

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas e Ingeniería



**Nanopartículas de Oleato de Propranolol para la Liberación
Transdermal del Fármaco**

Tesis que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M.C. Paola Cervantes Covarrubias

Director de tesis:

Dra. Aracely Serrano Medina

Codirector de tesis:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana, Baja California, México. Enero de 2021

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 302

Tijuana, B. C., a 1 de Diciembre del 2020

C. Paola Cervantes Covarrubias
Pasante de: Doctor en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

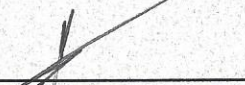
Es propuesto, por los C.C. Dra. Aracely Serrano Medina

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema Nanopartículas de Oleato de Propranolol para la Liberación
Transdermal del Fármaco.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

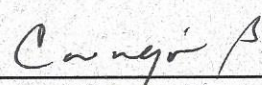
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- TEORÍA GENERAL
- III.- METODOLOGÍA
- IV.- RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES

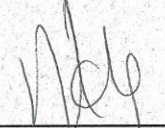

Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co- Director de Tesis


pa
Dr. José Luis González Vázquez
Director


Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Directora

Dedicatoria

A mi grupo de trabajo para mantener una línea de investigación y a mi familia por su apoyo.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a todas las personas e instituciones que hicieron posible este proyecto de investigación

A mi directora de tesis la Dra. Aracely Serrano Medina y Co-director Dr. José Manuel Cornejo Bravo por ser mis tutores y ver por mí en todo este camino académico, su tiempo, disposición y recursos para lograr culminar el presente proyecto. Mi sincero agradecimiento ya que en las dificultades donde parecía no haber resultados favorables para esta nueva investigación se mantuvieron profesionales respetuosos y optimistas de mí.

Gracias por compartir sus conocimientos a todo el comité de tesis Dra Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo, Dr. Iván Córdova Guerrero y Dr. Luis Jesús Villareal Gómez.

A la Dra. Kenia Palomino, Dr. Héctor Magaña, Dr. Ignacio Rivera por su apoyo con técnicas vitales en este proyecto.

A todos mis compañeros de posgrado, todo el equipo de trabajo de biofarmacia, maestros y alumnos gracias por resolver dudas, por su tiempo sus conocimientos.

A la Universidad Autónoma de Baja California por darme el espacio para desarrollar este proyecto, a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por proveerme de instalaciones y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por proveer económicamente con beca de estudios.

Índice de contenido

Hoja de aprobación	II
Dedicatoria	III
Agradecimientos.....	IV
Índice de contenido.....	V
Lista de símbolos y abreviaturas.....	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
ANTECEDENTES	4
JUSTIFICACIÓN.....	8
1.1. <i>Hipótesis alternativa:</i>	10
1.2. <i>Objetivo general:</i>	10
1.3. <i>Objetivos específicos:</i>	11
II. TEORIA GENERAL.....	12
2.1. <i>Hemangiomas infantiles</i>	13
Patogénesis de los HI	13
Epidemiología y factores de riesgo.....	14
Manifestaciones clínicas	14
Clasificación de los HI	16
Complicaciones y pronóstico	16
2.2. <i>Tratamiento de los Hemangiomas infantiles</i>	17
Tratamiento Farmacológico.....	17
Tratamiento quirúrgico.....	21
2.3. <i>Propranolol</i>	22
Generalidades de propranolol	22
Propiedades fisicoquímicas	23
Farmacocinética de propranolol.....	24
Tratamiento con propranolol	24
Mecanismo de acción de propranolol en HI.....	25
Efectos adversos y contraindicaciones de propranolol	26
2.4. <i>Anatomía y fisiología de la piel</i>	27

Epidermis.....	29
Dermis	30
2.5. <i>Propiedades de la barrera de la piel.....</i>	30
2.6. <i>Rutas de absorción transdermal.....</i>	31
Ruta Intercelular	31
Ruta Transcelular	32
2.7. <i>Sistemas nanoparticulados lipídicos de liberación de fármacos</i>	32
Nanopartículas lipídicas.....	33
Acarreadores lipídicos nano estructurados.....	35
2.8. <i>Fundamentos de los métodos de análisis.....</i>	35
Calorimetría diferencial de barrido	35
Cromatografía líquida de alta resolución	36
Dispersión de luz dinámica.....	36
Espectrofotómetro FT IR.....	36
Espectrofotómetro UV-Vis.....	37
III. METODOLOGÍA.....	38
3.1. <i>Materiales</i>	39
3.2. <i>Formación del oleato de propranolol a partir de clorhidrato de propranolol y la sal potásica del ácido oleico40</i>	
3.3. <i>Caracterización de la sal oleato de propranolol.....</i>	42
Determinación de % de rendimiento.....	42
Cuantificación de contenido de fármaco en la sal lipídica.....	42
Espectrofotómetro FT IR.....	44
Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	44
3.4. <i>Diseño experimental.....</i>	44
3.5. <i>Preparación de nanopartículas lipídicas mediante la adaptación del método de emulsión-difusión</i>	46
Prueba de solubilidad de la sal lipídica en diferentes solventes	46
Preparación de NPs mediante adaptación de método emulsión-difusión	47
Purificación mediante método de centrifugación con membrana.....	48
Liofilización	49
3.6. <i>Caracterización de NPs de oleato de propranolol</i>	49
Reconstitución	49
Determinación del tamaño de partícula por DLS.....	49
Microscopía electrónica de barrido.....	50
Calorimetría diferencial de barrido	50
Eficiencia de encapsulación	50
Estudio de estabilidad de NPs con respecto al tiempo.....	51
3.7. <i>Estudios de liberación in vitro.....</i>	51
3.8. <i>Estudios de permeabilidad</i>	52
Preparación de la membrana	52

3.9. Estudio de citotoxicidad de las nanopartículas	53
3.10. Curvas estándar de propranolol	54
Método espectrofotométrico UV-Vis	54
Método cromatografía líquida de alta resolución	55
3.11. Análisis de datos.....	54
IV. RESULTADOS	58
4.1. Formación del oleato de propranolol	59
4.2. Caracterización del oleato de propranolol	60
Determinación de contenido de fármaco.....	60
Espectrofotómetro FT IR.....	61
Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	63
4.3. Caracterización de NPs de oleato de propranolol	64
Determinación de apariencia física de las formulaciones	64
Determinación del tamaño de partícula por DLS.....	67
DSC 68	
Eficiencia de encapsulación y cargado de fármaco	69
Estudio de estabilidad de NPs con respecto al tiempo.....	72
4.4. Optimización de la formulación de NPs.....	73
4.5. Estudios de liberación invitro.....	77
4.6. Estudios de permeabilidad	78
4.7. Estudio de citotoxicidad de las nanopartículas	78
V. CONCLUSIÓN	84
REFERENCIAS.....	87

