacos. Estos sistemas están constituidos por matrices lipídicas a escala nanométrica, sólidas a temperaturas fisiológicas y estabilizadas por la presencia de tensoactivos. Así, sus componentes generales incluyen lípidos y agentes tensoactivos. El objetivo de la presente Tesis es investigar la obtención de sistemas de transporte de fármacos basados en NLCs a partir de reactivos seguros. Además, se pretende estudiar su potencial como sistema de transporte del fármaco piroxicam (PX), presentando así el sistema portador como una alternativa para la administración de principios activos que involucren efectos adversos relacionados con su incorporación directa. A su vez, el trabajo apunta al desarrollo de métodos analíticos para el estudio de los principios activos que son vehiculizados en este tipo de sistemas portadores.

Para la obtención de los NLCs se propuso un método simple, de baja energía y sin un uso considerable de solventes orgánicos. El sistema obtenido se caracterizó para corroborar la presencia de un sistema coloidal estable. Para esto se utilizaron técnicas experimentales, como dispersión dinámica de luz (DLS), microelectroforesis de láser Doppler y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los parámetros resultantes fueron satisfactorios, obteniéndose nanopartículas monodispersas, de morfología esférica, estables y con tamaños de partícula menores de 200 nm. Se incorporó el PX y se volvió a caracterizar el sistema. Se observó que la incorporación del principio activo no modificó sustancialmente las características del sistema portador.

Se llevaron a cabo estudios por espectroscopia de absorción UV-visible y de fluorescencia tanto del fármaco como del sistema portador, lográndose corroborar la incorporación de PX en los NLCs y establecer que, desde el primer día de preparadas las nanopartículas, existe un reparto del PX entre la fase acuosa externa y el interior de los portadores. Lo cual se vio posteriormente reflejado en la eficiencia de encapsulamiento del sistema.

Se desarrollaron dos nuevos métodos analíticos: uno de ellos, basado en electroforesis capilar, que permitió determinar el porcentaje de encapsulamiento de fármaco en sistemas portadores y el otro, basado en voltametría de onda cuadrada (VOC), el cual posibilitó la obtención de los perfiles de liberación del fármaco.

Se llevó a cabo el estudio de liberación *in vitro* del PX desde el sistema portador mediante VOC obteniéndose el correspondiente perfil de liberación. A su vez, los resultados obtenidos por VOC permitieron conocer la eficiencia de encapsulamiento del sistema. Los portadores exhibieron una fase inicial de liberación lenta de fármaco seguida por una liberación sostenida, dando como resultado un perfil aproximadamente sigmoideo. El sistema mostró una liberación del 60% del principio activo incorporado y una eficiencia de encapsulamiento del 75%. El tipo de patrón de liberación lenta y prolongada, es deseable para la mayoría de las aplicaciones de sistemas de administración de fármacos. La acción a largo plazo observada permite que la formulación sea adecuada para aplicaciones del tipo tópicas. El perfil de liberación permitió establecer también que el sistema obtenido presenta una estructura tipo II, la cual conduce a una difusión lenta del fármaco desde la matriz.

La última etapa del presente trabajo de Tesis consistió en proponer una formulación farmacéutica apta para la administración del fármaco. En función de las propiedades del PX se desarrolló un gel tópico apuntando a su aplicación transdérmica. La tesis concluyó con el estudio de la eficiencia del gel como sistema de soporte de los NLCs.

ABSTRACT

The nanostructured lipid carriers (NLCs) are organized systems currently studied for drugs transportation. These systems consist of nanoscale lipid matrices, solid at physiological temperatures and stabilized by the presence of surfactants. Thus, they are basically composed by lipids and surfactants. The objective of this Thesis was focused on obtaining drug delivery systems based on NLCs from safe reagents. Particularly, the designed delivery systems were intended for carrying active substances that present adverse effects related to its direct incorporation, such as the drug piroxicam (PX). This research also aimed at developing analytical methods able to determine the active principles in this type of carrier systems.

In order to obtain the NLCs, a simple, low-energy method with minimal use of organic solvents was proposed. The system obtained was characterized to corroborate the presence of a stable colloidal system. For this purpose, experimental techniques, such as dynamic light scattering (DLS), Doppler laser microelectrophoresis and transmission electron microscopy (TEM) were used. The parameters were satisfactory and consistent with monodisperse spherical nanoparticles, in a stable suspension, with particle size lower than 200 nm. The PX was successfully incorporated in the NLCs and the system was characterized again. In this regard, the incorporation of the active principle did not substantially modify the characteristics of the system.

Also, an exhaustive spectroscopic study using UV-visible and fluorescence was carried out for both PX and the PX-loaded NLC system in order to understand how the PX was incorporated in the delivery system. The incorporation of PX in the NLCs was confirmed and was also possible to establish that there is a distribution of the PX between the external aqueous phase and interior of the NLCs from the first day. This fact was related with the system entrapment efficiency.

Two new analytical methods were developed: one of them, based on capillary electrophoresis, made it possible to determine the percentage of drug encapsulation in carrier systems and the other, based on square wave voltammetry (VOC), which allowed the drug release profiles to be obtained.

In vitro release profile of PX was studied by VOC. The new method based on VOC measurements made it possible to know the entrapment efficiency of the system. The NLCs exhibited an initial phase of slow drug release followed by a sustained release, resulting in an approximately sigmoidal profile. The system showed a 60% release of the incorporated active principle and an entrapment efficiency of 75%. This type of slow and prolonged release pattern is desirable for most applications of drug delivery systems. The observed long-term action allows the formulation to be suitable for topical applications. The shape of the release profile was in accordance with a type II structure of the system, which led to a drug slow diffusion from the matrix.

The last stage of the current Thesis was to propose a suitable pharmaceutical formulation for PX-NLCs administration. To do this, a topical gel for dermal application was developed. The Thesis concluded with the study of the gel efficiency as a support system for the NLCs.

CONTENIDO

	Pág.
1. OBJETIVOS.....	2
1.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 GENERALIDADES	4
2.2 NANOPARTÍCULAS LÍPIDICAS: SNLS Y NLCS.....	7
2.3 COMPONENTES DE LAS NPS LIPÍDICAS	12
2.4 ESTRUCTURA DE LAS SLNS Y LOS NLCS.....	17
2.4.1 Estructura de las SLNs	18
2.4.2 Estructura de los NLCs.....	19
2.5 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	20
2.5.1 Método de microemulsión.....	21
2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	24
2.6.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad.....	25
2.6.2 Potencial zeta.....	25
2.6.3 Morfología.....	28
2.6.4 Eficiencia de encapsulamiento	28
2.6.5 Perfil de liberación.....	28
2.7 FAMILIA DE FÁRMACOS EN ESTUDIO.....	29
2.7.1 Piroxicam.....	29
2.8 FORMULACIÓN FARMACÉUTICA DE NLCS.....	34
2.9 FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS.....	40
2.9.1 Dispersión dinámica de luz.....	40

2.9.2 Movilidad electroforética	43
2.9.3 Espectroscopia de fluorescencia molecular	45
2.9.4 Técnicas electroquímicas.....	47
2.9.5 Electroforesis capilar	55
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	59
3.1 REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	59
3.2 PROCEDIMIENTOS	62
3.2.1 Obtención de suspensiones acuosas de NLCs	62
3.2.2 Obtención del gel conteniendo PX-NLCs	63
3.2.3 Dispersión de luz	64
3.2.4 Microscopía de transmisión eléctrica (TEM)	64
3.2.5 Electroforesis capilar	65
3.2.6 Liberación <i>in vitro</i> de la suspensión acuosa PX-NLC por VOC.....	65
3.2.7 Estudio de la eficiencia de la formulación farmacéutica.....	66
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
4.1 SELECCIÓN DE LOS REACTIVOS Y DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS NLCS	67
4.2 CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LOS SISTEMAS PORTADORES	68
4.2.1 Tamaño de partícula	68
4.2.2 Índice de polidispersidad (PDI)	71
4.2.3 Potencial Z.....	71
4.2.4 Morfología.....	72
4.3 ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO	73
4.3.1 Comportamiento del PX en medio acuoso: Identificación de especies.....	74
4.3.2 Comportamiento del PX en solventes polares próticos	75
4.3.3 Comportamiento del PX en solventes polares apróticos	77
4.3.4 Comportamiento del PX en solventes apolares	79

4.3.5 Comportamiento del PX dentro del sistema portador	81
4.4 ESTUDIO DEL SISTEMA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR	86
4.4.1 Condiciones de separación	86
4.4.2 Curva de calibrado de PX libre	87
4.4.3 Cálculo de la concentración de PX incorporado en el sistema PX-NLCs.....	88
4.5 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO	89
4.5.1 Comportamiento de PX en medio acuoso	89
4.5.2 Comportamiento los NLCs en el tiempo utilizando DLS	92
4.5.3 Comportamiento electroquímico de PX-NLCs en el tiempo.....	92
4.5.4 Modelo electroquímico para la liberación de PX	95
4.5.5 Estudio de liberación <i>in vitro</i> de PX-NLCs a partir de VOC	97
4.5.6 Eficiencia de encapsulamiento	102
4.6 ESTUDIOS DE LA FORMULACION DEL GEL PX-NLCS.....	102
4.6.1 Estudio de liberación <i>in vitro</i> de PX desde el GEL PX-NLCs mediante VOC...	103
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	107
6. REFERENCIAS	109
7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	121

ÍNDICE DE FIGURAS

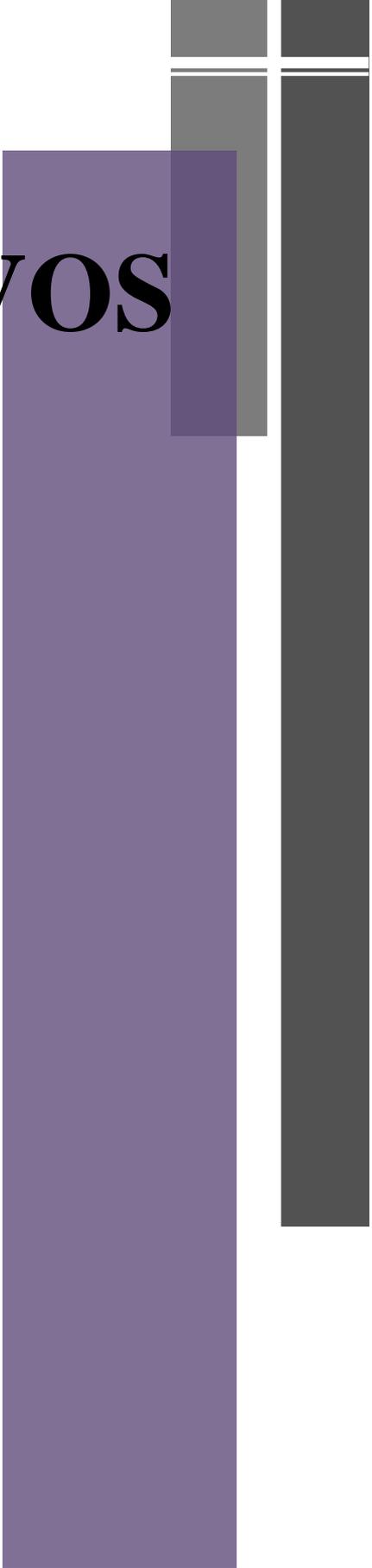
Figura 1. Descripción general del desarrollo histórico de nanovehículos: desde nanoemulsiones hasta nanopartículas lipídicas (SLNs/NLCs).....	6
Figura 2. Diferencias estructurales entre las matrices de SLNs y NLCs.....	11
Figura 3. Representación general de una molécula anfifílica.....	13
Figura 4. Estructura química de Tween 80. (w + x + y + z) se refiere al número total de unidades de óxido de etileno.	14
Figura 5. Estructura de lecitina.....	16
Figura 6. Estructura del oleato de etilo.....	16
Figura 7. Representación esquemática de una nanopartícula lipídica.	18
Figura 8. Modelos de incorporación de principios activos en las SLNs	18
Figura 9. Diferentes tipos de NLCs: I) imperfecto, II) múltiple y III) amorfo.....	20
Figura 10. Dos maneras de visualizar la doble capa (considerando una NP cargada negativamente). La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor de la NP. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor de la NP cargada.....	26
Figura 11. Representación del potencial eléctrico de una NP en suspensión. r simboliza la distancia desde la superficie de la NP hacia el seno de la solución.....	27
Figura 12. Diagrama de distribución de especies del PX ¹⁵¹	30
Figura 13. A) Equilibrio ceto-enólico de PX, B) enlace puente de hidrógeno intramolecular en enol PX y C) anión PX.	31
Figura 14. Propiedades de las nanopartículas lipídicas en la piel. Superior: Situación en la piel dañada. Inferior: Acción de SLNs/NLCs.	37
Figura 15. Aspectos del carbopol. a) Reacción química del ácido (poli) acrílico con una base, ej.: Hidróxido de sodio, NaOH, b) el polímero reticulado seco se hidrata y se hincha y c) polímero en polvo.....	38
Figura 16. Esquema de una celda de difusión de Franz.	39
Figura 17. Diagrama esquemático del fenómeno de dispersión.....	40
Figura 18. Dispersión de la luz debida a partículas de diferente tamaño.	41
Figura 19. Función de correlación y su relación con el tamaño de partícula.	42

Figura 20. Ilustración del proceso de electroforesis luego de la aplicación de un campo eléctrico sobre una suspensión de partículas cargadas negativamente.....	43
Figura 21. Sistema electroquímico y variables. A) Fuente de potencial, B) microamperímetro, C) electrodos y D) solución electrolítica.	48
Figura 22. Celda electroquímica de tres electrodos. A) Fuente de potencial y B) microamperímetro. ET: Electrodo de trabajo; ER: Electrodo de referencia; CE: Contra electrodo; D: Solución electrolítica.	49
Figura 23. Barrido de potencial en la técnica de voltametría cíclica.....	51
Figura 24. Voltagrama cíclico típico de una reacción reversible.	52
Figura 25. Representación esquemática de la función de perturbación en términos de potencial en función del tiempo de la onda cuadrada. Donde t_i = tiempo de reposo, t_p = es el tiempo de pulso, T = periodo, E_i = potencial de reposo, ΔE_s = salto de potencial, ΔE_{sw} = amplitud de potencia.	53
Figura 26. Voltagrama de onda cuadrada para una especie reversible R/O en ausencia de O en el seno de la solución, donde Ψ es la función corriente diferencial neta, Ψ_1 la corriente directa (de ida) y Ψ_2 la corriente inversa (de vuelta).....	54
Figura 27. Doble capa eléctrica en capilares de sílice fundida.....	56
Figura 28. Perfil de flujo uniforme en electroforesis capilar.....	57
Figura 29. Migración de solutos en electroforesis capilar.....	58
Figura 30. Cubeta tipo DTS 1060C.....	60
Figura 31. Celda de difusión de Franz.....	61
Figura 32. Distribución del tamaño de partícula obtenido mediante dispersión dinámica de la luz.....	69
Figura 33. Evolución del tamaño de partícula a lo largo del tiempo para los NLCs control (\circ) y PX-NLCs (\bullet). $[PX]= 100\mu M$	70
Figura 34. Fotografías digitales de suspensiones de NPs. (A) día 1, (B) día 2 y (C) día 5,	70
Figura 35. Índice de polidispersidad de las suspensiones de NLCs control (\circ) y PX-NLCs (\bullet) en función del tiempo. $[PX]= 100\mu M$	71
Figura 36. Potencial Z de las suspensiones de NPs a lo largo del tiempo. (Δ) NLCs control y (\blacktriangle) PX-NLCs. $[PX]=100\mu M$	72
Figura 37. Micrografía TEM de los PX-NLCs obtenida luego de un día de su preparación. $[PX]=100\mu M$	73
Figura 38. Espectros de absorción de PX en agua. $[PX]= 20\mu M$	74

Figura 39. Espectros de emisión de fluorescencia de PX en agua. [PX]=20 μ M.	75
Figura 40. Espectros de absorción de PX en solventes polares próticos. [PX]= 20 μ M. 77	77
Figura 41. Espectros de emisión de PX en solventes polares próticos. [PX]= 20 μ M.... 77	77
Figura 42. Espectros de absorción de PX en solventes polares apróticos. [PX] = 20 μ M.	78
Figura 43. Espectros de emisión de PX en solventes polares apróticos. [PX] = 20 μ M. 79	79
Figura 44. Espectros de absorción de PX en solventes apolares. [PX]= 20 μ M.	80
Figura 45. Espectros de emisión de PX en solventes apolares. [PX]= 20 μ M.	80
Figura 46. Espectro de absorción de PX en oleato de etilo. [PX]= 50 μ M.	82
Figura 47. Espectro de emisión de PX en oleato de etilo. [PX]= 50 μ M.	82
Figura 48. Espectro de absorción de PX en solución acuosa de Tween 80. [PX]= 50 μ M.	83
Figura 49. Espectro de emisión de PX en solución acuosa de Tween 80. [PX]= 50 μ M.84	84
Figura 50. Espectro de absorción de suspensión PX-NLCs. [PX]= 50 μ M.	85
Figura 51. Espectro de emisión de suspensión PX-NLCs. [PX]= 50 μ M.	85
Figura 52. Electroferogramas correspondientes a la suspensión de NLCs control (a) y a la suspensión de NLCs control con agregado de PX (b). El pico (c) pertenece al PX libre, sin encapsular.	87
Figura 53. Curva de calibrado correspondiente al área de pico electroforético en función de la concentración de PX libre.	88
Figura 54. (A) VC de PX en agua. [PX] = 380 μ M, $v = 0,10 \text{ Vs}^{-1}$. [LiClO ₄] = 0,05 M (B) VOC de PX en agua y su variación al cabo de 30 minutos (C) VOC de PX en solución acuosa de tensoactivos registrados, durante una semana. [PX] = 50 μ M, [LiClO ₄] = 0,05 M.	91
Figura 55. Dependencia del coeficiente de difusión de las nanopartículas PX-NLCs en el tiempo. [PX] _T = 100 μ M en [LiClO ₄] = 0,05 M. La línea sólida representa la función que mejor se adapta a los datos experimentales.	92
Figura 56. A) Voltagramas VOC del sistema PX-NLCs a diferentes tiempos. [PX] _T = 100 μ m en [LiClO ₄] = 0,05 M. B) Voltagrama VOC de PX agregado por fuera del sistema NLCs a diferentes tiempos. [PX] _T = 50 μ M en [LiClO ₄] = 0,05 M.	94
Figura 57. Curva de calibrado I _p en función de concentración de PX en solución acuosa [LiClO ₄]=0,05 M.	97

Figura 58. Dependencia de I_T en el tiempo para tres concentraciones totales de PX en los NLCs. $[PX]_T=50 \mu\text{m}$ (■), $[PX]_T=75 \mu\text{m}$ (●), $[PX]_T=100 \mu\text{m}$ (▲). $[\text{LiClO}_4]=0,05 \text{ M}$. La línea sólida representa la función que mejor se ajusta a los datos experimentales. ...	98
Figura 59. Dependencia de las concentraciones de PX dentro ($[PX]_{NP}=\bullet$) y fuera	100
Figura 60. Fotografía digital gel PX-NLCs.	102
Figura 61. Voltamogramas VOC del sistema PX-NLCs en diferentes tiempos. $[PX] = 100 \mu\text{M}$ en buffer fosfato de pH 7,4.	103
Figura 62. Dependencia de I_T en el tiempo para gel PX-NLCs en buffer fosfato pH 7,4. $[PX]_T = 100 \mu\text{m}$. La línea sólida representa la función que mejor ajusta a los datos experimentales.	104
Figura 63. Evolución temporal de la concentración de PX en los NLCs. (●) concentración de PX dentro de las NPs. (○) concentración de PX fuera del sistema portador. La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales. $[PX]_T = 100 \mu\text{M}$ en buffer fosfato pH 7,4.	105
Figura 64. Porcentaje de liberación de PX desde el gel PX-NLCs en función del tiempo.	105

OBJETIVOS



1. OBJETIVOS

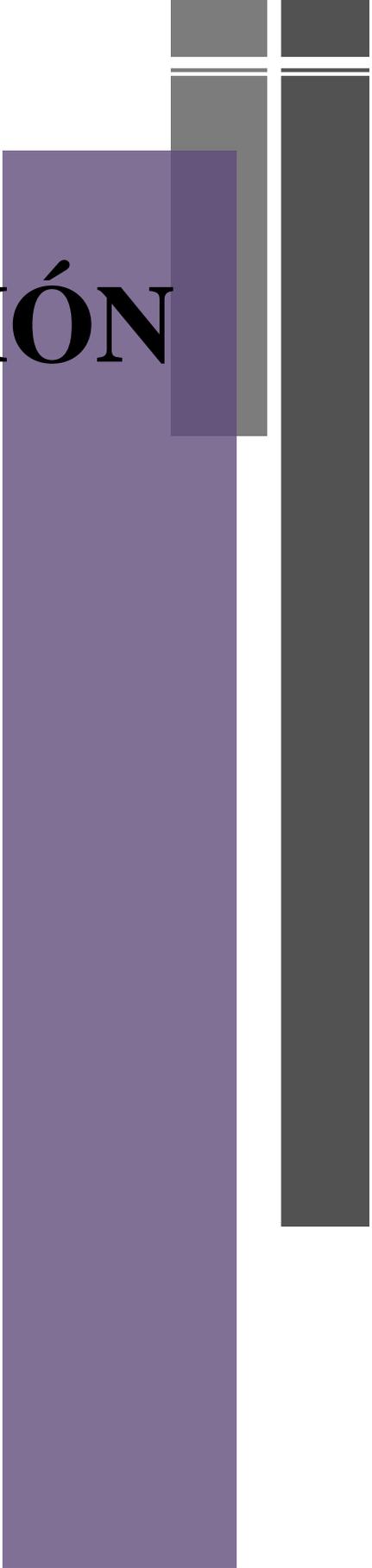
1.1 OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo general el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos basados en nanopartículas lipídicas del tipo de los portadores lipídicos nanoestructurados (NLCs) y el desarrollo de métodos analíticos confiables y adecuados para la cuantificación del principio activo de interés incorporado en el sistema.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtención de sistemas portadores (NLCs) a partir de reactivos que presenten mínima toxicidad para los organismos vivos.
- Caracterización de los sistemas portadores. Algunos parámetros a considerar están directamente relacionados con la estabilidad del sistema, a saber: tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidad.
- Incorporación del principio activo en los sistemas portadores. Es de interés el estudio de fármacos pertenecientes a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos. Sobre todo, aquellos que presentan baja solubilidad en fase acuosa y efectos secundarios relacionados con su administración por vía oral, como es el caso del piroxicam.
- Caracterización de los sistemas portadores luego de la incorporación del principio activo.
- Estudio *in vitro* de la liberación de la droga desde el sistema portador. Determinación de la eficiencia de encapsulamiento del sistema. A partir de las características del fármaco, se prevé el desarrollo de métodos analíticos adecuados para su determinación mediante el uso de técnicas espectroscópicas y electroquímicas.
- Desarrollo de una formulación farmacéutica adecuada para la administración segura de las nanopartículas. Estudio, mediante las técnicas electroquímicas ya empleadas, de la eficiencia de dicha formulación como soporte del sistema, analizando su influencia en la liberación del fármaco incorporado en las nanopartículas.

INTRODUCCIÓN



2. INTRODUCCIÓN

En esta sección se definirán brevemente los conceptos más relevantes relacionados con la serie de estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral. En tal sentido, se expondrán algunas generalidades de las nanopartículas lipídicas y su aplicación como sistemas de transporte de fármacos.

2.1 GENERALIDADES

Existen importantes grupos de fármacos que presentan propiedades físicoquímicas o biológicas desfavorables, que comprometen la eficacia y/o seguridad de su administración. Como ejemplos pueden citarse drogas poco solubles, irritantes o de biodisponibilidad errática. Para evitar estos inconvenientes, y otros relacionados con la degradabilidad o inestabilidad de ciertas drogas, se han desarrollado diferentes sistemas portadores de fármacos¹. Un sistema portador de fármacos está definido como una formulación o dispositivo que permite la introducción de una sustancia terapéutica en el cuerpo mejorando la eficacia y seguridad de la misma; controlando la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación de la droga^{2, 3}.

Es deseable que estos sistemas, desde el punto de vista farmacéutico, presenten ventajas tales como: facilidad de obtención, estabilidad, potencial para vehiculización de principios activos con diferentes polaridades, protección de las drogas solubilizadas en la fase dispersa, potencial aumento de la biodisponibilidad y un aumento en la eficiencia de absorción por endocitosis, micelización o vía capilar linfático².

El desarrollo de sistemas portadores de fármacos constituye una investigación de abordaje multidisciplinario donde es necesario conocer las propiedades físicoquímicas de los materiales a ser estudiados, diseñar métodos analíticos tendientes a cuantificar los fármacos, tanto en los sistemas portadores como en medios biorrelevantes, y estudiar la farmacocinética en organismos vivos.

En los últimos años se ha tratado de explotar el desarrollo de la nanotecnología al servicio de la medicina^{4, 5}. La nanotecnología es la aplicación del conocimiento científico

para manipular y controlar la materia, predominantemente en escala nanométrica, con el fin de hacer uso de las propiedades dependientes del tamaño, estructura y distintos fenómenos asociados con átomos o moléculas individuales^{6, 7}. La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en el cuidado de la salud, conduciendo a nuevas vías para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas⁸.

Así, actualmente se han desarrollado nanosistemas que poseen condiciones excepcionales que les permiten ser utilizados como sistemas portadores de fármacos (nanopartículas poliméricas y metálicas, liposomas, micelas, *quantum dots*, dendrímeros, micro/nanoemulsiones, para citar sólo unos pocos ejemplos)^{9, 10, 11, 12, 13}.

Algunos de estos nanosistemas pueden clasificarse como *sistemas organizados*. Como su nombre lo sugiere, los sistemas organizados son sistemas supramoleculares autoensamblados en los que existe cierto “orden” en las entidades que los conforman. El término supramolecular, hace referencia a aquellas estructuras que involucran agregados de moléculas o iones, y que se mantienen unidos por interacciones no covalentes, tales como las electrostáticas, puentes de hidrógeno (puente de H), fuerzas de dispersión y efectos solvofóbicos¹⁴.

La **Figura 1** muestra el desarrollo histórico de algunos sistemas organizados diseñados para el transporte de fármacos, desde nanoemulsiones hasta las modernas nanopartículas lipídicas. En la década de 1960, Wretlind desarrolló la primera emulsión lipídica parenteral segura (Intralipid) para nutrición¹⁵, marcando el comienzo de una nueva clase de sistema de transporte de fármacos lipofílicos. Otros sistemas portadores parenterales interesantes son los liposomas, los cuales fueron descritos por primera vez por Bangham et. al. en la década de 1960 y fueron introducidos para vehiculizar principios activos en la década de 1970^{16, 17}. La principal desventaja de este tipo de sistemas de transporte está relacionada con la estabilidad física tanto del fármaco como del sistema portador^{18, 19}. Las nanopartículas poliméricas, obtenidas tanto a partir de polímeros biodegradables como no biodegradables, son otro innovador sistema portador parenteral. Las ventajas más relevantes de estas nanopartículas son su especificidad respecto al sitio de entrega y la liberación controlada de los fármacos incorporados²⁰. Sin embargo, la citotoxicidad de los polímeros después de la internalización en las células es un aspecto crucial y a menudo

discutido²¹. A mediados de la década de 1990, la atención se ha centrado en las nanopartículas lipídicas^{22, 23}. Estos sistemas combinan las ventajas de otros sistemas de transporte innovadores (ej: estabilidad, protección contra la degradación de medicamentos lábiles incorporados, liberación controlada, excelente tolerabilidad). Una de las características más atractivas de estos sistemas es el hecho de que pueden aplicarse a diferentes rutas de administración (ej.: parenteral, oral, dérmica, ocular, pulmonar, rectal). Así, las nanopartículas lipídicas representan una alternativa interesante para el transporte seguro de principios activos lipofílicos²⁴.

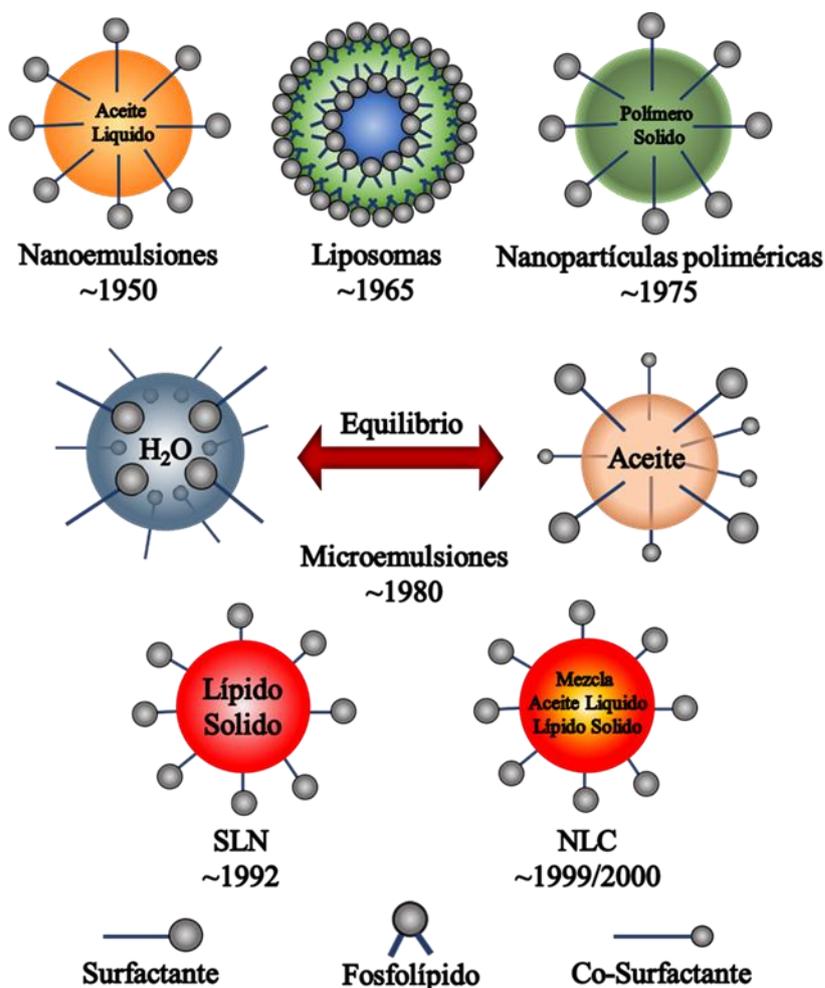


Figura 1. Descripción general del desarrollo histórico de nanovehículos: desde nanoemulsiones hasta nanopartículas lipídicas (SLNs/NLCs)²⁵.

2.2 NANOPARTÍCULAS LÍPIDICAS: SNLs y NLCs

Teniendo en cuenta lo expuesto en el apartado anterior, las nanopartículas lipídicas se presentan como sistemas organizados de gran interés para ser utilizados como portadores de fármacos.

Las nanopartículas (NPs) se pueden definir como *nanoobjetos* con todas las dimensiones externas del orden de la nanoescala, donde la longitud más larga y la más corta de los ejes del nanoobjeto no difieren significativamente. De acuerdo con las normas ISO, el término nanoescala define un rango de longitud aproximadamente de 1 a 100 nm^{6,7}. Aunque esta definición parece ser bastante arbitraria, especialmente en lo que respecta al límite superior, dicho rango es ampliamente aceptado²⁶. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, partículas de tamaño ligeramente mayor, también pueden exhibir propiedades típicas de las nanopartículas. Si las dimensiones difieren significativamente (generalmente en más de 3 veces), se prefieren términos como nanofibras, *nanorods* o nanoplacas en lugar de nanopartícula. Por lo tanto, de acuerdo con las normas ISO, las nanopartículas son un subgrupo de nanoobjetos.

Como se mencionó con anterioridad, las **Nanopartículas Sólidas Lipídicas** (SLNs, del inglés *solid lipid nanoparticles*)^{27, 28} surgieron a principios de los años '90 como una alternativa a las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas²⁹. Estos sistemas presentan una cinética de liberación controlada de los principios activos, buena biocompatibilidad, estabilidad y tolerabilidad, mostrándose así superiores a otros tipos de nanotransportadores^{30, 31, 32}. Básicamente, las SLNs están definidas como matrices lipídicas a escala nanométrica, sólidas a temperaturas fisiológicas y estabilizadas por surfactantes³³. Estos sistemas coloidales presentan un diámetro de partícula entre 50 y 1000nm^{34, 35}. Sin embargo, para aplicaciones nanomédicas, el tamaño preferencial es inferior a 200 nm³⁶.

Sus componentes generales incluyen lípidos sólidos y agentes tensoactivos. Para su utilización con fines farmacéuticos todos los reactivos utilizados en su preparación deben ser generalmente reconocidos como materiales seguros (GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*). Entre los lípidos más comúnmente utilizados se encuentran los triglicéridos (ej.: estearina), glicéridos parciales (ej.: mono y di caprato, estearato), ácidos grasos (ej.: ácidos esteárico, palmítico y oleico), esteroides (ej.: colesterol) y grasas (ej.:

cetilpalmitato), que son lípidos fisiológicos o moléculas utilizadas comúnmente como excipientes en formulaciones farmacéuticas. A su vez, se han utilizado toda clase de agentes tensoactivos para lograr la estabilización de la fase lipídica (ej.: fosfolípidos, copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno y polisorbatos)^{33,35}. Entre sus desventajas se pueden citar: su baja eficiencia de encapsulamiento de fármacos y la posible expulsión de los mismos debido a cambios en la forma de cristalización de los lípidos (transiciones polimórficas)³⁷, el posible crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, la tendencia a la formación de geles y cierta incapacidad de algunas formas cristalinas para incorporar fármacos³⁸.

Asimismo, en los últimos años surgió una segunda generación de estas NPs lipídicas basadas en mezclas de lípidos sólidos y lípidos líquidos (aceites). Estos sistemas son conocidos como **Portadores Lipídicos Nanoestructurados** (NLCs, del inglés *nanostructured lipid carriers*). Estos sistemas de administración, difieren de las SLNs en el estado físico de los lípidos que los componen. Para la producción de los NLCs es habitual mezclar moléculas de lípidos estéricamente muy diferentes. De esta forma, aunque la matriz lipídica será sólida a temperatura ambiente, las NPs obtenidas muestran puntos de fusión inferiores respecto a los lípidos sólidos que las componen³⁹.

El propósito original de los NLCs fue resolver las limitaciones más importantes de las SLNs convencionales^{40, 41, 42, 43} evitando la recrystalización tanto de la fase lipídica como de las sustancias activas cargadas en ellos, minimizando así la expulsión de los fármacos durante las transiciones polimórficas que tienen lugar al recrystalizar el lípido sólido (tanto durante la formación de la nanopartícula lipídica como durante el almacenamiento).

Entre las ventajas generales de estos sistemas de transporte (SLNs/NLCs), puede destacarse el uso mínimo o inexistente de solventes orgánicos, la posibilidad de ser utilizados en diferentes vías de administración: tópica⁴⁴, oral^{45,46}, parenteral⁴⁷, ocular⁴⁸, respiratoria, mediante formas tradicionales como pomadas⁴⁹, geles⁵⁰, suspensiones o soluciones inyectables⁵¹ y aerosoles⁵². Ambos tipos de NPs protegen a las moléculas de fármaco susceptibles de ser degradadas bajo la influencia de agentes externos como la luz y podrían diseñarse para lograr perfiles de liberación prolongada de principios activos de baja solubilidad/disponibilidad²⁴.

Particularmente, estos sistemas muestran grandes ventajas en la aplicación tópica de drogas^{53, 54}. Se ha demostrado que las formulaciones tópicas que contienen nanopartículas lipídicas pueden aumentar la penetración en la piel, incrementando la eficiencia del tratamiento y reduciendo efectos colaterales en ciertas drogas⁵⁵. A pesar de estas ventajas, casi no existen formulaciones en el mercado que contengan este tipo de portadores de fármacos. La **Tabla 1** resume las principales ventajas resultantes de la aplicación de NPs lipídicas como sistemas portadores de fármacos.

Tabla 1. Ventajas de las NPs lipídicas como portadores de fármacos.

Aspectos farmacológicos	Ejemplos	Comentarios/perspectivas
Tecnológico	Protección de la droga frente a la degradación química o enzimática	Numerosas vías de administración
	Estabilidad física	Aumento de la estabilidad del fármaco en la formulación
	Posibilidad de incorporar drogas hidrofóbicas e hidrofílicas	Versatilidad de aplicación como portador de fármacos de diferentes grupos farmacológicos
	Producción a gran escala	Posibilidad de producción industrial
	Facilidad de fabricación	Posibilidad de fabricación en un laboratorio, bajo costo
	Sin uso de disolventes orgánicos	Sin problemas de toxicidad, química verde
	Posibilidad de llevar dos agentes activos (co-entrega)	Posibilidad de una terapia más eficaz (terapia combinada)
	Alta eficiencia de encapsulamiento de drogas	Minimización de la dosis de formulación
	Posibilidad de esterilización	Adecuado para administración parenteral
	Diámetro pequeño y distribución de tamaño estrecha	Sistema atractivo para la administración de medicamentos
Biológico	Administración biológica a través de diferentes rutas	Mayor espectro de aplicación de drogas, posibilidad de selección de una terapia adecuada
	Biodegradabilidad	Posibilidad de aplicación como matriz para la liberación sostenida de fármacos
	Liberación controlada del fármaco	Seguridad para los pacientes, posibilidad de liberación prolongada del fármaco, la concentración terapéutica de fármaco en plasma puede ser proporcionada
	Orientación específica del sitio	Disminución de la toxicidad sistémica, terapia dirigida
	Biocompatibilidad	Evitando de reacciones alérgicas
	Aumento de la biodisponibilidad de la droga incorporada	Minimización de dosis
	Minimización de los efectos secundarios de ciertos medicamentos	Aumento de la seguridad del paciente
	Cruce eficiente de barreras biológicas	Posibilidad de diferentes rutas de administración
	Reducción de la frecuencia de dosificación	Cumplimiento de los pacientes

Si bien los NLCs presentan propiedades similares a las SLNs, debido a la presencia de líquido en su estructura la red cristalina del sólido se ve perturbada y, como consecuencia, la capacidad de carga del sistema portador sufre una sensible mejora⁵⁶. A su vez, la mayoría de los fármacos liposolubles son más solubles en lípidos líquidos que en los sólidos, justificando también el aumento en la capacidad de carga en los NLCs⁵⁷. Por otro lado, variando el núcleo lipídico, es posible modular el perfil de liberación del fármaco⁵⁸.

La **Figura 2** resume las diferencias estructurales entre las matrices de las SNLs y los NLCs, a su vez la ilustración resalta las ventajas de estos últimos.



Figura 2. Diferencias estructurales entre las matrices de SLNs y NLCs.

Liberación de fármacos desde las NPs lipídicas

La liberación de fármacos a partir de NPs lipídicas ocurre por difusión y, simultáneamente, por la degradación de las partículas en el cuerpo⁵⁹. En algunos casos puede ser necesaria una liberación controlada rápida, más allá de la difusión y degradación.

Los NLCs acomodan la droga en función de su estructura lipídica altamente desordenada. La liberación “explosiva” del fármaco puede iniciarse aplicando a la matriz lipídica un impulso para convertirla en una estructura más ordenada. Ciertas estructuras de NLCs pueden activarse por ejemplo, al aplicar sobre la piel las partículas incorporadas en una formulación en crema. El aumento de la temperatura y la consiguiente evaporación de agua pueden conducir a un aumento en la velocidad de liberación del fármaco⁶⁰. En base a este comportamiento se han desarrollado, por ejemplo, NPs lipídicas para el transporte de ciclosporina para tratar la psoriasis^{61,62}.

Dicha modulación no es posible en el caso de las SLNs siendo ésta una desventaja potencial respecto a los NLCs. Esto se debe a que en esta clase de NPs lipídicas la transformación a una estructura ordenada se produce en el momento de la cristalización³⁹.