Lista de símbolos y abreviaturas

AAP	Academia Americana de Pediatría
NLC	Acarreadores lipídicos nano estructurados
EtOAc	Acetato de etilo
MeOAc	Acetato de metilo
PLGA	Ácido polilactico glicolico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
IPA	Alcohol isopropílico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
HLB	Balance lipofílico hidrofílico
PBS	Buffer salino de fosfatos
DL	Cargado de fármaco
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Dh	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EE	Eficiencia de encapsulación
SC	Estrato corneo
EtOH	Etanol
FA	Fase acuosa
FI	Fase interna
Fig.	Figura
°C	Grados centígrados
HI	Hemangioma Infantil
HEC	Hidroxietilcelulosa
Hr	Horas
PDI	Índice de polidispersidad

IR	Índice de refracción
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INC	Instituto Nacional del Cáncer
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
kDa	Kilodalton
FESEM	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
Nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
OMS	Organización mundial de la salud
W	Peso
Mw	Peso molecular
MWCO	Peso molecular límite
PVA	Polivinil alcohol
% w/w	Porcentaje peso/peso
%w/v	Porcentaje peso/volumen
pH	Potencial de hidrogeno
pKa	Potencial de la constante de acides
TRP	Potencial transitorio del receptor
rpm	Revoluciones por minuto
SL	Sal lipídica
SN	Sistema nervioso

SNC	Sistema nervioso central
SC	Subcutánea
RT	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
Vis	Visible

Lista de figuras

Figura 1 Características fisiológicas de un tumor vascular (Kobayashi, Watanabe, & Choyke, 2014).....	13
Figura 2 Estructura molecular de propranolol clorhidrato	23
Figura 3 Anatomía de la piel. Muestra la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo.....	28
Figura 7 Solubilidad de la sal lipídica en disolventes. Agua, PBS, IPA, MeOAc y EtOAc de izquierda a derecha respectivamente.	60
Figura 8 Espectro infrarrojo de propranolol y oleato de potasio.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9 Espectro infrarrojo de la sal lipídica oleato de propranolol ..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10 Calorimetría diferencial de barrido de propranolol HCl, referencias y sal lipídica	64
Figura 11 Formulación en fresco de NPs. Preparadas con IPA, MeOAc, EtOAc respectivamente. 1% PVA, 2 % de Tween en FA y 100 mg de sal lipídica en FI se mantuvieron constantes.	66
Figura 12 Formulación en fresco de NPs. Preparadas con EtOAc (2% PVA), IPA (1% PVA) y mezcla de EtOAc:IPA (2:3 % PVA:Tween 80) respectivamente.	67
Figura 13 Calorimetría diferencial de barrido de propranolol clorhidrato y NPs preparadas con sal lipídica	69
Figura 14 Grafica de efectos principales para eficiencia de encapsulación	72
Figura 15 Diagrama de Pareto estandarizado para Tamaño	¡Error! Marcador no definido.
Figura 16 Grafico de efectos principales para tamaño	75
Figura 17 Grafico de superficie de respuesta estimada	76
Figura 18 Análisis para cuantificar la fracción liberada de propranolol en bolsa MWCO 12-14 KDa medio PBS pH:7.4. método cromatográfico UV	77

Figura 19 Análisis para cuantificar la fracción liberada de propranolol en celda Franz medio PBS pH:7.4. método HPLC	78
Figura 20 Porcentaje de viabilidad celular en línea HeLa, evaluación de NPs vs propranolol HCl.....	79
Figura 21 Porcentaje de viabilidad celular en línea 3T3, evaluación de NPs vs propranolol HCl.....	80
Figura 4 Curva estándar de propranolol en agua método espectrofotométrico.....	¡Error!
	Marcador no definido.
Figura 5 Curva estándar de propranolol en PBS pH 7.4 método espectrofotométrico	82
Figura 6 Curva estándar de propranolol en PBS método cromatográfico	83

Lista de tablas

Tabla 1 Efectos adversos asociados a propranolol oral en pacientes con HI (n=1839)	26
Tabla 2 Descripción de factores experimentales en diseño factorial 3^2	44
Tabla 3 Tabla de datos de experimentos del diseño factorial.....	45
Tabla 4 Seguimiento de rondas para la purificación de NPs con unidades PALL.....	48
Tabla 5 Diluciones de curva estándar.....	54
Tabla 8 Gradientes de método cromatográfico.....	55
Tabla 9 Diluciones para curva HPLC.....	56
Tabla 11 Determinación de % de rendimiento de formación de sal lipídica.....	59
Tabla 12 Determinación de la solubilidad de oleato de propranolol en diferentes disolventes	59
Tabla 13 Composición de las formulaciones preliminares de NPs. Muestra la apariencia cualitativa de las formulaciones frescas	64
Tabla 14 Tamaño de partícula al día 1 de muestras preparadas (2:1) PVA:Teen y fase orgánica con 25% IPA, se muestra el tamaño y PDI promedio \pm desviación estándar	67
Tabla 15 Cargado de fármaco y eficiencia de encapsulación de las corridas 1 a 9.....	70
Tabla 16 Análisis de tamaño para estabilidad de NPs con respecto al tiempo.....	72
Tabla 17 Análisis de Varianza para Tamaño.....	73
Tabla 6 Absorbancias de curva estándar de propranolol en agua método espectrofotométrico UV.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 7 Absorbancias de curva estándar de propranolol en PBS método espectrofotométrico UV.....	82
Tabla 10 Mili unidades de absorbancia por minuto de curva estándar de propranolol en PBS método cromatográfico	83

I. INTRODUCCIÓN

Las rutas más comunes de liberación de fármacos son la vía oral y parenteral, la ruta oral tiene la ventaja de poder predeterminar la dosis, es portable y autoadministrable, por estas razones la vía oral es de las más convenientes y accesibles para liberar fármacos (Alkilani et al., 2015), sin embargo, algunos fármacos pueden tener una rápida degradación en el estómago, entre otros factores que influyen el proceso de absorción intestinal, adicionalmente el fármaco puede ser eliminado por metabolismo de primer paso reflejándose en una baja biodisponibilidad (Gaur et al., 2013; Kraisit et al., 2018). Entre las rutas parenterales como la vía subcutánea (SC), intramuscular (IM) e intravenosa (IV), el modo primario de administración es a través de métodos invasivos que pueden generar dolor y una baja aceptación por parte del paciente, adicionalmente para algunos métodos se requiere entrenamiento de administración (Goyal et al., 2018; Spahn & Szeftl, 2008). La liberación transdermal de fármacos es un método indoloro que puede liberar fármacos sistemáticamente por aplicación de la formulación sobre la piel pudiendo tener ventajas sobre las rutas convencionales (Alkilani et al., 2015; Savard & Gosselin, 2006). Propranolol un fármaco beta-bloqueador establecido como primera línea de tratamiento para los hemangiomas infantiles según la

Academia Americana de Pediatría ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su sigla en inglés) en una sola presentación infantil llamada Hemangeol®, desafortunadamente no existe otra vía de administración para este producto que pueda tener las mismas ventajas del fármaco, pero sin el riesgo de los indeseables efectos secundarios que son comunes en el 33 % de los pacientes que reciben tratamiento. Por lo tanto, es de vital importancia la investigación de nuevos sistemas de liberación que permitan la

entrega de propranolol en el sitio de acción con la ventaja de evitar las reacciones adversas que conlleva una administración sistémica y manteniendo la misma acción farmacológica sobre el hemangioma. Al formular el fármaco deseado en un vehículo que permita su paso a través de las barreras naturales de la piel, llevando alta carga de droga al sitio blanco (Förster et al., 2009), será posible una alternativa de tratamiento para aquellos pacientes que presentan los indeseados efectos adversos.