2.3 COMPONENTES DE LAS NPs LIPÍDICAS

Como se mencionó con anterioridad las NPs lipídicas están compuestas por lípidos (líquidos y/o sólidos) y agentes tensoactivos:

- *Tensoactivos*: Los tensoactivos pertenecen al grupo de moléculas conocidas como *anfifílicas*. Estos compuestos son moléculas que, como se muestra en la **Figura 3**, poseen dos zonas con polaridades diferentes. La zona polar, presenta una densidad electrónica marcada, constituida habitualmente por grupos con carga eléctrica neta, tales como carboxilatos o sulfonatos o bien puede presentar grupos de polióxido de etileno. Así, esta zona es altamente soluble en agua y se conoce como *cabeza polar* o hidrofílica. La zona no polar (*colas hidrocarbonadas*) suele estar constituida por una cadena hidrocarbonada simple o ramificada (8 a 18 átomos de carbono). Si el solvente externo es agua, esta zona es la parte hidrofóbica de la molécula.

Las moléculas anfifílicas facilitan la miscibilidad de sustancias con polaridad diferente, cuya mezcla está impedida por la tensión superficial resultante. Estas moléculas le confieren distintas propiedades al sistema y, según el caso y su uso, se califican como jabones, detergentes, tensoactivos, emulsionantes, dispersantes, espumantes, humectantes, inhibidores de corrosión, etc. En esta tesis se usará la palabra castellana **tensoactivo** ya que la misma implica una acción de la molécula anfifílica sobre la tensión superficial⁶³, siendo ésta la actividad de interés sobre los sistemas en estudio.

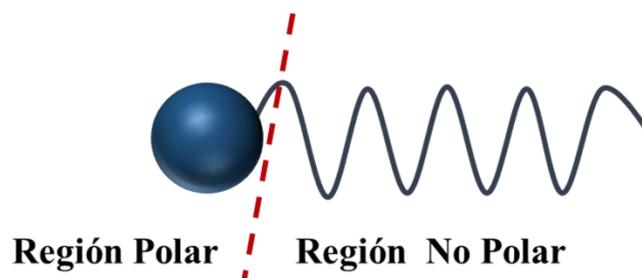


Figura 3. Representación general de una molécula anfifílica.

Dependiendo de la forma de disociarse en agua, los tensoactivos se pueden clasificar según su estructura en: aniónicos, catiónicos, no iónicos y *zwitteriónicos*^{64, 65}.

- *Aniónicos*; como carboxilatos, sulfonatos, etc.
- *Catiónicos*; como sales de amonio o amonio cuaternario
- *Zwitteriónicos*; los cuales poseen ambas cargas en la cabeza como aminoácidos de cadena larga y sulfobetainas.
- *No Iónicos*: como monoglicéridos de ácidos grasos, polioxietilalquilfenol.

Entre éstos, los tensoactivos no iónicos son los preferidos para aplicaciones médicas y alimentarias ya que los mismos presentan un bajo potencial de toxicidad o irritación en comparación con los iónicos⁶⁶. Los tensoactivos no iónicos y no poliméricos también son más fácilmente adsorbidos en la superficie oleosa de las NPs lipídicas en comparación con los estabilizantes poliméricos sintéticos como el alcohol polivinílico (PVA), el Poloxámero 188® y otros con cadenas de igual longitud, los cuales son altamente efectivos en términos de tamaño de partícula, aunque de utilidad limitada en términos de estabilidad. Por otro lado, la repulsión electrostática de las cargas de los tensoactivos y la mayor concentración de estabilizantes estéricos, provoca el incremento de la velocidad de cristalización del lípido⁶⁷.

Cuando las NPs solo se estabilizan con tensoactivos no iónicos, se puede suponer que la repulsión estérica es la principal interacción coloidal entre ellas. Las partículas estabilizadas por repulsión estérica son relativamente insensibles tanto a la concentración de electrolito como al pH; sin embargo, pueden experimentar una floculación débil (fácilmente reversible). Asimismo, se requieren grandes cantidades de surfactante no iónico para cubrir la superficie de las partículas en comparación a cuando estas se encuentran estabilizadas por repulsión electrostática⁶⁸.

Entre los tensoactivos no iónicos, los **polisorbatos** son ampliamente utilizados para la síntesis de NPs lipídicas⁶⁹. Estos tensoactivos están compuestos por ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitano⁷⁰. La naturaleza hidrofóbica de los polisorbatos está dada por las cadenas de hidrocarburos mientras que la naturaleza hidrofílica se debe a las subunidades de óxido de etileno. La estructura básica es un anillo de sorbitano con polímeros de óxido de etileno unidos en tres posiciones diferentes. Mientras que el número de repeticiones de subunidades de óxido de etileno varía en cada posición, su número total ($w + x + y + z$) es igual a 20 y es constante para cada polisorbato. Los restos de ácidos grasos se unen a través de un enlace éster con el oxígeno del óxido de etileno en la posición w . El resto de la cadena hidrocarbonada es lo que caracteriza a los diferentes polisorbatos⁷¹.

El **Tween 80**, monooleato de polioxietilen(20)sorbitano o polisorbato 80 (**Figura 4**) presenta un número de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) ~ 15 (HLB, del inglés *Hydrophilic-Lipophilic Balance*)⁷² lo cual indica que es un tensoactivo no iónico altamente hidrófilo con propiedades fisicoquímicas de un agente detergente y emulsionante. Por lo tanto, es adecuado para la estabilización de NPs lipídicas, y se seleccionó como tensoactivo en el presente trabajo de Tesis. En este caso la presencia de un doble enlace forma un pliegue en la cadena de hidrocarburos (se trata de un monooleato).

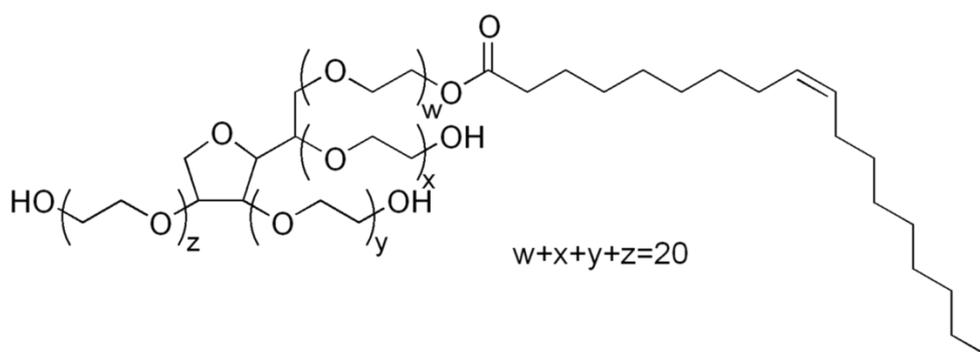


Figura 4. Estructura química de Tween 80. ($w + x + y + z$) se refiere al número total de unidades de óxido de etileno.

- *Matriz lipídica:* Según la actual definición química, los **lípidos** son moléculas hidrófobas que pueden originarse, completamente o en parte, a través de condensaciones de tioésteres o unidades de isopreno. Estos compuestos tienen funciones como: aportadores

de energía, estructuradores de la membrana celular, protectores de órganos, mediadores hormonales, entre otras, por lo que son indispensables para la vida⁷³.

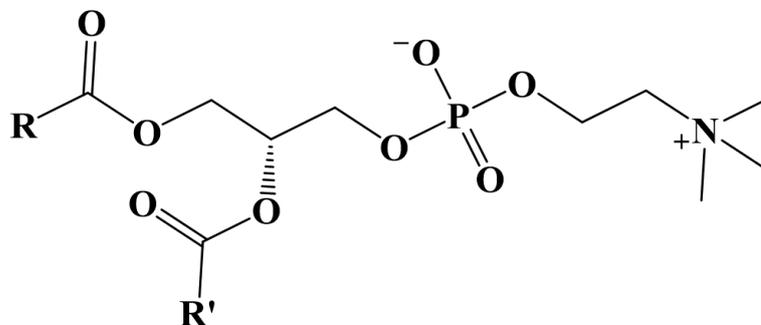
La mayor parte de los lípidos usados en las formulaciones de NPs lipídicas son sintéticos. El uso de lípidos fisiológicos es recomendable ya que disminuye el potencial de daño agudo y crónico inherente a su uso terapéutico. Las grasas sólidas usadas con este propósito generalmente están comprendidas en las siguientes categorías: triglicéridos (ej.: triestearina), glicéridos parciales (ej.: monoestearato de glicerilo), ácidos grasos (ej.: ácido esteárico), esteroides (ej.: colesterol) y ceras (ej.: palmitato de cetilo)⁶⁷.

Lípidos sólidos: La actividad tensoactiva y emulsificante que poseen algunos lípidos sólidos tiene un impacto importante en la estructura y estabilidad de la matriz de las NPs. En la elaboración de NPs lipídicas se pueden emplear diferentes mezclas de grasas naturales de origen vegetal (ej.: cera de abejas, manteca de cacao, etc.) con propiedades autoemulsionables y que, por su naturaleza, son mejor toleradas por el organismo que los compuestos sintéticos⁶⁷.

Entre las materias primas de origen natural, las lecitinas son particularmente interesantes. Las mismas se definen como emulsionantes zwitteriónicos los cuales se pueden extraer de una variedad de fuentes, incluyendo soja, colza y huevo⁷⁴. Representan una mezcla compleja de diferentes fosfolípidos y otros lípidos entre los cuales la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol son los fosfolípidos más comunes⁷⁴ (**Figura 5**). Las lecitinas son reconocidas como materiales seguros y biocompatibles y se encuentran disponibles comercialmente con diversos grados de pureza y especificidad. Dichos lípidos han sido extensamente estudiados como agentes estructurantes para alimentos, productos farmacéuticos y aplicaciones cosméticas⁷⁵. El estado físico de las lecitinas varía desde un líquido viscoso a un polvo dependiendo del contenido de ácidos grasos libres. También su color puede variar de marrón a amarillo claro⁷⁶.

En particular, la lecitina generada a partir de la soja puede mejorar la memoria, el metabolismo, la función cognitiva y hepática, la salud cardiovascular y el desarrollo físico⁷⁷. A su vez, existen estudios referidos a su aplicación para la administración

transdérmica de fármacos⁷⁸. Así, considerando sus características biocompatibles y su potencial para el transporte de drogas, se seleccionó **lecitina de soja** como lípido sólido en la síntesis de las NPs abordadas en este trabajo de Tesis.



R,R' Residuos de ácidos grasos

Figura 5. Estructura de lecitina

Lípidos líquidos: El oleato de etilo es un éster del ácido oleico (**Figura 6**), el mismo se ha utiliza como solvente en preparaciones farmacéuticas que involucran sustancias lipofílicas como esteroides⁷⁹ y fármacos, incluyendo el piroxicam⁸⁰. A su vez, actualmente, se ha estudiado como componente de sistemas de administración de fármacos basado en lípidos, como ej. microemulsiones⁸⁰ y NLCs⁸¹, obteniéndose muy buenos resultados. Considerando sus características en la presente Tesis se seleccionó **oleato de etilo** como lípido líquido para la formación de los NLCs.

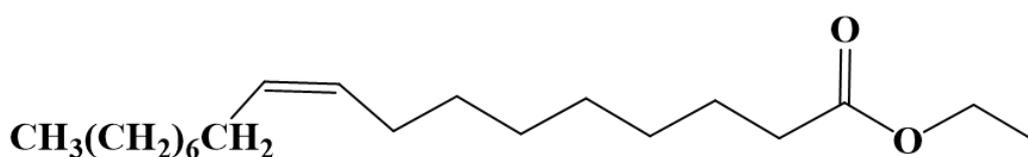


Figura 6. Estructura del oleato de etilo

En la **Tabla 2** se observa un listado de sustancias oleosas y tensoactivos comerciales comúnmente utilizadas para la obtención de NPs lipídicas.

Tabla 2. Naturaleza química y nombre comercial de las materias primas más utilizadas para la elaboración de NPs.

NOMBRE COMERCIAL	COMPOSICIÓN QUÍMICA
Compritol 888 ATO®	Mono, di y triglicéridos del ácido behénico
Cremonfor EL®	Aceite de ricino polioxielido
Dynasan 112®	Trilaurato de glicerol
Dynasan 114®	Trimiristina
Dynasan 116®	Tripalmitato de glicerilo
Dynasan 118®	Triestearina
Epikuron 200®	Lecitina de soja con 95% de fosfatidilcolina
Gelucire 44/14®	Mono, di y triglicéridos del ácido behénico
Inwitor 900®	Monoestearato de glicerilo (40-50%)
Lipoid S100® Lipoid GMBH®	Lípidos sólido a base de lecitina de soja
Lutrol F68® (Poloxámero 188,	Copolímero de unidades de polioxielileno (POE) y
Pluronic F68)®	polioxiopropileno (POP)
Miglyol 812®	Triglicéridos cáprico-caprílicos
Miranol Ultra C32®	Cocoamfoacetato de sodio. Tensoactivo anfotérico
Oramix CG110®	Glucósido de caprililo y caprilo (tensoactivo)
Pemulen TR-1®	Emulsificante polimérico. Polímero cruzado de alquil acrilatos
Precirol ATO 5®	Palmitato-estearato de glicerol (22% mono-, 40-60% di- y 25-35% triglicéridos de ácidos grasos C16-C18)
Phospholipon 90G®	Lecitina de soja con más de 90% de fosfatidilcolina (P90G)
Precifac ATO®	Palmitato de cetilo
Softisan 100, 142, 154®	Triacilgliceroles sólidos
Taurocolato de sodio	Taurocolato de sodio
TegoCare 450®	Diestearato de poliglicerol metilglucosa
Tyloxapol®	Tensoactivo no-iónico
Tween 20, 80®	
Witepsol H5®	Glicéridos hidrogenados de coco

2.4 ESTRUCTURA DE LAS SLNs Y LOS NLCs

En líneas generales, las NPs lipídicas poseen una matriz o núcleo lipídico capaz de solubilizar fármacos lipofílicos. Este núcleo se encuentra estabilizado por la presencia de tensoactivos y co-tensoactivos que se orientan sobre la superficie del lípido, creando una barrera física que estabiliza la nanopartícula²⁵. La **Figura 7** muestra una representación esquemática de una nanopartícula lipídica (SLN/NLC). Puede observarse cómo las moléculas de tensoactivo rodean la matriz aislándola de la fase acuosa externa, en caso de que ésta se encuentre en suspensión.

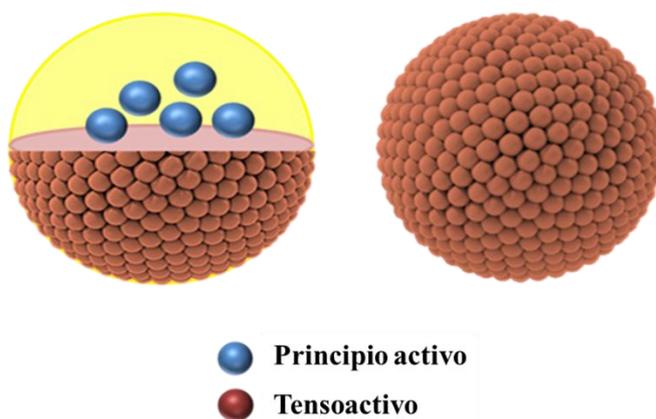


Figura 7. Representación esquemática de una nanopartícula lipídica.

2.4.1 Estructura de las SLNs

Existen tres tipos básicos de SLNs, la obtención de uno u otro depende de la composición de las SLNs (lípidos, componente activo, surfactante) y de las condiciones de producción (método utilizado)³⁹.

La estructura denominada tipo I (**Figura 8 I**) se obtiene por homogeneización en frío y se caracteriza por una distribución uniforme del ingrediente activo en el volumen total de la matriz lipídica. La estructura tipo II (**Figura 8 II**) se caracteriza por una concentración de sustancia activa en la parte exterior de las nanopartículas. Por lo tanto favorece una "liberación explosiva". En las SLNs con estructura tipo III (**Figura 8 III**), la concentración de compuesto activo es más alta en la parte central de las nanopartículas³⁹.

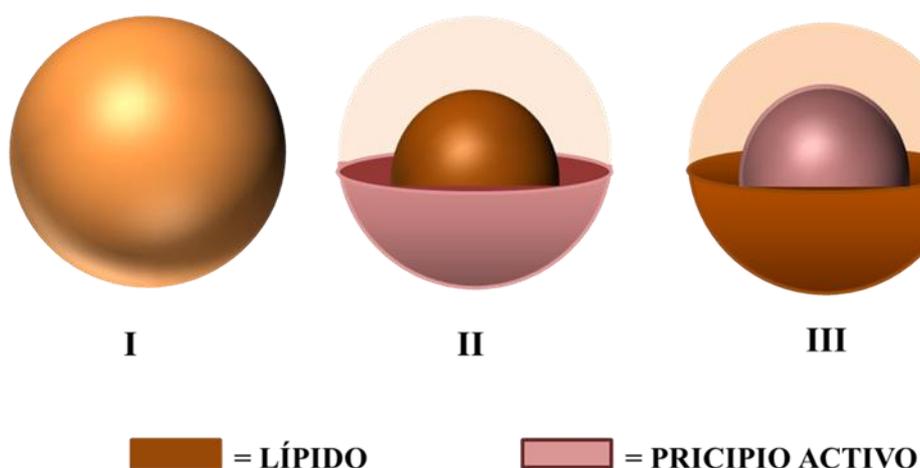


Figura 8. Modelos de incorporación de principios activos en las SLNs

2.4.2 Estructura de los NLCs

Dependiendo de la composición de la mezcla lipídica, pueden obtenerse diferentes tipos de NLCs³⁹. Existen tres tipos de estructura de NLCs posibles: tipo I (conocida como imperfecta), tipo II (múltiple) y tipo III (amorfa), como se muestra esquemáticamente en la **Figura 9**.

La tipo I es una estructura altamente desordenada que se forma mezclando lípidos sólidos con una pequeña cantidad de aceite (lípidos líquidos). Asimismo, esta estructura se obtiene mezclando lípidos sólidos con lípidos líquidos químicamente muy distintos. La diferencia en las estructuras de los lípidos y los requisitos especiales en el proceso de cristalización conducen a un elevado desorden; la estructura de una matriz lipídica imperfecta ofrece espacio para las moléculas de la droga y para agregados amorfos de ella (**Figura 9 I**)²⁶.

La estructura tipo II deriva de una emulsión múltiple y se produce combinando lípidos sólidos con la cantidad máxima posible de lípidos líquidos. Durante un proceso de producción en caliente, las partículas lipídicas en estado líquido (nanoemulsiones) se enfrían para cristalizar y formar partículas sólidas. A altas concentraciones de aceite y durante el enfriamiento, se produce una brecha de miscibilidad de los dos lípidos (lípidos sólidos y aceite) lo que, a su vez, conduce a una separación de fases, dando como resultado la formación de pequeños nano-compartimentos oleosos (**Figura 9 II**). Estos nano-compartimentos dentro de una nanopartícula no pueden ser generados por herramientas mecánicas⁵⁷. En este tipo de estructura múltiple aceite/grasa/agua, la droga puede ser acomodada en el sólido, pero con una solubilidad mayor en las partes oleosas de la matriz lipídica, aumentando así la capacidad de incorporación de principio activo del sistema. Los nano-compartimentos están rodeados por una matriz sólida lipídica, lo que permite una liberación controlada del fármaco. Esta matriz sólida, a su vez, evita la fuga del principio activo⁸².

La estructura tipo III se obtiene cuando se mezclan lípidos especiales (ej. hidroxi octacosanilhidroxiestearato, miristato de isopropilo, adipato de dibutilo) que no recristalizan después de su homogeneización y enfriamiento⁸³. La matriz lipídica es sólida,

pero en un estado amorfo (**Figura 9 III**)⁸⁴. La ausencia de cristalización evita la expulsión del fármaco durante el tiempo de almacenamiento^{85, 86}.

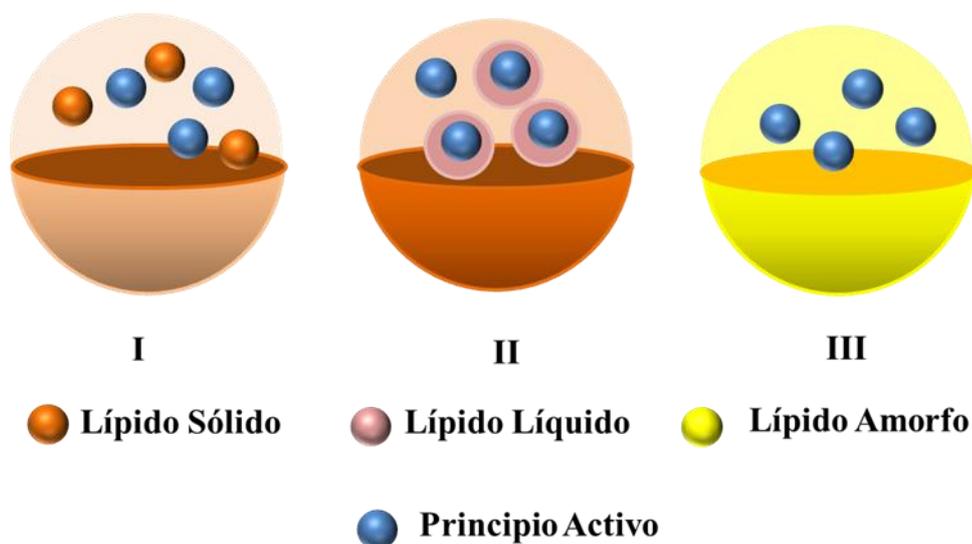


Figura 9. Diferentes tipos de NLCs: I) imperfecto, II) múltiple y III) amorfo.

2.5 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Entre los diferentes métodos empleados para la obtención de NPs lipídicas, se pueden citar:

Homogeneización a alta presión^{87, 88}, Ultrasonificación y homogeneización de alta velocidad^{89, 90}, Método de microemulsión^{91, 92, 93}, Método de evaporación del solvente^{94, 95, 96}, Método de doble emulsión^{97, 98, 99}, Método de difusión de solvente^{100, 101}, Método de fluido supercrítico^{102, 103}, Técnica de inyección de disolvente¹⁰⁴, Método de membrana de contracción^{105, 106}.

A continuación se detallarán brevemente, las técnicas más comúnmente utilizadas para la obtención de NPs lipídicas:

La *Homogenización a alta presión* (HPH del inglés, *high-pressure homogenization*) fue el primer método que se utilizó para la producción de NPs lipídicas. Es uno de los pocos métodos que satisface los principales requisitos industriales (aspectos reglamentarios, etc.) y posibilita la producción a gran escala a un costo relativamente bajo. Básicamente, los homogeneizadores de alta presión permiten impulsar un líquido a través de un espacio estrecho (en el rango de unas pocas micras) a elevada presión (100-2000 bar). El líquido se acelera a una distancia muy corta y a una velocidad muy alta (más de 1000 km/h). Las

partículas originadas debido a las elevadas fuerzas de cizallamiento (esfuerzo cortante) y cavitación alcanzan el rango submicrométrico. Existen dos tipos de HPH, en caliente y en frío. En ambos casos, se requiere una etapa preparatoria que implica la incorporación del fármaco disolviéndolo en la masa fundida de lípidos⁶⁹.

Las NPs lipídicas también pueden producirse mediante un proceso de ultrasonificación. En este método, los procesadores ultrasónicos utilizados como homogeneizadores pueden reducir el tamaño de pequeñas partículas en un líquido. El proceso se basa en el fenómeno de cavitación en el que producen centros de alta temperatura y alta presión⁶⁹.

Otro método ampliamente utilizado es el conocido como *Evaporación del solvente*. En este caso, la fase lipídica se disuelve en un solvente orgánico inmiscible con el agua y a continuación se emulsiona dicha fase con la fase acuosa. Durante la evaporación del solvente (bajo presión reducida), la dispersión de nanopartículas se forma por precipitación del lípido en el medio acuoso⁶⁹.

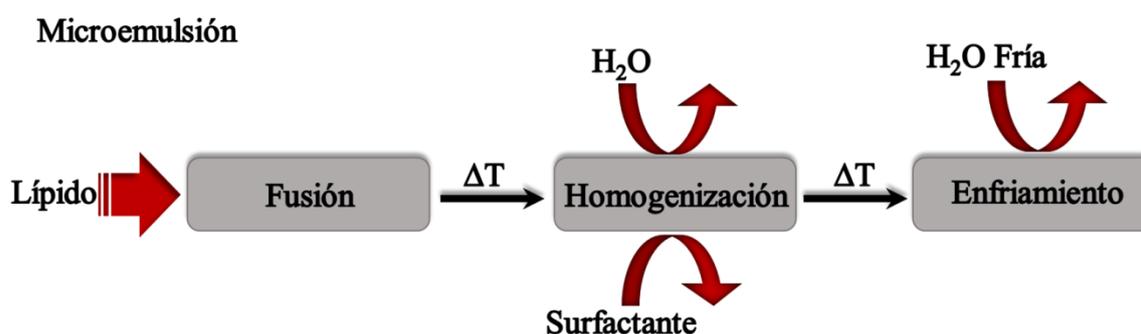
Una variante de este último método es el *Método de doble emulsión*, que es usado para la incorporación de fármacos hidrofílicos en las NPs. El mismo se basa en el Método de emulsificación- evaporación del solvente pero, en este caso, el fármaco se encapsula con un estabilizador para evitar el reparto del mismo en la fase acuosa externa durante la evaporación del solvente⁶⁹.

Entre los métodos existentes, el *Método de microemulsión* es uno de los más interesantes en función de su simpleza y bajo costo. Las características del mismo se detallan a continuación:

2.5.1 Método de microemulsión

La esencia de este método es la dilución en agua de una microemulsión. Las microemulsiones son sistemas bifásicos (ej.: microemulsiones O/W, del inglés *oil/water*) ópticamente transparentes; constituidos por lípidos, emulsionantes, co-emulsionantes, y agua en proporciones específicas. En este método se obtiene una microemulsión a una temperatura entre 65-70 °C y el calor de la misma se disipa en agua a una temperatura de aproximadamente 2 o 3 °C bajo agitación continua. Es usual utilizar lípidos o un ácido graso de bajo punto de fusión (ej.: ácido esteárico), emulsionantes como los polisorbatos y alcoholes de cadena corta como co-emulsionantes (ej.: butanol). Para obtener

nanopartículas utilizando este método, no se requieren grandes gastos energéticos. En la microemulsión existen previamente pequeñas gotas de una fase dispersa en otra. Estas gotas suelen tener el tamaño de una decena o unos pocos cientos de nanómetros. Generalmente, la microemulsión y el agua están en una proporción no mayor a 1:25 o 1:50. Si hay un contenido demasiado alto de agua en comparación con el contenido de partículas, este necesita ser eliminado^{107, 108, 109}. El **Esquema 1** muestra el proceso de obtención de NPs lipídicas a través del método de microemulsión.



Esquema 1. Método de microemulsión para la obtención de NPs lipídicas.

En el presente trabajo de Tesis se desarrolló el Método de microemulsión para la obtención de los NLCs. El mismo se seleccionó considerando que es un método simple, económico, rápido y que no requiere el uso de ningún equipamiento especial^{91, 92, 93, 91}.

- *Etapas en el proceso de elaboración de nanopartículas lipídicas:* En general, el proceso de elaboración de nanopartículas lipídicas consiste básicamente en cuatro etapas¹¹⁰: la preparación de una fase oleosa, la preparación de una fase acuosa, la formación de una pre-emulsión o microemulsión previa a la formación de las nanopartículas sólidas y la purificación y/o preconcentración de las nanopartículas obtenidas.

La preparación de la fase oleosa consiste en la fusión de los lípidos sólidos mediante el aumento de la temperatura o su disolución en un disolvente adecuado, de tal manera que pierdan su estructura cristalina original. Los principios activos generalmente se agregan a la fase oleosa^{111, 112} y raramente a la fase acuosa^{113, 114}. Por esta razón los lípidos que formarán la matriz de las nanopartículas deberán seleccionarse considerando su capacidad para disolver el fármaco que se desea incorporar en el sistema portador. Deben seleccionarse entonces aquellos lípidos en los que el fármaco presente un alto coeficiente de partición (fase oleosa/fase acuosa). La solubilidad del compuesto activo en la matriz

lipídica es esencial ya que influye en la capacidad de carga de la NP, en su eficiencia encapsulamiento y, por lo tanto, en el rendimiento del sistema portador^{115, 116}. Asimismo, la concentración del fármaco disuelto en la fase oleosa podría tener un efecto significativo en el tamaño y en la estructura de las partículas¹¹⁰.

Por otra parte, el incremento en la capacidad de encapsulamiento de las NPs lipídicas está relacionado con la capacidad del fármaco de “acomodarse” en las imperfecciones de la matriz lipídica. Con lo cual es ideal trabajar con lípidos que solidifiquen con un empaquetamiento cristalino poco ordenado y presentar grandes distancias intermoleculares¹¹⁰. A su vez, el lípido sólido que conforma la matriz debe presentar una temperatura de fusión que no afecte la estabilidad del principio activo.

La fase acuosa consiste generalmente en una disolución de alta concentración de tensoactivos¹¹⁰. La naturaleza y concentración de los tensoactivos tienen gran impacto en las propiedades de las NPs, puesto que rodean la superficie de las gotas de lípido, formando una barrera estérica que les imparte estabilidad física. Asimismo, influyen en el tamaño, potencial zeta, estabilidad química y propiedades biofarmacéuticas. Como contrapartida a estos efectos benéficos, muchos de ellos son poco tolerados por los organismos vivos. Como se mencionó, los tensoactivos comúnmente utilizados en la formación de sistemas portadores, debido principalmente a su baja o nula toxicidad, son: fosfolípidos, copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno como el Poloxamer 188 y polisorbatos como el Polisorbato 80⁶⁷.

En ocasiones es necesaria la adición de co-tensoactivos. Éstos mejoran la estabilidad física de las partículas al incrementar los efectos estéricos y la rigidez de la película externa, y también al modificar la carga superficial de las partículas¹¹⁷. Entre los agentes co-tensoactivos pueden citarse surfactantes aniónicos como el lauril sulfato sódico, alcoholes de cadena corta como el butanol y sales biliares como los colatos y taurocolatos³⁵.

Cómo se mencionó anteriormente, la tercera etapa en la elaboración de las NPs lipídicas consiste en la formación de una pre-emulsión o microemulsión, que se produce al mezclar las fases oleosa y acuosa en frío o en caliente¹¹⁰. En esta etapa los métodos de obtención pueden subdividirse en: métodos de producción de alta y baja energía. Los primeros consisten, básicamente, en lograr emulsiones entre la fase lipídica y la fase acuosa (a una

temperatura 5 - 10 °C mayor que el punto de fusión del lípido) mediante un método de alta energía como la homogeneización a alta presión o la utilización de ultrasonido¹¹⁸. Los lípidos cristalizan en forma de nanopartículas cuando la emulsión recobra la temperatura ambiente. Estos métodos no son recomendables para drogas termosensibles o de fácil degradación. Los métodos de baja energía están basados en la obtención previa de la pre-emulsión (también a temperaturas por sobre el punto de fusión de los lípidos) la cual se forma espontáneamente, sin necesidad de otro tipo de energía para lograrla, seguida de un descenso de temperatura, lo que provoca la precipitación de las nanopartículas. Entre los métodos de baja energía se encuentran: el Método de microemulsión⁹³, el Método de evaporación del solvente⁹⁴ y el Método de difusión del solvente¹⁰⁰.

Finalmente, la última etapa está relacionada con la preconcentración y purificación de las nanopartículas obtenidas. Dado que las dispersiones de SLNs o NLCs usualmente contienen una baja proporción de partículas, normalmente es necesaria la concentración y purificación de la dispersión acuosa de las NPs lipídicas a partir de procesos de evaporación, ultracentrifugación, ultrafiltración, secado o liofilización (mediante la adición de crioprotectores como trehalosa, manosa, maltosa, fructuosa o polivinilalcohol) para facilitar su manejo y administración¹¹⁰.

Se puede concluir que existen métodos de obtención de NPs lipídicas de alta o baja energía¹¹⁹ y, a su vez, éstos pueden subdividirse en métodos con o sin uso de solventes orgánicos¹²⁰. En este trabajo de Tesis, se seleccionó un método simple de baja energía sin un uso considerable de solventes orgánicos para obtener el sistema portador de interés. Dicho método se basa en el **Método de microemulsión** y el mismo se detallará en la **Sección 3.2**.

2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

El estudio de estos sistemas está orientado a conocer parámetros que pueden afectar directamente la estabilidad y la cinética de liberación de las NPs¹²¹. Entre los parámetros más importantes que se deben tomar en consideración se encuentran: el tamaño de partícula³⁶, el índice de polidispersidad, el potencial zeta y la morfología superficial. La caracterización finaliza con la determinación de la eficiencia de encapsulamiento del

principio activo y el estudio de la liberación del fármaco incorporado con el fin de obtener el correspondiente perfil de liberación *in vitro* e *in vivo*.

2.6.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad

El tamaño de partícula de las nanopartículas se presenta como diámetro medio (d) y es una medida necesaria para confirmar la producción de las mismas en escala nanométrica.

A partir del tamaño y de la desviación estándar calculada para la distribución de tamaños se obtiene el índice de polidispersidad, definido como el cociente entre la desviación estándar y la media obtenida para el tamaño de partículas¹²². El índice de polidispersidad (PDI, del inglés *polydispersity index*) brinda una idea de la distribución global de tamaños, asumiendo una sola media. Valores alrededor de 0,1 reflejan una población monodispersa homogénea, mientras que un PDI mayor que 0,3 indica una distribución de gran tamaño, así como una mayor tendencia a la aglomeración¹²³.

La técnica utilizada por excelencia para la determinar el tamaño de partícula e índice de polidispersidad es la *Dispersión dinámica de luz*¹²⁴. Dicha técnica se ampliará en la **Sección 2.9.1**.

2.6.2 Potencial zeta

La carga eléctrica sobre la superficie de las partículas influye en la distribución de los iones en el área interfacial circundante, lo que resulta en una mayor concentración de contraiones. Los contraiones son iones que tienen carga opuesta a la carga sobre la superficie de las partículas. De esta manera, se forma una *doble capa eléctrica* alrededor de cada partícula. La capa líquida que rodea a la partícula, se puede dividir en dos partes: la interior se denomina *capa de Stern*, donde los iones están cerca de la partícula y la capa exterior se conoce como *capa difusa*, donde los iones están a una mayor distancia (**Figura 10**). La composición de esta capa difusa es dinámica y varía según distintos factores como el pH, la fuerza iónica, etc¹²⁵.

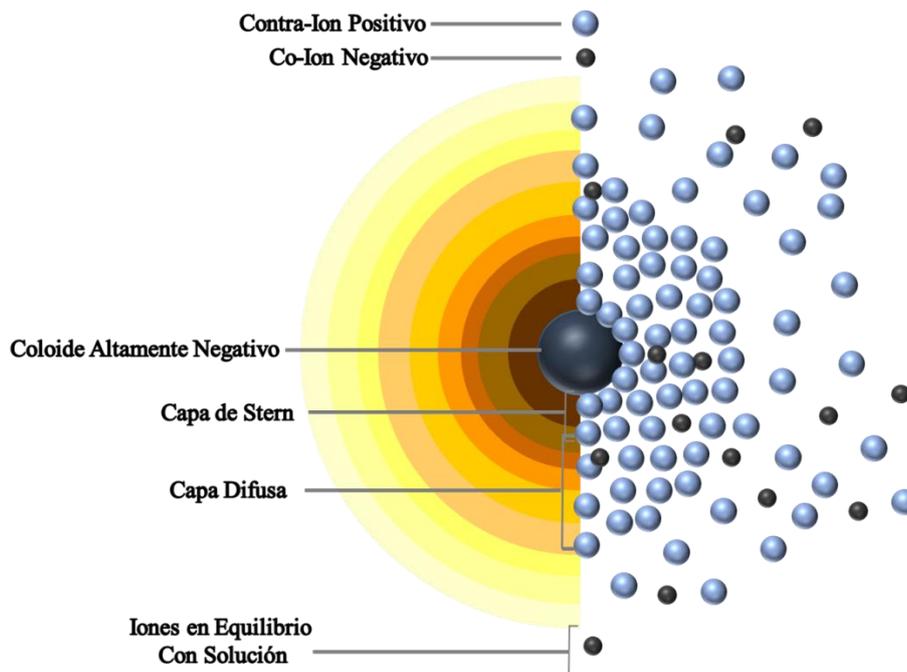


Figura 10. Dos maneras de visualizar la doble capa (considerando una NP cargada negativamente). La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor de la NP. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor de la NP cargada.

La NP y su atmósfera cargada producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia a la NP, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. Esta caída del potencial delimita la distancia a la cual las fuerzas repulsivas entre NPs entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como **potencial zeta (potencial Z) (Figura 11)**, el cual es un parámetro importante ya que puede ser medido de manera simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse¹²⁵. En agua, la importante doble capa hace que el potencial zeta sea una buena aproximación del potencial superficial.

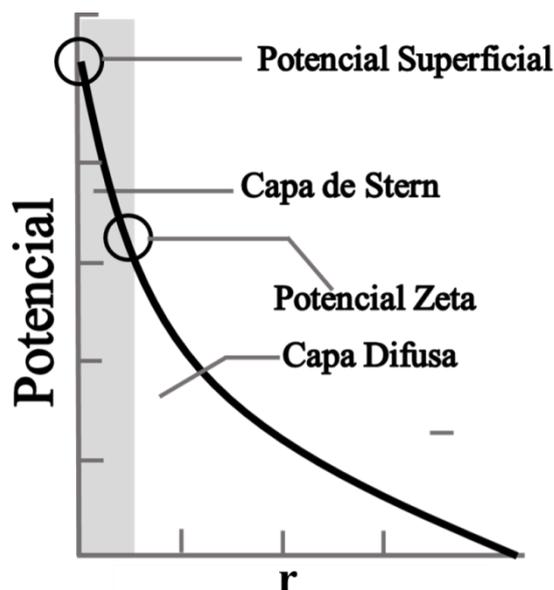


Figura 11. Representación del potencial eléctrico de una NP en suspensión. r simboliza la distancia desde la superficie de la NP hacia el seno de la solución.

El potencial Z es un parámetro útil para estudiar el comportamiento de un sistema coloidal de NPs puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre partículas adyacentes de carga similar en una dispersión, permitiendo realizar predicciones sobre la estabilidad física de dispersiones coloidales^{126, 127}.

Un valor pequeño de potencial Z, indica que las fuerzas atractivas pueden exceder las de repulsión, por lo que la dispersión puede romperse y flocular^{128, 129}. Por otro lado, si las partículas en la suspensión tienen un alto potencial zeta, negativo o positivo, entonces muestran una tendencia a repelerse de modo que no se produce floculación. Generalmente se consideran estables las suspensiones de partículas con potencial Z superior 30 mV, en valor absoluto¹³⁰.

Como se mencionó, el potencial Z no puede medirse directamente, pero puede estimarse aplicando modelos teóricos a mediciones de la movilidad electroforética o movilidad electroforética dinámica de la dispersión de partículas¹²⁵. El fundamento teórico/práctico para la determinación de este potencial se ampliará en la **Sección 2.9.2**.

2.6.3 Morfología

La microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning electron microscopy*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*) son métodos directos para la caracterización física de las NPs. Estas técnicas permiten no solo conocer su morfología, sino también posibilitan estimar el tamaño de las mismas¹³¹.

2.6.4 Eficiencia de encapsulamiento

Por otro lado, es importante conocer la eficiencia de encapsulamiento (EE) del sistema portador. Este parámetro marca el rendimiento del sistema, evaluando el grado de incorporación de principio activo en las NPs. Dicho parámetro se calcula a partir de la ecuación (1)¹³²:

$$EE(\%) = \frac{[\text{Fármaco Total}] - [\text{Fármaco libre}]}{[\text{Fármaco Total}]} \times 100 \quad (1)$$

donde **[Fármaco Total]** representa la concentración inicial de principio activo utilizada para la preparación de las NPs y **[Fármaco libre]** simboliza la concentración de droga que no se logró incorporar al sistema luego de su formulación.

Este parámetro se determina a partir de un estudio cuantitativo utilizando la técnica analítica adecuada en función de las características del fármaco. La técnica utilizada convencionalmente es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)^{130, 133}. Más allá de los costos y del elevado tiempo de análisis, la utilización esta técnica requiere un paso previo que consiste en la ultracentrifugación de la suspensión de NPs. La ultracentrifugación se realiza para poder separar las NPs de la suspensión acuosa que contiene el fármaco sin encapsular y, de esta manera, proceder a su determinación. Así, esta técnica puede involucrar también un aumento de los errores potenciales derivados del manejo de la muestra^{130,133}.