ANTECEDENTES

Propranolol un fármaco beta bloqueador ha sido objeto de estudio en el tratamiento de hemangioma infantil (HI) debido a que se observó fortuitamente un efecto no reportado en dos pacientes tratados vía oral por problemas cardiovasculares, destacando una mejoría en la coloración y tamaño del hemangioma, que después corroboraron los investigadores con nueve pacientes mas (Léauté-Labrèze et al., 2008); posteriormente diversos casos de estudio fueron presentados con resultados satisfactorios (Babiak-Choroszczak et al., 2019; Jamshidian-Tehrani et al., 2019; Yang et al., 2019; Yu et al., 2019) y múltiples investigadores presentaron interés también en reportar los efectos adversos asociados a propranolol (Al-Haddad et al., 2019; Léaute-Labrèze et al., 2016); adicionalmente se observó que los hemangiomas infantiles los cuales afectan cerca del 5 % de infantes (Krowchuk et al., 2019), pueden ser tratados efectivamente con seguridad utilizando beta-bloqueadores de forma local (Cheirif-Wolosky et al., 2019; Mannschreck et al., 2019), generando así una oportunidad de investigación con el objetivo de minimizar los efectos adversos siendo la forma tópica o un beta bloqueador selectivo la posible solución (Mannschreck et al., 2019).

De acuerdo a la guía práctica clínica de la Academia Americana de Pediatría (Krowchuk et al., 2019) para el manejo de hemangiomas infantiles, se consideran de alto riesgo si hay evidencia o potencial de (1) complicaciones potencialmente mortales, (2) ulceración o deterioro funcional, (3) anomalías estructurales o (4)

desfiguración permanente. Las características de estas evidencias son presentadas en el Capítulo II Teoría general.

A continuación, se describen algunos sistemas de liberación de fármacos con beta-bloqueadores que han sido desarrollados en los últimos 5 años, los principales puntos a detallar son el sistema o formulación desarrollado, en que matriz se elaboró, bajo que método, con que fármaco, que tamaño y eficiencia de encapsulación se obtuvo.

(Wu et al., 2019) Desarrollo NPs de silica mesoporosa-propranolol para el tratamiento de hemangiomas infantiles, las NPs primarias fueron después tratadas con PVA para formar NPs silica mesoporosa-propranolol-PVA, con una eficiencia de encapsulación de $58.8 \% \pm 7.2\%$, de tamaño promedio de 140 nm bajo el método de co-condensación directa y adsorción física.

(Kelchen & Brogden, 2018) Desarrollaron cuatro microemulsiones-propranolol, cuantificando concentraciones de propranolol en la piel y permeación de fármaco comparando con una solución PBS que contiene al fármaco disuelto, ellos encontraron que la solubilidad de propranolol fue significativamente mayor en las micro emulsiones vs PBS. El fármaco acumulado liberado proveniente de micro emulsiones a las 24 h estuvo en un rango de 13 a 26% y el tamaño de 23.5 - 92.5 nm.

(Casiraghi et al., 2016) Evaluaron la adhesión de clorhidrato de propranolol en un vehículo semisólido, encontraron que clorhidrato de propranolol es factible para permear a la epidermis, esta penetración está influenciada por la composición del vehículo semisólido, en la comparación de crema base lipofílica vs hidrofílica, se

obtuvieron mejores resultados usando la crema hidrofílica y se evidenció que la epidermis actúa como reservorio del fármaco.

Se reporta la elaboración de NPs con concentraciones bajas del estabilizador PVA [1-2% w/v] en NPs elaboradas con ácido esteárico, gliceril monoestearato o Compitrol ATO 888 (Priyanka & Sathali, 2012) o 2 % de PVA para NPs de PLGA (Shi et al., 2015) y concentraciones de Tween 80 al 3% v/v (Katas et al., 2009).

JUSTIFICACIÓN

Propranolol se ha establecido como fármaco de primera elección para el tratamiento de hemangiomas infantiles de acuerdo a la Academia América de Pediatría. Hasta el momento solo una presentación administrada por vía oral ha sido desarrollada y aprobada por la FDA. El alto índice de incidencia de los hemangiomas y en apego a las líneas clínicas de utilizar propranolol como primera línea de tratamiento a generado la necesidad de investigación para desarrollar nuevos sistemas que permitan cubrir la demanda con eficacia y a la menor incidencia de los pocos, pero severos efectos adversos asociados a la administración de propranolol por vía sistémica. Por lo que es necesario desarrollar opciones para aquellos pacientes que pueden presentar potenciales reacciones adversas tras la administración de propranolol y otros beta-bloqueadores por vía oral en infantes con hemangioma, se ha propuesto la administración de estos medicamentos en forma tópica resaltando que la incorporación de propranolol en un vehículo de tipo oleoso que pueda ser altamente cargado y fácil de administrar resultara en una alta concentración de fármaco en el sitio blanco con los efectos farmacológicos deseados y la evasión de reacciones adversas asociadas con la vía oral. Para esto es de vital importancia desarrollar un sistema fácil de escalar con un

método sencillo y eficiente como lo es el método de emulsión difusión de solvente a temperatura ambiente.

Existen estudios recientes sobre la formulación de propranolol y otros antihipertensivos, estudiándose la permeabilidad de los fármacos en la piel, encontrándose resultados satisfactorios (Chantasart et al., 2013).

Por otra parte, las nanopartículas sólidas lipídicas en las cuales el fármaco se incorpora en un vehículo de tipo oleoso han resultado una excelente estrategia para aumentar la permeabilidad cutánea de diversos fármacos. La principal ventaja de estos acarreadores es que tienden a retenerse en el folículo piloso propiciando la penetración del fármaco (Prow et al., 2011).

En este contexto se evalúa la formación de un conjugado lipídico a base de ácidos grasos formulado en nanopartícula lipídica para propiciar la entrada de propranolol a capas profundas de la piel con la seguridad de evitar efectos adversos. Este sistema nano acarreador se elabora a partir de la conjugación de clorhidrato de propranolol con la sal potásica del ácido oleico, el producto lipofílico es elaborado como nanopartícula mediante el método emulsión-difusión de solvente a

temperatura ambiente en orden de generar partículas altamente cargadas que pueden penetrar las capilaridades del hemangioma.

1.1. Hipótesis alternativa:

$$H_1 = K_p \text{propranolol libre} \neq K_p \text{propranolol en nanopartícula}$$

H₁: Hipotesis alternativa

K_p: Constante de permeabilidad

La sal oleato de propranolol formulado como nanopartícula sólida lipídica administrada en un hidrogel tiene diferente permeabilidad en piel que el clorhidrato de propranolol administrado en piel disperso en el hidrogel.