2.6.5 Perfil de liberación

La caracterización del sistema portador se completa conociendo el perfil de liberación de la droga de interés que se encuentra confinada en él. Dicho perfil representa la cantidad de fármaco liberada en función del tiempo. Este estudio cuantitativo debe realizarse

utilizando la técnica analítica apropiada en función de las propiedades del principio activo. La técnica utilizada por excelencia es HPLC^{133, 134, 135}. Como se mencionó con anterioridad, dicha técnica involucra el uso de equipamiento especial, con lo cual los costos son elevados y, a su vez, los tiempos de análisis suelen ser importantes. En el presente trabajo de Tesis la determinación en el tiempo del fármaco liberado desde el sistema portador se realizó utilizando VOC, proponiéndola como una técnica analítica alternativa a la cromatografía convencional (**Secciones 4.5.5 y 4.6.1**).

2.7 FAMILIA DE FÁRMACOS EN ESTUDIO

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son unos de los agentes terapéuticos más utilizados en el mundo. Conforman un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos con efectos antiinflamatorios, analgésicos y/o antipiréticos^{136, 137}. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Estos antiinflamatorios pueden ocasionar importantes efectos secundarios, siendo la irritación gástrica el más común de ellos. Otros efectos indeseados relacionados con su administración directa son: mayor frecuencia de infecciones, descalcificación, ciertas modificaciones indeseadas en la piel (acné, estrías) y retención de líquido^{138, 139}. Como analgésicos se caracterizan por no pertenecer a la clase de los narcóticos y actuar bloqueando la síntesis de prostaglandinas.

Considerando sus efectos secundarios la administración tópica y transdérmica de los AINEs es una alternativa apropiada. Sin embargo, la principal barrera para estas vías de administración es el estrato córneo^{140, 141}. Con el fin de superar esta barrera y mejorar la permeabilidad de la piel se han investigado diversos enfoques, incluyendo nuevas formulaciones. Los sistemas portadores de fármacos presentados en este trabajo de Tesis podrían representar una estrategia válida para garantizar una administración segura de esta clase de principios activos.

2.7.1 Piroxicam

El piroxicam (4-Hidroxi-2-metil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido) es un AINE, miembro de la familia de los oxicames. Es ampliamente utilizado para aliviar los síntomas de artritis reumatoide inflamatoria, osteoartritis, fracturas, dolores agudos en el sistema musculoesquelético, dolor menstrual primario, dolor postoperatorio, etc^{142, 143}. Este agente antiinflamatorio a su vez presenta efectos quimiopreventivos y

quimiosupresores¹⁴⁴. En medicina veterinaria se indica para el tratamiento de neoplasias que expresan receptores para la enzima ciclooxygenasa, tal es el caso del cáncer de vejiga, colon o próstata^{145, 146, 147}.

El piroxicam (PX) es escasamente soluble en agua y es una molécula ácida debido a la presencia de un protón débilmente ácido ($pK_a = 5,1$) en el sustituyente enólico 4-hidroxi. Por otra parte, el PX tiene un nitrógeno de piridilo débilmente básico ($pK_a = 1,8$). La **Figura 12** muestra el correspondiente diagrama de distribución de especies a diferentes pH^{148, 149}.

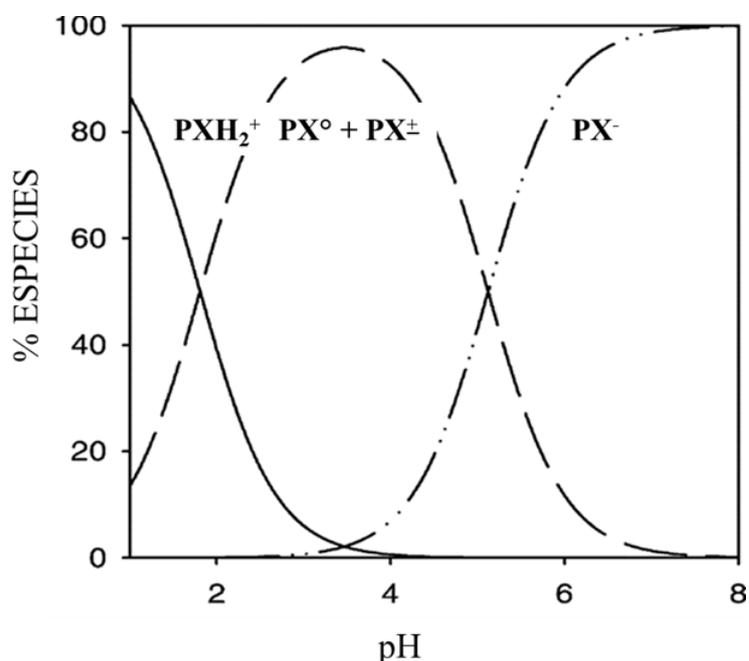


Figura 12. Diagrama de distribución de especies del PX¹⁴⁹.

Debido a su baja solubilidad acuosa y alta permeabilidad, el PX es un medicamento de Clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica^{150, 151}. Los fármacos con baja solubilidad en agua, puede mostrar limitaciones de rendimiento, tales como absorción incompleta o errática, baja biodisponibilidad e inicio de acción lento. El PX presenta, además, ciertos efectos secundarios relacionados con su incorporación directa, principalmente trastornos gástricos^{152, 153}.

Desarrollar estrategias para superar estos efectos secundarios es uno de los grandes desafíos para los científicos activos en la investigación farmacéutica. Estas estrategias incluyen el desarrollo de nuevos sistemas de administración que representen una

alternativa segura para su administración. En bibliografía se pueden encontrar estudios previos relacionados a la encapsulación de PX en sistemas como microesferas, ciclodextrinas, liposomas y vesículas^{154, 155, 156}. Se ha demostrado que estos sistemas, al encapsular el fármaco, cambian su farmacocinética y biodistribución, centrando su entrega en el sitio de destino y reduciendo así su toxicidad.

- *Formas estructurales de PX:* Además de su gran potencial farmacológico y terapéutico, el PX es también un compuesto químico intrínsecamente interesante debido a sus características estructurales dinámicas. En este sentido, se puede observar la presencia de un equilibrio tautomérico (**Figura 13A**). Así, el PX en el estado fundamental puede adoptar diferentes estructuras dependiendo las propiedades del solvente en el cual se encuentre. La especie **aniónica** (**Figura 13C**) predomina en solventes muy polares como el agua, lo cual puede corroborarse a partir del diagrama de especies. La forma **enólica** presenta un momento dipolar pequeño con lo cual es más estable en solventes apolares. A su vez, estos medios estabilizan el enol permitiendo que éste forme puentes de hidrógeno intramoleculares entre el hidrógeno del grupo enol y el oxígeno de la amida (**Figura 13B**). Por otro lado, la forma **ceto** predomina en solventes próticos de polaridad intermedia que no favorezcan la formación del enol¹⁵⁷.

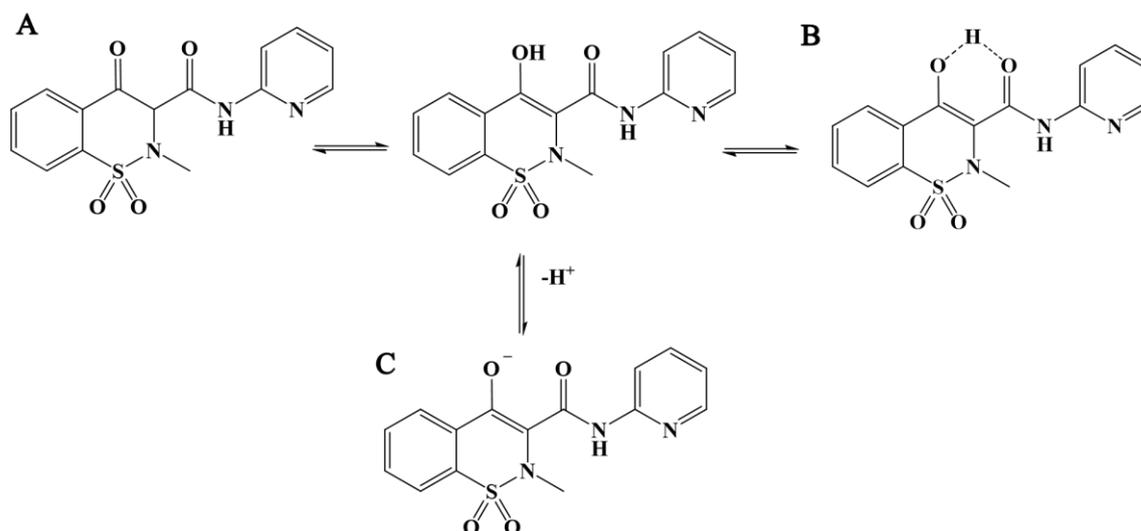
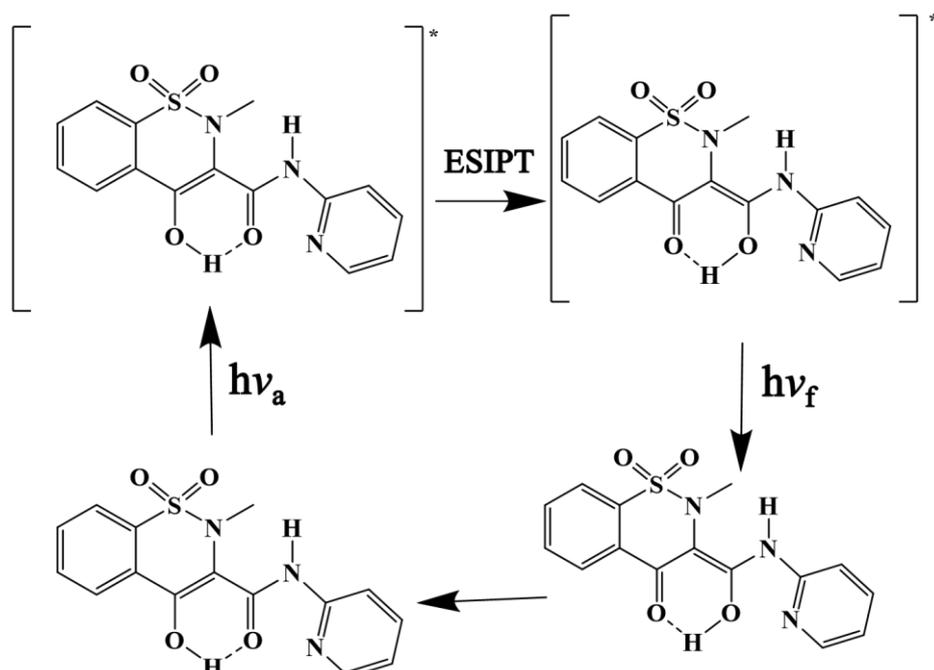


Figura 13. A) Equilibrio ceto-enólico de PX, B) enlace puente de hidrógeno intramolecular en enol PX y C) anión PX.

El hecho que el PX pueda tomar diferentes formas es especialmente importante para el transporte y la acción de este principio activo, ya que sólo la forma neutra de los fármacos de la familia de los oxicames se supone médicamente activa¹⁵⁸.

- *Propiedades espectroscópicas:* Respecto a sus propiedades espectroscópicas se reconoce a la forma enólica como responsable de la fluorescencia que presenta la molécula¹⁵⁷. La misma presenta una intensa banda de emisión en medios apolares. Recientemente se ha descubierto que, después de la excitación de la forma enólica, se produce una reacción de transferencia de protones intramolecular (ESIPT, del inglés *excited stated intramolecular proton transfer*) que genera la estructura tautomérica ceto, emitiendo con un gran desplazamiento de Stokes^{158, 159} (**Esquema 2**). La fluorescencia del enol está relacionada con su conformación estructural, la cual obedece a dos condiciones básicas: planaridad y presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular (**Figura 13B**). La primera define al enol como la forma más estable debido a que presenta una mayor deslocalización electrónica. La segunda le proporciona a la molécula una estructura más rígida, disminuyendo la desactivación por procesos no radiantes¹⁵⁷. Así, la forma ceto no fluoresce porque su conformación estructural no es planar ni rígida, dando lugar a una desactivación a través de procesos no radiantes, reduciendo el rendimiento cuántico de fluorescencia molecular¹⁵⁷.

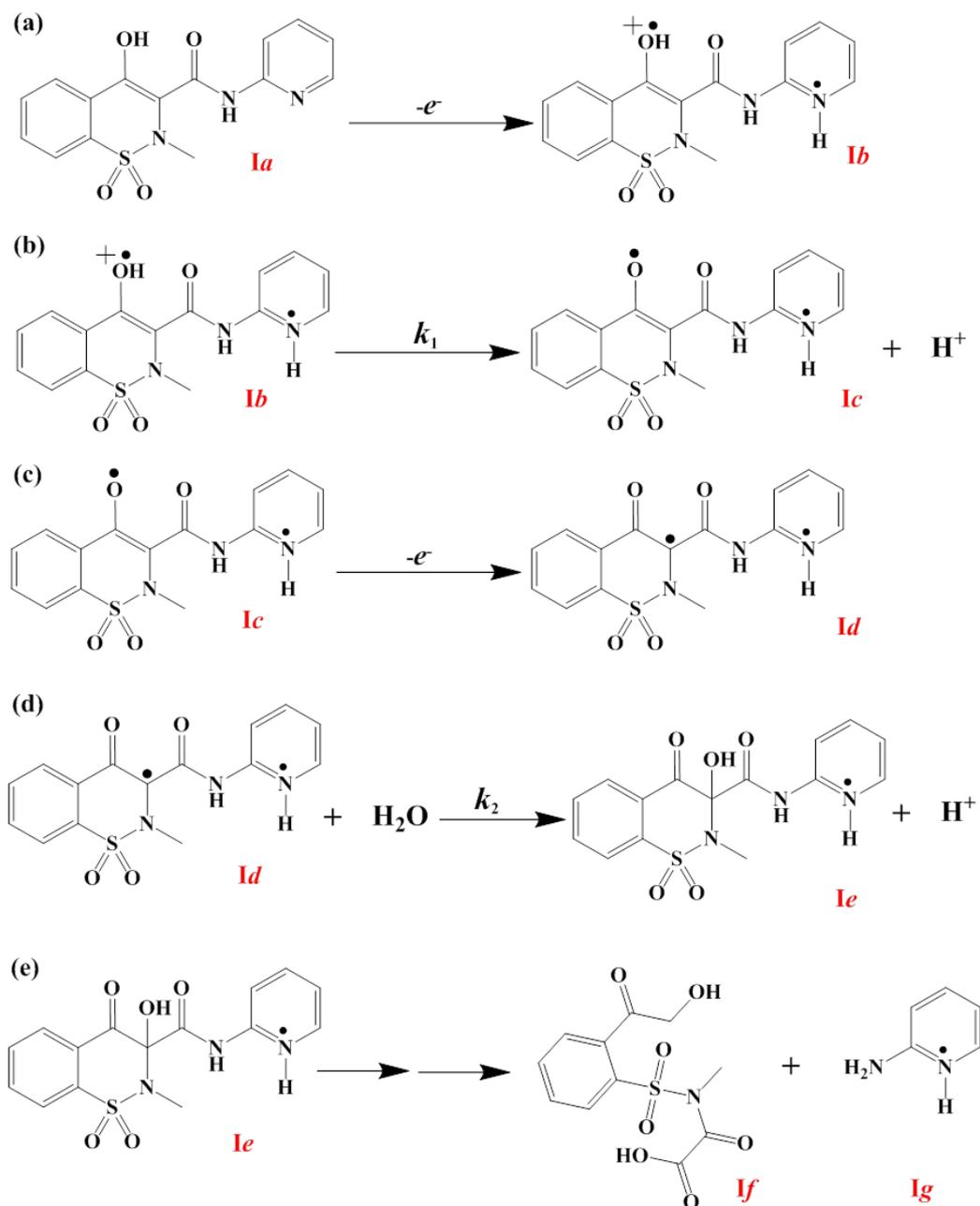


Esquema 2. Diagrama del proceso fotofísico del enol-PX.

El PX presenta baja o incluso nula fluorescencia cuando se disuelve en solventes próticos. Las interacciones específicas soluto-solvente no permiten la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, la ausencia de estos enlaces en el estado fundamental y en los estados excitados proporciona estructuras menos rígidas. Por lo tanto, la molécula puede desactivarse por medio de procesos no radiantes. Cuando la interferencia del solvente es baja (solventes no próticos) se puede producir la transferencia de protón sin obstáculos, favoreciendo la formación de la estructura enólica radiante (**Figura 13A**).

Así, las propiedades fotoquímicas del PX son sensibles al medio. Las características de los solventes como la polaridad, el pH o la posibilidad de formar o no enlaces hidrógeno afectan la conformación del PX y, por lo tanto, la fluorescencia del fármaco¹⁵⁹. Por otro lado, se observa también que el PX presenta una absorción molecular diferenciada para cada especie¹⁵⁸, la cual se estudiara en la **Sección 4.3**.

- *Propiedades electroquímicas*: La molécula de PX es electroactiva y su mecanismo de electrooxidación es conocido. El **Esquema 3** representa el mecanismo propuesto para la electrooxidación del PX en medios ácidos (PX en forma neutra). El mismo se clasifica como un mecanismo E1C1E2C2, donde E1, E2 significan transferencias de electrones con potencial formal similar y C1, C2 son reacciones químicas irreversibles para generar productos electroinactivos¹⁶⁰.



Esquema 3. Mecanismo probable de reacción para la electrooxidación de PX a pH ácido.

2.8 FORMULACIÓN FARMACÉUTICA DE NLCs.

Desde la perspectiva de la tecnología farmacéutica, las NPs lípidicas constituyen dispersiones acuosas que tienen baja viscosidad para su aplicación cutánea. Por lo tanto, una vez obtenidas las NPs, es necesario proponer una formulación farmacéutica que favorezca la administración del fármaco. Como se mencionó en la sección anterior, el PX es un AINE que, además de mostrar escasa solubilidad en agua, presenta efectos

secundarios relacionados con su incorporación directa. Así, en función a las características del principio activo de interés, se consideró que el sistema portador es candidato para la aplicación a través de un gel tópico,¹⁶¹ apuntado a la vía transdérmica.

- *Aplicación cutánea:* Las formas farmacéuticas convencionales para la aplicación en la piel generalmente tienen consistencia semisólida e incluyen geles acuosos (es decir, hidrogeles), ungüentos y geles hidrofóbicos (es decir, oleogeles), o bien una mezcla de ambas fases, acuosa y oleosa, como las cremas agua en aceite (W / O, del inglés *water/oil*) o aceite en agua (O/W, del inglés *oil/water*). En todos estos sistemas, la fase externa de la formulación gobierna la liberación de moléculas. De este modo, los hidrogeles y las cremas O/W proporcionan una liberación rápida, mientras que en formulaciones hidrofóbicas se origina una liberación prolongada. Además, las formulaciones que contienen agua son más fáciles de aplicar y, por lo tanto, preferidas por los consumidores sobre formulaciones lipídicas de alta viscosidad. Debido a sus propiedades reológicas (es decir, su comportamiento viscoelástico), las formulaciones semisólidas permanecen en el lugar de aplicación durante largos períodos, lo que prolonga la entrega de moléculas. Además, estas formas de dosificación son fáciles de aplicar y puede transportar una gran variedad de sustancias^{162, 163}.

Las formulaciones para la aplicación en la piel se pueden planificar para uso local o entrega transdérmica. Este último está permitido para drogas, pero no para ingredientes cosméticos, e incluye difusión de moléculas a través de las capas de la piel hacia la circulación sistémica, originando el efecto terapéutico. Por el contrario, la administración local está normalmente relacionada con los efectos dérmicos y está dirigida a las capas de piel, con absorción sistémica menor o nula¹⁶⁴.

La administración transdérmica es un método que muestra amplio potencial para incorporación de fármacos. Esta vía evitaría la variabilidad en las tasas de absorción y metabolismo encontradas en el tratamiento oral^{165, 166}, representando una opción interesante, conveniente y segura. Una de las características positivas del transporte de fármacos a través de la piel es lograr efectos sistémicos, evitando la incompatibilidad gastrointestinal. Así, este tipo de administración minimiza efectos secundarios no deseados y posibilita la utilización de fármacos con tiempos de vida biológica cortos, con estrecha

ventana terapéutica mediante la mejora de la respuesta fisiológica y farmacológica. Esta forma de administración también evita fluctuaciones en la concentración plasmática de fármaco y proporciona idoneidad para la autoadministración y una mayor eficacia terapéutica¹⁶⁷.

El estrato córneo (SC, del inglés *stratum corneum*) es la principal barrera de una piel intacta para la aplicación de medicamentos e ingredientes cosméticos. Una estrategia prometedora para mejorar la penetración de moléculas en todo el SC es el uso de nanosistemas lipídicos ya que su lipofilia facilita el cruce intacto de dicha capa.

Entre las diferentes aplicaciones que se han propuesto para las NPs lipídicas (SLNs y NLCs) el uso cutáneo parece ser uno de los más atractivos para fines terapéuticos y cosméticos. Se han estudiado diferentes enfoques en este campo para la administración transdérmica y local de fármacos^{168, 169} y de cosméticos hidratantes¹⁷⁰ y antiedad.^{171, 172}

El uso cutáneo de nanopartículas lipídicas presenta numerosas ventajas, como la protección química de las sustancias incorporadas, permitiendo la aplicación en la piel de moléculas lábiles que son difíciles de transportar en formulaciones semisólidas tradicionales. A su vez, estas NPs proporcionan un aumento en la biodisponibilidad del fármaco, relacionado con la posibilidad de modular la liberación de las moléculas, promoviendo su penetración y retención de la piel. Esto último se explica en función a la facilidad de las NPs lipídicas para adherirse al SC, permitiendo que las moléculas encapsuladas alcancen las capas más profundas de la piel. Estas propiedades están relacionadas con la composición de los lípidos fisiológicamente compatibles que constituyen las NPs. Dichos lípidos les permiten interactuar con el SC, creando un reordenamiento de lípidos y facilitando la penetración de las moléculas¹⁷³.

Por otro lado, la aplicación cutánea de estas NPs promueve la hidratación de la piel mediante dos mecanismos¹⁷⁴: 1) formación de una película oclusiva en la superficie del SC que previene la pérdida de agua por evaporación, evitando la pérdida transepidérmica de agua y 2) refuerzo de la barrera lipídica de la piel mediante adhesión de nanopartículas al SC. Esta restauración aumenta la hidratación de la piel. La **Figura 14** resume las propiedades de las NPs lipídicas en la piel.

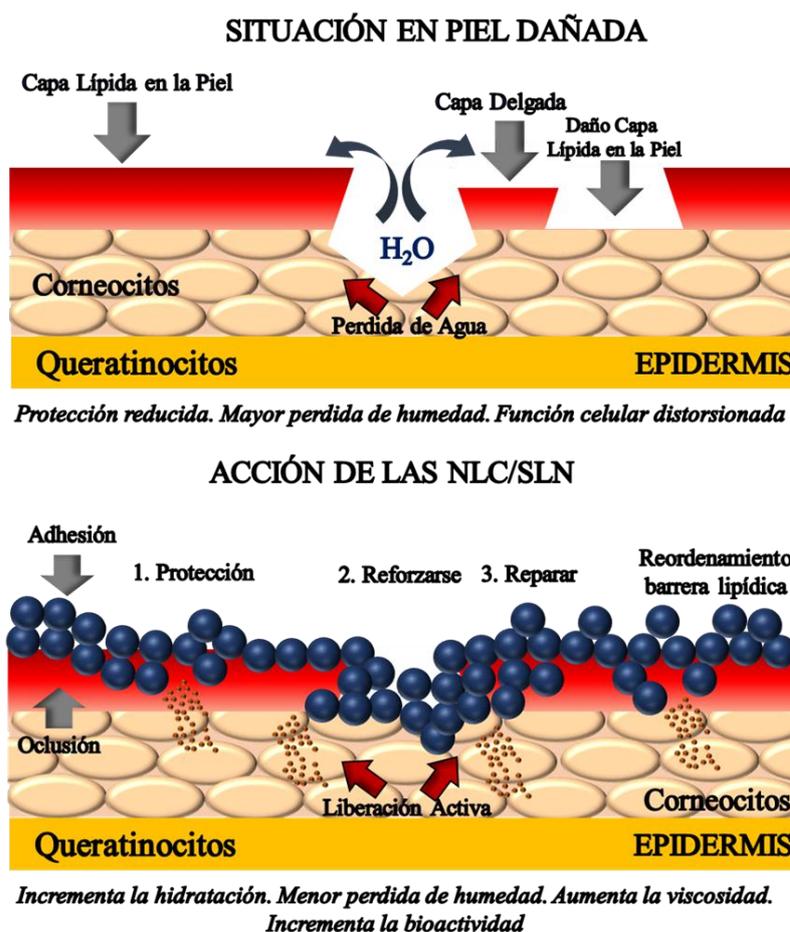


Figura 14. Propiedades de las nanopartículas lipídicas en la piel. Superior: Situación en la piel dañada. Inferior: Acción de SLNs/NLCs.

Dependiendo de su tamaño, después de su aplicación, las nanopartículas lipídicas pueden seguir diferentes caminos. Las NPs más grandes permanecen adheridas liberando localmente las moléculas de fármaco mientras que las más pequeñas pueden alcanzar la circulación sanguínea¹⁷⁵.

Se han propuesto diferentes estrategias para la preparación de sistemas semisólidos basado en NPs lipídicas¹⁷⁶: 1) la asociación de las dispersiones acuosas a formulaciones semisólidas convencionales previamente preparadas (ej.: geles, cremas y ungüentos) y 2) el aumento directo de la consistencia de las dispersiones de NPs, ya sea mediante la adición de potenciadores de la viscosidad a la fase acuosa o producción de sistemas con alta concentración de nanopartículas. La estrategia 2) es más prometedora ya que la concentración de NPs lipídicas en la formulación final es mayor, evitando dilución excesiva de las dispersiones de nanopartículas que puede originar formulaciones con niveles bajos de principio activo¹⁷⁶.

- *Hidrogel de NLCs*: Como se mencionó con anterioridad, las formulaciones de NPs con consistencia semisólida se pueden obtener incorporando directamente agentes gelificantes hidrófilos a las dispersiones acuosas de partículas, originando sistemas similares a nanoemulgeles que presentan la típica red de hidrogel con nanopartículas lipídicas atrapadas y estabilizadas. Los agentes gelificantes más utilizados son los carbopoles que adquieren consistencia semisólida después de una neutralización llevada a cabo generalmente por la adición de trietanolamina (TEA)^{177, 178, 179}.

El carbopol (también denominado carbomer, carbómero, carboxipolimetileno o carpoleno) es un polímero reticulado del ácido acrílico. Se trata de un polímero hidrofílico que en su estructura molecular cuenta con una gran cantidad de grupos carboxilo. Cuando se dispersa en agua, cada molécula individual de polímero se hincha hasta 1000 veces su volumen original formando una dispersión tipo mucílago con pH ácido (alrededor de 3,0). La presencia de agentes neutralizadores genera cargas negativas a lo largo de la estructura del polímero debido a la ionización de los grupos de ácido carboxílico que favorecen la reticulación de las moléculas de polímero hinchadas, dando lugar a la formación del gel.¹⁸⁰ (Figura 15).

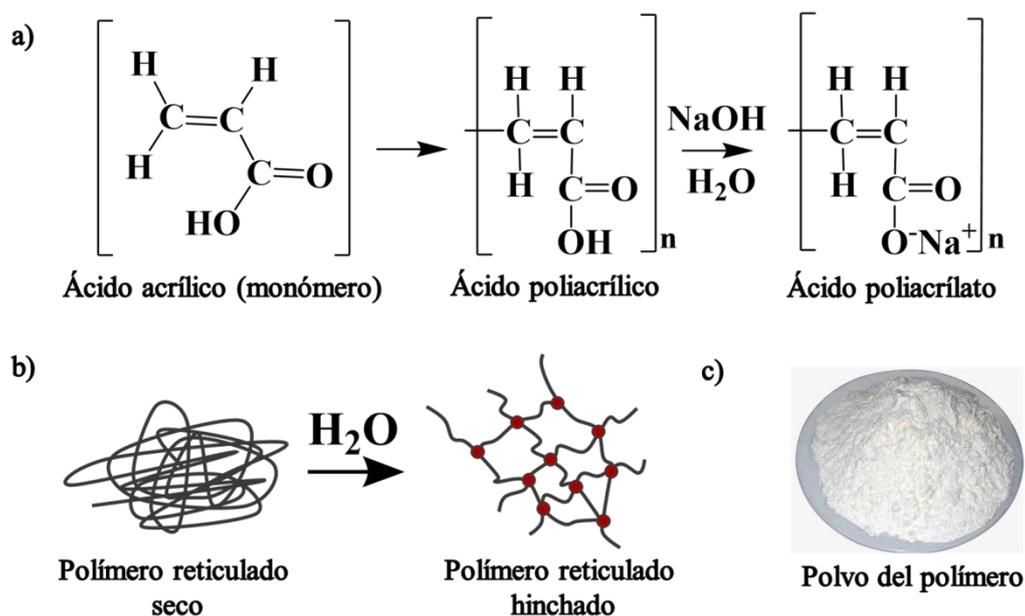


Figura 15. Aspectos del carbopol. a) Reacción química del ácido (poli) acrílico con una base, ej.: Hidróxido de sodio, NaOH, b) el polímero reticulado seco se hidrata y se hincha y c) polímero en polvo.

Ensayo *in vitro* de liberación de un principio activo desde una formulación farmacéutica tópica, determinación del perfil de liberación.

La formulación farmacéutica seleccionada como medio de soporte de las NPs debe someterse a estudios con el fin de corroborar su eficacia. Entre ellos es de importancia analizar la influencia de la formulación farmacéutica en la liberación del fármaco incorporado en las NPs. Para esto, se debe utilizar la técnica analítica y la instrumentación adecuada considerando las propiedades de la droga y de la formulación propuesta.

El sistema de *celda de difusión de Franz* se utiliza frecuentemente para el estudio de permeación cutánea *in vitro* en formulaciones farmacéuticas tópicas (**Figura 16**). Esta celda consta de dos cámaras primarias separadas por una membrana. Se prefiere la piel humana pero también puede utilizarse piel animal o bien una membrana sintética que simule el poro de la piel. La formulación tópica (gel de NPs lipídicas, en este caso) se coloca en la cámara donadora en contacto con la membrana. La dispersión se dializa entonces contra el medio de disolución contenido en la cámara inferior. Dicha cámara se encuentra termostatazada por un flujo de agua a 32°C y consta de un buffer fosfato a pH 7,4. A intervalos de tiempo determinados, desde el brazo lateral de la celda, se toman alícuotas de la solución buffer para llevar a cabo un análisis cuantitativo del fármaco que atravesó la membrana. Para este estudio usualmente se utiliza espectroscopia UV o HPLC¹⁸¹. La dilución que sufre la muestra es una limitación del método ya que compromete el límite de detección de las técnicas analíticas utilizadas para la determinación del principio activo¹⁸². En la presente Tesis, el contenido de PX se determinó electroquímicamente sin inconvenientes, utilizando VOC.

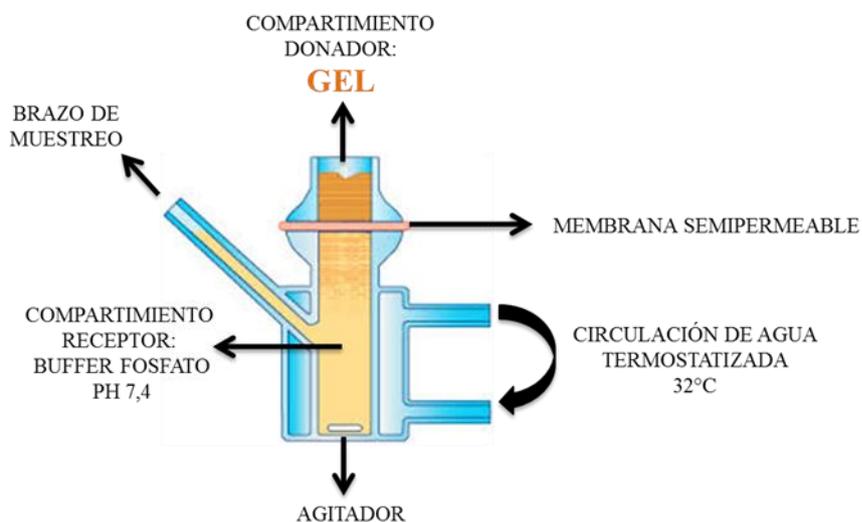


Figura 16. Esquema de una celda de difusión de Franz.

2.9 FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS.

2.9.1 Dispersión dinámica de luz

Entre las técnicas analíticas empleadas para realizar la caracterización de estos sistemas portadores se puede nombrar la Dispersión dinámica de luz (o espectroscopía de correlación fotónica) la cual es una de las técnicas más utilizadas para la medida del **tamaño de partícula e índice de polidispersidad**¹²⁴. Esta técnica se utiliza fundamentalmente para estimar el perfil de distribución de tamaño de pequeñas partículas en suspensión.

Como su nombre lo indica, esta técnica se basa en la dispersión de la luz por parte de partículas en suspensión. En la **Figura 17** se observa un esquema simple sobre cómo se lleva a cabo un fenómeno dispersivo. Un haz de luz, de longitud de onda λ , incide sobre la muestra y es dispersado (en ausencia de fenómenos de absorción) por las partículas que en ella están presentes.

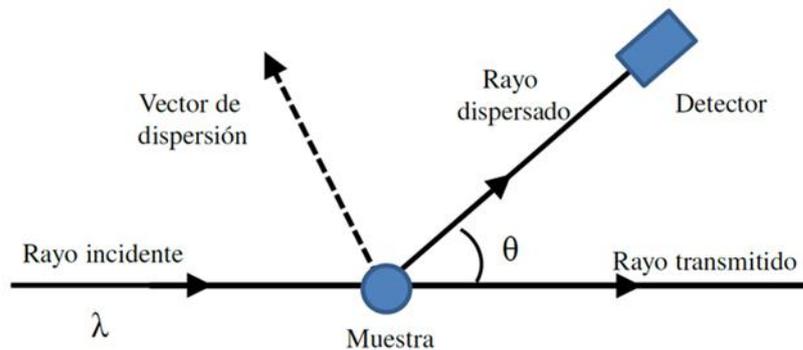


Figura 17. Diagrama esquemático del fenómeno de dispersión.

Si la fuente de luz es un láser (luz cercana a la monocromaticidad y coherente) es posible observar fluctuaciones en la intensidad de la dispersión a lo largo del tiempo. Estas fluctuaciones se deben al hecho de que las pequeñas partículas en suspensión experimentan movimiento Browniano con lo cual la distancia entre ellas cambia constantemente con el tiempo. La luz dispersada, entonces, sufre interferencias destructivas y constructivas ocasionadas por las partículas en movimiento dentro de la suspensión, dando origen a un patrón de señal similar al ruido¹²⁵ (**Figura 18**).

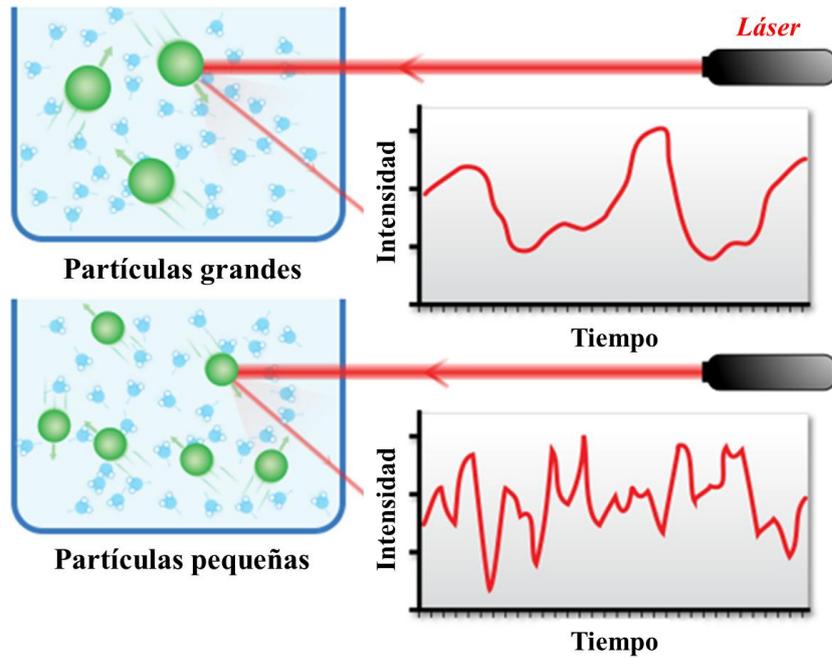


Figura 18. Dispersión de la luz debida a partículas de diferente tamaño.

Las fluctuaciones de ese “ruido” son una medida de la velocidad de desplazamiento. Dicha velocidad se define por la propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional. El coeficiente de difusión de las partículas (D) será inversamente proporcional al tiempo de decaimiento de las fluctuaciones de la luz dispersada. Este decaimiento describe una función dependiente del tiempo llamada *función de correlación*¹²⁵ (**Figura 19**). Aquellas partículas que posean mayor tamaño presentarán una función de correlación en la que el tiempo de decaimiento es mayor, mientras que las partículas pequeñas ofrecen tiempos de decaimiento menores.

Distribución de tamaño de partícula

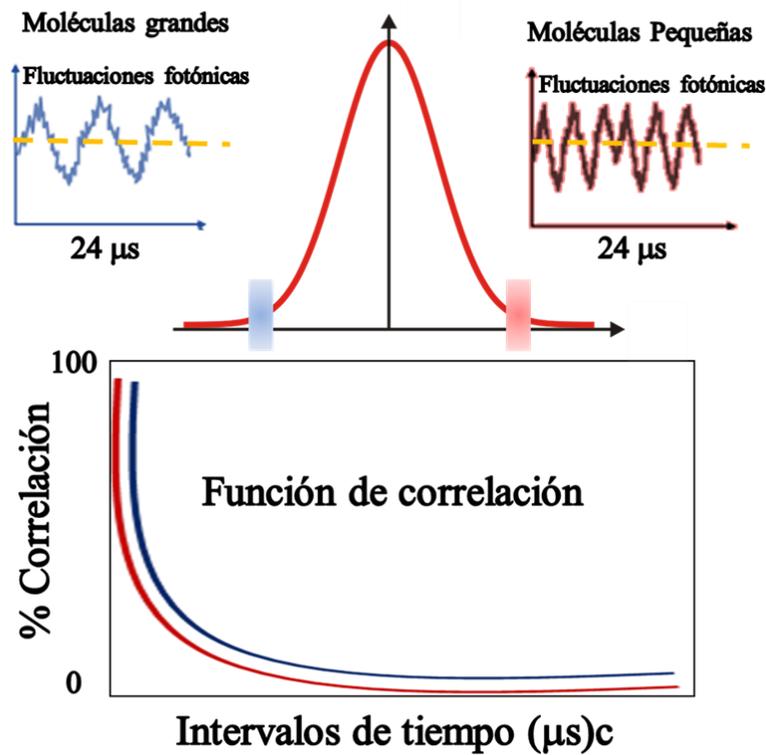


Figura 19. Función de correlación y su relación con el tamaño de partícula.

Básicamente, mediante un algoritmo adecuado (ej. con el algoritmo CONTIN¹⁸³), se realiza el ajuste de función de correlación $G(\tau)$ para determinar el coeficiente de difusión translacional D . Esta función puede tener dos formas según se trate de partículas monodispersas (ecuación (2)) o polidispersas (ecuación (3)) en movimiento Browniano:

$$G(\tau) = A(1 + Be^{-2q^2D\tau}) \quad (2)$$

donde A y B son constantes, Q es el módulo del vector de onda, τ es el tiempo de muestreo y D es el coeficiente de difusión translacional. Para muestras polidispersas, la función de correlación se define como:

$$G(\tau) = A(1 + g(\tau)^2) \quad (3)$$

donde $g(\tau)$ es la suma de todos los decaimientos exponenciales contenidos en la función de correlación.