1.2. Objetivo general:

Obtener nanopartículas de oleato de propranolol mediante el método adaptado de emulsión-difusión de solvente a temperatura ambiente, incorporarlas en un

hidrogel y estudiar la permeabilidad del fármaco en la piel para aplicaciones transdermales.

1.3. Objetivos específicos:

- Preparar el oleato de propranolol a partir de clorhidrato de propranolol y la sal de potasio del ácido oleico
- Caracterizar el compuesto oleato del propranolol por espectrofotómetro FT IR, y comparar con el clorhidrato de propranolol por el mismo método.
- Preparar NPs lipídicas mediante la adaptación del método de emulsión-difusión de solvente a temperatura ambiente.
- Optimizar la formulación de nanopartículas en dos principales variables tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación. Aplicar un diseño experimental para la optimización.
- Determinar diámetro hidrodinámico de las nanopartículas con técnica de DLS y evaluar morfología con técnica FESEM.
- Estudiar la estabilidad de las nanopartículas con respecto al tiempo mediante medición de tamaño de partícula y PDI
- Determinar cargado de propranolol y eficiencia de encapsulación mediante HPLC
- Evaluar la dispersión del fármaco por calorimetría diferencial de barrido
- Evaluar la liberación *ex-vivo* del propranolol en celda Franz en piel humana
- Estudiar la toxicidad de las NPs en línea celular con el método MTT

II. TEORIA GENERAL

2.1. Hemangiomas infantiles

Los hemangiomas son tumores vasculares formados por masas derivadas de la formación anormal de vasos sanguíneos o capilares no diferenciados, en la figura 1 se observan las características fisiológicas de un tumor vascular. En los tumores, el crecimiento agresivo de la población celular neoplásica y la sobreexpresión asociada de factores pro-angiogénicos conduce al desarrollo de redes de vasos sanguíneos desorganizados que son fundamentalmente diferentes de la vasculatura normal. Los vasos sanguíneos son de diámetro inconsistente y forma irregular con protuberancias anormales (Castaneda et al., 2016).

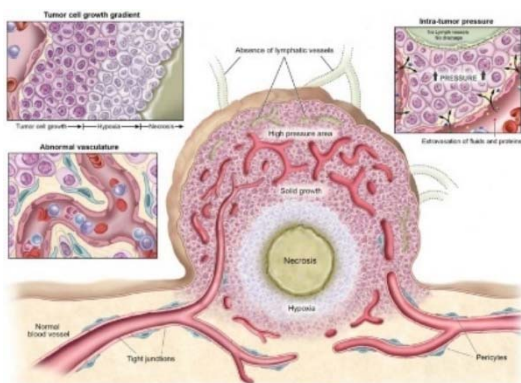


Figura 1 Características fisiológicas de un tumor vascular (Kobayashi et al., 2014).

Patogénesis de los HI

Los HI surgen de células madre endoteliales y luego proliferan por vasculogenesis (Lee & Bercovitch, 2013).

Transportador-1 de glucosa (GLUT-1) es una proteína transportadora de glucosa de tipo-eritrocito que a sido identificada como un marcador altamente selectivo de HI en todos los estados comparado con otras malformaciones vasculares (Smith et al., 2017). GLUT-1 se ha convertido en un marcador histológico

de gran utilidad para diferenciar aquellos casos en que el diagnóstico clínico es difícil.

Observaciones clínicas sugieren que los HI son desencadenados y mantenidos por hipoxia como consecuencia de eventos maternos que crean estrés hipóxico, ya que los factores inducidos por la hipoxia (factor-1-alpha (HIF-1a), factor A de crecimiento endotelial (VEGF-A) y factor 2 de insulina (IGF-2)) son cruciales para la vasculogenesis observada en los HI (Rotter & de Oliveira, 2017; Smith et al., 2017).

Epidemiología y factores de riesgo

Las lesiones son raramente detectables al nacer, pero se vuelven evidentes durante la fase proliferativa cuatro semanas después y continúan creciendo rápidamente hasta una edad media de 3.2 meses. Son más comunes en mujeres caucásicas y de bajo peso al nacer. 50 y 70 % tiene una regresión espontánea a los 5 y 7 años respectivamente (Lou et al., 2018).

Manifestaciones clínicas

Los HI comienzan a aparecer durante las primeras semanas de vida, ya sea en forma de lesiones como telangiectasias o un área de palidez. La evolución del

HI varía; pueden transformarse en lesiones rojas pequeñas brillantes, o en tumores grandes y voluminosos (Léauté-Labrèze et al., 2008).

En su historia natural los HI constan de tres fases: inicial, proliferativa e involución.

Fase inicial: Se presenta en las primeras semanas de vida, se manifiestan como zonas pálidas, telangiectasias, máculas rosadas, micropápulas rojizas agrupadas o úlceras, no causan ningún daño debido a su dimensión pequeña.

Fase proliferativa: se desarrolla entre la cuarta y sexta semana de vida; caracterizándose por un aumento de tamaño, y se transforman en pápulas, nódulos o tumores de color rojo intenso. Durante esta fase pueden duplicar o triplicar su tamaño, lo que ocasiona que puedan presentarse complicaciones posteriores, afectando al paciente. Su duración es variable, con un promedio de 3 a 18 meses.

Fase involutiva: es la última fase, los signos indicativos de regresión son la aparición de tractos fibrosos blanquecinos en su superficie y de una coloración gris o rosada. La duración es variable, siendo esta fase la de mayor duración, con un tiempo promedio de 5 a 10 años. Los hemangiomas localizados en la punta nasal, los labios y la zona parotídea involucionan con más lentitud. En general, los que

más tardan en involucionar suelen dar lugar a una lesión residual del tamaño inicial (McGuinness SM., 2011).

Clasificación de los HI

El aspecto clínico de los hemangiomas depende de la profundidad a la que se sitúen, con base en esto se dividen en hemangiomas superficiales, profundos y mixtos.

Los hemangiomas superficiales se localizan por encima de la dermis y son visibles en la piel, los profundos están extendidos sobre el tejido subcutáneo Los hemangiomas mixtos surgen de la combinación de superficiales y profundos. Pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero la mayoría de los casos afecta a la cabeza y cuello (40% en rostro y 20% en cuello). Otras áreas comprometidas en orden de frecuencia son tronco, miembros inferiores y miembros superiores, mucosas orales y genitales (Lou et al., 2018).

Complicaciones y pronóstico

La mayoría de los HI se presenta sin complicaciones y no requieren tratamiento. La ulceración es la complicación más frecuente de los hemangiomas de la infancia, con una incidencia oscila entre el 5-13% de los casos. Sin embargo, dependiendo la ubicación pueden conducir a un deterioro visual, obstrucción aérea o desfiguraciones permanentes y pueden dar lugar a una cantidad significativa de morbilidad (Haggstrom et al., 2007). Debido al riesgo de las complicaciones, 10 al 15 de los hemangiomas requiere tratamiento. La mayoría de los hemangiomas no

tratados involucionan espontáneamente, pero cambios residuales en la piel como telangiectasia, fibroblastos y laxitud de la piel comúnmente ocurren.