A partir de D , y partiendo de la suposición de que las partículas consideradas son esféricas, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein se puede calcular el diámetro hidrodinámico de las partículas en suspensión.

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (4)$$

donde D_h es el diámetro hidrodinámico, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura (en grados Kelvin), D es el coeficiente de difusión y η es el índice de refracción del medio.

2.9.2 Movilidad electroforética

Como se explicó en la **Sección 2.6.2**, el potencial Z no puede medirse directamente, pero puede estimarse aplicando modelos teóricos a mediciones de la movilidad electroforética o movilidad electroforética dinámica de la dispersión de partículas. En la práctica, el potencial Z de una dispersión se calcula aplicando un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas cargadas migrarán hacia el electrodo de carga opuesta (electroforesis) (**Figura 20**). Dentro de la capa difusa existe un plano hipotético que, durante la electroforesis, actúa como la interfaz entre el movimiento de las partículas y la capa de dispersante a su alrededor. El potencial de esta interfaz define el ya mencionado potencial Z ¹⁸⁴.

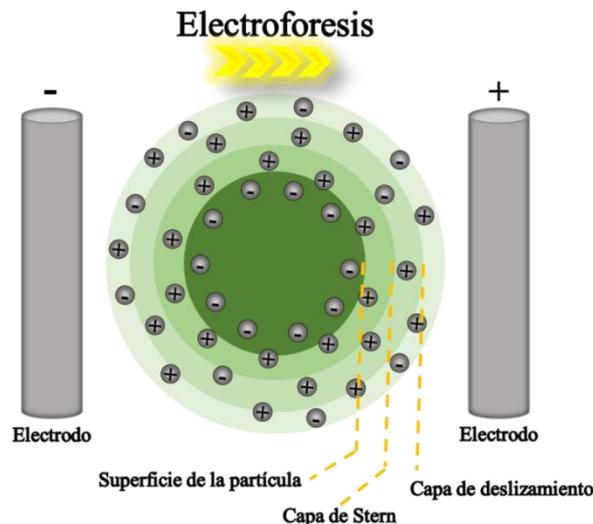


Figura 20. Ilustración del proceso de electroforesis luego de la aplicación de un campo eléctrico sobre una suspensión de partículas cargadas negativamente.

La movilidad electroforética (μ_e) de las partículas se calcula como:

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (5)$$

donde V es la velocidad de la partícula ($\mu\text{m/s}$), E es la intensidad del campo eléctrico aplicado (Volt/cm) (ambos parámetros conocidos). El potencial Z se relaciona con la μ_e a partir de la ecuación de Henry¹²⁵ (ecuación (6)).

$$\mu_e = \frac{2 \varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (6)$$

donde ε_r es la permitividad relativa (constante dieléctrica), ε_0 es la permitividad del vacío, ζ es el potencial Z , $f(Ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad a la temperatura experimental.

Cuando el grosor de la doble capa eléctrica es mucho más pequeño en comparación con el radio de la partícula, siendo el caso de partículas grandes (hasta $1 \mu\text{m}$) en soluciones acuosas de alta fuerza iónica (10^{-2} M), el valor de $f(Ka)$ se toma como 1.5. La ecuación de Henry se modifica obteniéndose la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski¹²⁵:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} \quad (7)$$

Por el contrario, cuando el grosor de la doble capa eléctrica es mucho mayor que la partícula propia debido a la presencia partículas más pequeñas ($\leq 100 \text{ nm}$) dispersas en baja fuerza iónica (10^{-5} M) el valor de $f(Ka)$ se toma como 1 y la ecuación de Henry se puede modificar como la ecuación de Hückel¹²⁵ (ecuación (6)).

$$\mu_e = \frac{2 \varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{3\eta} \quad (8)$$

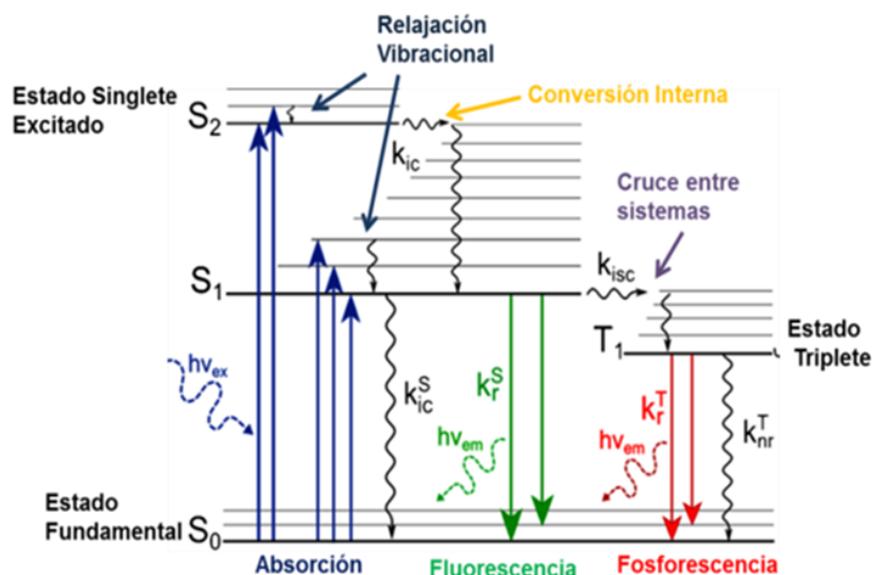
La *microelectroforesis de láser Doppler* es la técnica utilizada para medir el potencial Z . Se aplica un campo eléctrico a una solución de moléculas o a una dispersión de partículas, las cuales se mueven con una velocidad relacionada con su potencial Z . Esta velocidad se mide utilizando una técnica interferométrica de láser patentada llamada M3-PALS (Dispersión de luz para análisis de fase, por sus siglas en inglés). Esto permite el cálculo de la movilidad electroforética y, a partir de esta, del potencial Z para la medición

exacta de una amplia gama de tipos de muestras y medios de dispersión, incluidos los dispersantes con altas concentraciones de sal y no acuosos¹²⁵.

Esta técnica se usa a menudo junto con DLS y, por lo tanto, existen una gama de instrumentos (ej.: Malvern Zetasizer®) que permiten realizar medidas en conjunto de tamaño de partícula y potencial Z.

2.9.3 Espectroscopia de fluorescencia molecular

Los procesos donde ocurre absorción y emisión de luz por parte de una molécula pueden ser ilustrados mediante un diagrama de Jablonski^{185, 186}. En el **Esquema 4** se muestra el diagrama típico, donde se observan los estados electrónicos S_0 , S_1 y S_2 para los singletes y T_1 , para el triplete. A temperatura ambiente, la energía térmica no es suficiente para poblar significativamente los estados vibracionales superiores del estado fundamental y por lo tanto, la absorción generalmente ocurre desde los niveles con energía vibracional más baja. Normalmente las moléculas son excitadas desde el estado electrónico S_0 a algún nivel rotacional de un estado vibracional de un estado electrónico singlete superior (S_1 , S_2) en un tiempo de 10^{-15} s. Esto es mucho más rápido que el reordenamiento de los núcleos, es decir, cumple con el principio de Franck-Condon, donde la transición electrónica más probable, es aquella que no presenta cambios en la posición de los núcleos de la entidad molecular y de sus alrededores¹⁸⁵.



Esquema 4. Diagrama de Jablonski.

Luego, las moléculas se relajan al nivel vibracional más bajo de S_1 (o S_2). Este proceso que es no radiante (no emite luz y la energía se pierde como calor) es llamado relajación vibracional. También puede producirse el proceso llamado conversión interna que generalmente ocurre en 10^{-12} s o menos. Este fenómeno consiste en un relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Debido a que el tiempo en que la mayoría de las moléculas permanece en estado excitado es cercano a 10^{-8} s, la conversión interna se completa generalmente antes de la emisión^{185, 186}. Por lo tanto, la emisión de fluorescencia usualmente proviene desde un estado excitado equilibrado térmicamente, es decir, del estado vibracional de energía más baja de S_1 . El retorno al estado fundamental típicamente ocurre hacia un nivel vibracional de energía superior de dicho estado, luego rápidamente (10^{-12} s) se alcanza el equilibrio térmico. Una consecuencia interesante de la emisión a altos niveles vibracionales del estado fundamental, es que el espectro de emisión de fluorescencia es generalmente la imagen especular del espectro de absorción de la transición $S_0 \rightarrow S_1$. Además de emitir fluorescencia, las moléculas en el estado S_1 pueden cambiar de espín electrónico al primer estado triplete (T_1) a través de un proceso conocido con el nombre de cruce de sistemas. El fluoróforo pasa al nivel vibracional más alto del T_1 y posteriormente ocurre la relajación vibracional, conduciendo al fluoróforo al nivel vibracional más bajo del T_1 . Desde T_1 se observa emisión de luz a través de un proceso poco probable de ocurrir en solución, llamado fosforescencia. La transición de T_1 a S_0 es prohibida por espín y como resultado, las constantes de velocidad para la emisión del triplete son varios órdenes de magnitud más pequeñas que para aquellas de fluorescencia^{185, 186}.

Corrimiento de Stokes: Examinando el diagrama de Jablonski (**Esquema 4**), es posible observar que la energía de la emisión (ν_{emi}) es generalmente menor que la de absorción (ν_{abs}). Por lo tanto, la fluorescencia siempre ocurre a menores energías o mayores longitudes de onda que la absorción. Esta pérdida de energía se debe a una variedad de procesos dinámicos, que ocurren luego de la absorción de luz y se denomina corrimiento de Stokes (ν_{stokes})^{185, 186}, el cual se puede definir según la ecuación (9):

$$v_{Stokes} = v_{abs} - v_{emi} \quad (9)$$

2.9.4 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas están basadas en reacciones de óxido/reducción (redox) que puede experimentar la materia cuando las condiciones termodinámicas de un sistema dado lo permiten (*celdas galvánicas*) o bien, cuando son favorecidas (*celdas electrolíticas*) producto de una perturbación aplicada al sistema (en términos de potencial o corriente).

Una celda electrolítica es un sistema fisicoquímico no espontáneo que interactúa con la corriente eléctrica tras la aplicación de un potencial, compuesto por una fase líquida donde se encuentra la sustancia susceptible de oxidarse o reducirse y un metal o semiconductor que se la llama electrodo. La solución debe ser eléctricamente conductora. Por lo general la transferencia de electrones puede ser homogénea entre sustancias disueltas en el seno de la fase líquida pero, bajo la descripción de la celda electroquímica, necesariamente hay transferencia de electrones de forma heterogénea, en la interfaz del electrodo¹⁸⁷.

De acuerdo al principio de electro neutralidad se sabe que, mientras una sustancia se oxida otra se reduce de forma simultánea. Este proceso global es imposible para un solo electrodo en una celda electrolítica, de tal manera que éstas deben estar constituidas por lo menos con dos electrodos, uno de los cuales es llamado cátodo donde ocurren los fenómenos de reducción y el otro es llamado ánodo en el cual se lleva a cabo la oxidación. A fines analíticos el sistema debe ser referido a uno de los electrodos, llamado electrodo de trabajo, donde se siguen las reacciones de interés (oxidación o reducción) según se manipule el sistema de acuerdo al sustrato susceptible de oxidarse y/o reducirse. Para ello, el electrodo de trabajo debe poseer un área tal que controle la señal cuantificable de acuerdo a la ley de Faraday. El contra electrodo; donde se llevan a cabo los fenómenos opuestos al electrodo de trabajo, no controla el fenómeno de interés ya que su área efectiva es unas 200 veces mayor que la del electrodo de trabajo. Esto facilita que la reacción ocurra rápido, puesto que no limita cinéticamente el proceso bajo estudio.

En el caso de celdas electrolíticas es necesario considerar el potencial propio de la celda y el potencial necesario para que tenga lugar la transformación de la especie. El potencial se define como el trabajo requerido para desplazar una carga desde un punto de referencia a un punto considerado. Dicho trabajo se expresa en Voltios ($V = \text{Julio/Coulomb}$) y debe, además, incorporar la resistencia al desplazamiento ($V = \text{Resistencia} \times \text{Corriente}$ (flujo de

carga por unidad de tiempo)), hecho relevante cuando se tienen sistemas que implican medios no continuos donde el desplazamiento de la carga ocurre entre múltiples fases¹⁸⁷.

La **Figura 21** muestra un sistema electroquímico y sus variables de manera simplificada. Este sistema está compuesto por dos electrodos acoplados con una fuente de potencial eléctrico, capaz de aplicar la perturbación necesaria para la transformación electroquímica y un lector de corriente (microamperímetro) encargado de coleccionar una señal cuantificable; sumergidos en una solución compuesta por la especie electroactiva y algún electrolito conductor inerte. La especie electroactiva es susceptible de experimentar reacciones de óxido/reducción según la reacción general mostrada en la ecuación (10) de acuerdo a la ley de Faraday¹⁸⁷.

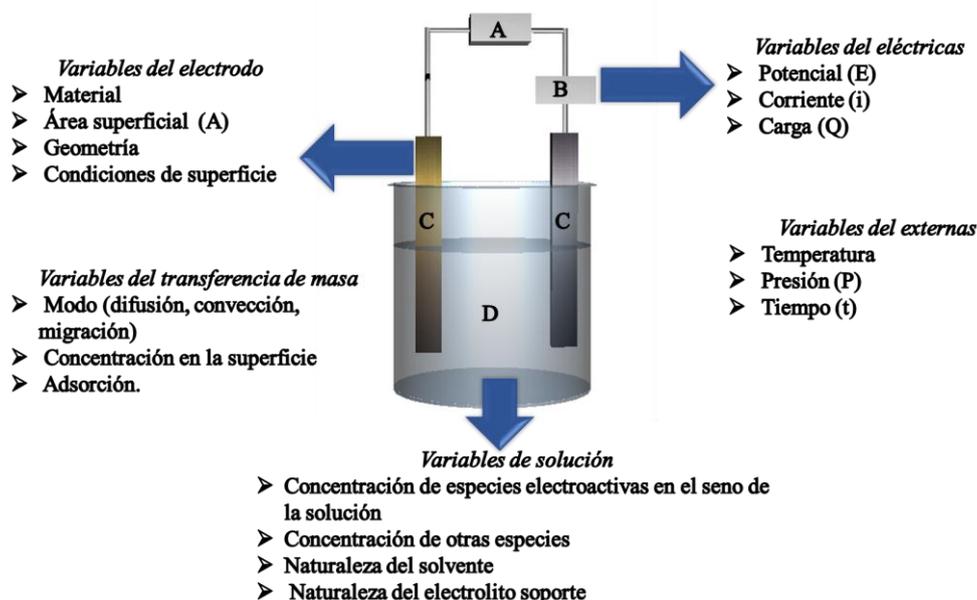


Figura 21. Sistema electroquímico y variables. **A)** Fuente de potencial, **B)** microamperímetro, **C)** electrodos y **D)** solución electrolítica.

- *Celda de tres electrodos:* Bajo una perturbación suficiente del sistema para producir fenómenos redox en la superficie del electrodo, se generan gradientes de concentración tanto en el electrodo de trabajo como en el contra electrodo. Además de los fenómenos farádicos, la aplicación de una diferencia de potencial entre ambos electrodos, provoca una caída de potencial óhmico por la resistencia de la solución. En una celda de dos electrodos, la señal de corriente contiene una componente resistiva que distorsiona las señales propias del fenómeno farádico. Por eso, en cinética electroquímica se emplean las celdas de tres electrodos.

Por otro lado, los potenciales de electrodo se deben referir al potencial de un *electrodo de referencia*, lo cual es equivalente a controlar la energía de los electrones dentro del electrodo de trabajo. Este electrodo trabaja con una hemireacción en condiciones normalizadas de manera que su potencial se mantiene constante para un gran intervalo de flujo de corriente.

Como muestra la **Figura 22**, la celda de tres electrodos está compuesta por un electrodo de trabajo donde ocurren los fenómenos redox de interés, un electrodo de referencia conectado al electrodo de trabajo a través de un potenciómetro y una fuente de poder externa. Dicha fuente es encargada de aplicar una diferencia de potencial controlada entre el electrodo de trabajo y el contra electrodo, donde ocurren los fenómenos redox opuestos al electrodo de trabajo. En este último (circuito de polarización) se registra la corriente (carga por unidad de tiempo) resultante del fenómeno redox.

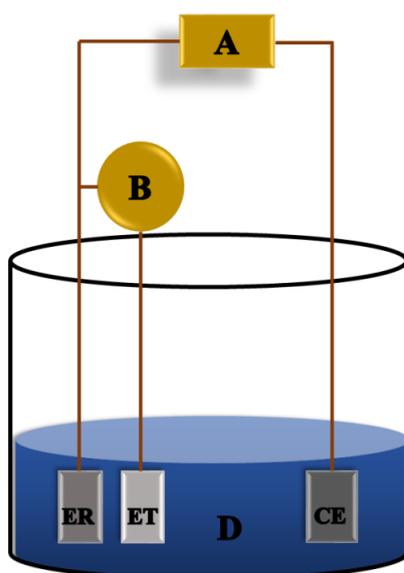


Figura 22. Celda electroquímica de tres electrodos. **A)** Fuente de potencial y **B)** microamperímetro. **ET:** Electrodo de trabajo; **ER:** Electrodo de referencia; **CE:** Contra electrodo; **D:** Solución electrolítica.

- *Técnicas potencioestáticas:* El principio de las técnicas potencioestáticas consiste en la perturbación del sistema en términos de potencial constante bajo una función conocida en el tiempo $E=f(t)$, razón por la cual se emplea un equipo llamado potencioestato, encargado de efectuar dicha perturbación y coleccionar la señal en términos de corriente. Se suelen denominar métodos de saltos de potencial. En cambio, si la función del potencial es tal que

cambia con el tiempo, se habla de técnicas potenciodinámicas. La elección del potencial y la duración en el tiempo, depende del fin cualitativo y cuantitativo que se desee.

Hasta aquí se han mencionado múltiples variables que inciden en la funcionalidad de una celda electroquímica. Como se ha dicho reiteradamente, del control de las variables depende el seguimiento cuantitativo, lo que implica un conocimiento detallado de cada fenómeno que permita su descripción matemática. En este orden de ideas plantearemos los fenómenos del sistema cuando éste es perturbado en términos de potencial.

Voltametría lineal y cíclica

Se trata de técnicas potenciodinámica, en donde el potencial se varía en forma lineal según funciones conocidas del tiempo, siendo la más común, aquella en que se produce una oxidación (ecuación (11)).

$$E = E_i + vt \quad (11)$$

donde E_i es el potencial inicial, t es el tiempo y $v = dE/dt$, es la velocidad de cambio de potencial.

Si, luego de un cierto tiempo ($t=\lambda$), se invierte el sentido del barrido de potencial, se observará el proceso redox opuesto, dando lugar a una nueva ecuación que describe la función de potencial correspondiente a la voltametría cíclica (VC).

$$E = E_i + 2v\lambda - vt \quad (12)$$

donde λ es el tiempo en el que se realiza la inversión de barrido de potencial. La representación de las ecuaciones (11) y (12) se muestra en la **Figura 23**.

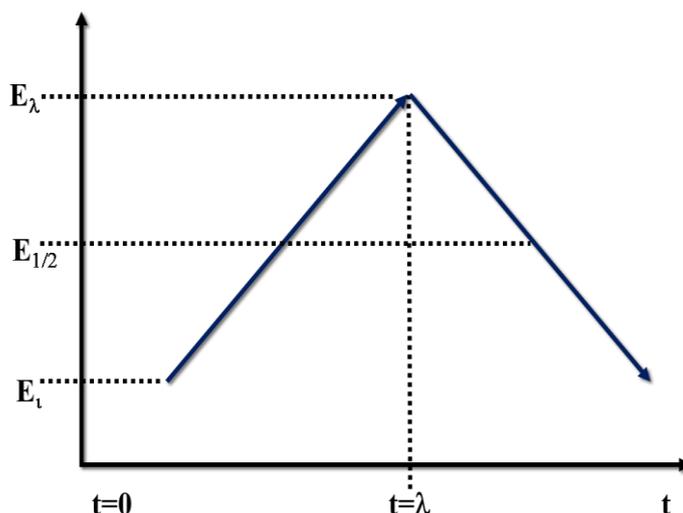


Figura 23. Barrido de potencial en la técnica de voltametría cíclica.

La magnitud de potencial y respuesta en corriente están determinados por el sustrato y la velocidad con que se programe el experimento, de forma tal que permitan dilucidar mecanismos de reacción, si se encuentran de por medio reacciones acopladas cuya cinética lo permita. La zona de potencial donde aparece la respuesta correspondiente está relacionada con el potencial de media onda ($E_{1/2}$) característico de sistema redox. Normalmente, dicha respuesta se obtiene en un intervalo de potencial de alrededor de 400 mV en el entorno del $E_{1/2}$. Es decir $E_\lambda - E_i \approx 400\text{mV}$ siendo $E_i < E_{1/2} < E_\lambda$,

Por su parte el $E_{1/2}$, si bien es característico de la especie comprometida; se puede describir matemáticamente como una función de la perturbación.

Para toda perturbación dirigida en términos de potencial, la respuesta del sistema se dará en corriente como función del tiempo (i vs t) según se altere el sistema (i vs E).

La respuesta (corriente) para un sistema reversible sin complicaciones cinéticas se muestra en la **Figura 24**. Se observa también un pico centrado alrededor del $E_{1/2}$ del sistema. Este pico, cuyo valor se denomina potencial de pico (E_p) y al cual le corresponde una cierta corriente de pico (i_p), puede ser interpretado en forma cuantitativa. La corriente de pico es proporcional a la cantidad de sustancia oxidada/reducida según sea la dirección del barrido de potencial.

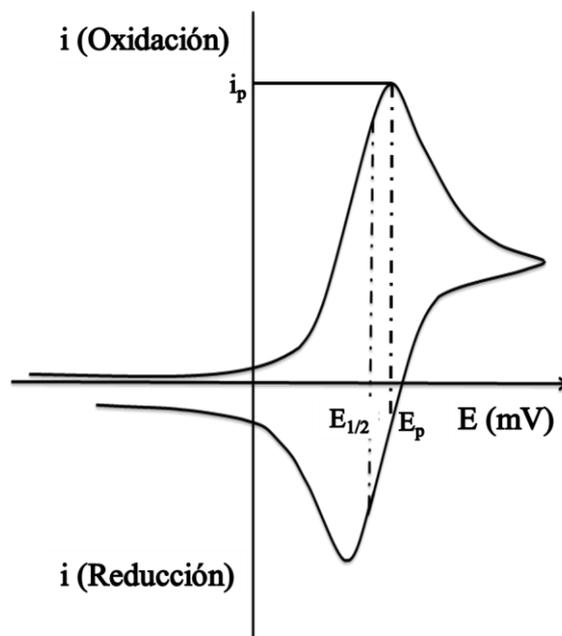


Figura 24. Voltagrama cíclico típico de una reacción reversible.

En sistemas más complejos, las respuestas electroquímicas difieren con respecto a la de un sistema simple como el mostrado en la **Figura 24**, ya que hay reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga y adoptan características propias según el mecanismo particular de que se trate.

Técnicas convolutivas o semiintegral

Un tratamiento matemático de las curvas i - E obtenidas por voltametría cíclica permite transformar las mismas y obtener curvas similares a las encontradas en voltametría de estado estacionario, las cuales suelen presentar mayores ventajas a la hora de procesar los datos experimentales. Esta transformación se basa en el principio de la convolución, la cual consiste en aplicar la integral de convolución a las curvas experimentales corriente-tiempo o corriente-potencial¹⁸⁸. Las curvas obtenidas tienen el perfil de curvas i - E donde, a partir de un potencial dado, la corriente se vuelve constante. A esta corriente se la denomina corriente límite (i_L). Con los datos obtenidos de las nuevas curvas es posible obtener información del mecanismo de reacción de electrodo, como así también de los parámetros cinéticos del mismo.

Para un sistema dado, la corriente límite convolucionada (I_L) está definida por:

$$I_L = nFAD_R^{1/2}C_R^* \quad (13)$$

donde n es el número de electrones intercambiados, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, D_R es el coeficiente de difusión y C_R^* es la concentración de la especie de interés.

A partir de la ecuación (13) y conociendo n , F , A y C_R^* es posible determinar D_R de la sustancia en estudio.

Voltametría de onda cuadrada (VOC)

La voltametría de onda cuadrada es una técnica compleja que presenta mayor sensibilidad y rapidez, comparándola con técnicas de barrido como las voltametrías cíclica o lineal. La VOC empezó a adquirir importancia con la aparición en el mercado de instrumentos comandados por computadoras. Esta técnica consiste en aplicar, sobre el electrodo de trabajo, una modulación de potencial en forma de onda cuadrada, combinando su amplitud (ΔE_{sw}) con un incremento de la onda (ΔE_s), que se aplica con una frecuencia determinada (f)¹⁸⁷.

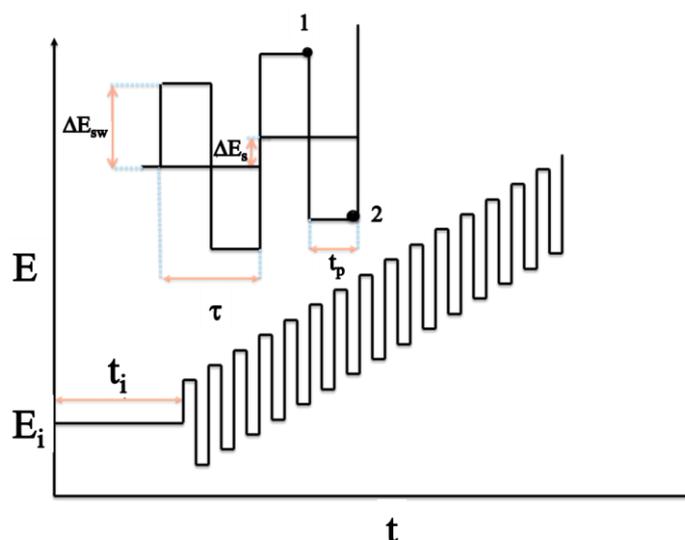


Figura 25. Representación esquemática de la función de perturbación en términos de potencial en función del tiempo de la onda cuadrada. Donde t_i = tiempo de reposo, t_p = es el tiempo de pulso, T = período, E_i = potencial de reposo, ΔE_s = salto de potencial, ΔE_{sw} = amplitud de potencia.

En la **Figura 25**, se representa la función de perturbación del potencial, característica de la técnica VOC; donde E_i es el potencial inicial donde no ocurren fenómenos redox, ΔE_{sw} es la amplitud de la onda, ΔE_s es el salto de potencial, t_i el tiempo de espera a E_i , t_p el tiempo de pulso y τ el período luego de un ciclo.

La VOC es una técnica de pulso. Su perturbación consta de saltos de potencial realizados a lo largo del tiempo, que permiten obtener una respuesta en forma de corriente como lo muestra la **Figura 26**. La respuesta muestra un perfil i-t con decaimiento exponencial donde, a tiempos cortos, encontramos contribuciones de corrientes de blanco y las generadas por la oxidación/reducción de la especie de interés, mientras que a tiempos largos solo encontramos contribución de corrientes de la especie de interés, siendo éstas de interés analítico.

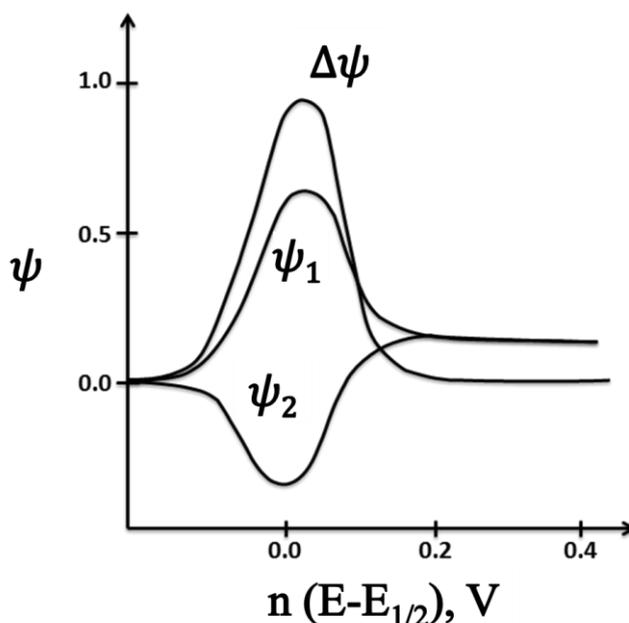


Figura 26. Voltograma de onda cuadrada para una especie reversible R/O en ausencia de O en el seno de la solución, donde Ψ es la función corriente diferencial neta, Ψ_1 la corriente directa (de ida) y Ψ_2 la corriente inversa (de vuelta).

En la VOC la corriente es muestreada justo antes de invertir el potencial como lo muestran los puntos 1 y 2 al final del pulso de ida y vuelta, respectivamente, en la **Figura 25**. Esto permite un registro diferencial de las corrientes de ida y vuelta (ecuación (14)), llamado función corriente neta en la cual se suprimen las corrientes de blanco.

$$\psi = \psi_1 - \psi_2 \quad (14)$$

En la **Figura 26**, se muestran los tres registros de la función corriente teórica que se obtienen en un experimento de voltametría de onda cuadrada para una especie reversible del tipo presente en la ecuación (10), donde su magnitud respectiva está normalizada respecto al $E_{1/2}$. El valor de la función corriente neta (ψ) es proporcional a la concentración

de la especie y tiene importancia desde el punto de vista analítico ya que suprime la corriente de blanco (capacitiva) y hace posible que esta técnica sea muy sensible¹⁸⁹.

Luego de resolver las ecuaciones matemáticas correspondientes se obtiene la corriente neta experimental (i_n) y la misma queda expresada por la siguiente ecuación:

$$i_n = \frac{nFAD_R^{\frac{1}{2}}C_R^*}{(\pi t_p)^{\frac{1}{2}}} \psi = BC_R^* \quad (15)$$

donde n es el número de electrones intercambiados, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, D_R y C_R^* es el coeficiente de difusión y la concentración de la especie de interés respectivamente, t_p es el tiempo de pulso y ψ es la función corriente normalizada, que está relacionada con la forma cualitativa de la onda voltamétrica y es función de $(\Delta E_{SW}, \Delta E_S)$. En términos generales la ψ es simple en concepto, pero matemáticamente compleja y típica de cada sustancia en particular¹⁹⁰.

2.9.5 Electroforesis capilar

En su nivel más básico, la electroforesis es el movimiento de especies iónicas en medios conductivos bajo la aplicación de un campo eléctrico. La movilidad electroforética de un ion (μ_{ep}) se puede describir en términos de parámetros físicos cuando la fuerza eléctrica es igual a la fuerza de fricción¹⁹¹:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r_i} \quad (16)$$

donde q es la carga, η es la viscosidad, y r_i es el radio del ion. De esta ecuación surge la noción de que la velocidad en el movimiento de un ion está íntimamente ligada a su relación carga/tamaño (q/r_i). Es importante considerar que es la forma creada por los iones solvatados la que realmente gobierna la fuerza de fricción e influye en la movilidad. La ecuación también deja en evidencia que el signo de la carga, es decir, si el ion es un anión o un catión, define la dirección en que se mueve el ion y, por lo tanto, los aniones y cationes se moverán en direcciones opuestas.

Electroósmosis y el flujo electroosmótico

La electroósmosis se observa cuando se aplica un campo eléctrico a una solución conductora en un capilar que tiene cargas fijas en su pared interior. En un capilar de sílice

fundida, que es el más comúnmente utilizado en electroforesis capilar (EC), la superficie interna contiene grupos silanol ionizables (SiOH) que tienen valores de pKa entre 4 y 6. A valores de pH mayores que 4, los grupos silanol se ionizan dando lugar a la forma aniónica, silanoato (SiO⁻) y, por lo tanto, la superficie presenta una carga negativa. Ésta atrae cationes con carga positiva provenientes del seno solución, formando una doble capa con densidad de carga positiva la cual disminuye exponencialmente a medida que aumenta la distancia desde la pared. Se genera así una diferencia de potencial en la proximidad de la pared y este potencial es el ya conocido potencial Z. Como se muestra en la **Figura 27**, la capa más interna cerca de la superficie capilar es esencialmente estática y se denomina capa interior de Helmholtz o capa de Stern y la segunda capa es más difusa y se denomina plano exterior de Helmholtz¹⁹¹.

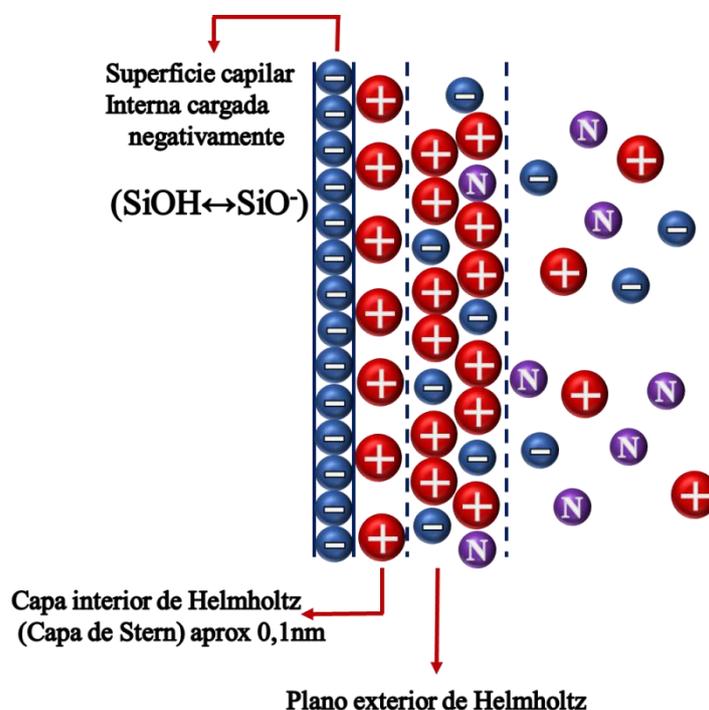


Figura 27. Doble capa eléctrica en capilares de sílice fundida.

Bajo la aplicación de un campo eléctrico, los cationes en la segunda capa, más difusa, migran en dirección al cátodo y, al hacerlo, arrastran moléculas de disolvente junto con ellos dando lugar al llamado flujo electroosmótico (FEO). La fuerza que impulsa el líquido se origina en la superficie cargada. Así, en los estrechos confines del capilar, la velocidad del líquido es aproximadamente uniforme en todo el diámetro interno del capilar dando lugar a un perfil de flujo uniforme en contraste con el perfil parabólico observado en el flujo laminar que se produce cuando se usa presión para bombear líquido (**Figura 28**)¹⁹¹. Esta diferencia en el perfil del flujo es una de las razones principales de las altas eficiencias

que se pueden obtener por electroforesis. El flujo uniforme obtenido por EC reduce en gran medida el ensanchamiento de las bandas normalmente observado en los sistemas que bombean el fluido por un diferencial de presión (como la cromatografía líquida de alta resolución)¹⁹².

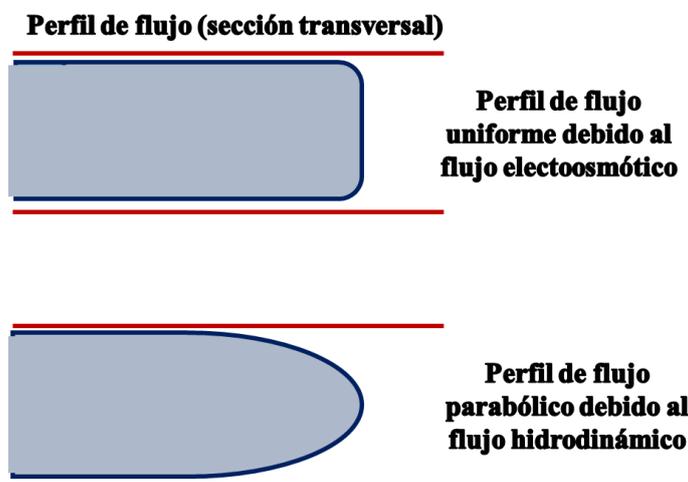


Figura 28. Perfil de flujo uniforme en electroforesis capilar.

Una de las implicaciones más importantes de tener FEO es que moverá físicamente el líquido a través del capilar y la separación electroforética se superpone a la parte superior de este flujo. Este FEO actúa como un mecanismo de bombeo para impulsar todas las moléculas (catiónicas, aniónicas y neutras) hacia el detector con una separación finalmente determinada por las diferencias en la migración electroforética de cada analito individual. La movilidad aparente neta (μ_{app}) es la suma de los vectores del μ_{FEO} y μ_{ep} ¹⁹¹:

$$\mu_{app} = \mu_{FEO} + \mu_{EP} \quad (17)$$

Como se muestra en la **Figura 29**, en un capilar de sílice fundida con el FEO dirigido hacia el cátodo, los cationes llegarán al detector más rápido ordenados según la disminución de sus μ_{EP} ya que sus μ_{EP} están en la misma dirección que los μ_{FEO} . A continuación, habrá moléculas neutras que migrarán como un pico no resuelto con el FEO. Después del FEO, emergerán los aniones ordenados según el aumento de sus μ_{EP} , ya que su movilidad está en dirección opuesta a la del FEO. Es importante tener en cuenta que los aniones con una movilidad μ_{EP} mayor que μ_{FEO} nunca llegarán al detector y migrarán a través de la entrada del capilar¹⁹¹.

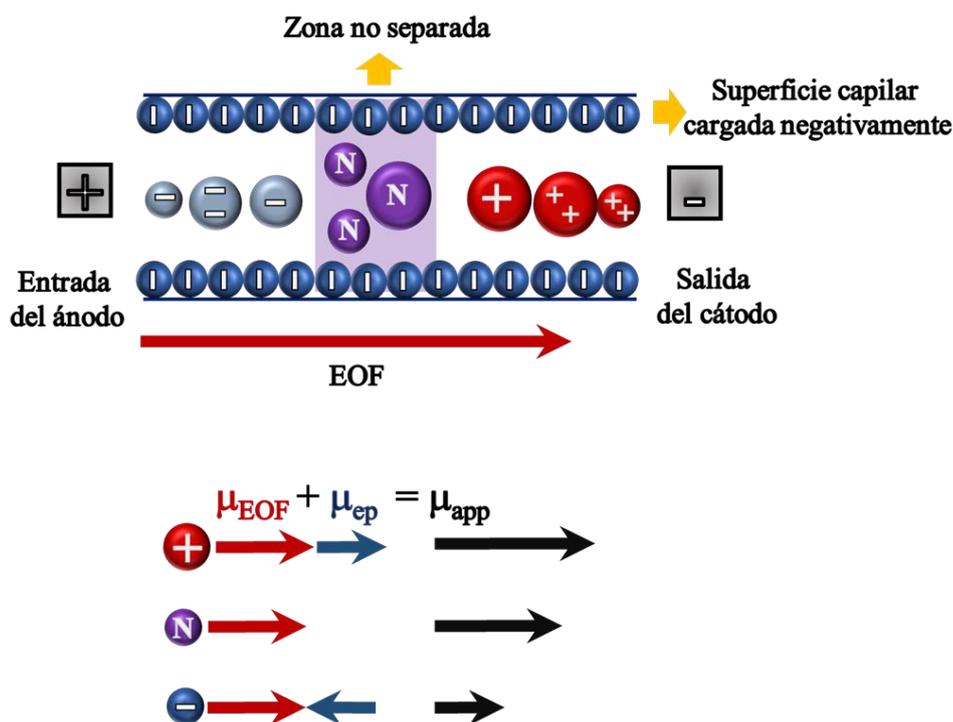
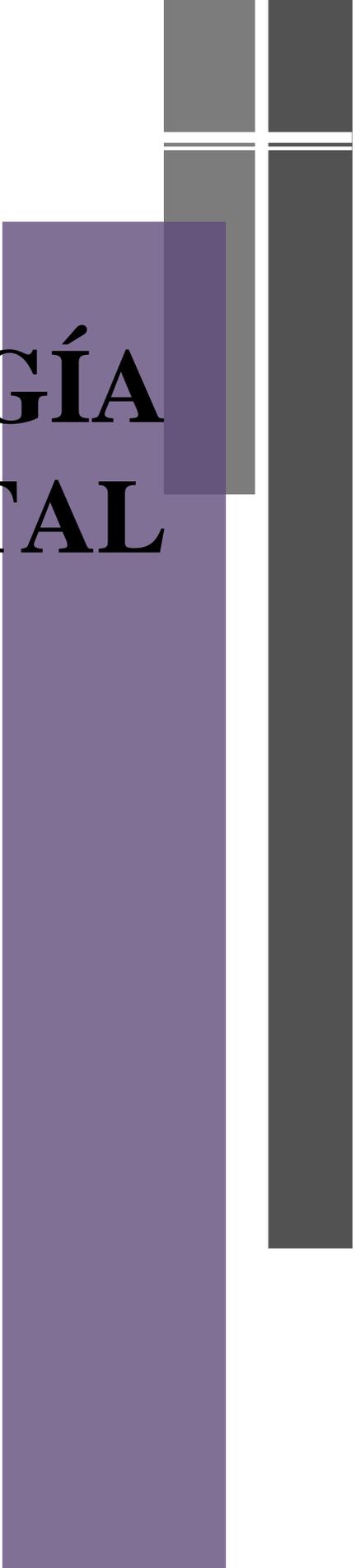


Figura 29. Migración de solutos en electroforesis capilar.