2.2. Tratamiento de los Hemangiomas infantiles

Las indicaciones para el tratamiento después de la identificación del HI de alto riesgo son propranolol como primera elección para HI que requieren tratamiento sistémico, a una dosis de entre 2-3 mg/Kg por día, a menos que haya comorbilidades o efectos adversos que requieran disminuir la dosis o contraindicaciones o respuesta inadecuada a propranolol que requiera utilizar otro fármaco. El tratamiento está indicado para cualquier infante con HI que obstruya estructuras vitales como la vía aérea o la vía visual, hemangiomas ulcerados sintomáticos, hemangiomas hepáticos complejos, lesiones asintomáticas que continúan creciendo en tamaño, lesiones de la cara media que amenazan con desfiguración permanente, o lesiones grandes que causan sobrecarga cardíaca (Lee & Bercovitch, 2013). Una cuidadosa consideración de los riesgos potenciales de efectos adversos en contra de los beneficios se lleva a cabo antes de iniciar el tratamiento. Una vez tomada la decisión de tratar el HI, se pueden seleccionar terapias farmacológicas, quirúrgicas y no invasivas.(Sánchez-Carpintero et al., 2011)

Tratamiento Farmacológico

Anteriormente el tratamiento de los Hemangiomas infantiles en los años 60s se inició con terapia sistémica e intralesional de esteroides como prednisolona, en los años 80s y cercano a los 90s interferón alfa se administró como alternativa a lo HI resistentes a esteroides, posteriormente en 2008 propranolol fue efectivo y bien tolerado para el manejo de HI (Darrow et al., 2015). Actualmente la farmacoterapia

propuesta por la AAP consiste en el uso de propranolol como agente de primera línea para HI que requieren tratamiento sistémico, puede ser prescrito prednisolona o prednisona si hay contraindicación o inadecuada respuesta a propranolol, puede ser recomendado inyección intralesional de triamcinolona y/o betametasona para el tratamiento focal; en HI voluminosos en fase proliferativa o localizados en ciertas ubicaciones anatómicas críticas (ej. Labios) es recomendado maleato de timolol tópico como terapia para HI delgados y/superficiales (Krowchuk et al., 2019).

A continuación, se resume información de los diferentes tratamientos farmacológicos empleados para tratar hemangiomas infantiles y sus principales efectos adversos.

A. Corticosteroides orales

Los corticosteroides sistémicos fueron previamente utilizados como terapia de línea principal para los hemangiomas desde la década de 1960. El rol de los corticoesteroides es ahora limitado a pacientes con contraindicación de beta-bloqueadores o en pacientes que la terapia sistémica con estos falló (Luu & Frieden, 2013). La mayoría de los niños reciben una dosis de 2-3 mg/kg/día por la mañana de prednisolona durante la fase proliferativa y el curso del tratamiento continúa por 6 a 12 meses o más dependiendo de la respuesta de la lesión, un tercio de los pacientes experimenta regresión, otro tercio se mantiene estable y el último no muestra respuesta. El tratamiento sistémico puede ser efectivo para hemangiomas de alto riesgo, pero la respuesta es variable y los efectos adversos son considerables y potencialmente de alto riesgo. Una vez que se logra la respuesta al tratamiento, se debe iniciar una disminución gradual a los esteroides, ya que la

interrupción brusca del tratamiento puede provocar una crisis suprarrenal o una proliferación de rebote del hemangioma (Satterfield & Chambers, 2019).

Otros efectos adversos de los glucocorticoides sistémicos incluyen ulceración gastrointestinal, insomnio, síndrome de Cushing, retraso en crecimiento, resistencia a insulina, dispepsia y aumento del riesgo de infecciones debidas a la inmunosupresión. El mecanismo de acción exacto es aún desconocido en hemangiomas, pero los corticosteroides han mostrado interrupción de la vasculogenesis por inhibición de la expresión del factor A de crecimiento en el endotelio vascular (Satterfield & Chambers, 2019).

B. Los corticoides intralesionales y tópicos

Se consideran como una alternativa de tratamiento para hemangiomas más pequeños (menores a 25 mm) y superficiales. Se ha reportado respuesta al tratamiento de hasta 90%. Las dosis recomendadas no exceden 3 a 5 mg/kg y las sesiones se realizan en intervalos de seis a ocho semanas. Los efectos adversos de la terapia intralesional son la embolización y oclusión de arteria central de la retina, atrofia subcutánea grasa, necrosis epidérmica y despigmentación del área tratada.

C. El interferón- α

Inhibe el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Se indica en el tratamiento de HI agresivos y resistentes a esteroides con éxito reportado en algunas series hasta en 90% de los pacientes. El compromiso neurológico que puede producir limita su uso para sólo hemangiomas

de alto riesgo cuando otros tratamientos han fallado.(Sánchez-Carpintero et al., 2011)

D. β -bloqueadores

Los β -bloqueadores no selectivos como el propranolol, se han posicionado como primera línea de terapia para estas lesiones suplantando a los corticosteroides, mostrando efectividad para todos los tipos de HI (Lee & Bercovitch, 2013). La administración de otros β -bloqueadores tales como acebutolol, atenolol, nadolol han sido utilizados en estudios posteriores, así como tratamientos tópicos con timolol en forma de gel (Pediatr & Tratamiento, 2011; Sorrell & Chamlin, 2013).

En un estudio de 44 niños con HI en cabeza y cara en fase proliferativa a los cuales se les administro una dosis de 2mg/kg/día de propranolol combinado con 2mg/kg/día de prednisona grupo A y propranolol solo a la misma dosis grupo B, se encontró resultados significativamente diferentes ($P>0.05$) en la decreción del tamaño del tumor, el grupo a fue mejor que grupo b.(Lou et al., 2018)

La mayoría de los dermatólogos utilizan la dosis de 2 mg/kg/día dividido en 2 dosis, formulado en jarabe simple, con agradable sabor. Antes de iniciar el tratamiento se debe realizar una valoración cardiológica y debe prestarse especial atención a los pacientes con problemas bronquiales (Wang, Xia, Zhai, Li, & Li, 2012). Los principales efectos adversos raros pero serios asociados a la distribución

sistémica posterior a la administración por vía oral de propranolol son broncoespasmo, hipotensión e hipoglucemia (Mannschreck et al., 2019).

Hemangeol es el único producto comercial aprobado por la FDA y disponible en mercado para el tratamiento de HI (<https://www.hemangeol.com/hcp/>).

Tratamiento quirúrgico

La AAP recomienda cirugía y/o terapia laser como opciones de tratamiento en el manejo de HI que ulceran, obstruyan o deformen estructuras vitales (como vía aérea o alrededores) o que envuelven áreas sensibles estéticamente. Bajo estas circunstancias el manejo quirúrgico puede ser indicado cuando (1) la lesión no ha mejorado con cuidado local de la herida o farmacoterapia, (2) la lesión está bien localizada y una pronta cirugía puede simplificar la posterior reconstrucción, (3) la lesión está bien localizada en un área anatómica favorable y (4) la escisión probablemente es necesaria en el futuro y la cicatriz resultante sería la misma. La decisión de realizar una cirugía en la infancia debe tener el conocimiento de los riesgos de la anestesia general en este grupo de edad (Krowchuk et al., 2019).

A. Láser Pulsante

El láser pulsante es una alternativa de tratamiento no farmacológico utilizado por décadas para el tratamiento de HI, siendo un método seguro y efectivo removiendo el eritema macular residual y las telangiectasias superficiales en HI evolucionados, pero a menudo requiere varios tratamientos para lograr óptimos resultados. Su profundidad de penetración es de ~ 1 mm, por lo que su uso es exclusivo de los HI superficiales, tratamiento de la ulceración y los efectos residuales (Chen, Eichenfield, & Friedlander, 2012). Los efectos adversos incluyen sangrado, ulceración, cicatrices, atrofia de la piel y cambios en la pigmentación.

Esto genera una controversia si debe o no ser usado la terapia laser en estadios tempranos por ejemplo durante la fase proliferativa ya que se han reportado varios casos que revelan un mayor riesgo de ulceración, cicatrización e hipopigmentación cuando la terapia laser es usada durante este periodo (Krowchuk et al., 2019). Un estudio en 105 pacientes tratados con láser colorante pulsado (PDL) reporto que .4% de los pacientes presento hiperpigmentación, 14% hipopigmentación, y 1% ulceración (Satterfield & Chambers, 2019).

B. Cirugía

De acuerdo a la AAP la cirugía también es una opción de tratamiento importante para los HI que a pesar de la involución han dejado cambios residuales en la piel (p.ej. Piel adelgazada, cicatriz, tejido fibroblastoso,, telangiectasias, y/o deformidades en áreas anatómicas como nariz, oído o labio) (Krowchuk et al., 2019).

2.3. Propranolol

Los fármacos β -bloqueadores son antagonistas de los receptores β -adrenérgicos y bloquean estos receptores en diferentes órganos como el corazón, vasos periféricos, bronquios, páncreas y el hígado.

El propranolol es un agente bloqueador β -adrenérgico no selectivo que inhibe la respuesta a los estímulos adrenérgicos al bloquear competitivamente los receptores adrenérgicos β dentro del miocardio en el plazo de músculo liso vascular bronquial.

Generalidades de propranolol

Propranolol ha sido utilizado por más de 50 años en pacientes pediátricos y adultos para tratamiento de hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, taquicardia

e infarto agudo al miocardio. Las dosis empleadas en pacientes pediátricos van desde los 0.5 hasta 6mg/kg/día.

Propiedades fisicoquímicas

Clorhidrato de propranolol es un sólido blanco cristalino que es fácilmente soluble en agua y etanol >44.4 µg/mL. Su peso molecular es 295.80 g/mol su pKa es de 9.45 y su rango de fusión es de 162~165°C. Compuesto de dos anillos aromáticos un grupo éter, un alcohol, y una amina secundaria. En soluciones acuosas se descompone por la oxidación de la cadena lateral del isopropilamino, acompañada por una reducción en el pH y la posterior decoloración de la solución.

Las soluciones de propranolol más estables se obtienen a un pH entre 3.0 y 3.5 y se descomponen rápidamente en pH alcalino.

Propranolol en su forma no ionizada tiene un peso molecular de 259.34g/mol, un logP= 3.48 , solido con un punto de fusión de 96 °C, solubilidad en agua de 61.7 mg/L a RT, Caco 2 permeabilidad de -4.58, y un pKa de 9.42 (pubchem).

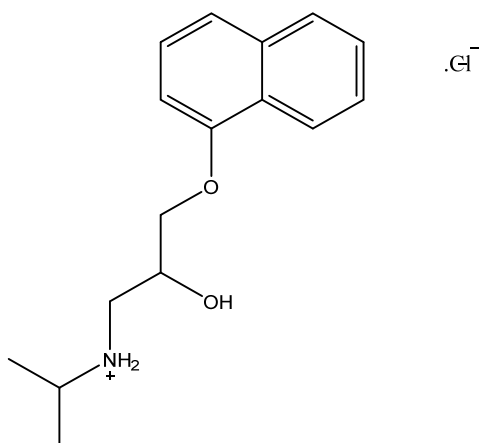


Figura 2 Estructura molecular de propranolol clorhidrato

Farmacocinética de propranolol

- Absorción

Se absorbe casi completamente desde el tracto gastrointestinal, sin embargo, las concentraciones plasmáticas alcanzadas son muy variables entre individuos. Propranolol es altamente lipofílico, se somete a alto metabolismo de primer paso por el hígado y en promedio, sólo alrededor del 25% del fármaco alcanza la circulación sistémica.

- Distribución

Aproximadamente el 90% del fármaco circulante se une a las proteínas plasmáticas. El volumen de distribución es de aproximadamente 4 litros/kg.

- Metabolismo y eliminación

Propranolol se metaboliza a través de tres vías principales: hidroxilación aromática, N-desalquilación y la glucuronidación directa. La vida media plasmática aparente es de aproximadamente 10 horas.

Tratamiento con propranolol

El tratamiento comienza después del diagnóstico y elección del medicamento por parte del médico tratante. Antes de iniciar la terapia ambulatoria, el médico debe

considerar algunos parámetros hemodinámicos basales y estudios como electrocardiograma, toma de presión arterial y frecuencia cardiaca.

Las dosis se basan en la respuesta individual del paciente. Se recomiendan una dosis objetivo de 1-3 mg/kg/día. La terapia ambulatoria se inicia con dosis de 0.5 mg/kg/día dividido en intervalos de 8 horas u 6 horas.

La forma de administración habitual es la vía oral; al no existir comercializado en la mayoría del mundo se indica en fórmula magistral o extemporánea en forma de solución (Sánchez-Carpintero et al., 2011).

Mecanismo de acción de propranolol en HI

a) Vasoconstricción.

Se atribuye a una disminución de la liberación de óxido nítrico, es inmediatamente visible y se traduce en un cambio de coloración asociado a una disminución de la consistencia del hemangioma durante los primeros días de tratamiento, los β -bloqueadores sin efectos alfa-antagonistas, como el propranolol, inhiben la vasodilatación mediada por adrenalina, se contraen los capilares, y reducen el flujo de sangre al hemangioma. Estos efectos se ven dentro de 1-3 días después del inicio de la terapia con propranolol.

b) Disminución de genes proangiogénicos

Existe una disminución de los genes involucrados en el crecimiento de los HI como el bFGF y el VEGF, a través de una reducción de la vía proteína-cinasa RAF mitógeno-activada, provocando un detenimiento en el crecimiento del hemangioma, además propranolol reduce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular, una proteína señal que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos

(angiogénesis) para proliferación del hemangioma, e inhibe la tubulogénesis, lo que impide la angiogénesis de las células endoteliales micro vasculares.

c) Apoptosis

La activación de la apoptosis de las células endoteliales de los capilares, comportando la regresión final del tumor (relacionado con los efectos a largo plazo del propranolol). La apoptosis de células endoteliales se produce principalmente durante la fase de involución y se acelera por el bloqueo beta-adrenérgico (Storch & Hoeger, 2010);(Chen et al., 2012).