Electroforesis de zona

La electroforesis de zona (CZE, del inglés *capillary zone electrophoresis*) es el modo más utilizado de esta técnica. Constituye la forma más simple de EC, principalmente porque el capilar solo está lleno de una solución buffer. La separación ocurre porque los solutos migran en zonas discretas y a diferentes velocidades y están separados únicamente en función de las diferencias en μ_{EP} . Ambos solutos, aniónicos y catiónicos, se pueden separar simultáneamente por CZE debido al FEO (Figura 29). Sin embargo, algunos analitos no pueden separarse por esta versión clásica de la electroforesis porque son neutros o no difieren significativamente en sus movilidades electroforéticas¹⁹¹.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

El oleato de etilo y la lecitina de soja (*Sigma Aldrich*) empleados en la síntesis de las nanopartículas lipídicas presentan un grado de pureza del 98%. El surfactante utilizado fue el polisorbato 80 (Tween 80) (*Sigma Aldrich*) y el co-surfactante fue n-butanol (*Baker*) con una pureza de 99,5 %. La droga piroxicam (PX) presenta un 99,7% de pureza y fue obtenida de *Saporiti*. Para la preparación de la solución estándar de PX se utilizó acetonitrilo obtenido de *Cicarelli*. Para la formulación del gel-NLCs se empleó Carboxipolimetileno 940 (Carbopol 940) (*Parafarm*) y trietanolamina (*Sigma Aldrich*) con una 99,0% de pureza

Para los estudios espectrométricos se utilizaron los siguientes solventes: metanol (*Aberkon Química*), etanol (*Merk*), n-propanol (*Merk*), n-butanol (*Baker*), n-pentanol (*Sigma Aldrich*), acetonitrilo (*Cicarelli*), acetato de etilo (*Sintorgan*), diclorometano (*Sintorgan*), tetrahidrofurano (*Sintorgan*), 1,4-dioxano (*Sintorgan*), tetracloruro de carbono (*Merk*), éter (*Taurus*), benceno (*Sigma Chemicals*), tolueno (*Sigma Chemicals*) y n-heptano (*Sigma Aldrich*).

El electrolito soporte para llevar a cabo las medidas por VOC fue perclorato de litio (LiClO_4), el cual se obtuvo de (*Fluka*).

Se utilizó acetato de amonio y amoniaco (*Merck*) para preparar la solución buffer electroforética empleada en el estudio por CZE.

El agua utilizada fue ultrapura y se obtuvo de un equipo Labonco 90901-01. Para todas las experiencias se empleó material de vidrio volumétrico clase A.

Todos los procesos de calentamiento fueron realizados utilizando una placa agitadora/calefactora Cole-Parmer donde se realizó también la agitación magnética. Para el control de la temperatura se utilizó un termómetro con una incertidumbre de $\pm 0,1$ °C. Los reactivos fueron pesados en balanza analítica (Analytical Standard OHAUS).

Las medidas del tamaño de partícula e índice de polidispersidad fueron obtenidas a partir de un equipo de dispersión dinámica de luz (Ligth Scattering Malvern 4700), equipado con un láser de ion Argón ($\lambda=488\text{nm}$). Todas las medidas fueron realizadas a un ángulo de dispersión de 90° . La celda utilizada para las medidas de tamaño de partícula fue de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

El potencial Z fue medido utilizando un zetámetro Malvern Nano ZS90. El dispersante utilizado fue agua, la temperatura de medida fue de 25°C , el tiempo de equilibración de las muestras fue de 2 minutos y el ángulo de detección fue de 90° . Las medidas de potencial Z, se realizaron de forma directa utilizando una celda de poliestireno modelo DTS 1060C. En la **Figura 30** pueden verse las celdas con los contactos metálicos necesarios para la aplicación del campo eléctrico.



Figura 30. Cubeta tipo DTS 1060C.

El estudio morfológico de las partículas se llevó cabo utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL JSM-100 CXII, operado con un voltaje de aceleración de 80 kV.

Las medidas de emisión de fluorescencia fueron realizadas en un equipo Spex Fluoromax y las de espectrometría de absorción molecular en un equipo Shimadzu 2401, con una celda de cuarzo con 1 cm de paso óptico. Para las experiencias de absorción de radiación realizadas en las nanopartículas, se acoplo una celda de reflectancia difusa (esfera integradora) que permitió eliminar gran parte del efecto de dispersión de la luz causado por la turbidez de las soluciones.

Las mediciones de VC y VOC se realizaron en un potencióstato AUTOLAB PGSTAT30, controlado por el software GPES 4.8 utilizando una celda de tres electrodos:

uno de carbono vítreo (GC, del inglés *glassy carbon*, área = 0,07 cm²) como electrodo de trabajo, otro de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un electrodo de platino como electrodo auxiliar.

Para llevar a cabo las medidas de intensidad de corriente por VOC en el gel de NPs se utilizó una celda de difusión de Franz (**Figura 31**). Las dimensiones de la celda fueron: 15 mm de diámetro interno, 22 ml de volumen y 1,77cm² de área. Se empleó una membrana artificial de nitrato de celulosa como barrera de difusión (tamaño de poro de 0,1 μm)¹⁹³.



Figura 31. Celda de difusión de Franz

Los experimentos por EC se llevaron a cabo utilizando un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter MDQ (Fullerton, EE. UU.), equipado con un detector de arreglo de diodos. El capilar también fue provisto por Beckman Systems. El control y el procesamiento de datos se llevaron a cabo con el software 32 Karat.

Los valores de pH fueron medidos con pH-metro Orion 720A calibrado con soluciones amortiguadoras comerciales.

Todos los cálculos y análisis de los resultados fueron realizados con OriginPro 8.0.

3.2 PROCEDIMIENTOS

3.2.1 Obtención de suspensiones acuosas de NLCs

- **Preparación de la solución estándar de PX**

Se preparó una solución estándar de PX 0,01 M en acetonitrilo. Se transfirieron cantidades apropiadas de esta solución para obtener concentraciones de PX en los NLCs de 50, 75 y 100 μ M, aproximadamente. Previo a la síntesis de las NPs el acetonitrilo fue evaporado con nitrógeno gaseoso.

- **Obtención de las NLCs acuosas**

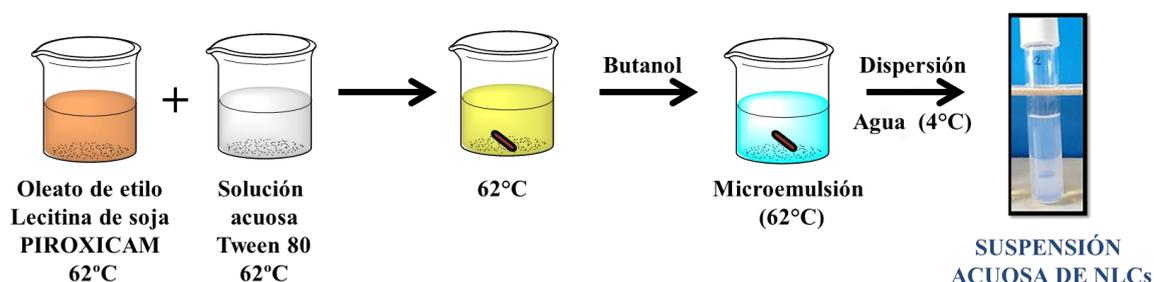
La obtención del sistema de interés se basa en la utilización de un método de baja energía, el cual se conoce como Método de microemulsión.

A continuación, se detalla el procedimiento para la obtención de una suspensión acuosa de NLCs basándose en dicho método:

- 1) **Formación de la fase lipídica:** La fase lipídica se formó a partir de una mezcla que contenía 75% (m/m) de oleato de etilo y 25% (m/m) de lecitina de soja. La misma fue llevada a 62 °C hasta la formación de una fase homogénea.
- 2) **Formación de la fase acuosa:** La fase acuosa consistió en una solución de Tween 80 de concentración 7,6 % (m/v), la mezcla fue calentada a la misma temperatura que la fase oleosa (62 °C).
- 3) **Formación de la microemulsión:** La fase acuosa se incorporó a la fase lipídica bajo agitación magnética (350 rpm) manteniendo la temperatura a 62 °C. Seguidamente, a la emulsión formada se le adicionó butanol (gota a gota), bajo continua agitación, hasta la obtención de una microemulsión transparente. Se utilizó un 8 % (m/m) de butanol, aproximadamente.
- 4) **Obtención de las nanopartículas lipídicas:** La microemulsión obtenida se mantuvo a la temperatura de 62°C y el calor de la misma se disipó dispersándola en agua a 4°C, en una proporción microemulsión/agua de 1:5.

Incorporación del principio activo. Obtención de PX-NLCs.

Se tomó la cantidad apropiada de solución estándar de PX y, tras la evaporación del solvente, se disolvió el fármaco en la fase lipídica bajo continua agitación (punto 1 en la síntesis de NLCs). A partir de esta fase lipídica se continuó con el procedimiento descrito anteriormente. Cabe señalar que la estabilidad del PX no se ve comprometida a la temperatura de trabajo¹⁹⁴. El **Esquema 5**, presenta un diagrama de flujo del proceso de obtención de los PX-NLCs.

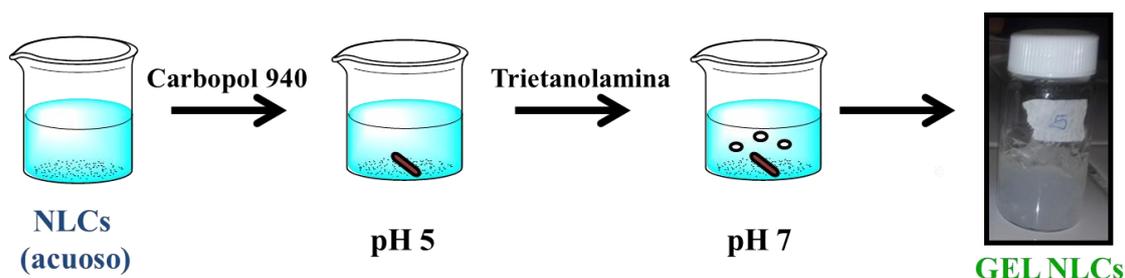


Esquema 5. Diagrama de flujo del procedimiento de obtención de los PX-NLCs.

3.2.2 Obtención del gel conteniendo PX-NLCs

La formulación en gel de las NPs se realizó con el fin de obtener los niveles de viscosidad adecuados para su aplicación transdérmica.

El gel PX-NLCs se preparó usando Carbopol 940 como agente gelificante. Se añadió, bajo continua agitación, la cantidad apropiada de polímero a la suspensión acuosa de PX-NLCs (0,30 % p/v respecto a la suspensión acuosa de PX-NLCs). En este paso, el pH de la suspensión disminuyó de 6,4 hasta aproximadamente 5,0. Seguidamente, la dispersión se neutralizó con el agregado de trietanolamina. Se agitó suavemente hasta la formación del gel. El mismo fue conservado herméticamente, protegido de la luz y almacenado a 4°C. El **Esquema 6** resume el procedimiento experimental para obtención del gel.



Esquema 6. Diagrama de flujo del procedimiento de obtención del gel PX-NLCs.

Consistencia del hidrogel y estabilidad de almacenamiento a largo plazo

Para determinar la concentración óptima del polímero, se prepararon geles con diferentes concentraciones del carbómero (0,10%, 0,15%, 0,20% y 0,30% p/v), logrando diferentes consistencias.

Con el fin de estudiar la estabilidad física, los geles obtenidos se almacenaron herméticamente a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y en un refrigerador (4 ± 2 °C) durante un período de 90 días durante los cuales se verificó a diario la estabilidad de las fases.

3.2.3 Dispersión de luz

Para las medidas de tamaño de partícula por DLS la solución acuosa de NPs fue filtrada 3 veces utilizando filtros Varian Nylon-66 de tamaño de poro $0,45 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich) con el fin de eliminar cualquier partícula de polvo o suciedad que causara error en la medición. Las suspensiones acuosas se colocaron en una celda de cuarzo. Se trabajó utilizando la viscosidad (η) y el índice de refracción (n) del agua ya que ésta conforma la fase externa del sistema. Las determinaciones por DLS se realizaron por triplicado. Debido a las características del equipo y el software de análisis, cada medida implica diez determinaciones independientes para garantizar confiabilidad estadística. El algoritmo utilizado en los ajustes de las funciones de correlación fue CONTIN¹⁸³. Se obtuvieron las distribuciones de tamaños por intensidad, volumen y número, informando el valor de D_h correspondiente a la distribución por intensidad. Se informó el resultado que presentó el menor PDI.

3.2.4 Microscopía de transmisión eléctrica (TEM)

Para el estudio morfológico mediante TEM, se trabajó con la suspensión acuosa de NPs detallada en la **Sección 3.2.1**. Para la visualización en el microscopio, las muestras fueron

tratadas con una solución de acetato de uranilo al 1% (pH alrededor de 4,5) el cual produce un contraste negativo. El acetato de uranilo ocasiona una alta densidad electrónica, lo que deriva en una imagen de contraste oscuro de grano fino. Esta característica es particularmente útil para la visualización de muestras con partículas pequeñas. Los iones uranilo se enlazan tanto a proteínas como a los ácidos carboxílicos y grupos fosfato dando precipitados cristalinos que oscurecen la superficie de las muestras que contienen dichos compuestos. Por esta razón, el acetato de uranilo resulta especialmente adecuado para lograr contrastes negativos en muestras que contienen lípidos y fosfolípidos, como es el caso de las partículas estudiadas.

3.2.5 Electroforesis capilar

Para la cuantificación de PX la separación electroforética se llevó a cabo utilizando un capilar de sílice fundida de 65 cm x 75 μm de diámetro interno termostatzado a 20°C. Antes de su primer uso al mismo se le acondicionó secuencialmente HCl 1,0 M (10 min), agua ultrapura (5 min), NaOH 1,0 M (10 min), agua ultrapura (5 min), NaOH 0,1 M (5 min), agua ultrapura (3 min) y solución buffer acetato de amonio/amoniaco (10 min).

Posteriormente, antes de cada inyección, el capilar se lavó con agua ultrapura (1 min), NaOH 0,1 M (2 min) y solución buffer acetato de amonio 50 mM y amoniaco 13,75 mM a pH 9 (5 min).

Método electroforético

El pico de PX se obtuvo satisfactoriamente trabajando con una solución tampón que consistía en acetato de amonio 50 mM y amoniaco 13,75 mM a pH 9. Este valor de pH se ajustó con NaOH 1,0 M. El voltaje aplicado fue de 20 kV. Las inyecciones se realizaron en modo hidrodinámico durante 5 s a 0,5 psi. Los electroferogramas se registraron a 220 nm.

3.2.6 Liberación *in vitro* de la suspensión acuosa PX-NLC por VOC

La liberación de PX desde la suspensión acuosa de NLCs se llevó a cabo por medida directa sobre la misma. A determinados intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de la suspensión y se analizó la variación de corriente con el fin de determinar la concentración de fármaco liberada.

Los voltamogramas se obtuvieron en el rango de 0,25-0,80 Vs^{-1} . Los parámetros característicos utilizados fueron los siguientes: amplitud de VOC (ΔE_{swv}) de 50 mV; salto

de potencial (ΔE) de 10 mV y frecuencia (f) de 20 Hz. El electrodo de trabajo consistió en un electrodo de carbono vítreo (área = 0,07 cm²), el cual fue pulido y lavado de tal forma que se obtuvieron superficies con áreas reproducibles. Se empleó como contra electrodo una lámina de platino (área: 2 cm²) y en cada experiencia se utilizó un cuasi-electrodo de referencia de Ag/AgCl recién preparado. Como electrolito soporte se empleó una solución de LiClO₄ 0,05 M. La caída óhmica fue compensada en el mismo potenciostato utilizado.

3.2.7 Estudio de la eficiencia de la formulación farmacéutica

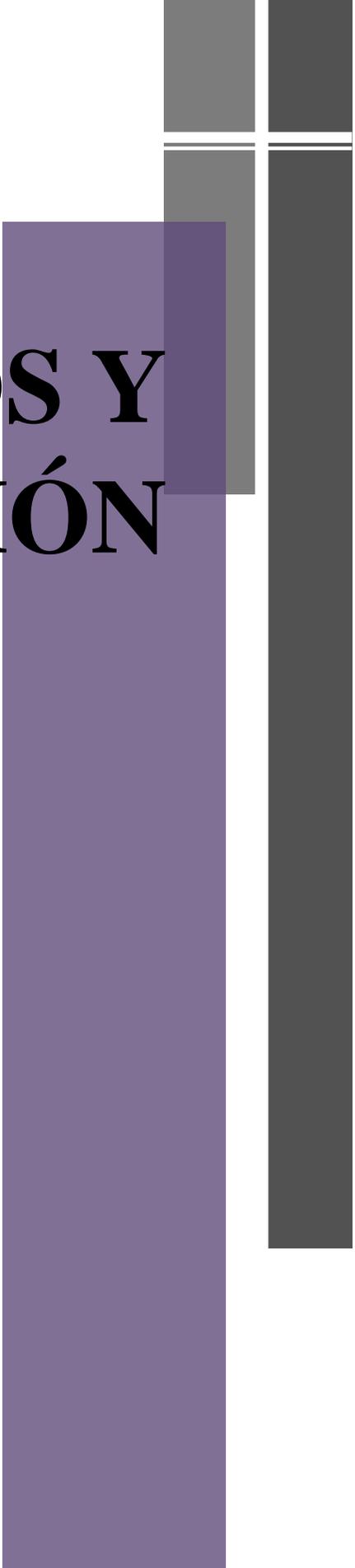
El gel debe someterse a una serie de estudios con el fin de corroborar su eficacia como sistema de soporte de las NPs. En el presente trabajo de Tesis se estudió su influencia en la liberación del fármaco incorporado en los NLCs. Para esto, se utilizó VOC y una celda de Franz. La técnica analítica y la instrumentación fueron seleccionadas considerando las propiedades de la droga y de la formulación propuesta.

- *Ensayo in vitro de liberación de PX desde el gel PX-NLCs*

La liberación de PX desde el gel de NLCs se evaluó mediante una celda de difusión de Franz utilizando una membrana artificial de nitrato de celulosa (tamaño de poro de 0,1 μm) que simula la barrera epidérmica¹⁹³. El compartimento receptor consistió en una solución de buffer fosfato de pH 7,6 conteniendo Tween 80 al 3%, el cual fue mantenido a 32°C bajo agitación constante. Se adicionaron 2 g de gel PX-NLCs en el compartimento donador, observando que los mismos tardan alrededor de 60 min en difundir completamente a través de la membrana. Se tomaron muestras del compartimento receptor a intervalos de tiempo determinados, para el análisis por medio de la técnica electroquímica de VOC con el fin de determinar la concentración del fármaco liberado.

Los voltagramas se obtuvieron en el rango de 0,25-0,80 V s⁻¹. Los parámetros característicos utilizados fueron los detallados en la **Sección 3.2.6.**, empleando el mismo sistema de tres electrodos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SELECCIÓN DE LOS REACTIVOS Y DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS NLCs

Los reactivos utilizados para la producción de nanopartículas lipídicas se seleccionaron teniendo en cuenta dos parámetros: la inocuidad, dado que los NLCs producidos serán eventualmente utilizados para vehicular principios activos en organismos vivos, y la asequibilidad, ya que se apunta a la producción de un sistema portador de bajo costo. Tanto la lecitina de soja como el oleato de etilo y los surfactantes del tipo de los polisorbatos (Tween 80) son considerados materiales seguros para usos farmacéuticos (GRAS). A su vez, se trata de reactivos relativamente económicos.

Como se ha comentado en la **Sección 2.7.1** el principio activo estudiado presenta ciertas características negativas y problemas relacionados con su administración por vía oral, lo que genera el interés de crear nuevas formulaciones que intenten resolver estos inconvenientes. Particularmente se seleccionó el piroxicam por su baja solubilidad en medio acuoso y su uso masivo como antiinflamatorio. Sus características lipofílicas hacen que las nanopartículas lipídicas resulten medios de transporte ideales para esta clase de principio activo.

Se decidió estudiar un método de obtención de NLCs que no involucre un uso masivo de solventes orgánicos teniendo en cuenta, no solo el impacto ambiental sino también los posibles riesgos de utilizar este tipo de solventes en la elaboración de sistemas de uso fisiológico. El método de obtención seleccionado en la presente Tesis fue un método de baja energía que en líneas generales consiste en la dispersión a baja temperatura de una microemulsión. Dicho método, conocido como Método de microemulsión¹⁹⁵ fue descrito en la **Sección 2.5.1**. Se trata de un método simple, rápido, que evita el uso de condiciones que puedan comprometer la estabilidad de los principios activos y que, además, no involucra un uso considerable de solventes orgánicos. Asimismo, es un método de baja energía que permite lograr una alta reproducibilidad en las características de las nanopartículas obtenidas sin la utilización de instrumentación costosa.

Cabe destacar que el paso determinante en este método es la formación de la microemulsión (**Sección 3.2.1**), para lo cual se requiere la incorporación de una cantidad exacta de co-tensoactivo. Por otro lado, el control de la temperatura también es un parámetro importante a considerar, la misma debe permanecer constante a lo largo de todo el procedimiento. Se observó que, con la variación de la temperatura, la concentración de tensoactivos requerida también varía. Así, la microemulsión obtenida depende estrechamente de las condiciones experimentales de trabajo.

4.2 CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LOS SISTEMAS PORTADORES

La caracterización de las NPs es fundamental para evaluar su calidad como sistema coloidal. Por otra parte, dependiendo su campo de aplicación para fines terapéuticos, el sistema debe presentar determinados parámetros, los cuales son definidos a partir de la caracterización general, tales como diámetro y carga superficial¹⁹⁶.

Así, primeramente, se llevó a cabo la caracterización de los NLCs obtenidos con el fin de analizar su tamaño, estabilidad (potencial Z), polidispersidad y morfología. Se estudiaron tanto los sistemas con incorporación del principio activo como los sistemas sin el fármaco, utilizados como control (PX-NLCs y NLCs control, respectivamente).

4.2.1 Tamaño de partícula

En la **Figura 32** se muestra, a modo de ejemplo, la distribución del tamaño de partícula obtenida para una suspensión de NLCs tres días después de su preparación.

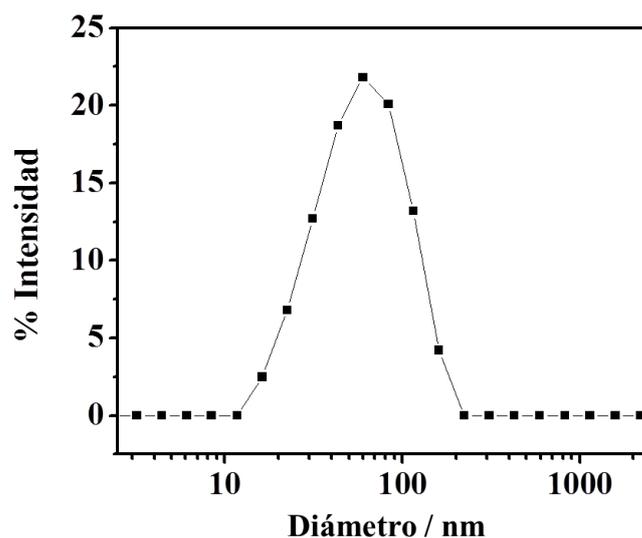


Figura 32. Distribución del tamaño de partícula obtenido mediante dispersión dinámica de la luz.

La **Figura 33** muestra los valores correspondientes al estudio del tamaño de partícula a lo largo del tiempo para suspensiones de NLCs control y PX-NLCs. El diámetro hidrodinámico de partícula (D_h) se presenta como un diámetro medio (d). Como puede observarse, en ambos casos las nanopartículas sufren un aumento gradual de tamaño, comenzando con un diámetro de aproximadamente 40 nm hasta alcanzar un valor medio de aproximadamente 160 nm al cabo de 20 días desde su preparación. La gráfica muestra los resultados obtenidos para una dispersión PX-NLCs con una concentración inicial de PX de 100 μM . También se observó un ligero aumento en el tamaño (10%) de los PX-NLCs en relación con los NLCs control, presumiblemente debido a la presencia del principio activo dentro de la estructura de las NPs.

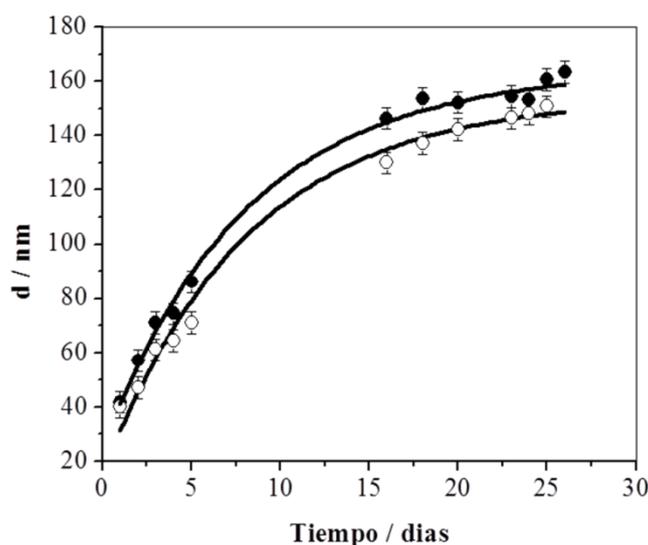


Figura 33. Evolución del tamaño de partícula a lo largo del tiempo para los NLCs control (○) y PX-NLCs (●). [PX]= 100μM.

La tendencia al aumento del tamaño de partícula también puede apreciarse visualmente como un aumento de la opalescencia de las suspensiones. En la **Figura 34**, se observan tres fotografías digitales de suspensiones de NPs en diferentes días desde su preparación. Este aumento de tamaño, manteniendo la forma esférica podría considerarse como un proceso de agregación que sufren las NPs desde el día 1 de su obtención hasta llegar a un tamaño estable para las mismas¹⁹⁷.

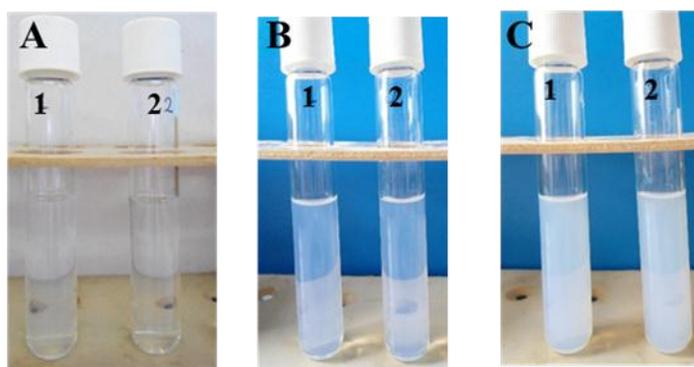


Figura 34. Fotografías digitales de suspensiones de NPs. (A) día 1, (B) día 2 y (C) día 5, Tubo 1: NLCs control; Tubo 2: PX-NLCs.

A partir de los tamaños de partícula obtenidos se podría concluir que los NLCs mostrarían potencial para ser utilizados en aplicaciones tópicas, ya que las partículas con un tamaño de hasta 500 nm son capaces de penetrar el epitelio¹⁹⁶.

4.2.2 Índice de polidispersidad (PDI)

La **Figura 35** muestra los valores de PDI obtenidos tanto para PX-NLCs como para las NPs sin incorporación del principio activo en función del tiempo. Los dos sistemas mostraron una polidispersidad satisfactoria, que disminuyó marcadamente pasados 7 días desde su preparación, alcanzando un valor promedio de 0,215. Estos valores de PDI marcan la presencia de una suspensión constituida por partículas relativamente monodispersas¹²³. Este comportamiento en los primeros días posteriores a la formación de las nanopartículas (tanto en lo que respecta al tamaño de partícula como al PDI) podría indicar que el sistema necesita de aproximadamente una semana para lograr estabilizarse.

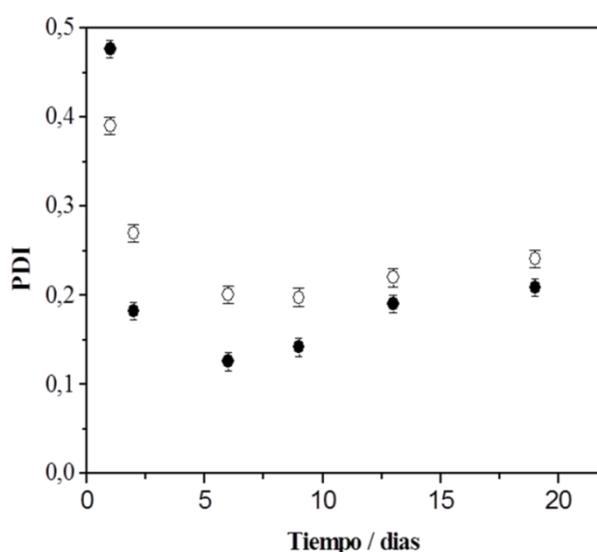


Figura 35. Índice de polidispersidad de las suspensiones de NLCs control (○) y PX-NLCs (●) en función del tiempo. [PX]= 100μM.

4.2.3 Potencial Z

En la **Figura 36** se muestran los valores del potencial zeta registrados, a lo largo del tiempo, para las suspensiones de NLCs con y sin incorporación del fármaco. Como puede observarse, en ambos casos el potencial se mantiene aproximadamente constante a lo largo del tiempo (alrededor de -40 mV), inclusive durante los primeros días posteriores a la formación de las nanopartículas. Lo cual estaría indicando la existencia de un sistema estable con baja tendencia a la floculación¹²³. A su vez, el hecho de que no existan diferencias apreciables entre los valores obtenidos para los NLCs control y PX-NLCs

implica que la estabilidad de los portadores lipídicos no se ve comprometida a causa de la incorporación del principio activo.

Cabe destacar que los valores negativos obtenidos predicen una buena penetración por parte del sistema portador (NLCs) en la piel ya que se ha descrito en bibliografía que sólo partículas cargadas negativamente son capaces de atravesarla¹⁹⁶.

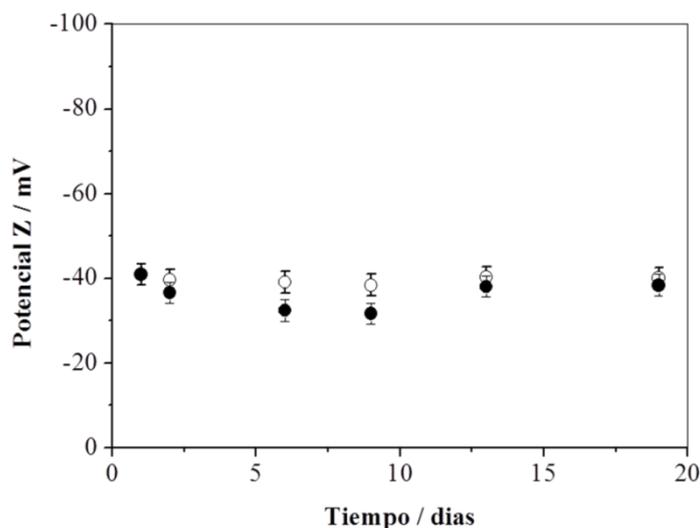


Figura 36. Potencial Z de las suspensiones de NPs a lo largo del tiempo. (Δ) NLCs control y (\blacktriangle) PX-NLCs. [PX]=100 μ M.

4.2.4 Morfología

Con el fin de conocer la morfología de las nanopartículas, las mismas fueron estudiadas mediante TEM. La **Figura 37** muestra una micrografía correspondiente a NPs con PX incorporado ([PX]=100 μ M), la cual fue tomada un día después de su preparación. Se observa una forma esférica y una cierta regularidad en la apariencia de las partículas. Cabe destacar que el tamaño es coincidente con el obtenido por DLS (aproximadamente 50 nm).

Era de esperarse una forma esférica para los NLCs obtenidos ya que sus constituyentes (lecitina vegetal y oleato de etilo) no presentan una elevada pureza. Una calidad intermedia en los lípidos utilizados da lugar a nanopartículas esféricas mientras que los lípidos de alta pureza conducen a formas cuboides¹²⁷.

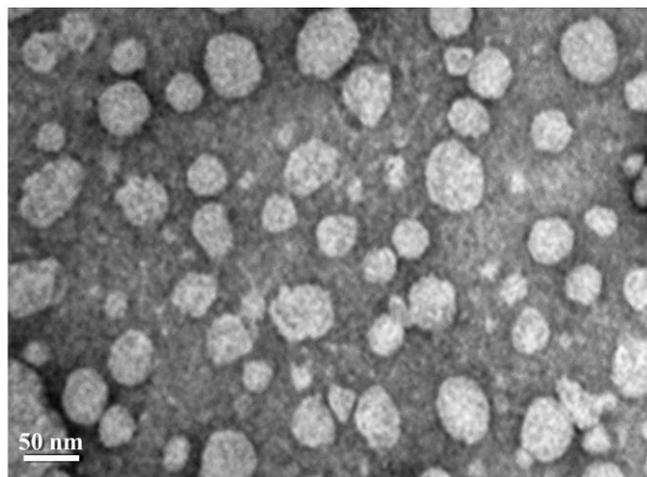


Figura 37. Micrografía TEM de los PX-NLCs obtenida luego de un día de su preparación.
[PX]=100µM.

4.3 ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO

Se llevó a cabo un estudio espectroscópico exhaustivo considerando que no se encuentra en bibliografía un análisis de tal magnitud, el cual permita estudiar las 3 especies posibles de PX simultáneamente.

Según lo descrito en la **Sección 2.7.1**, el PX puede adoptar diferentes estructuras dependiendo las propiedades del medio en el cual se encuentre. Por esto, con el objeto de comprender de qué manera se encuentra incorporado el PX en las nanopartículas, se llevaron a cabo estudios, tanto del fármaco como del sistema portador, mediante espectroscopia de absorción UV-visible y de fluorescencia. A su vez, el estudio apunta a tratar de dilucidar cuál/es de las posibles estructuras del PX se encuentra presente en el sistema.

Como se comentó en la **Sección 2.7.1**, las propiedades fotoquímicas de PX son sensibles a su entorno. Por esto, en primer término, se estudió el comportamiento fotofísico de las formas prototrópicas del PX en diferentes microambientes. Y, en un segundo momento, se analizó el comportamiento del PX dentro del sistema portador.

Cabe destacar que para el estudio de absorción de radiación UV se utilizaron, como blanco de reactivos, los diferentes medios de solubilización del PX, es decir, solvente, oleato de etilo, fase acuosa de Tween 80 o suspensión acuosa de NLCs.

4.3.1 Comportamiento del PX en medio acuoso: Identificación de especies

Teniendo en cuenta los valores de pK_a^{149} del PX, se puede deducir que la forma predominante en un intervalo de pH entre 1,8 y 5,1 es la neutra, mientras que a valores de pH por encima de 5,1 la especie aniónica se encuentra en mayor proporción. Por lo tanto, a fin de aislar e identificar las diferentes formas prototrópicas del PX, se añadieron distintas cantidades de ácido o álcali a soluciones acuosas del fármaco. Luego de maximizar la población de la forma neutra o aniónica se estudió su comportamiento espectroscópico.

Los correspondientes espectros de absorción molecular UV-Visible y emisión de fluorescencia se muestran en las **Figuras 38 y 39**, respectivamente. A pH 3,0, se observa que la forma neutra presenta un máximo de absorción a 342 nm y de emisión a 465 nm. La baja intensidad obtenida para la banda de emisión puede deberse a que en este medio polar predomina la especie ceto, la cual es no fluorescente, disminuyendo así la emisión total de fluorescencia de la molécula. Por lo tanto, se podría deducir que la forma neutra (en equilibrio ceto/enólico) absorbe a 342 nm, mientras que la forma enólica presenta un máximo de emisión a 465nm. Por otra parte, la forma aniónica, predominante a pH 8,0, exhibe un máximo de absorción centrado en 354 nm con una emisión de fluorescencia débil a 473,5 nm.

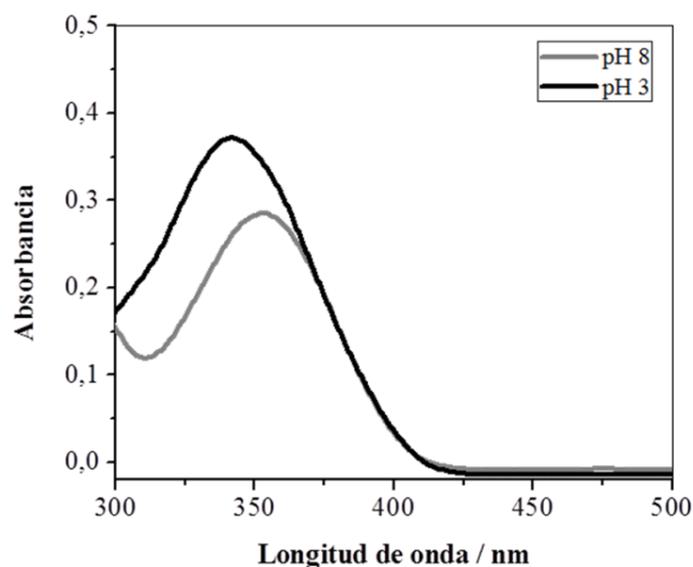


Figura 38. Espectros de absorción de PX en agua. $[PX]= 20\mu M$.

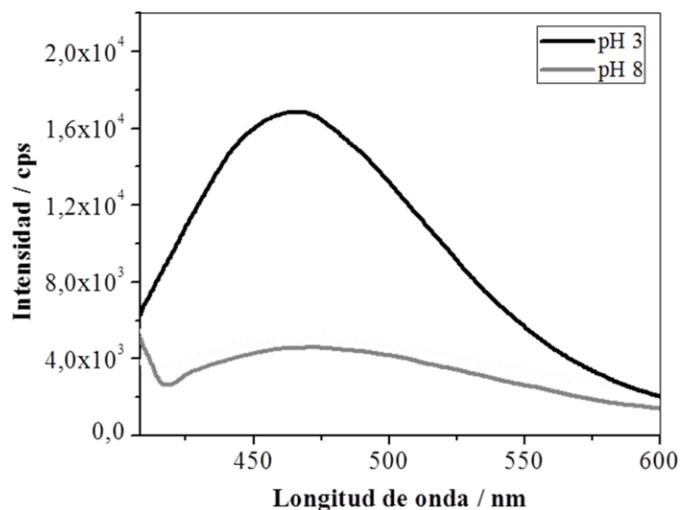


Figura 39. Espectros de emisión de fluorescencia de PX en agua. $[PX]=20\mu M$.

Así, a partir de los resultados obtenidos se logró identificar el comportamiento espectroscópico de las diferentes formas estructurales de PX en solución acuosa. Esta identificación se utilizará para analizar los datos obtenidos en los posteriores estudios (Secciones 4.3.2 a 4.3.5).