Efectos adversos y contraindicaciones de propranolol

En pacientes con HI tratados con propranolol por vía oral los efectos adversos observados se presentan en aproximadamente el 33 % de los pacientes (Yang et al., 2019). El principal efecto adverso asociado al uso de propranolol es alteración del sueño (Darrow et al., 2015; Lee & Bercovitch, 2013; Yang et al., 2019), otros efectos adversos comunes son frescura, acrocianosis, manchas en extremidades distales, diarrea o pérdida de apetito, vomito, hipotensión, vomito y eventos respiratorios incluidos infecciones (Raphael et al., 2016). En casos mas severos, aunque menos frecuente se observaron hipoglicemia, broncoespasmo e hipotensión (Babiak-Choroszczak et al., 2019; Yang et al., 2019). Sin embargo, propranolol contribuye significativamente a la involución de los HI con una alta eficacia y un bajo grado de efectos adversos (Lee & Bercovitch, 2013). Los eventos adversos presentados en un metaanálisis descrito por Yang et. al., 2019, en pacientes con HI se enlistan en la **Tabla 2**.

Tabla 1 Efectos adversos asociados a propranolol oral en pacientes con HI (n=1839)

<i>Evento adverso</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
-----------------------	----------	------------

<i>Diarrea o pérdida de apetito</i>	79	17.5
<i>Desordenes de sueño</i>	78	17.3
<i>Bronquitis, bronquiolitis, hiperactividad bronquial</i>	68	15.1
<i>Vomito</i>	52	11.5
<i>Agitación</i>	45	10.0
<i>Constipación</i>	31	6.7
<i>Manos y pies fríos</i>	29	6.4
<i>Otros</i>	25	5.5
<i>Hipotensión, bradicardia o episodio de desvanecimiento</i>	19	4.2
<i>Somnolencia</i>	13	2.9
<i>Broncoespasmo</i>	7	1.6
<i>Hipoglicemia</i>	3	0.7
<i>Insomnio</i>	2	0.4
<i>Total</i>	451	100

Se encuentra contraindicado el uso de propranolol en pacientes con antecedentes de asma bronquial, insuficiencia cardiaca, y broncoespasmo; por lo que su uso se debe limitar y utilizarse bajo continua supervisión médica en casos en los que sea necesario su uso en este tipo de padecimientos (Drolet et al., 2012).

2.4. Anatomía y fisiología de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, protege contra el calor, la luz solar, las lesiones y las infecciones. Ayuda también a controlar la temperatura del cuerpo y almacena agua, grasa y vitamina D, es la principal barrera que evita el paso de

fármacos de aplicación tópica. La piel tiene varias capas, pero las dos principales son la epidermis (capa superior o externa) y la dermis (capa inferior o interna). (NCI, 2016)

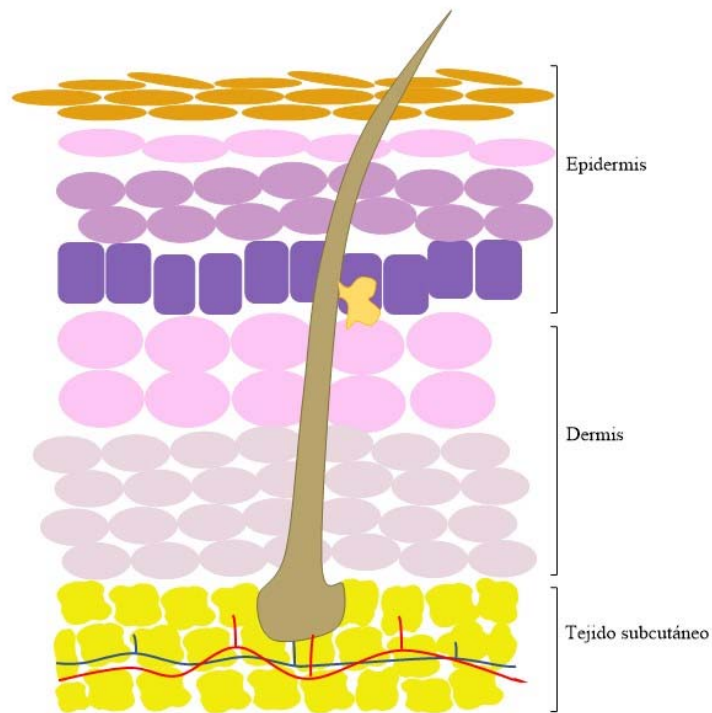


Figura 3 Anatomía de la piel. Muestra la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo.

Epidermis

La epidermis está constituida por un epitelio escamoso que está compuesta de manera general por tres tipos de células:

Células escamosas: células delgadas y planas que forman la capa superior de la epidermis.

Células basales: células redondas debajo de las células escamosas.

Melanocitos: células que elaboran melanina y se encuentran en la parte inferior de la epidermis. La melanina es el pigmento que da su color natural a la piel. (NCI, 2016)

La epidermis se constituye por 4 capas en todas estas la célula más presente es el queratinocito, iniciando por la parte más externa se encuentra el estrato corneo (SC) que consiste en varias capas de corneocitos (muertas y aplanadas) embebidas en una matriz laminar agua:lípido (Manca et al., 2016); después se encuentra la capa granulosa y está constituida por una o varias hileras de células que contienen los gránulos de queratina, por debajo de esta se haya el estrato espinoso que está constituido por múltiples hileras de queratinocitos de citoplasma eosinófilo, aplanados y unidos entre sí por los desmosomas y por último la capa basal es la más profunda constituida por una sola capa de células cuboidales.

También podemos encontrar en la epidermis células de Merkel a nivel de la capa basal y células de Langerhans que tienen la función de presentación

antigénica y están involucradas en una gran variedad de respuestas inmunes por medio de la activación de las células T.

Dermis

La dermis es el soporte de la piel y está formada por fibras de colágeno y elastina que contiene pocos fibroblastos, y finalmente la hipodermis compuesta por fibroblastos, células adiposas y macrófagos (Manca et al., 2016).

Folículo piloso: los orificios foliculares ocupan 0.1% del total del área superficial de la piel (Escobar-Chavez et al., 2012). Entre las principales funciones del pelo está el actuar como un receptor sensible del tacto. Las glándulas sebáceas están también vinculadas con cada folículo piloso y producen una secreción grasosa que ayuda a acondicionar el pelo y la piel circundante (Enciclopedia médica A.D.A.M., 2015).