4.3.2 Comportamiento del PX en solventes polares próticos

Las Figuras 40 y 41, respectivamente, muestran los espectros de absorción y emisión del PX en agua y en alcoholes lineales. La serie de alcoholes seleccionada proporciona un buen sistema para estudiar el efecto general de la polaridad del solvente en las propiedades espectrales del PX. Esto se debe a que, a medida que aumenta la longitud de la cadena carbonada en estos alcoholes, la polaridad del solvente cambia significativamente sin demasiada variación en la naturaleza de las propiedades de los enlaces puentes de hidrógeno, minimizando así el efecto de las interacciones específicas del solvente en las propiedades espectrales.

En agua y en los alcoholes de cadena corta, como metanol y etanol, el PX presenta un máximo en el espectro de absorción alrededor de 356 nm y una banda de emisión muy débil centrada en 476 nm. Comparando los resultados obtenidos con los encontrados en la Sección 4.3.1 y con los datos bibliográficos¹⁵⁹, puede confirmarse que la especie predominante en estos solventes altamente polares, es la aniónica. Cuando se utiliza propanol como solvente, las bandas de absorción y emisión se encuentran centradas en 342

y 473 nm, respectivamente. Según la bibliografía consultada, pese al corrimiento de la banda de absorción, la especie predominante en este solvente sigue siendo la aniónica¹⁵⁹.

A medida que disminuye la polaridad de los alcoholes, la especie predominante es la enólica¹⁵⁸. Este hecho se refleja en un corrimiento de las bandas de absorción hacia menores longitudes de onda y en un marcado incremento de la banda de emisión de fluorescencia. Así, en butanol los máximos de absorción y emisión se centran en 339 y 465.4 nm, respectivamente, mientras que en pentanol se encuentran en 329 y 471 nm y en octanol se centran alrededor de 333 y 471.5 nm, respectivamente.

El aumento en la longitud de la cadena carbonada y, por lo tanto, la disminución de la polaridad del medio van acompañados por un desplazamiento de la banda de absorción hacia el azul del espectro electromagnético (longitudes de onda menores). Esta tendencia podría explicarse en función del predominio de la especie aniónica en solventes fuertemente polares y la preponderancia de la neutra en solventes de polaridad intermedia/baja.

Como puede observarse, los espectros de absorción y emisión obtenidos para el PX en la serie de alcoholes estudiados coinciden con el comportamiento descrito en la **Sección 4.3.1** para las especies aniónica y neutra.

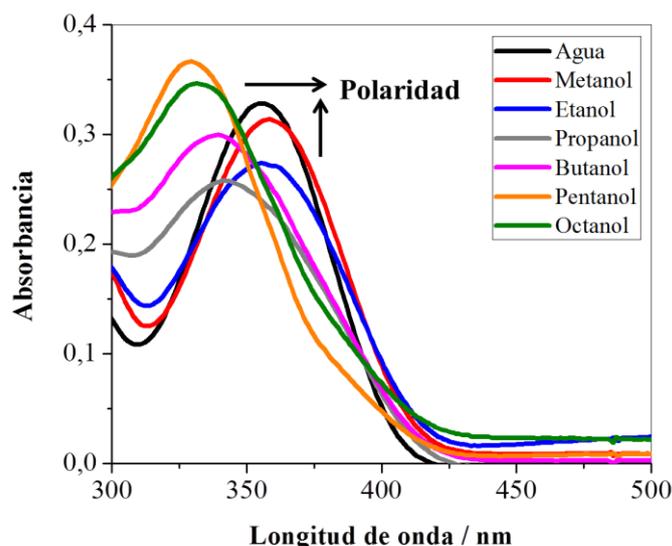


Figura 40. Espectros de absorción de PX en solventes polares próticos. [PX]= 20 μ M.

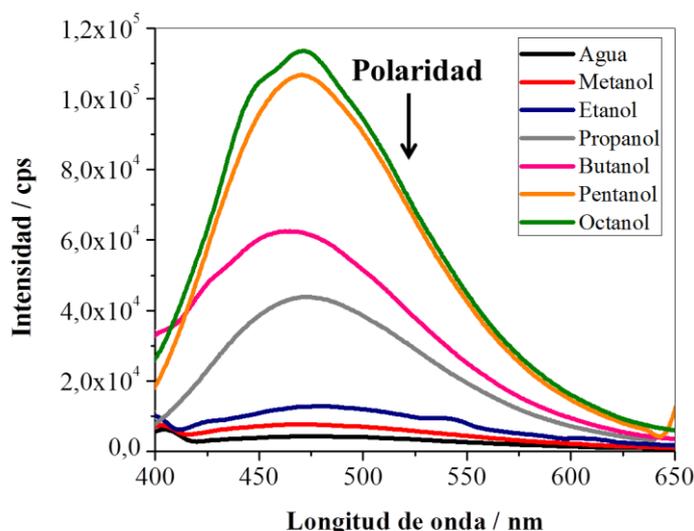


Figura 41. Espectros de emisión de PX en solventes polares próticos. [PX]= 20 μ M.

4.3.3 Comportamiento del PX en solventes polares apróticos

En este caso se analizó el comportamiento espectroscópico de PX en solventes apróticos de polaridad intermedia. Como tales, los mismos participan como aceptores en la formación de puentes de hidrógeno. Las **Figuras 42 y 43** muestran, respectivamente, los espectros de absorción y de emisión de PX en dichos medios.

En estos solventes el PX presenta una única banda de absorción centrada en 326 nm. Respecto a los espectros de emisión, se observan intensas banda centradas en 480 nm para

acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano y dioxano, mientras que en diclorometano la banda de emisión presenta un máximo alrededor de 466 nm. Estas bandas sufren un aumento gradual de intensidad a pesar de que la concentración del fármaco se mantiene constante. Este comportamiento puede explicarse en función de las interacciones específicas soluto-solvente, relacionadas con el carácter aceptor de puente de hidrogeno de los diferentes solventes¹⁵⁷.

En estos solventes de polaridad intermedia, las especies predominantes son las correspondientes al equilibrio ceto-enólico. Éste se desplazará en función de la capacidad del solvente para estabilizar una u otra especie. Si el medio es polar pero las moléculas del solvente no forman enlaces puente de hidrógeno con las moléculas de PX, entonces la forma enólica del PX podrá estabilizarse a través de enlaces puente de hidrógeno intramoleculares. Esto le confiere cierta rigidez a la molécula, favoreciendo su desactivación mediante procesos radiantes. Así, a medida que disminuye el carácter aceptor de puente de hidrógeno del medio, aumenta la fluorescencia de la molécula. En el caso de que el solvente tienda a formar enlaces puente de hidrógeno con las moléculas de PX, el equilibrio se desplazará hacia la forma ceto no radiante, la cual es más estable en estos solventes de polaridad intermedia¹⁵⁷.

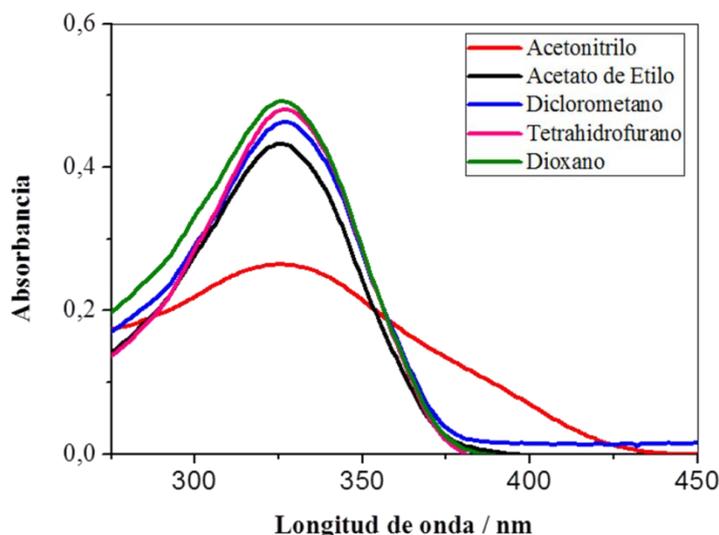


Figura 42. Espectros de absorción de PX en solventes polares apróticos. [PX] = 20 μ M.

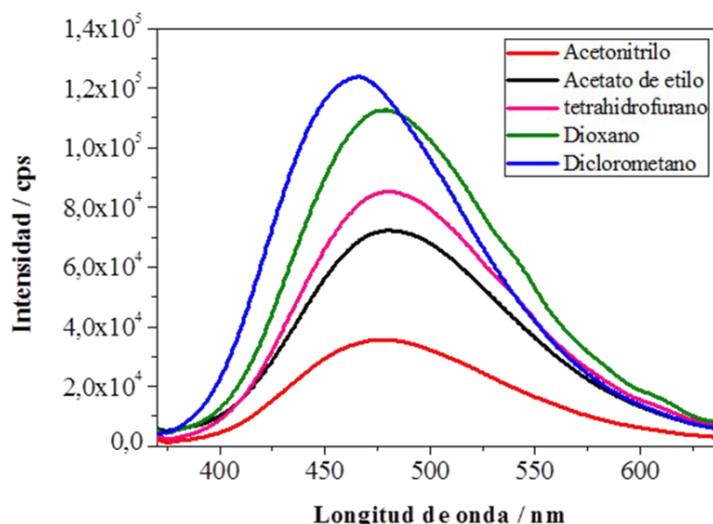


Figura 43. Espectros de emisión de PX en solventes polares apróticos. [PX] = 20 μM.

4.3.4 Comportamiento del PX en solventes apolares

Las **Figuras 44** y **45** muestran, respectivamente, los espectros de absorción y emisión, de la molécula de PX en diferentes medios apolares. Como se mencionó en la **Sección 2.7.1**, en estos medios la especie predominante es la enólica¹⁵⁷.

Puede observarse que en estos solventes el PX presenta un único máximo de absorción centrado en 326 nm. Las bandas de emisión se encuentran centradas aproximadamente en 468 nm. Además, se aprecia que la intensidad de fluorescencia en éter es marcadamente inferior a la obtenida en otros solventes. Esta disminución de fluorescencia, nuevamente, se puede atribuir a las interacciones específicas soluto-solvente. El éter es el único de los solventes apolares estudiados que es aceptor de enlaces puente de hidrógeno, lo cual interfiere en la formación de enlaces hidrógeno intramolecular del enol-PX. Así, estas moléculas pierden rigidez y pueden desactivarse a través de procesos no radiantes, disminuyendo la fluorescencia neta.

A partir de los espectros obtenidos se pudo corroborar que, efectivamente, en estos solventes la población predominante corresponde a la forma enólica.

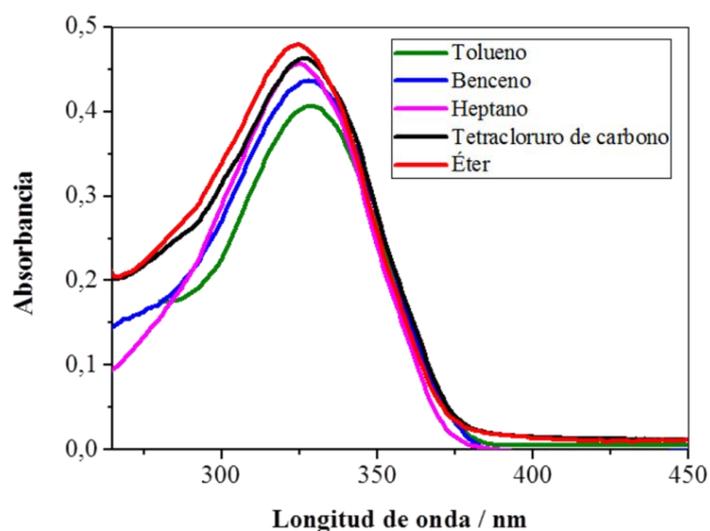


Figura 44. Espectros de absorción de PX en solventes apolares. [PX]= 20µM.

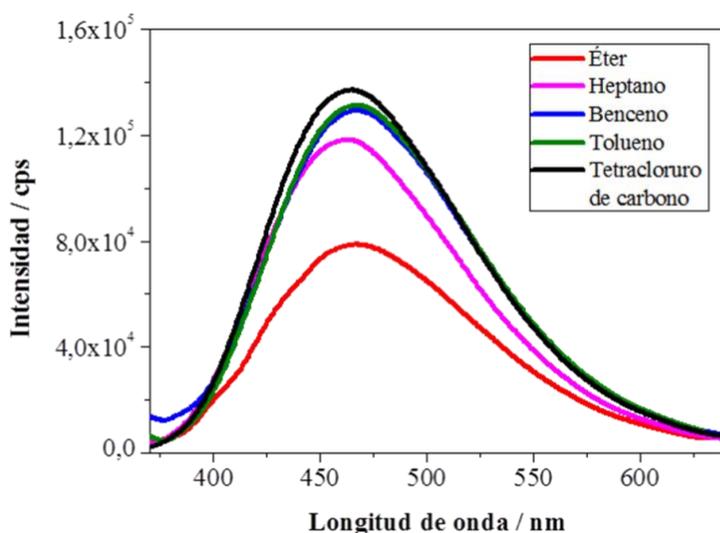


Figura 45. Espectros de emisión de PX en solventes apolares. [PX]= 20µM.

La **Tabla 3** muestra, a modo de resumen, los máximos de absorción y emisión de PX en los diferentes solventes. Los valores de longitudes de onda coloreadas en **rojo** representan los valores obtenidos para la especie aniónica de PX. Los valores en **verde** representan las longitudes de onda correspondientes a la forma neutra (en equilibrio ceto/enólico) de PX. Y las longitudes de onda denotadas en **azul** se refieren a la absorción y emisión de la forma enólica de PX. Esta distinción se realizó en base a los resultados mostrados en **Sección 4.3.1** y a la información bibliográfica consultada (**Sección 2.7.1**).

Tabla 3. Longitudes de onda del máximo de absorción y emisión para el PX en diferentes microentornos. UA: Unidades arbitrarias de absorción. [PX] = 20 μ M

Solvente	λ_{Abs}	UA	λ_{Emi}	Intensidad (cps)
Agua	355	0,33	473,5	4210
Metanol	358	0,30	475,5	7905
Etanol	356	0,27	480	1,28. 10 ⁴
n-Propanol	342	0,26	473	4,52.10 ⁴
n-Butanol	339	0,30	465,5	6,30.10 ⁴
n-Pentanol	329	0,35	471	1,07.10 ⁵
n-Octanol	333	0,36	471,5	1,13.10 ⁵
Acetonitrilo	326	0,27	479	3,58.10 ⁴
Acetato de etilo	326	0,43	481,5	7,30.10 ⁴
Diclorometano	327	0,46	466,5	1,23.10 ⁵
Tetrahidrofurano	327	0,48	482,5	8,58.10 ⁴
Dioxano	326	0,49	479,5	1,13.10 ⁵
Tetracloruro de carbono	326	0,46	465	1,37.10 ⁵
Éter	324	0,48	468	7,80.10 ⁴
Benceno	327	0,44	468	1,30.10 ⁵
Tolueno	328	0,42	468,5	1,31.10 ⁵
Heptano	325	0,46	463	1,19.10 ⁵

4.3.5 Comportamiento del PX dentro del sistema portador

Se estudió el comportamiento espectroscópico del PX disuelto en las dos fases (lipídica y acuosa) que componen los NLCs para luego finalmente estudiar el sistema PX-NLCs.

PX en oleato de etilo: Generalmente los fármacos liposolubles son más solubles en el lípido líquido que compone la fase lipídica de los NLCs que en los sólidos⁵⁷⁵⁷. Teniendo en cuenta esta premisa y el hecho de que el oleato de etilo se encuentra en mayor proporción en las NPs, se decide analizar los espectros de absorción y emisión del PX cuando se

encuentra disuelto en este lípido.

Los espectros de absorción y emisión obtenidos se muestran en las **Figuras 46 y 47**, respectivamente. Como puede observarse, en este medio el PX presenta un máximo de absorción centrado en 343 nm. El máximo de emisión se presenta intenso y centrado en 454 nm. Considerando la intensidad del máximo de emisión y el estudio realizado en la sección anterior (ver **Tabla 3**) se podría afirmar que en este medio apolar la especie predominante es la enólica, tal como cabía esperar.

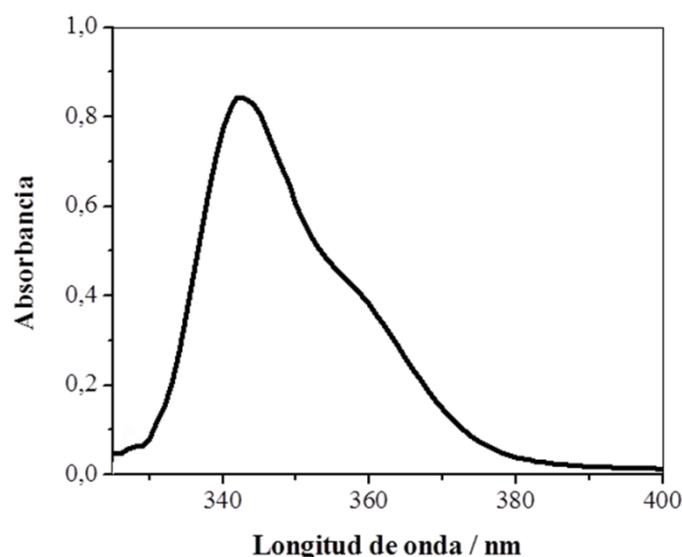


Figura 46. Espectro de absorción de PX en oleato de etilo. [PX]= 50 μ M.

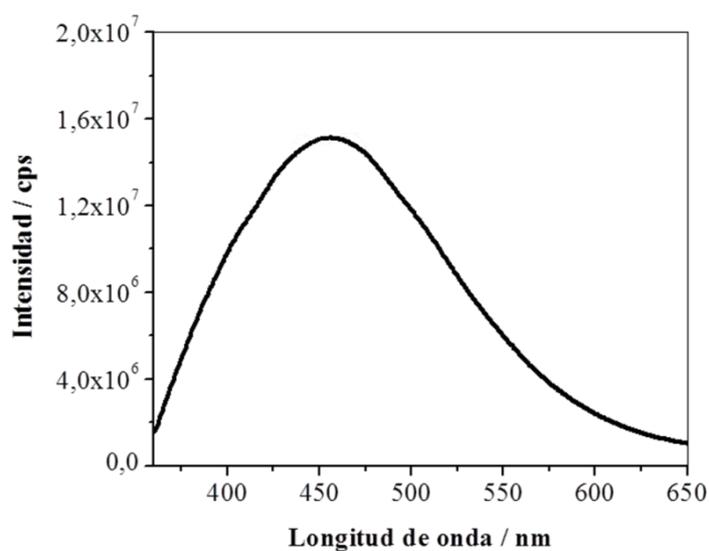


Figura 47. Espectro de emisión de PX en oleato de etilo. [PX]= 50 μ M.

PX en fase acuosa de Tween 80: En caso de encontrarse fuera del sistema portador, el PX estaría en contacto con la fase acuosa externa. La misma se compone de una solución acuosa del tensoactivo Tween 80. Se trabajó a la misma concentración de tensoactivo que se utiliza en la preparación de las NPs. Los correspondientes espectros de absorción y emisión en este medio se muestran en las **Figura 48** y **49**, respectivamente.

Como puede observarse, el PX en la fase acuosa presenta un máximo de absorción centrado en 358 nm. El máximo de absorción coincide con aquel obtenido en agua pura en la **Sección 4.3.1**, con lo cual la especie predominante es el anión PX. En dicha sección se corroboró que el anión emite con baja intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de 476 nm. En este caso, se obtuvo una banda de emisión débil pero centrada en 451 nm. Esta longitud de onda de emisión podría corresponder a la especie enólica, protegida dentro de las micelas que forma el tensoactivo. Se prevé la presencia de micelas, ya que se trabajó a una concentración de tensoactivo (0,06 M) que supera la concentración micelar crítica (0,01 mM)^{198, 199}. La intensidad de la banda podría hacer referencia a la baja proporción de la especie enólica en este medio.

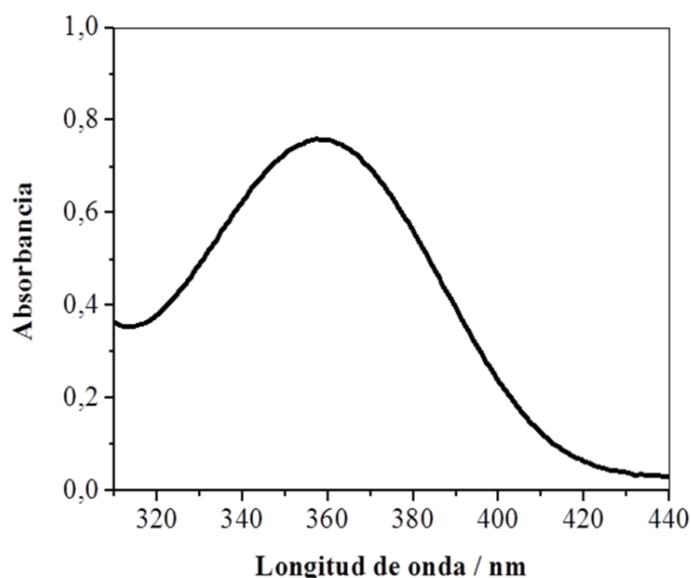


Figura 48. Espectro de absorción de PX en solución acuosa de Tween 80. [PX]= 50 μ M.

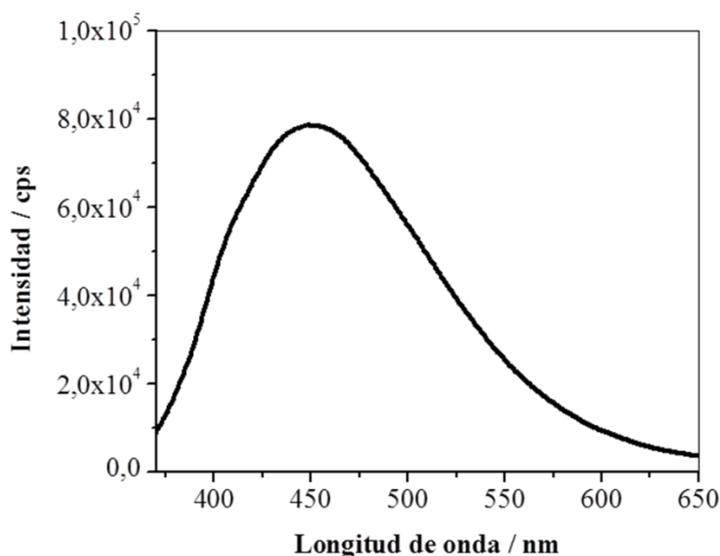


Figura 49. Espectro de emisión de PX en solución acuosa de Tween 80. [PX]= 50 μ M.

PX incorporado al sistema portador (PX-NLCs): Finalmente se estudió el comportamiento espectroscópico de PX cuando se encuentra incorporado en el sistema portador. Se trabajó con suspensiones de NPs frescas (día 1) dado que no presentan turbidez, a fin de que no exista dispersión de radiación que pueda interferir con la señal de emisión de fluorescencia. En las **Figuras 50** y **51** se muestran los espectros de absorción y emisión, respectivamente, obtenidos para una suspensión PX-NLCs.

Se observa que en este medio el PX presenta un máximo de absorción centrado en 351 nm y una intensa banda de emisión en 438 nm. Por un lado, la posición de la banda de absorción del PX en la suspensión de los NLCs (a 351 nm) se encuentra entre las bandas de PX en oleato de etilo (343 nm) y en Tween 80 (358 nm), con lo cual podría ser la resultante de la absorción de radiación de las moléculas de PX incorporadas al sistema portador y de otras afuera del mismo tiempo. Respecto a la banda de emisión de fluorescencia, la banda intensa a 438 nm estaría indicando que una parte importante de moléculas de PX se encuentra en forma enólica. Este fenómeno parece ser consistente con una estructura enólica estabilizada por un entorno fuertemente apolar que correspondería a las moléculas de PX dentro del sistema portador, ubicadas en la matriz rígida de las NPs sólidas. Por otra parte, las moléculas de PX en la solución acuosa contribuirían con una banda de emisión de fluorescencia mucho más débil. Por lo tanto, podría pensarse que una parte del PX se encuentra incorporada en el sistema portador y otra parte fuera de él, en contacto con la fase acuosa externa.

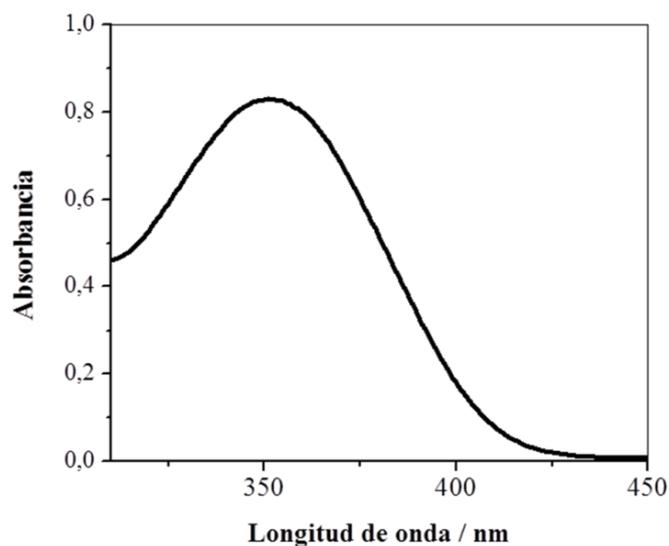


Figura 50. Espectro de absorción de suspensión PX-NLCs. [PX]= 50 μ M.

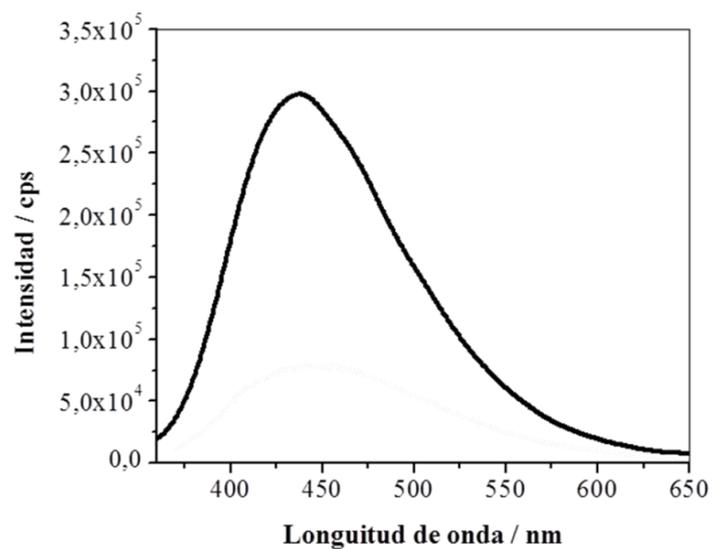


Figura 51. Espectro de emisión de suspensión PX-NLCs. [PX]= 50 μ M.

La **Tabla 4** muestra un resumen de las longitudes de onda (λ) máximas de absorción y emisión obtenidas para el sistema PX-NLCs.

Tabla 4. Longitudes de onda del máximo de absorción y emisión para el PX en los diferentes microentornos de las NPs. [PX] = 50 μ M

Medio	λ_{abs}	UA	λ_{emis}	Intensidad (cps)
Fase acuosa	358	0,80	451	78970
Oleato de etilo	343	0,86	454	1,47.10 ⁷
PX-NLCs	351	0,83	438	3,00.10 ⁵

Confirmada la presencia del principio activo dentro de los NLCs mediante el estudio espectroscópico, se continuó la caracterización del sistema portador investigando dos importantes parámetros como son la eficiencia de encapsulamiento del sistema y el perfil de liberación del principio activo desde el sistema portador. Para esto se propuso el uso de técnicas alternativas a la convencional HPLC como lo son la EC y la VOC.

4.4 ESTUDIO DEL SISTEMA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

Considerando las conclusiones del estudio espectroscópico y las propiedades ópticas de PX se desarrolló un nuevo método analítico para la determinación de la concentración de PX incorporado en el sistema portador, basado en la utilización de electroforesis capilar (EC)²⁰⁰.

Por otra parte, teniendo en cuenta los valores de pKa¹⁴⁹ del PX, la especie aniónica se encuentra en mayor proporción cuando el pH del medio está por encima de 5,1. Esta característica del analito se aprovechó para desarrollar el método mediante electroforesis capilar de zona (CZE)²⁰¹.

4.4.1 Condiciones de separación

La optimización de las condiciones de separación se realizó utilizando una suspensión de NLCs (sin principio activo incorporado) a la cual se añadieron cantidades adecuadas de PX (es decir, suspensión de NLCs control + PX libre).

Tal como se estableció en la **Sección 3.2.5** como buffer electroforético se utilizó una solución de acetato de amonio/amoníaco teniendo en cuenta los datos bibliográficos respecto al estudio de AINEs por EC. El pH de este buffer se estudió en el intervalo de 7,0-9,3. La señal electroforética del PX no se apreció correctamente trabajando con valores de pH entre 7.0 y 8.0. A valores de pH alrededor de 9.0 la señal de PX pudo visualizarse con

claridad. Por lo tanto, considerando la eficacia de la separación, la simetría de la forma del pico y la estabilidad de la línea base, el pH de la solución buffer se mantuvo en 9.0.

El efecto del voltaje aplicado también se investigó en un intervalo entre 15 a 25 kV. Los resultados indicaron que un voltaje más alto correspondía a un tiempo de análisis más corto pero a áreas de pico más bajas. Así, se seleccionó un valor de 20 kV como el voltaje de separación óptimo.

4.4.2 Curva de calibrado de PX libre

La **Figura 52** muestra el electroferograma de la suspensión NLCs control y el electroferograma obtenido tras la adición de 8,10 μ g de PX a la misma. El pico de PX libre se observó con una buena resolución respecto al pico de la suspensión de NLCs. Por lo tanto, se preparó la curva de calibrado correspondiente a PX libre. Para esto se incorporó a cada testigo diferentes cantidades de PX sobre una suspensión de NLCs previamente preparada sin principio activo. Las señales correspondieron a las áreas de los picos electroforéticos pertenecientes a cada testigo (**Figura 53**).

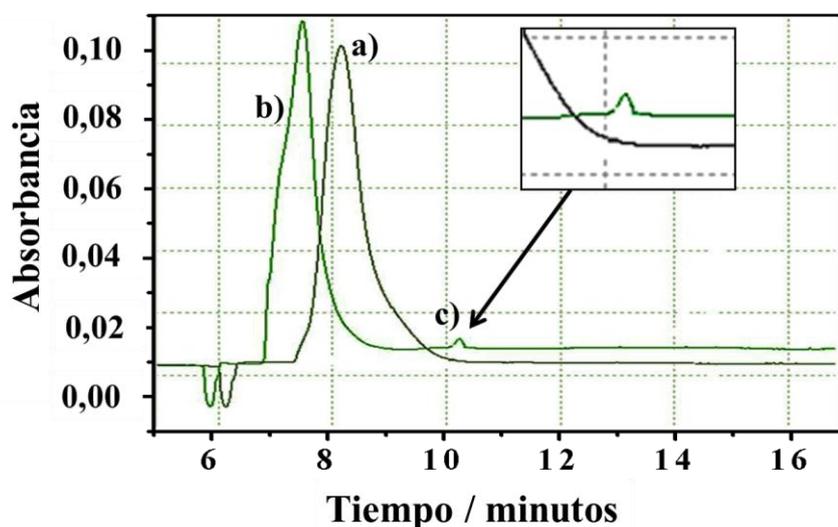


Figura 52. Electroferogramas correspondientes a la suspensión de NLCs control (a) y a la suspensión de NLCs control con agregado de PX (b). El pico (c) pertenece al PX libre, sin encapsular.

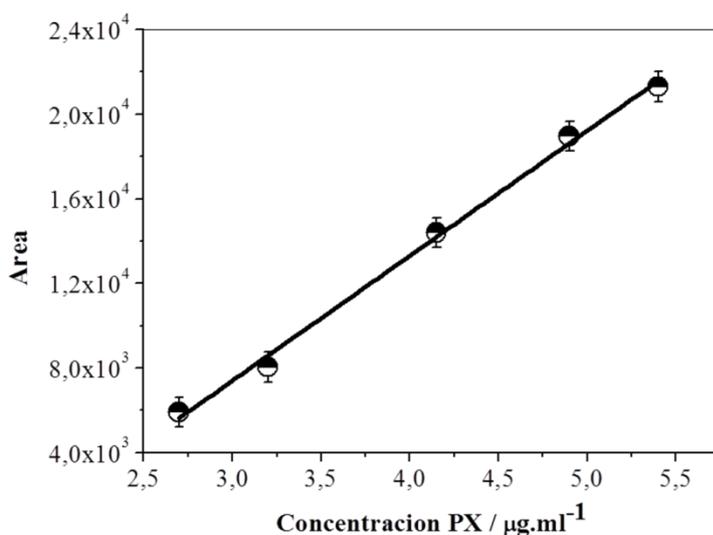


Figura 53. Curva de calibrado correspondiente al área de pico electroforético en función de la concentración de PX libre.

La curva de calibrado fue lineal en el intervalo de concentraciones de 2,7 a 5,4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. La ecuación de regresión fue $A = 5904,5C - 10361$, donde A es el área del pico y C la concentración de PX en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$). Se investigó la reproducibilidad del tiempo de migración y el área del pico, y los valores de RSD% obtenidos ($n = 5$) fueron de 0,99% y del 2,13%, respectivamente.

4.4.3 Cálculo de la concentración de PX incorporado en el sistema PX-NLCs

Una vez construida la curva de calibrado, teniendo en cuenta que la cantidad de PX empleada para la preparación de los PX-NLCs es conocida, se procedió a determinar la cantidad de PX libre remanente luego de la preparación de las NPs, de forma de encontrar, por diferencia, la cantidad efectivamente incorporada en el sistema portador. El estudio se llevó a cabo al día 5 desde la preparación de la suspensión de los PX-NLCs dado que, según los estudios de tamaño de partícula e índice de polidispersidad, el sistema se comporta de manera más estable.

Para el estudio de la concentración de PX encapsulado en el sistema se utilizó un conjunto de cuatro réplicas de una suspensión de PX-NLCs preparados usando 4,32, 4,86 y 5,40 μg de PX por mililitro de suspensión. Estas suspensiones se inyectaron en el capilar y se midieron las áreas de pico del PX libre. La concentración de PX libre en cada suspensión de NPs se cuantificó haciendo uso de la curva de calibrado descripta en la

sección anterior. El valor promedio encontrado para el porcentaje de encapsulamiento de PX en las NPs, luego de 5 días de preparadas, fue de 37.6% (RSD%=4.06). Considerando la masa lipídica utilizada en la preparación de los NLCs como la masa teórica de NPs obtenidas se calculó la concentración de PX incorporado en sistema. La **Tabla 5** muestra los resultados obtenidos.

Tabla 5. Concentraciones iniciales totales ($[PX]_T$) de PX, concentraciones de PX libre ($[PX]_w$), concentración de PX encapsulado ($[PX]_{NP}$) y porcentaje de fármaco incorporado en las NPs (% Encapsulamiento).

$[PX]_T$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$[PX]_w$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Diferencia	$[PX]_{NP}$ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	% Encapsulamiento
4,32	2,62	1,70	0,183	39
4,86	3,11	1,75	0,188	36
5,40	3,35	2,05	0,221	38

Como conclusión de este estudio se puede afirmar que la EC es una técnica adecuada para el estudio del porcentaje de encapsulamiento en este tipo de sistemas.

4.5 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO

Considerando el comportamiento electroactivo del PX, los antecedentes existentes de la aplicación de técnicas electroquímicas para su estudio¹⁶⁰ y su reciente aplicación en el estudio de sistemas organizados²⁰², se utilizó la técnica de voltametría de onda cuadrada (VOC) para monitorizar la liberación del fármaco.

4.5.1 Comportamiento de PX en medio acuoso

En primer lugar, se llevaron a cabo estudios electroquímicos de PX mediante voltametría cíclica (VC) y VOC en medio acuoso a los fines de obtener los parámetros característicos de la droga, como el potencial de pico (E_p) y su coeficiente de difusión (D_w) en dicho medio. La **Figura 54A** muestra el voltamograma cíclico de la electrooxidación de PX obtenido utilizando un electrodo de carbono vítreo (GC) en una solución acuosa fresca de LiClO_4 0,05 M (pH 6) a una velocidad de barrido (v) de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$. Se observa un pico de oxidación con un E_p centrado en 0,60 V, cuyo valor está en concordancia con los reportados en bibliografía²⁰³. No se observó ningún pico de reducción en el intervalo de potencial barrido (0,25-0,80 V), indicando que PX se oxidó de

manera irreversible. Este comportamiento coincide también con aquel reportado en trabajos previos^{204,205}. Luego de restar las corrientes de blanco en el voltamograma cíclico para PX en solución acuosa, las corrientes anódicas fueron convolucionadas para encontrar así la corriente límite (I_L). A partir de ésta y utilizando la ecuación (13)^{206, 207} se logró determinar el coeficiente de difusión en agua (D_w) de PX hallándose un valor medio de $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (suponiendo $n = 2$)¹⁶⁰.

La **Figura 54B** muestra los voltamogramas de onda cuadrada obtenidos a diferentes tiempos. Los mismos presentan un E_p centrado en 0,60 V con la correspondiente corriente de pico neta (I_p) decreciente en el tiempo, lo que indica que el PX se estaría descomponiendo en este medio. Este comportamiento está de acuerdo con lo reportado en bibliografía respecto a la baja estabilidad de PX en medio acuoso^{160, 208, 209}. La degradación de PX se atribuye a la probable influencia del pH y de la luz¹⁶⁰. Según lo reportado por otros autores la síntesis del precursor 2-aminopiridina es el principal producto de degradación, así como 2-metil- 2H - 1,2 - benzotiazin - 4 (3H) - ona - 1,1 - dióxido y N - metil - N0 - (2 - piridinil) - etano - diamida¹⁶⁰.

Luego, el PX se estudió en una solución acuosa que contenía el tensoactivo Tween 80 y el co-tensoactivo n-butanol con el objetivo de simular el medio en el que se encuentran suspendidas las nanopartículas (**Figura 54C**). En estas condiciones, la descomposición en el tiempo de PX disminuyó marcadamente (variaciones de $I_p < 10\%$) observándose a su vez un desplazamiento del pico de oxidación hacia menores potenciales en comparación con los voltamogramas mostrados en la **Figura 54B** (solución acuosa sin tensoactivo). Estas observaciones nos permiten concluir que la oxidación de PX se ve favorecida en este medio debido a que la droga se disuelve y es protegida dentro de las micelas formadas por el tensoactivo no iónico. Como se explicó en la **Sección 4.3.5** se prevé la presencia de micelas, ya que las mediciones se llevaron a cabo utilizando una concentración de tensoactivo superior a la concentración micelar crítica (0,01 mM).

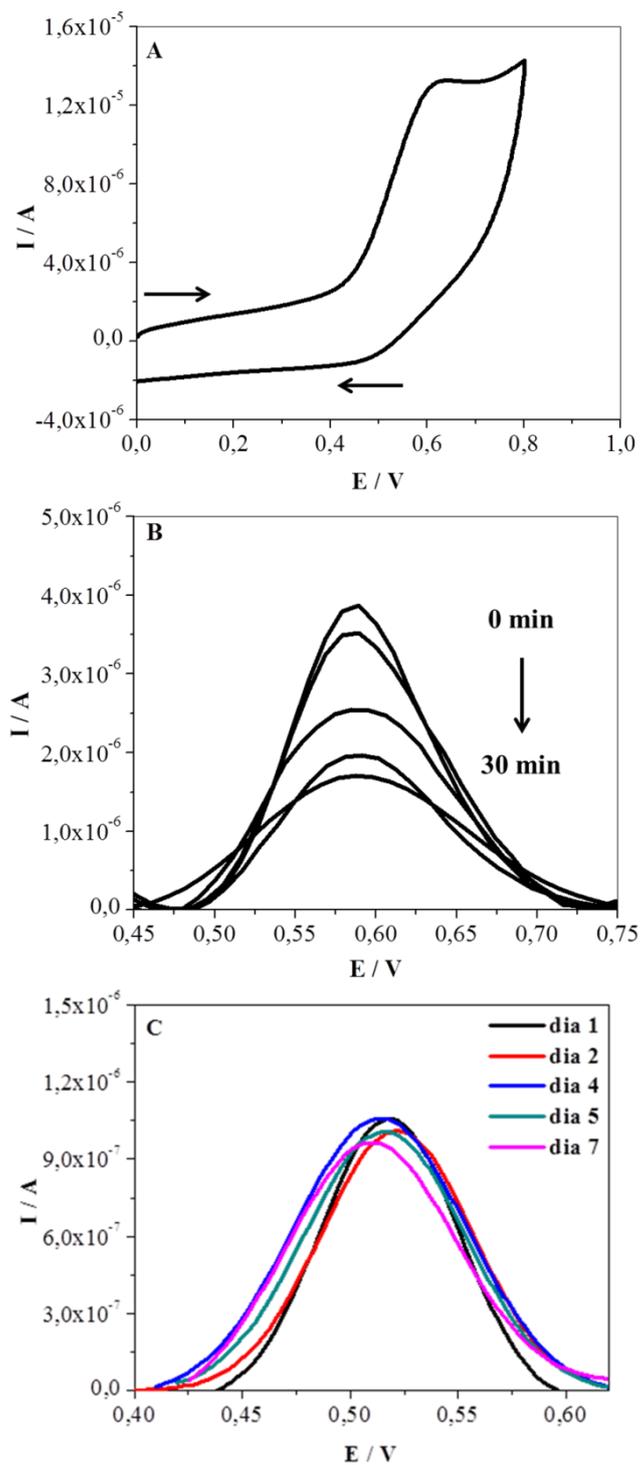


Figura 54. (A) VC de PX en agua. $[PX] = 380 \mu M$, $v = 0,10 \text{ Vs}^{-1}$. $[\text{LiClO}_4] = 0,05 \text{ M}$ (B) VOC de PX en agua y su variación al cabo de 30 minutos (C) VOC de PX en solución acuosa de tensoactivos registrados, durante una semana. $[PX] = 50 \mu M$, $[\text{LiClO}_4] = 0,05 \text{ M}$. $[\text{Tween } 80] = 0,06 \text{ M}$. $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, $\Delta E_{\text{swv}} = 50 \text{ mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$.

4.5.2 Comportamiento los NLCs en el tiempo utilizando DLS

Como se ilustró en la **Sección 4.2.1**, los NLCs control y PX-NLCs sufren un aumento progresivo de tamaño, hasta alcanzar un valor medio de aproximadamente 160 nm. La **Figura 55** muestra la variación del coeficiente de difusión (D) obtenido por la técnica de DLS con el tiempo. Como es de esperarse, el aumento del tamaño de las nanopartículas con el tiempo es acompañado de una disminución del coeficiente de difusión (D). Dicho parámetro se determinó a fin de utilizarse en cálculos posteriores, en los cuales se denota como D_{NP} .

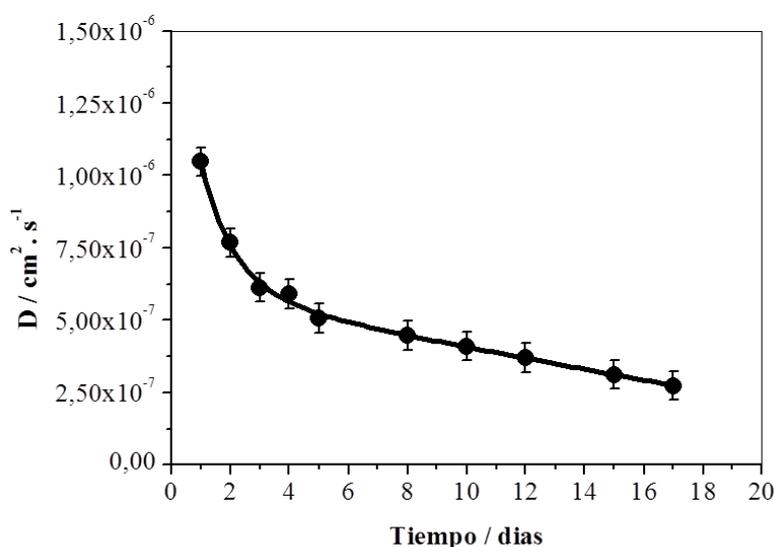


Figura 55. Dependencia del coeficiente de difusión de las nanopartículas PX-NLCs en el tiempo. $[PX]_T = 100 \mu\text{M}$ en $[\text{LiClO}_4] = 0,05 \text{ M}$. La línea sólida representa la función que mejor se adapta a los datos experimentales.

4.5.3 Comportamiento electroquímico de PX-NLCs en el tiempo

Se llevó a cabo un estudio de la respuesta electroquímica de una suspensión de PX-NLCs, $[PX]_T = 100 \mu\text{M}$, en función del tiempo. La **Figura 56A** muestra los voltamogramas de VOC registrados en diferentes días. Se observó un solo pico de oxidación en el intervalo de potencial estudiado y un aumento de la I_P con el tiempo. El E_p se desplaza alrededor de 200 mV hacia potenciales inferiores, respecto del pico obtenido para PX en medio acuoso.

La ecuación (18) muestra la dependencia de I_P con la concentración de PX (C_{PX}) y con el coeficiente de difusión de la especie electroactiva (D_{PX})²¹⁰.

$$I_{p=} = \frac{nFA D_{PX}^{1/2} C_{PX}}{(\pi t p)^{1/2}} \psi \quad (18)$$

donde ψ es la función corriente de VOC, tp es tiempo de pulso de aplicación de la VOC, n es el número de electrones intercambiados, A es el área del electrodo y F es la constante de Faraday.

Es importante notar que la concentración total de PX es constante en el sistema portador y el tamaño de las nanopartículas aumenta con el tiempo, reduciendo así su coeficiente de difusión. Además, la corriente total de pico tiene dos contribuciones: 1) la oxidación de PX no encapsulado en las nanopartículas y 2) la oxidación del PX encapsulado. Ya se ha mencionado que el tamaño de partícula aumenta a lo largo del tiempo y, por ende, su coeficiente de difusión disminuye. Sin embargo, se observa un aumento de la I_p en función del tiempo. Este aumento puede ser causado por el PX liberado desde el interior del sistema portador, ya que el PX liberado tiene un coeficiente de difusión mayor que el PX incorporado en las nanopartículas, debido a que éste difunde hacia la superficie del electrodo estando dentro de la nanopartícula. Por lo tanto, de acuerdo con la ecuación (18), la corriente de pico total depende de la concentración de PX así como de los coeficientes de difusión de PX dentro y fuera del sistema portador, suponiendo que PX no se descompone con el tiempo en este medio.

Se realizó además un estudio para verificar que, una vez liberado, el fármaco no vuelve a incorporarse en el sistema de transporte y que el PX no se descompone con el tiempo bajo las condiciones experimentales utilizadas. Para ello, se añadió PX a una suspensión de NLCs control para asegurar de este modo que el pico de oxidación observado corresponde al PX fuera del sistema portador. La corriente de pico de este sistema se midió a diferentes tiempos y la **Figura 55B** muestra que la misma no cambia. Esto demuestra que el fármaco no reingresa al sistema portador, permaneciendo en la fase acuosa externa. Así, el proceso de difusión del PX incorporado en los NLCs hacia la fase acuosa externa puede ser descrito por la ecuación (19):

$$[PX]_{NP} \rightarrow [PX]_W \quad (19)$$

donde $[PX]_{NP}$ y $[PX]_W$ son la concentración de PX dentro y fuera del sistema portador, respectivamente.

La concentración total de PX ($[PX]_T$) obedece a la ecuación (20):

$$[PX]_T = [PX]_W + [PX]_{NP} \quad (20)$$

La **Figura 56B** muestra además que el medio de NLCs estabiliza al PX, el cual no se descompone con el tiempo.

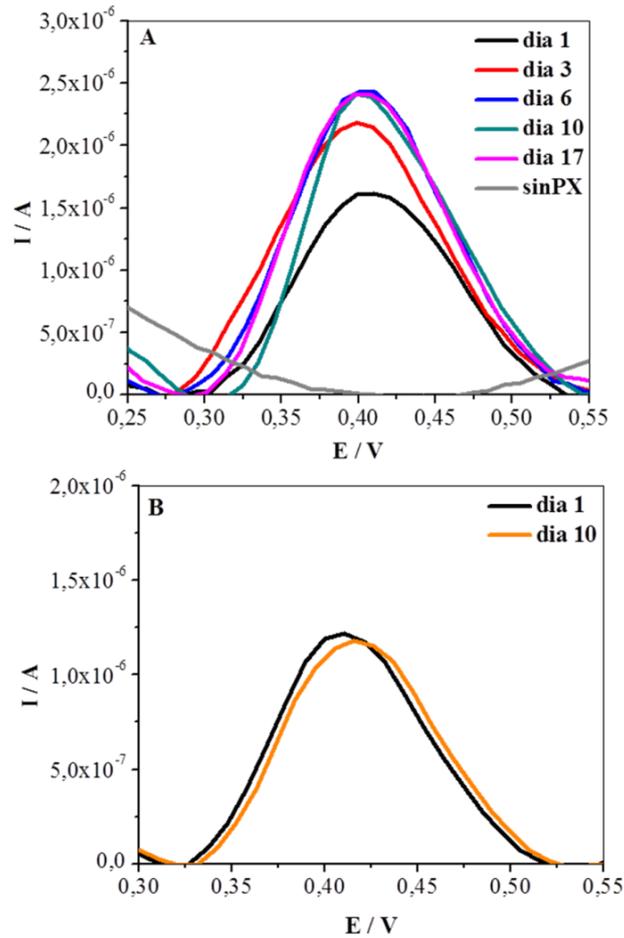


Figura 56. A) Voltagramas VOC del sistema PX-NLCs a diferentes tiempos. $[PX]_T = 100 \mu\text{M}$ en $[\text{LiClO}_4] = 0,05 \text{ M}$. B) Voltagrama VOC de PX agregado por fuera del sistema NLCs a diferentes tiempos. $[PX]_T = 50 \mu\text{M}$ en $[\text{LiClO}_4] = 0,05 \text{ M}$.

En función a los resultados presentados anteriormente se propone un modelo matemático mediante el cual se puede obtener el perfil de liberación de los PX-NLCs a partir de los resultados experimentales obtenidos por VOC.

4.5.4 Modelo electroquímico para la liberación de PX

Para estudiar el proceso de liberación PX utilizando la técnica VOC, se requirió un modelo matemático basado en los siguientes supuestos:

1) La ecuación (19) representa el proceso de difusión de PX desde el interior de las nanopartículas a la fase acuosa externa.

2) Las especies electroactivas son las moléculas de PX presentes en la fase acuosa externa y las incorporadas en el sistema NLCs.

3) Ambas especies se oxidan simultáneamente al mismo potencial. Esta suposición es validada debido a que en los voltogramas de VOC mostrados en la **Figura 56A**, se observa un único pico voltamétrico en el intervalo de potencial aplicado.

4) El mecanismo de electrooxidación de PX en fase acuosa y de PX incorporado en el sistema NLCs es el mismo (n y ψ son constantes).

En agua, la corriente neta de pico de electrooxidación de PX (I_w) se define según la ecuación (21)²¹¹:

$$I_w = a [PX]_w \quad (21)$$

Con a definido por la ecuación (22):

$$a = nFA \frac{(D_w)^{1/2}}{\pi t p} \psi = K D_w^{1/2} \quad (22)$$

donde D_w es el coeficiente de difusión de PX en agua y K es una constante que contiene todos los parámetros constantes indicados en la ecuación (22), cuyo significado fue definido previamente.

La corriente neta de pico de PX incorporado en el sistema de NLCs (I_{NP}) se define por la ecuación (23):

$$I_{NP} = b [PX]_{NP} \quad (23)$$

Con b definido en la ecuación (24):

$$b = nFA \frac{(D_{NP})^{1/2}}{\pi t p} \psi = K D_{NP}^{1/2} \quad (24)$$

donde D_{NP} es el coeficiente de difusión PX cuando se encuentra incorporado a las NPs, el cual fue obtenido mediante DLS (**Sección 4.5.2**) y K fue definida previamente.

De acuerdo a la suposición de que ambas especies electroactivas (PX encapsulado en nanopartículas y PX en el exterior acuoso) se oxidan al mismo potencial (véase la **Figura 56A**), la corriente de pico total (I_T) tiene dos contribuciones, como lo muestra en la ecuación (25):

$$I_T = a [PX]_w + b [PX]_{NP} \quad (25)$$

donde la constante a tiene incorporado el D_w y la constante b el D_{NP} . Insertando las ecuaciones (20), (22) y (24) en la ecuación (25) se obtiene la ecuación (26), que expresa la corriente total en función de la concentración de PX incorporado en el sistema NLC:

$$I_T = K D_w^{1/2} ([PX]_{TOTAL} - [PX]_{NP}) + K D_{NP}^{1/2} [PX]_{NP} \quad (26)$$

Conforme a la suposición 4) la constante K se calculó a partir de la pendiente de una curva de calibrado [I_P en función de $[PX]$, según la ecuación (18)] obtenida a partir de medidas de VOC en medio homogéneo utilizando diferentes concentraciones de PX (**Figura 57**). Para construir la curva, se usaron soluciones acuosas frescas de PX realizando las medidas inmediatamente después de su preparación para evitar la descomposición del principio activo. Se obtuvo un valor de $9624,16 \pm 0,2 \text{ A cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{1/2}$ para la constante K .

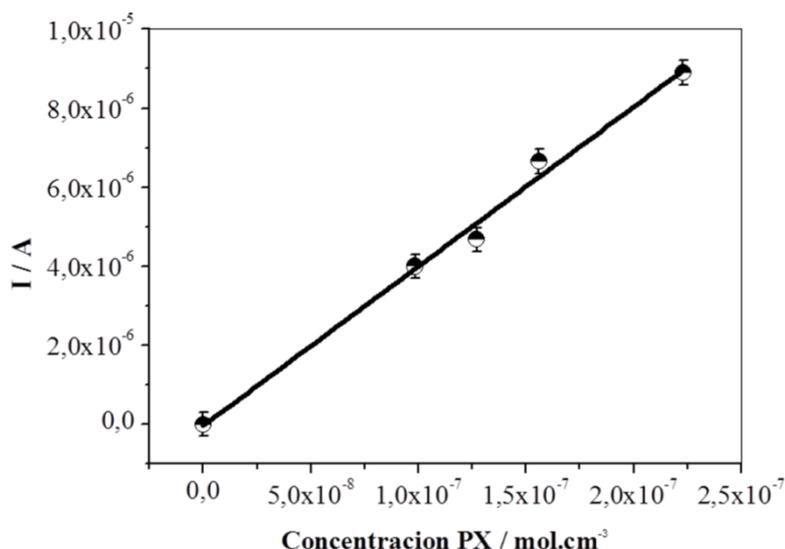


Figura 57. Curva de calibrado I_p en función de concentración de PX en solución acuosa $[LiClO_4]=0,05$ M.

4.5.5 Estudio de liberación *in vitro* de PX-NLCs a partir de VOC

Los estudios de liberación se realizaron por triplicado, usando concentraciones iniciales de PX de 50, 75 y 100 μ M, estas concentraciones corresponden a la cantidad de PX utilizada para la preparación de las NPs. La respuesta electroquímica de estas concentraciones fue seguida por VOC a lo largo del tiempo. La **Figura 58** muestra que la evolución temporal de los picos de corriente de las suspensiones PX-NLCs tiene una forma sigmoidea. Mediante el uso de la ecuación (26), la concentración de PX en el sistema de NLCs se determinó para diferentes tiempos midiendo la corriente de pico, usando $D_w = 1,96 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (calculada en la **Sección 4.5.1**) y los D_{NP} obtenidos, como ya se mencionó, a partir de la curva experimental de DLS (**Sección 4.5.2**). Esto se realizó a las diferentes concentraciones iniciales de PX ($[PX]_T = 50, 75$ y 100μ M).

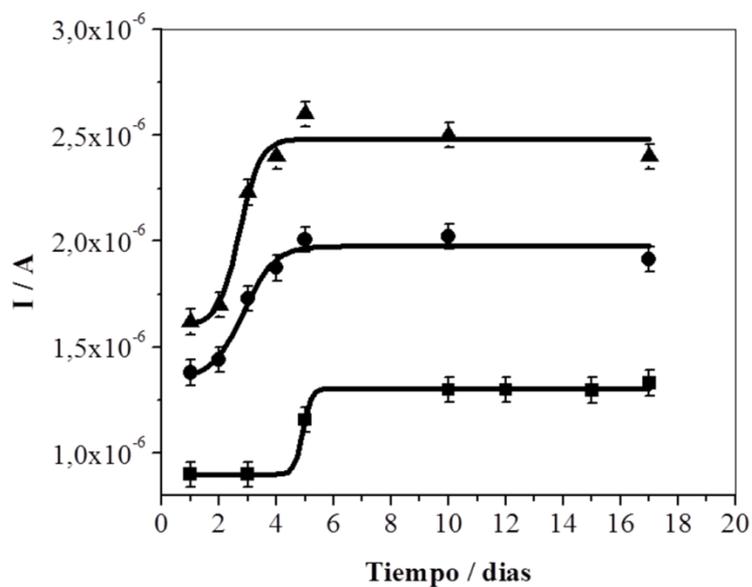


Figura 58. Dependencia de I_T en el tiempo para tres concentraciones totales de PX en los NLCs. $[PX]_T=50 \mu\text{m}$ (\blacksquare), $[PX]_T=75 \mu\text{m}$ (\bullet), $[PX]_T=100 \mu\text{m}$ (\blacktriangle). $[\text{LiClO}_4]=0,05 \text{ M}$. La línea sólida representa la función que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Conociendo la concentración del PX incorporado dentro de las NPs y aplicando la ecuación (20), se calculó la concentración de PX fuera del sistema portador para cada tiempo. Las concentraciones obtenidas se resumen en la **Tabla 6**. Conociendo estas concentraciones se logró construir los perfiles de liberación del sistema NLCs para cada concentración inicial de PX (**Figura 59**).

Tabla 6. Concentraciones de PX dentro ($[PX]_{NP}$) y fuera ($[PX]_W$) del sistema de NLCs en el tiempo, para las tres concentraciones iniciales totales ($[PX]_T$): A) $[PX]_T=50 \mu M$. B) $[PX]_T=75 \mu M$. C) $[PX]_T=100 \mu M$.

Concentración (μM) A			Concentración (μM) B			Concentración (μM) C	
Día	$[PX]_{NP}$	$[PX]_W$	Día	$[PX]_{NP}$	$[PX]_W$	$[PX]_{NP}$	$[PX]_W$
1	36,8	13,2	1	54,3	20,7	79,3	20,7
3	34,3	15,7	2	50,0	25,0	73,3	26,7
5	26,0	24,0	3	40,0	35,0	55,4	44,6
10	21,4	28,6	4	37,0	38,0	50,1	49,9
12	21,2	28,8	5	31,0	44,0	43,4	56,6
15	21,0	29,0	10	30,0	45,0	45,5	54,5
17	19,9	30,1	17	32,0	43,0	46,8	53,2

La **Figura 59** muestra los perfiles de liberación *in vitro* de las suspensiones PX-NLCs durante un período de tiempo de 17 días. Como se puede ver, en todos los casos los portadores exhibieron una fase inicial de liberación lenta de fármaco seguida por una liberación sostenida, obteniendo de este modo un perfil de liberación aproximadamente sigmoideo.

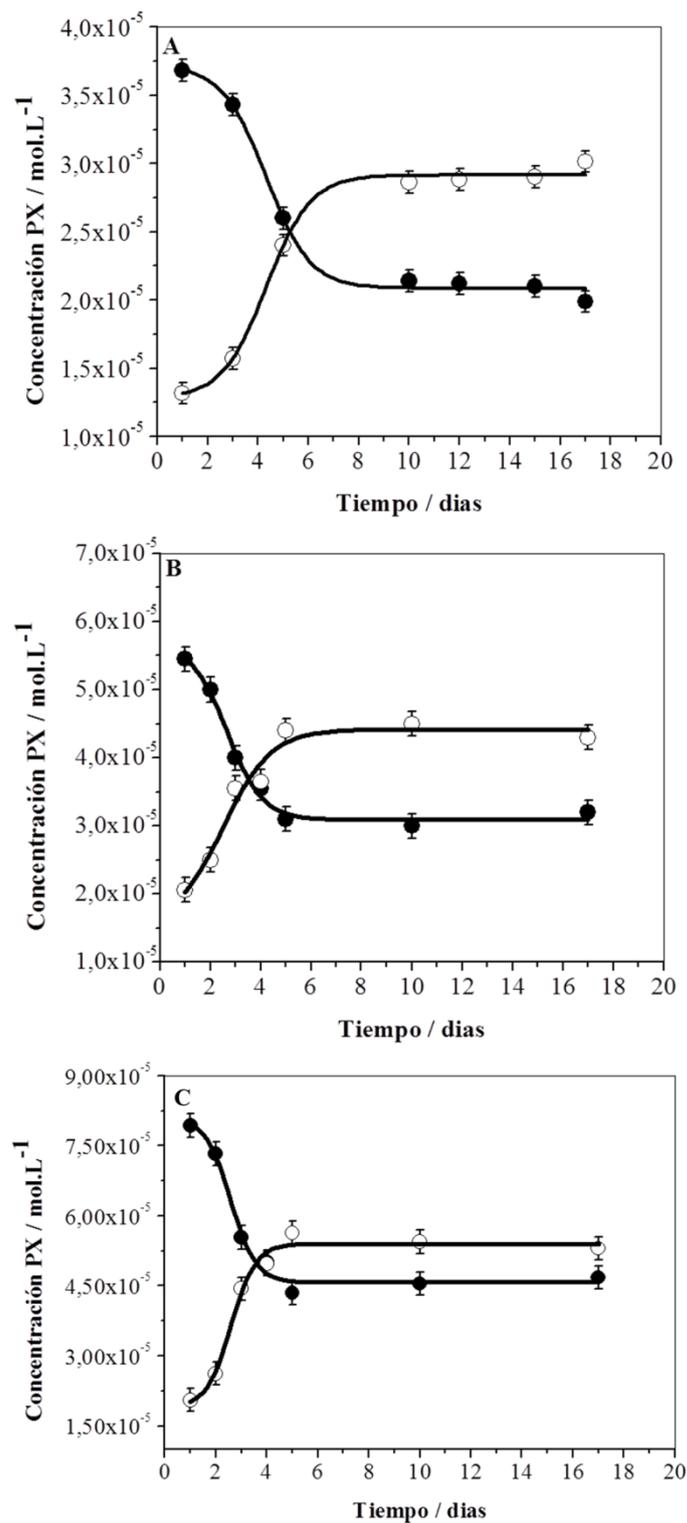


Figura 59. Dependencia de las concentraciones de PX dentro ($[PX]_{NP} = \bullet$) y fuera ($[PX]_{NE} = \circ$) del sistema NLCs con el tiempo. (A) $[PX]_T = 50 \mu M$ (B) $[PX]_T = 75 \mu M$ (C) $[PX]_T = 100 \mu M$ en $[LiClO_4] = 0,05 M$. La línea sólida representa la función que mejor se ajusta a los datos experimentales.

El sistema PX-NLCs mostró una liberación del **60%** del fármaco incorporado al cabo de 6 días. Dentro de las 24 hs iniciales, sólo el 25% de la droga fue liberada. La cantidad de fármaco libre aumentó a un 50% después de 120 hs (5 días) hasta alcanzar un valor constante al 60%. Después de éste, el porcentaje de liberación permanece constante a lo largo del tiempo. Así, se podría concluir que el sistema logra liberar el 60% del PX inicialmente incorporado. Esta limitación probablemente se deriva de la fuerte interacción hidrofóbica entre la fase lipídica y el fármaco modelo seleccionado.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por EC (**Sección 4.4.3**), los cuales muestran que en el día 5 el sistema mantiene incorporado aproximadamente el 38% de la cantidad de fármaco utilizado en la preparación de los PX-NLCs. Por otro lado ambas técnicas reflejan que el sistema portador se comporta de igual forma más allá de la concentración inicial de droga incorporada, liberando siempre la misma concentración de fármaco.

Por otro lado, hasta el día 17 no se observó degradación de las nanopartículas lipídicas. Esto hubiese ocasionado a la liberación de las restantes moléculas de fármaco atrapadas, lo que se traduciría como aumento de la señal analítica²¹².

Esta clase de patrón de liberación de fármacos, lenta y prolongada, es deseable para la mayoría de las aplicaciones de sistemas de administración de fármacos²¹³. La acción a largo plazo observada permite que la formulación se utilice en diferentes aplicaciones, especialmente tópica (alivio del dolor de heridas superficiales como úlceras, fibromas y lesiones)²¹². La liberación gradual de PX evitaría la pérdida del agente terapéutico por degradación, dado que el entorno de las NPs lo protege, posibilitaría la administración a través de la piel y, además, reforzaría el efecto de la dosis de fármaco principal administrada al paciente a lo largo del tiempo²¹³.

Una posible explicación para estos perfiles podría ser la presencia de una estructura de NLCs tipo II, en la cual una matriz lipídica sólida presenta en su interior pequeños nanocompartimientos oleosos. En dichos compartimientos se encontraría la mayor proporción de fármaco disuelto. Esta estructura conduce a una difusión lenta de PX desde la matriz²¹⁴. Además, se ha informado de que la interacción entre la fase lipídica y los

fármacos hidrófobos puede resultar en perfiles mejorados de liberación sostenida²¹⁵. En varios estudios anteriores se observó que los perfiles de liberación de los NLCs eran bifásicos: una liberación inicial de ráfaga seguida de una liberación prolongada²¹⁶. En nuestro caso no se observó ningún efecto de ráfaga. La liberación prolongada obtenida con PX-NLCs demuestra la idoneidad de NLCs como formulación de liberación prolongada para fármacos²¹⁵.

4.5.6 Eficiencia de encapsulamiento

A partir de los resultados obtenidos en la **Tabla 6** de la sección anterior y de la ecuación (1) (**Sección 2.6.4**) se calculó la eficiencia de encapsulación (EE%) del sistema portador para la incorporación de PX. Se realizaron los cálculos para las tres concentraciones iniciales de PX en la suspensión de nanopartículas (50, 75, 100 μ M) basándose en los datos obtenidos para el día 1, recordando que el estudio se llevó a cabo trabajando sobre soluciones frescas. Los resultados mostraron que el valor de EE% es independientes de la concentración inicial de PX en el sistema, el valor promedio obtenido fue de **75%**. Este valor es comparable con los calculados para sistemas similares^{217, 218, 219}, y se considera satisfactorio para el sistema PX-NLCs.

4.6 ESTUDIOS DE LA FORMULACION DEL GEL PX-NLCs

A continuación se prosiguió con la realización de una formulación farmacéutica para una administración segura del fármaco. La misma consistió en un gel conteniendo PX-NLCs apuntado a su aplicación transdérmica, la cual evitaría los efectos secundarios relacionados con la incorporación del PX por vía oral. La **Figura 60** muestra una fotografía digital del gel PX-NLCs obtenido a partir del procedimiento detallado en la **Sección 3.2.2**.



Figura 60. Fotografía digital gel PX-NLCs.

Consistencia del hidrogel y estabilidad de almacenamiento a largo plazo

La concentración óptima de Carbopol 940 fue de 0,30 % p/v ya que el gel resultante fue el único estable a lo largo del tiempo. Por lo tanto, a partir de este gel se llevaron adelante estudios de liberación de PX con el tiempo, los mismos son detallados a continuación.

4.6.1 Estudio de liberación *in vitro* de PX desde el GEL PX-NLCs mediante VOC

El perfil de liberación *in vitro* del PX incorporado en los NLCs se estudió a una concentración de fármaco inicial de 100 μM . La respuesta de PX fue seguida por VOC a lo largo del tiempo. La **Figura 61** muestra cómo la corriente de pico total aumenta con el tiempo. Como se explicó en la **Sección 4.4.3** el aumento en la corriente de pico ocurre como resultado de que el PX liberado difunde más rápidamente hacia la superficie del electrodo²⁰². Así, este aumento de señal refleja la liberación de PX desde los NLCs hacia la solución acuosa una vez que éstos han difundido a través de la membrana.

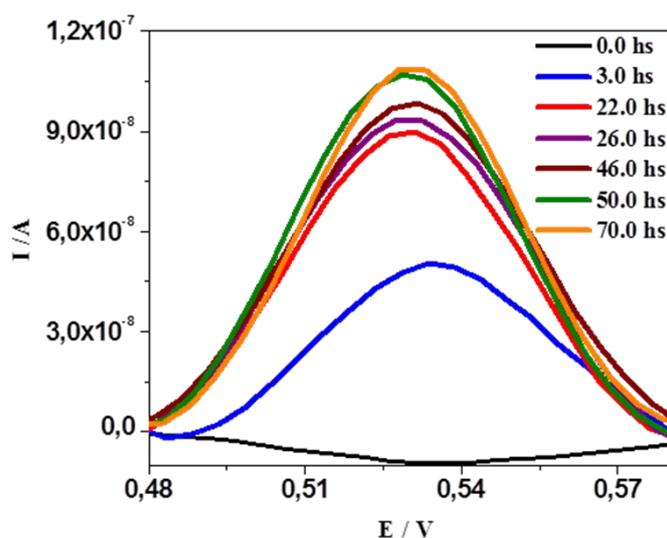


Figura 61. Voltamogramas VOC del sistema PX-NLCs en diferentes tiempos. $[\text{PX}] = 100 \mu\text{M}$ en buffer fosfato de pH 7,4.

La **Figura 62** muestra que la evolución temporal de los picos de corriente total (I_T) cuando se estudia la liberación desde el gel PX-NLCs aumenta progresivamente hasta los 100 hs para luego permanecer constante.

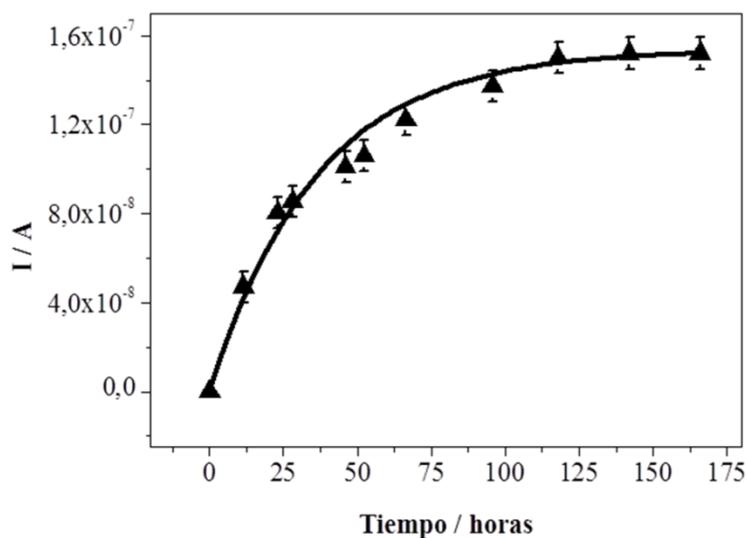


Figura 62. Dependencia de I_T en el tiempo para gel PX-NLCs en buffer fosfato pH 7,4. $[PX]_T = 100 \mu\text{m}$. La línea sólida representa la función que mejor ajusta a los datos experimentales.

La determinación por VOC se realizó utilizando el modelo electroquímico desarrollado en la **Sección 4.5.4**²⁰². Así, la concentración de PX dentro del sistema portador y fuera del mismo se obtuvo a partir de la corriente medida en diferentes tiempos, de acuerdo con las ecuaciones (26) y (20), respectivamente. Se utilizó $D_w = 1,96 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (calculada en la **Sección 4.5.1**) y los D_{NP} obtenidos a partir de la curva experimental de DLS (**Sección 4.5.2**). La constante K de la ecuación (26) se recalculó, ya que en este caso se utiliza como medio circundante un buffer fosfato, a partir de la pendiente de una curva de calibración [I_p en función de $[PX]$, según la ecuación (18)] obtenida por medidas de VOC en buffer fosfato utilizando diferentes concentraciones de PX. Para construir la curva, se usaron soluciones acuosas frescas de PX, realizando las medidas inmediatamente después de su preparación para evitar la descomposición del PX. Se obtuvo un valor de $5376,02 \pm 0,2 \text{ A cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{1/2}$ para la constante K.

La **Figura 63** muestra el perfil de liberación *in vitro* de PX desde el gel de NLCs durante 165 h. Como se puede observar, los PX-NLCs exhibieron una fase inicial lenta de liberación de fármaco seguida de una liberación sostenida, obteniendo de ese modo el correspondiente perfil de liberación.

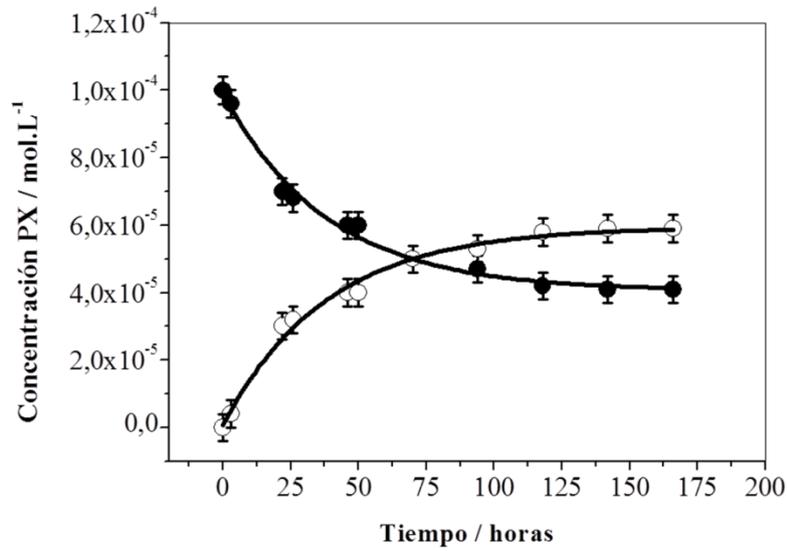


Figura 63. Evolución temporal de la concentración de PX en los NLCs. (●) concentración de PX dentro de las NPs. (○) concentración de PX fuera del sistema portador. La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales. $[PX]_T = 100 \mu\text{M}$ en buffer fosfato pH 7,4.

Se observó que el sistema libera el 60% del fármaco incorporado después de las 120 h del comienzo de la experiencia (**Figura 64**). A partir de ese momento, el porcentaje de liberación permanece constante a lo largo del tiempo.

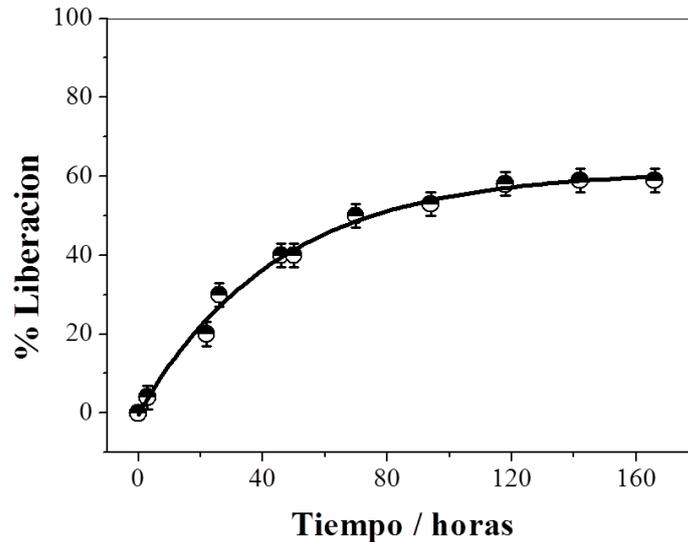
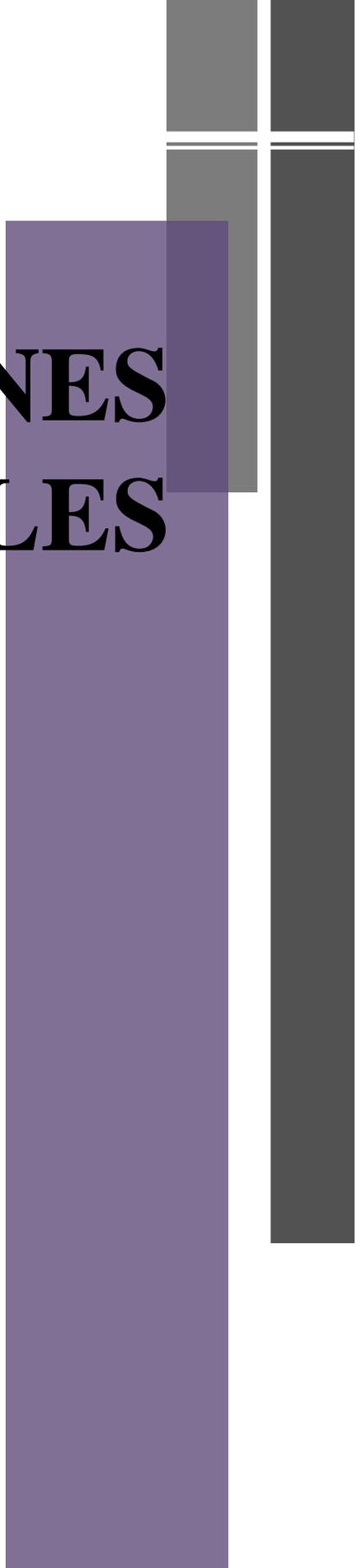


Figura 64. Porcentaje de liberación de PX desde el gel PX-NLCs en función del tiempo.

Como puede observarse, se obtuvieron resultados similares a los perfiles de liberación de PX-NLCs cuando éstos se encuentran en solución acuosa, en ausencia del gel²⁰² (**Sección 4.5.5**). Esto indica que la presencia del gel no afecta la liberación del

medicamento. Por otro lado, como la difusión del gel a través de la membrana ocurre dentro de los 60 min y el tamaño de los NLCs es menor que el tamaño del poro (**Figura 32**) la presencia de la membrana no afecta la difusión de los NLCs.

CONCLUSIONES GENERALES



5. CONCLUSIONES GENERALES

A continuación se presentan las principales conclusiones de este trabajo de Tesis:

- ✓ Se logró la obtención de sistemas de transporte de fármacos del tipo portadores lipídicos nanoestructurados basados en reactivos seguros para la administración en organismos vivos.
- ✓ El método propuesto para la obtención de las nanopartículas es simple, rápido, sin uso considerable de solventes orgánicos y sus condiciones experimentales no comprometen la estabilidad del principio activo.
- ✓ Los parámetros resultantes de la caracterización de los sistemas portadores resultaron satisfactorios, obteniéndose nanopartículas monodispersas, de morfología esférica, estables a lo largo del tiempo y con tamaños menores de 200 nm.
- ✓ Se incorporó exitosamente el principio activo piroxicam en el sistema portador. Es de destacar la potencialidad de estos sistemas portadores para la vehiculización de fármacos que muestran escasa solubilidad en soluciones acuosas, la cual representa una limitante en su paso a la circulación sistémica.
- ✓ La incorporación del principio activo a los NLCs no modificó sustancialmente las características de los sistemas portadores.
- ✓ El perfil de liberación obtenido para estos sistemas (PX-NLCs) fue aproximadamente sigmoideo, con un patrón de liberación lento. Este tipo de liberación es deseada para la mayoría de las aplicaciones de sistemas de administración de fármacos.

- ✓ Las técnicas espectroscópicas permitieron presuponer que desde el día 1 existe un reparto del PX entre la fase acuosa externa y el interior de las NPs. Lo cual posteriormente se vio reflejado en la eficiencia de encapsulamiento del sistema.

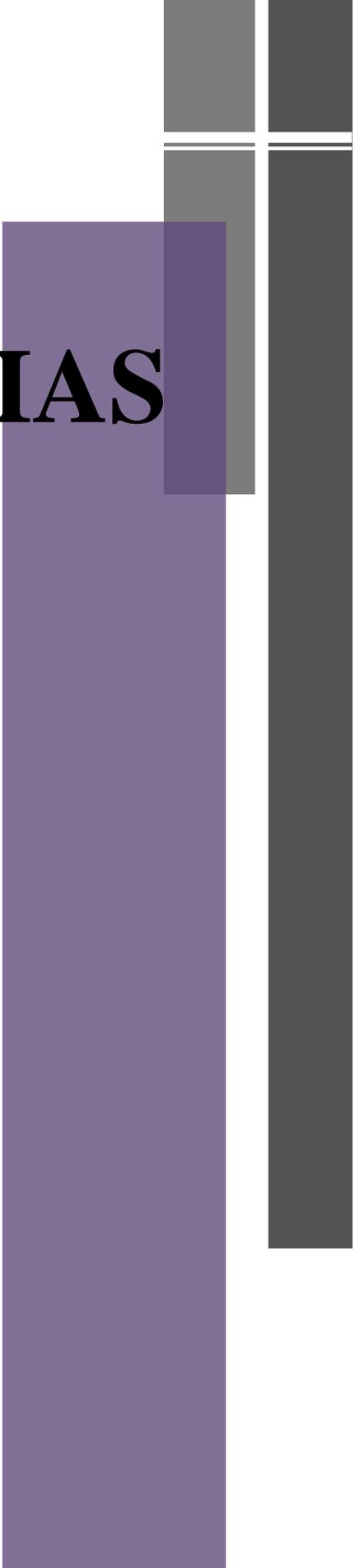
- ✓ Se desarrollaron dos métodos analíticos nuevos para el análisis del rendimiento de los sistemas portadores. Uno, basado en EC, el cual permitió estudiar el sistema portador en un tiempo corto de análisis y mostró potencial para la determinación de la eficiencia de encapsulamiento del sistema. El otro, basado en VOC, que permitió llevar a cabo un estudio de liberación *in vitro* del fármaco desde las NPs, obteniéndose el correspondiente perfil de liberación. Cabe destacar que ambas técnicas, además de su simplicidad, permiten estudiar las NPs sin previa manipulación. Por otro lado, las técnicas electroquímicas presentan ciertas ventajas con respecto a otras técnicas analíticas, como: rapidez de análisis, menor costo, potencialmente portátiles y la generación de menos residuos tóxicos.

- ✓ Considerando el perfil de liberación obtenido se pudo establecer que el sistema presenta una estructura tipo II, lo que conduce a la difusión lenta de PX desde la matriz lipídica.

- ✓ El sistema presentó una eficiencia de encapsulamiento (EE%) comparable con los valores obtenidos en trabajos previos para sistemas similares.

- ✓ Se planteó una formulación farmacéutica para una administración segura del fármaco. La misma consiste en un gel, apuntado a su aplicación transdérmica.

REFERENCIAS



6. REFERENCIAS

-
- 1) Y. Soleimanian, S. A. Hossein Goli, J. Varshosaz, S. Mohammad Sahafi, *Food Chem.* 244 (2013) 83-92.
 - 2 A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H Markiewicz, H. Car., *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 1020– 1037.
 - 3 T. R. Kommuru, B. Gurley, M. A. Khan, I. K. Reddy, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 233-246.
 - 4 X. J. Zhang, X.H. Hu, L.Y. Hao, Chapter 10: Nanocomposite Drug Carriers, *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* (2016) 261–284.
 - 5 A. Aiacoaboe, T. Gheorghe, I. Lungu, C. Curutiu, M. C. Chifiriuc, A. M. Grumezescu, A. M. Holban, Chapter 2: Applications of nanoscale drugs carriers in the treatment of chronic diseases, *Nanostructures for Novel Therapy* (2017) 37-55.
 - 6 ISO/TR 10993-22. Biological evaluation of medical devices—part 22: guidance on nanomaterials. International Organization for Standardization; 2016.
 - 7 ISO/TS 80004-1. Nanotechnologies – vocabulary – part 1: Core terms. International Organization for Standardization; 2010.
 - 8 ETPN Association. Nanomedicine—European Nanotechnology Platform; 2017.
 - 9 Y.T. Zhang, Z. Li, K. Zhang, H. Y. Zhang, Z. H. He, Q. Xia, J. H. Zhao, N. P. Feng, *Int. J. Pharm.* 528 (2017) 100–106
 - 10 S. C. Park, Y. M. Kim, J. K. Lee, N. H. Kim , E. J. Kim , H. Heo, M. Y. Lee, J. R. Lee , M. K. Jang, *J. Control Release* 256 (2017) 46–55.
 - 11 R. Karim, C. Palazzo, J. Laloy, A. S. Delvigne, S. Vanslambrouck, C. Jerome, E. Lepeltier, F. Orange, J. M. Dogne, B. Evrard, C. Passirani, G. Piel, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 757-768.
 - 12 F. L. Prima, L. Michieletto, M. A. M. Rodrigues, P. P. Macaroffa, P. C. Morais, Z. G. M. Lacavac, M. V. Bentley, A. C. Tedesco, *J. Magn. Mater.* 311 (2007) 354–357.
 - 13 H. Bessar, I. Venditti, L. Benassi, C. Vaschieri, P. Azzoni, G. Pellacani, C. Magnoni, E. Botti, V. Casagrande, M. Federici, A. Costanzo, L. Fontana, G. Testa, F. F. Mostafa, S. A. Ibrahim, M. V. Russo, I. Fratoddi, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 141 (2016) 141–147
 - 14 J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallace, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. John Wiley & Sons (2007).
 - 15 A. Wretling, J. Parenter. *Enter. Nutr.* 5 (1981) 230– 235.
 - 16 A.D. Bangham, R.W. Horne, *J. Mol. Biol.* 8 (1964) 660– 668.

-
- 17 New York Academy of Science, The Use of Liposomes in Biology and Medicine, Conference Proceedings (1977).
- 18 L. Collins-Gold, N. Feichtinger, T. Warnheim, *Mod. Drug Discov.* 3 (2000) 44– 48.
- 19 D.D. Lasic, *Tibtech* 16 (1998) 307–321.
- 20 E. Allemann, R. Gurny, E. Doelker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39 (1993) 173– 191.
- 21 A. Smith, I.M. Hunneyball, *Int. J. Pharm.* 30 (1986) 215– 230.
- 22 B. Siekmann, K. Westesen, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1 (1992) 123– 126.
- 23 E. B. Souto, R. H. Muller, Chapter 14: Lipid nanoparticles (Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for cosmetic, dermal, and transdermal applications, *Informa Healthcare* (2007) 213-233.
- 24 S. A. Wissing, O. Kayserb, R. H. Muller, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1257– 1272.
- 25 R.H. Muller, S. Staufenbiel, C.M. Keck, *H&PC Today* 9 (2014) 18-25.
- 26 H. Rauscher, G. Roebben, A. B. Sanfeliu, H. Emons, N. Gibson, R. Koeber, T. Linsinger, K. Rasmussen, J. R. Sintes, B. Sokull-Kluttgen, H. Stamm, Towards a review of the EC recommendation for a definition of the term nanomaterial—part 3: Scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation. *European Commission* (2015).
- 27 S. Das, W. K. Ng, R. B. Tan, *Eur. J. Pharm Sci.* 47 (2012) 139–151.
- 28 L. M. D. Gonçalves, F. Maestrelli, L. Di Cesare Manelli, C. Ghelardini, A. J. Almeida, P. Mura, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 102 (2016) 41–50.
- 29 R. H. Müller, W. Mehnert, J. S. Lucks, C. Schwarz, A. Zur Mühlen, H. Weyhers, C. Freitas, D. Rühl, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 62-69.
- 30 L.G. Souza, E.J. Silva, A.L.L. Martins, M.F. Mota, R.C. Braga, E.M. Lima, M.C. Valadares, S.F. Taveira, R.N. Marreto, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 79 (2011) 189–196.
- 31 L. Arana, C. Salado, S. Vega, O. Aizpurua-Olaizola, I. de la Arada, T. Suarez, A. Usobiaga, J. L. Arrondo, A. Alonso, F. M. Goni, I. Alkorta, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 135 (2015) 18–26.
- 32 S. Kumar, J. K. Randhawa, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 1842–1852.
- 33 R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 161-177.
- 34 M. Moazeni, H. R. Kelidari, M. Saeedi, K. Morteza-Semnani, M. Nabili, A. Abdollahi Gohar, J. Akbari, E. Lotfalif , A. Nokhodchi, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 142 (2016) 400–407.
- 35 M. Geszke-Moritz, M. Moritz, *Mater. Sci. Eng. C.* 68 (2016) 982–994.
-

-
- 36A. K. Biswas, M. R. Islam, Z. S. Choudhury, A. Mostafa. M. F. Kadir, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2014) 043001.
- 37 A. Zielińska, I. Nowak, Chapter 10: Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel carriers for cosmetic ingredients, *Applications of Nanobiomaterials* (2016) 231–255.
- 38 V. P. Torchilin, *Nanoparticulates as drug carriers* Imperial College Press, London (2006).
- 39 R. H. Muller, M. Radtke, S. A. Wissing, *Adv Drug Deliv Rev.* 54 (2002) S131-S155.
- 40 H. R. Kelidaria, M. Moazenib, R. Babaeia, M. Saeedid, J. Akbarid, P. I. Parkoohi, M. Nabili, A. A. Gohar, K. Morteza-Semnani, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 83–88.
- 41 S. J. Park, C. V. Garcia, G. H. Shin, J. T. Kim, *Food Chem.* 225 (2017) 213–219.
- 42 C. Puglia, F. Bonina, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 429-441.
- 43 S. Nikolic, S. Gohla, R.H. Muller, *Expert Rev. Dermatol.* 6 (2011) 501-507.
- 44 G. Chen-yua, Y. Chun-fen, L. Qi-lu, T. Qi, X. Yan-wei, L. Wei-na, Z. Guang-xi, *Int. J. Pharm.* 430 (2012) 292– 298
- 45 R.H. Müller, S. Runge, V. Ravelli, W. Mehnert, A.F. Thünemann, E.B. Souto, *Int. J. Pharm.* 317 (2006) 82–89.
- 46 A. Beloqui, A. del Pozo-Rodríguez, A. Isla, A. Rodríguez-Gascón, Marí.Á. Solinís, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 42 (2017) 144-154.
- 47 M.D. Joshi, R.H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 161–172.
- 48 A. A. Attama, S. Reichl, C. C. Muller-Goymanna, *Int. J. Pharm* 355 (2008) 307–313.
- 49 X. Kong, Y. Zhao, P. Quan, L. Fang, *Asian J. pharm. Sci.* 11 (2016) 248–254.
- 50 P. Chen, H. Zhang , S. Cheng, G. Zhai, C. Shen, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 506 (2016) 356–362.
- 51 H. L. Xu, K. L. Mao, C. T. Lu, Z. L. Fan, J. J. Yang, J. Xu, P. P. Chen, D. L. ZhuGe, B. X. Shen, B. H. Jin, J. Xiao, Y. Z. Zhao, *Biomaterials* 107 (2016) 44-60.
- 52 A. Patil-Gadhe, A. Kyadarkunte, M. Patole, V. Pokharkar, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88 (2014) 169-177.
- 53 W. J. Lin, Y. S. Duh, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108 (2016) 297-303.
- 54 N. K. Garg, B. Singh, R. K. Tyagi, G. Sharma, O. P. Katare, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 147 1 (2016) 17-24.

-
- 55 M. Schäfer-Korting , W. Mehnert , H. C. Korting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 427–443.
- 56 E. B. Souto, S. A. Wissing, C. M. Barbosa, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 71.
- 57 F. Tamjidi, M. Shahedi, J. Varshosaz, A. Nasirpour, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19 (2013) 29-43.
- 58 A. Beloqui, M. A. Solinís, A. Rodríguez-Gascón, A. J. Almeida, V. Preat, *Nanomed-Nanotechnol* 12 (2016) 143–161.
- 59 S. Selvamuthukumar, R. Velmurugan, *Lipids in Health and Disease* 11 (2012) 159.
- 60 M. Radtke, E.B. Souto, R.H. Muller, *Pharm. Technol. Eur.* 17 (4) (2005) 45–50.
- 61 M. Radtke, R. H. Müller, *Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 28 (2001) 472–473.
- 62 M. Radtke, R. H. Müller, *Int Symp Control Rel. Bioact. Mater.* 28 (2001) 470–471.
- 63 D. Myers, *Surfactant Science and Technology*, 3rd Ed., John Wiley and Sons (2006).
- 64 J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallace, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, John Wiley & Sons (2007).
- 65 F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chemie. Int. Ed.* 39 (2000) 1906-1920.
- 66D. J. McClements, J. Rao, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51(2011) 285-330.
- 67 M. L. Garzón, M. L. Vázquez, L. Villafuerte, B. García, A. Hernández, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40 (2009) 26-40.
- 68 R. J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Vol. 1. Oxford: Oxford University Press (1986).
- 69 P. Shanmukhi, *Int J Pharm Technol* 5 (2013) 2645-2674.
- 70 E. Ha, W. Wang , Y. J. Wang, *J. Pharm Sci.* 10 (2002) 2252-64.
- 71 B. A. Kerwin, *J. Pharm Sci.* 97 (2008) 2924-2935.
- 72 R. J. Whitehurst, *Emulsifiers in food technology*, Oxford: Blackwell Publishing Ltd. (2004).
- 73 M. Hoyos Serrano, V. V. Rosales Calle, *Rev. Act. Clin. Med* 41 (2014) 2142-2145.
- 74 M. Faergemand, N. Krog, *Texture in Foods, Volume 1: Semi-Solid Foods* B. M. McKenna (Editor.), Florida: CRC Press. (2003).
- 75 M. Rosa, M. Kwiecien, B. Tal-Figiel, *Technical Transactions* (2015) 69-77.

-
- 76 A. Wade, P. J. Weller, Hand book of pharmaceutical excipients. 2nd ed. Washington: Ame. Pharm. Association (1994).
- 77 S.H. Zeisel, Nutrition 16 (2000) 669-671.
- 78 R. Kumar, O. P. Katare, AAPS PharmSciTech 6 (2005) E298–E310.
- 79 S. J. Ory, C. B. Hammond, S. G. Yancy, R. W. Hendren, C. G. Pitt , Am. J. Obstet. Gynecol. 145 (5) (1983) 600-605.
- 80 Q. Xing, J. Song, X. You, D. Xu, K. Wang, J. Song, Q. Guo, P. Li, C. Wu, H. Hu, Int. J. Pharm. 511(2016) 709-718.
- 81 Y. Zhang, Z. Li, K. Zhang, G. Yang, Z. Wang, J. Zhao, R. Hu, N. Feng, Int. J. Pharm. 511 (2016) 57-64.
- 82 P. Ganesan, D. Narayanasamy, Sustainable Chemistry and Pharmacy 6 (2017) 37–56.
- 83 B.Gaba, M. Fazil, A. Ali, S. Baboota, J.K. Sahni, J. Ali, Drug Deliv. 22(2015) 691-700.
- 84 R.H. Müller et al., Extended patent on the basis of (6), PCT application PCT/EP00/04112 (2000).
- 85 K. L. Guimaraes, M. I. Ré, Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: the first (SLN) and the second generation (NLC). In: Beck, R., Guterres, S., Pohlmann, A. (Eds.), Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for Skin Care. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (2011) 101-122.
- 86 O. Uchechi, J. D. N. Ogbonna, A. A. Attama, Nanoparticles for dermal and transdermal drug delivery. In: Sezer, A.D. (Ed.), Application of Nanotechnology in Drug Delivery. InTech, Rijeka, Croatia (2014) 193-235.
- 87 N. Yadav, S. Khatak, U. V. S. Sara, Int. J. App. Pharm. 5 (2)(2013) 8-18.
- 88 K. Mitri, R. Shegokar, S. Gohla, C. Anselmi, R.H. Muller, Int. J. Pharm. 414 (2011) 267-275.
- 89 H. Ali, A. B. Shirode, P. W. Sylvester, S. Nazzal, Colloids Surf. A 353 (2010) 43-51.
- 90 C. Puglia, P. Blasi, L. Rizza, A. Schoubben, F. Bonina, C. Rossi, M. Ricci, Int. J. Pharm. 357 (2008) 295-304.
- 91 M.R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, US Patent 5250236 (1993).
- 92 E. Ugazio, R. Cavalli, M.R. Gasco, Int. J. Pharm. 241 (2002) 341e344.
- 93 M.L. Bondi, G. Fontana, B. Carlisi, G. Giammona, Drug Deliv. 10 (2003) 245-250.

-
- 94 S. E. Lee, J. K. Lee, W.S. Jang, T. H. Kima, A. Tunsirikongkon, J. S. Choi, J. S. Park, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 508 (2016) 294–300
- 95 W. Mehnert, K. Mader, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47 (2001) 165–196.
- 96 B. Sjostrom, B. Bergenstahl, *Int. J. Pharm.* 88(1992) 53-62.
- 97 M.G. Zariwala, N. Elsaid, T.L. Jackson, F.C. López, S. Farnaud, S. Somavarapu, D. Renshaw, *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 400–407.
- 98 S. Soares, P. Fonte, A. Costa, J. Andrade, V. Seabra, D. Ferreira, S. Reis, B. Sarmento, *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 370–381.
- 99 G. Chen, S. Zeng, H. Jia, X. He, Y. Fang, Z. Jing, X. Cai, *Res. Vet. Sci.* 96 (2014) 62–68.
- 100 H. Yuan, L. F. Huang, Y. Z. Du, X. Y. Ying, J. You, F. Q. Hu, S. Zeng, *Colloids Surf. B* 61 (2008) 132-137.
- 101 R. Paliwal, S. Rai, B. Vaidya, K. Khatri, A. K. Goyal, N. Mishra, A. Mehta, S. P. Vyas, *Nanomedicine* 5 (2009) 184-191.
- 102 P. Chattopadhyay, B. Y. Shekunov, D. Yim, D. Cipolla, B. Boyd, S. Farr, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 59 (6) (2007) 444-453.
- 103 I. E. Santo, A. S. Pedro, R. Fialho, E. Cabral-Albuquerque, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (1) (2013) 386.
- 104 M. A. Schubert, C. C. Müller-Goymann, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55(2003), 125-131.
- 105 C. Charcosset, H. Fessi., *J. Memb. Sci.* 266 (2005) 115-120.
- 106 C. Charcosset, A. El-Harati, H. Fessi, *J. Control Release* 108 (2005) 112-120.
- 107 R.M. Shah, F. Malherbe, D. Eldridge, E. A. Palombo, I. H Harding, *J. Colloid. Interface. Sci.* 428 (2014) 286-294.
- 108 M.R. Gasco, *Pharm. Technol. Eur.* 9 (1997) 32-42.
- 109 L. Priano, D. Esposti, R. Esposti, G. Castagna, C. De Medici, F. Fraschini, M. R. Gasco, A. Mauro, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7(2007) 3596-3601.
- 110 M. L. Garzón, A. Hernández, M. L. Vázquez, L. Villafuerte, B. García, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39 (4) (2008) 50-66.
- 111 M. R. Alex, A. J. Chacko, S. Jose, E. B. Souto, *Eur. J. Pharm. Sci.* 42 (2011) 11–18.
- 112 J. Sun, C. Bi, H. M. Chan, S. Sun, Q. Zhang, Y. Zheng, *Colloids Surf., B* 111 (2013) 367–375.
-

-
- 113 M. G. Zariwala, N. Elsaid, T. L. Jackson, F. C. López, S. Farnaud, S. Somavarapu, D. Renshaw, *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 400–407.
- 114 P. Severino, T. Andreani, A. Jäger, M. V. Chaud, M. H. A. Santana, A. M. Silva, E. B. Souto, *Eur. J. Med. Chem.* 81 (2014) 28–34.
- 115 S. Jaspart, G. Piel, L. Delattre, B. Evrard, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2(2005) 75-87.
- 116 K. W. Kasongo, J. Pardeike, R. H. Müller, R. B. Walker, *J. Pharm Sci.*, 100(2011) 5185-5196.
- 117 Y. Wang, Y. Deng, S. Mao, S. Jin, J. Wang, D. Bi, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 769-778.
- 118 A.C. Silva, E. González-Mira, M.L. García, M.A. Egea, J. Fonseca, R. Silva, *Colloids Surf. B* 86 (2011) 158–165.
- 119 N. Anton, J. P. Benoit, P. Saulnier, *J. Control. Release* 128 (2008) 185-199.
- 120 Y. Donga, W. K. Ng, S. Shen, S. Kim, R. B. H. Tan, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 94 (2012) 68– 72.
- 121 L. Montenegro, F. Lai, A. Offerta, M. G. Sarpietro, L. Micicch, A. M. Maccioni, D. Valenti, A. M. Fadda, *J. Drug Deliv. Sci. Technol* 32 (2016) 100-112.
- 122 A. A. Kokhanovsky, *Light Scattering Reviews* 4, Springer-Praxis, Chichester (2009) 481.
- 123 R. Kamel, D. M. Mostafa, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 153 (2015) 59–66.
- 124 S. Xie, L. Zhu, Z. Dong, X. Wang, Y. Wang, X. Li, W. Z. Zhou *Colloids Surf., B* 83 (2011) 382-387.
- 125 S. Bhattacharjee, *J. Control. Release* 235 (2016) 337–351.
- 126 S. Da., A. Chaudhury, *AAPS PharmSciTech* 12 (2011) 62–76.
- 127 C. Freitas, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* 168 (1998) 221–229.
- 128 M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, F., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1-9.
- 129 K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann, K. Mader, *J. Control. Release* 95 (2004) 217-227.
- 130 P.O. Nnamani, S. Hansen, M. Windbergs, C. M. Lehr, *Int. J. Pharm* 477 (2014) 208–217.
- 131 M. A. Iqbal, S. Md, J. K. Sahni, S. Baboota, S. Dang, J. Ali, *J. Drug Target* 20 (2012) 813-830.

-
- 132 A. A. Phatak, P. D. Chaudhari, *J Pharm Res*, 7 (2013) 677-685.
- 133 T. Chantaburanan, V. Teeranachaideekul, D. Chantasart, A. Jintapattanakit, V. B. Junyaprasert, *J. Colloid Interface Sci.* 504 (2017) 247–256.
- 134 L. G. Martins, N. M. Khalil, R. M. Mainardes, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 388-393.
- 135 P. Ma, T. Li, H. Xing, S. Wang, Y. Sun, X. Sheng, K. Wang, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 689–695
- 136 A. Navarro-Martínez, M. Vidal-Martínez, I. García-Rosa, M.J. Lázaro-Gómez y J. Brotons-Román, *Rev. Calid. Asist.* 30 (2015):256-264.
- 137 M. Seguí Díaz, *Semergen* 43 (2017) 332-334.
- 138 G.A. Green, *Clin. Cornerstone* 3(2001)50–58.
- 139 I. Pountos, T. Georgouli, H. Bird, P. V. Giannoudis, *Int. J. Interferon Cytokine Mediator Res.* 3 (2011) 19–27.
- 140 J. Zuo, L. Du, M. Li, B. Liu, W. Zhu, Y. Jin, *Int. J. Pharm.* 466 (2014) 76–82.
- 141 P. Charoenputtakun, S. K. Lib, T. Ngawhirunpat, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 318–328.
- 142 M. B. Gholivand, G. Malekzadeh, A. A. Derakhshan, *Sens. Actuator B-Chem* 201 (2014) 378–386.
- 143 R. M. Santiago, F. S. Tonin, J. Barbiero, T. Zaminelli, S. L. Boschen, R. Andreatini, C. Da Cunha, M. M. S. Lima and M. A. B. F. Vital, *Neuroscience* 300 (2015) 246–253.
- 144 A. Navarro-Martínez, M. Vidal-Martínez, I. García-Rosa, M.J. Lázaro-Gómez, J. Brotons-Román, *Rev. Calid. Asist.* 30(5) (2015) 256-264.
- 145 N. Rai, M. Sarkar, S. Raha, *Pharmacol Rep* 67 (2015) 1215–1223.
- 146 F. U. Alkan, O. Ustuner, T. Bakirel, S. Cinar, G. Erten, G. Deniz, *Sci World J.* (2012) 976740.
- 147 S.M. Ong, K. Saeki, Y. Tanaka, R. Nishimura, T. Nakagawa, *Vet. J.* 218 (2016) 51–59.
- 148 U. Paaver, A. Lust, S. Mirza, J. Rantanen, P. Veski, J. Heinämäki, K. Kogermann, *Int. J. Pharm.* 431 (2012) 111–119.
- 149 G. M. Escandar, A. J. Bysto, A. D. Campiglia, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 275–283.
- 150 A. Lust, C. J. Strachan, P. Veski, J. Aaltonen, J. Heinämäki, J. Yliruusi, K. Kogermann, *Int. J. Pharm.* 486 (2015) 306–314.
- 151 M. Nyström, J. Roine, M. Murtoma, R. M. Sankaran, H. A. Santos, J. Salonen, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 89 (2015) 182–189.

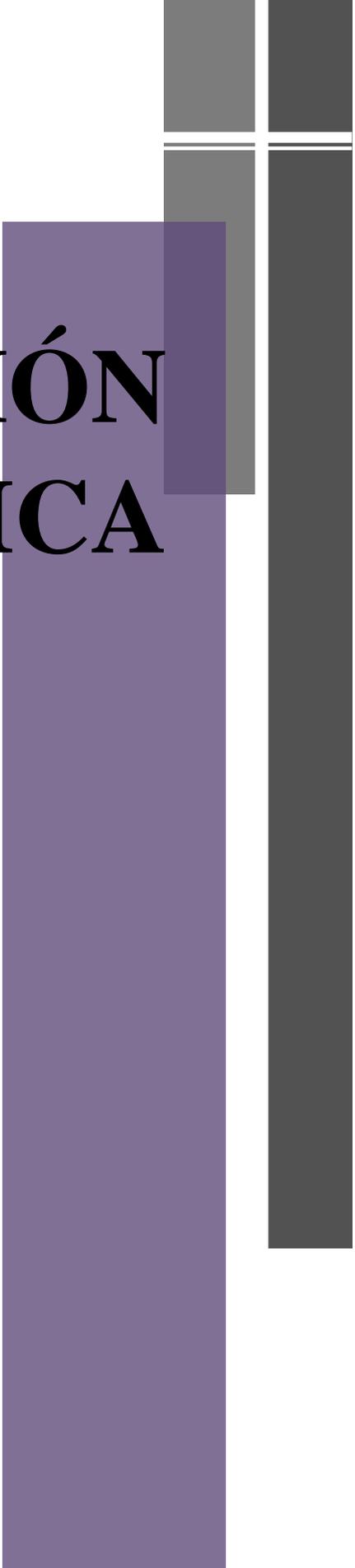
-
- 152 M. A. Maciá Martínez , *Reumatol Clin.* 11(2015) 345-52
- 153 J. Castellsague, N. Riera-Guardia, B. Calingaert, C. Varas-Lorenzo, A. Fourier-Reglat, F. Nicotra, M. Sturkenboom, S. Perez-Gutthann, *Drug Saf.* 35(2012) 1127–1146.
- 154 R. Silva, H. Ferreira, A. C. Carvalho, A. C. Gomes, A. Cavaco-Paulo, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 92 (2012) 277–285
- 155 N. Wilkosz, S. Rissanen, M. Cyza, R. Szybka, M. Nowakowska, A. Bunker, T. Róg, M. Kepczynski, *Eur. J. Pharm Sci.* 100 (2017) 116–125.
- 156 F. Bouchal, M. Skiba, N. Chaffai, F. Hallouard, S. Fatmi, M. Lahiani-Skiba, *Int. J. Pharm.* 478 (2015) 625–632.
- 157 K. Ferreira de Souza, J. A. Martins, F. B. Pessine, R. Custodio, *Spectrochim. Acta Part A* 75 (2010) 901-9077
- 158 M. Gil, A. Douhal, *Chem. Phys* 350 (2008) 179-185.
- 159 R. Banerjee, H. Chakraborty, M Sarkar, *Spectrochim. Acta A* 59 (2003) 1213-1222.
- 160 A. A. Torriero, C. E. Tonn, L. Sereno, J. Raba, *J. Electroanal. Chem.* 588 (2006) 218–225.
- 161 H. Chaudhary, A. Rohilla, P. Rathee, V. Kumar, *Int. J. Biol. Macromol.* 55 (2013) 246– 253.
- 162 P. Gupta, S. Garg, *Pharm. Technol.* (2002) 144–162.
- 163 T. Hatahet, M. Morille, A. Hommos, J.M. Devoisselle, R.H. Müller, S. Bégu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108 (2016) 41–53.
- 164 M. B. Brown, G. P. Martin, S.A. Jones, F. K. Akomeah, *Drug Deliv.* 13 (3) (2006) 175–187.
- 165 L.V. Allen, N.G. Popovich, H.C. Ansel, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8th ed., Wolter Kluwer Publishers, New Delhi (2005) 298–299.
- 166 R. Kumar, A. Philip, *Trop J Pharm Res.* 6 (1) (2007) 633–644.
- 167 P. Kumar, C. Sankar, B. Mishra, *The Indian Pharmacist* 5 (3) (2004) 7–17.
- 168 Y. Yue, D. Zhao, Q. Yin, *Biomed. Pharmacother.* 98 (2018) 813–820.
- 169 W. J. Lin, Y. S. Duh, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 108 (2016) 297-3
- 170 D. M. Tichota, A. C. Silva, J. M. Sousa Lobo, M. H. Amara, *Int. J. Nanomedicine* 9 (2014) 3855–3864.
- 171 E.H. Gokce, E. Korkmaz, S. Tuncay-Tanriverdi, E. Dellera, G. Sandri, M.C. Bonferoni, O. Ozer, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 5109-5117.

-
- 172 D. Paolino, A. H. S. Stancampiano, F. Cilurzo, D. Cosco, G. Puglisi, R. Pignatello,, Drug Deliv. Lett. 1 (2011) 32-39.
- 173 M. Sala , R. Diab, A. Elaissari, H. Fessi, Int. J. Pharm 535 (2018) 1–17.
- 174 R. H. Muller, R. Shegokar, C.M. Keck, Curr. Drug Discov. Technol. 8 (2011) 207–227.
- 175 A. Beloqui, M. A. Solinis, A. Rodriguez-Gascon, A. J. Almeida, V. Preat, Nanomedicine 12 (2016) 143–161.
- 176 J. Pardeike, A. Hommoss, R. H. Muller, Int. J. Pharm. 366 (2009) 170–184.
- 177 S. Ghanbarzadeh, S. Arami, J. Drug Deliv. Sci. Tech. 23 (6) (2013) 587-590.
- 178 C. Y. Shen, L. Dai, B. D. Shen, X. Zhou, J. X. Bai, H. Xu, Q. Y. LV, J. Han, H. L. Yuan, Chin. J. Nat. Med. 13(2015) 454-460.
- 179 J. Song, X. Fan, Q. Shen, Int. J. Pharm 501 (2016) 245–252.
- 180 E. Di Giuseppe, F. Corbi, F. Funicello, A. Massmeyer, T. N. Santimano, M. Rosenau, A. Davaille, Tectonophysics 642 (2015) 29–45.
- 181 V. Jenning, M. Schafer-Korting, S. Gohla, J. Control. Release 66 (2-3) (2000) 115-126.
- 182 S. Utreja, N. K. Jain, Solid Lipid Nanoparticles. Advances in Controlled and Novel Drug Delivery, CBS Publihers & Distributors, New Delhi (2001) 408–425.
- 183 D. E. Koppel, D. W. Schaefer, Appl. Phys. Lett. (1973) 22, 36.
- 184 M. Kaszuba, J. Corbett, F.M. Watson, A. Jones, Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci. 368 (2010) 4439-4451.
- 185 J. R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Springer: New York. (2006).
- 186 N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, Principles of Molecular Photochemistry. University Science Books. California. (2009).
- 187 A. J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochemical Methods Second Edition, John Wiley & Sons, inc., New York (1944).
- 188 J. C. Imbeaux, J. M. Savèant, J. Electroanal. Chem., 44 (1973) 169.
- 189 J. S. Florez, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto (2015).
- 190 M. S. Ramaley, Jr. Krauser, Anal. Chem. 41 (1969) 1362.
- 191 A Shallan, R Guijt, M Breadmore, Encyclopedia of Forensic Sciences (2013) 549–559.

-
- 192 H. Whatley, Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. In: Petersen J.R., Mohammad A.A. (eds) Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis. Pathology and Laboratory Medicine. Humana Press, Totowa, N. J. (2001).
- 193 N. Mennini, M. Cirri, F. Maestrelli, P. Mura, Int. J. Pharm. 515 (2016) 684–691.
- 194 M. A. Zayed, F. A. El-Dien, G. G. Mohamed, N. E. El-Gamel, Spectrochim. Acta A 60 (2004) 2843–2852.
- 195 M. Igartua, P. Saulnier, B. Heurtault, B. Pech, J. E. Proust, J. L. Pedraz, J. P. Benoit, Int. J. Pharm. 233 (2002) 149-157.
- 196 A.K. Kohli, H. O. Alpar, Int. J. Pharm. 275 (2004) 13–17.
- 197 G. Schmalz, R. Hickel, K. L. Van Landuyt, F. X. Reichl, Dent. Mater., 33 (2017) 1298-1314.
- 198 G. Lv, F. Wang, W. Cai, X. Zhang, Colloids Surf. A 447 (2014) 8–13.
- 199 S. Kang, H. Y. Jeong, J. Hazard. Mater. 284 (2015) 143–150.
- 200 J. Otarola, A. G. Lista, B. Fernández Band, M. Garrido, J. Pharm. Anal. 5 (2015) 70–73.
- 201 A. Maciá, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 133–153.
- 202 J. Otarola, M. Garrido, N. M. Correa, P. G. Molina, ChemPhysChem 17 (2016) 2322 – 2328.
- 203 M. B. Gholivand, G. Malekzadeh, A. A. Derakhshan, Sens. Actuators B 201 (2014) 378–386.
- 204 A. Abbaspour, R. Mirzajani, J. Pharmaceut. Biomed, 44 (2007) 41–48.
- 205 M. Gonzalez, D. M. V. zquez, M. L. Tascûn, P. S.nchez-Batanero, Electroanalysis 6 (1994) 497–504.
- 206 A. J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Wiley, New York (1980).
- 207 J. C. Imbeaux, J. M. Savea, J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem 44 (1973) 169–187.
- 208 H. Bartsch, A. Eiper, H. Kopelent-Frank, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 531–541.
- 209 H. Tománková., J. Sabartová., Chromatographia 28 (1989) 197–202.
- 210 M. Ikonen, L. Murtomaki, K. Kontturi, J. Electroanal. Chem. 602 (2007) 189–194.

-
- 211 J. Osteryoung, *Microelectrodes: Theory and Applications*, Vol. 197, (Eds: M. I. Montenegro, M. A. Queiros, J. L. Daschbach), NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht, (1990).
- 212 L. N. Ribeiro, M. Franz-Monta, M. C. Breitzkreitz, A. C. Alcântara, S. R. Castro, V.A. Guilherme, R. M. Barbosa, *Eur. J. Pharm Sci.*:93 (2016) 192–202.
- 213 M. F. Pinto, C. Costa Moura, C. Nunes, M. A. Segundo, S. A. Costa Lima, S. Reis, *Int. J. Pharm* 477 (2014) 519–526.
- 214 N. Dan, *J. Food Eng.* 171 (2016) 37-43.
- 215 A. Zur Muhlen, C. Schwarz, W. Mehnert, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 149–155.
- 216 E. Lasón, E. Sikora, J. Ogonowski, M. Tabaszewska, Ł. Skoczylas, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 510 (2016) 87–92.
- 217 R. Cortesi, E. Esposito, M. Drechsler, G. Pavoni, I. Cacciatore, M. Sguizzato, A. Di Stefano, *Mater. Sci. Eng. C.* 72 (2017) 168–176.
- 218 S. E. Leea, J. K. Lee, W. S. Jang, T. H. Kim, A. Tunsirikongkon, J. S. Choi, J. S. Park, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 508 (2016) 294–300.
- 219 B. Sun, C. Luo, L. Lia, M. Wang, Y. Du, D. Di, D. Zhang, G. Ren, X. Pan, Q. Fu, J. Sun, Z. He, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 143 (2016) 47–55.

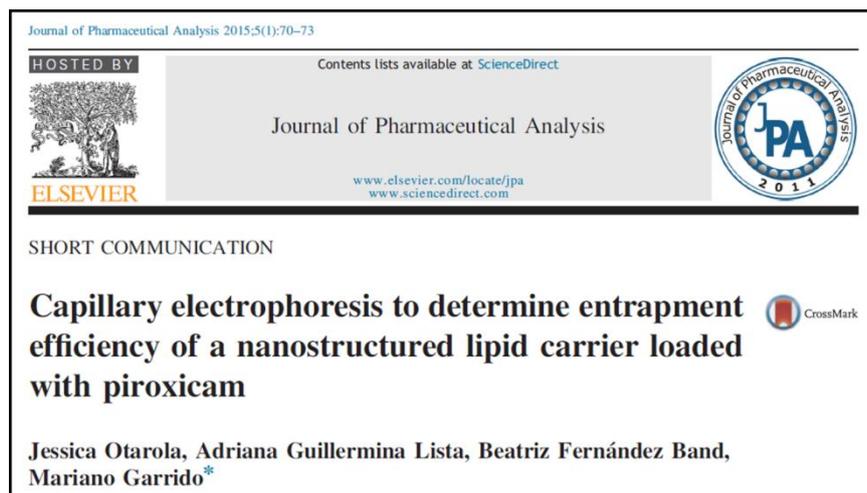
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



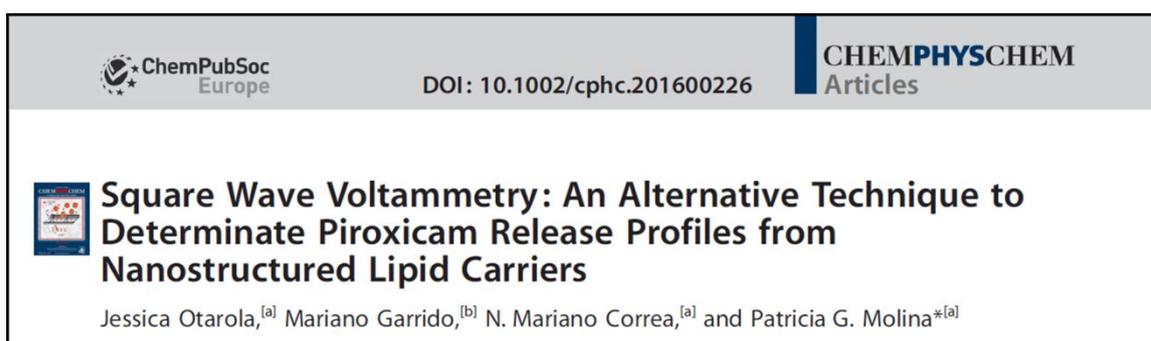
7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones en revistas internacionales con referato

- *Capillary electrophoresis to determine entrapment efficiency of a nanostructured lipid carrier loaded with piroxicam.* J. Otarola, A. G. Lista, B. Fernández Band, M. Garrido. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5 (2015) 70–73.



- *Square wave voltammetry: An alternative technique to determinate piroxicam release profiles from nanostructured lipid carriers.* J. Otarola, M. Garrido, N. M. Correa, P. G. Molina. *ChemPhysChem* 17 (2016) 2322 – 2328.



Presentaciones en Congresos

- IX Congreso Argentino de Química Analítica. Presentación de trabajo: “*Estudio in vitro de permeación de Piroxicam incorporado en gel de Nanopartículas Lipídicas utilizando voltamperometría de onda cuadrada*”. Modalidad póster. Autores: J.

Otarola, A. Cobo Solis, M. Garrido, N. M. Correa, P.G. Molina. Río Cuarto, Córdoba . 7 al 10 de Noviembre de 2017.

- VIII Congreso Argentino de Química Analítica. Presentación de trabajo: “*Estudio de liberación de Piroxicam incorporado en Nanopartículas Lipídicas utilizando voltamperometría de onda cuadrada*”. Modalidad póster. Autores: J. Otarola, P. G. Molina, M. Garrido, N. M. Correa. La Plata, Buenos Aires. 3 al 6 de Noviembre de 2015.
- XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Presentación de trabajo: “Portadores lipídicos nanoestructurados para vehiculización de piroxicam”. Modalidad póster. Autores: J. Otarola, M. Garrido, N. M. Correa. Ciudad de Buenos Aires. Buenos Aires. 12 al 15 de Abril de 2015.
- XXIX Congreso Argentino de Química. Presentación de trabajo: “Sistemas portadores de fármacos basados en portadores lipídicos nanoestructurados para vehiculización de piroxicam”. Modalidad póster. Autores: J. Otarola, B. S. Fernández Band, M. Garrido. Mar del Plata, Buenos Aires. 3 al 5 de octubre de 2012.