2.5. Propiedades de la barrera de la piel

Las principales funciones de la piel son evitar la invasión de organismos, actuando como una barrera defensiva a las amenazas del ambiente externo. La piel ha desarrollado mecanismos de defensa: barreras físicas, inmunológica, metabólicas y con protección UV, para inhibir los ataques de microbios, productos químicos tóxicos, radiación UV y material particulado, pudiendo también ser

utilizada como un puerto de entrada para sustancias terapéuticas tales como fármacos y vacunas (Manca et al., 2016).

El SC representa la principal barrera de la piel de modo que, para permear una sustancia, la difusión a través del SC es un paso limitado en la velocidad (Prow et al., 2011).

2.6. Rutas de absorción transdermal

La absorción transdermal de fármacos depende de una variedad de factores incluidos el tamaño de molécula, la permeabilidad de la membrana dada por el sistema de liberación transdermal, el estado de hidratación de la piel, el pH del fármaco, el metabolismo del fármaco por la flora de la piel, la estabilidad de la formulación, la solubilidad del lípido y el SC como reservorio del fármaco (Tanner & Marks, 2008).

Ruta Intercelular

Las regiones interlamelares en el SC, incluyen regiones conectoras con menos lípidos ordenados y más cadenas hidrofóbicas flexibles. Los fluidos lipídicos en la barrera de la piel son crucialmente importantes para la difusión transepidermal de lípidos y moléculas anfifílicas, ocupando estos espacios para la inserción y migración a través de las capas lipídicas intercelulares de estas moléculas. Moléculas hidrofílicas difunden predominantemente de forma lateral a través de estas superficies con menores espacios interlamelares llenos de agua, moléculas polares también pueden usar estos espacios libres con el mismo fin (Escobar-Chavez et al., 2012).

Para la mayoría de los penetrantes la ruta intercelular es favorecida. Pequeñas moléculas pueden moverse libremente dentro del espacio intercelular y las

velocidades de difusión se rigen en gran medida por su lipofilidad pero solo propiedades fisicoquímicas como peso molecular o volumen, solubilidad y habilidad de formar puentes de hidrogeno.

Ruta Transcelular

La difusión transcelular por si sola es prácticamente insignificante sin embargo la contribución puede incrementarse cuando el SC es expuesto a estimulaciones eléctricas, mecánicas, termales, o al utilizar penetrantes apropiados.

La penetración folicular ha tenido un enfoque importante por el hecho de que el fármaco puede llegar a almacenarse en el folículo y ha sido estudiado en desordenes de la piel (Escobar-Chavez et al., 2012).

2.7. Sistemas nanoparticulados lipídicos de liberación de fármacos

Nanotecnología es un concepto que muestra la habilidad de trabajar en una escala de 1-100 nanómetros para entender diseñar, crear, caracterizar y utilizar materiales estructurales y sistemas con nuevas propiedades derivadas de tamaños nanométricos. Los nanomateriles pueden ser naturales, incidentales o manufacturados que contienen partículas en un estado libre, agregado o aglomerado, y donde el 50 % o más de la distribución de tamaño de partícula en una o más dimensiones esta entre 1-100 nm, sin embargo, algunos estudios usan

el prefijo “nano” en estructuras que superan ligeramente los 100 nm (Nobile & Nobile, 2017).

La nanotecnología ha sido ampliamente explotada en la administración de fármacos con un gran potencial en la mejora de la eficiencia y la eficacia de fármacos (Chen Kang, 2016).

Algunos parámetros que influyen en la actividad biológica de los nanomateriales son: el tamaño de partícula, la distribución de tamaños, el área superficial, la carga de superficie, la funcionalidad de superficie, la forma, el estado de agregación y la estabilidad (E., LLC 2011), el tamaño de partícula puede determinar la vida media y distribución por ejemplo partículas menores a 10 nm son filtradas por el riñón, partículas mayores a 200 nm son fagocitadas y removidas por el bazo. Las nanopartículas con mayor efecto terapéutico se encuentran en el rango de 10 a 100 nm de tal forma que pueden fluir por todo el sistema circulatorio y penetrar en los tejidos diana a través de los capilares (Nobile & Nobile, 2017).

Desde los años 1970 varias generaciones de sistemas de suministro de medicamentos se han desarrollado para la administración controlada de fármacos en el cuerpo, los acarreadores de tamaño nanométrico son particularmente atractivos ya que proveen protección al fármaco, mejoran la captación celular y liberan en sitios específicos (Lallana, Sousa-Herves, Fernandez-Trillo, Riguera, & Fernandez-Megia, 2012).

Nanopartículas lipídicas

En los años 90's las nanopartículas lipídicas se comenzaron a desarrollar como compuestos de lípidos sólidos los cuales se propusieron como portadores de

fármacos, este sistema ha sido estudiado y modificado desde el concepto original hasta sistemas más complejos.

Las nanopartículas lipídicas sólidas son portadores coloidales que van de 50 a 1000 nm, se componen de lípidos que se dispersan en agua. Estas se consideran que son los portadores coloidales a base de lípidos más eficaces.

Estas poseen un núcleo sólido lipídico, que puede solubilizar fármacos lipofílicos. El núcleo sólido lipídico se estabiliza con tensoactivos o emulsificantes.

Las nanopartículas lipídicas son generalmente compuestas de lípidos biocompatibles y surfactantes naturales. Algunas cargas del lípido pueden ser modificadas como la del ácido esteárico y proveer grupos activos que actúan como puntos de anclaje de ligando (Singh, Swami, Jeengar, Khan, & Sistla, 2015).

La capacidad de incorporación o capacidad de carga de las SLN se expresa como un porcentaje a la fase lipídica (matriz lipídica + fármaco). La capacidad de carga es variable y depende de algunos factores. Sin embargo, se considera típico un % entre 1 y 5 para las SLN. Aunque se han reportado cargas de hasta un 50%, dependiendo del sistema estudiado y del estado de agregación en que se encuentra (Villafuerte Robles, García F., Garzonn S., Hernández L., & Vazquez R., 2008).

La captación de SLN (<180nm) en los queratinocitos ha sido estudiada y sugiere que estas atraviesan la membrana celular fácilmente, sin efectos tóxicos (Prow et al., 2011).

Los avances que se reportan en la literatura con el uso de materiales lipídicos han demostrado ventajas sobre los métodos anteriores como es baja toxicidad, alta carga de fármaco, la capacidad de incluir fármacos lipófilos e hidrófilos y la liberación controlada, además de estas una característica interesante es que las

nanopartículas sólidas lipídicas pueden mejorar la absorción de diferentes medicamentos, por lo que es una alternativa para sustancias con escasa solubilidad en agua y escasa absorción.

Acarreadores lipídicos nano estructurados

Los acarreadores lipídicos nano estructurados (NLC) se proponen para liberar fármacos altamente lipofílicos. Esto es porque la mayoría de fármacos tiene alta solubilidad en lípidos líquidos (aceites).

2.8. Fundamentos de los métodos de análisis

Calorimetría diferencial de barrido

DSC es una técnica termoanalítica que analiza como la temperatura cambia la capacidad calorífica de un material. Una muestra con masa conocida se calienta o enfría y los cambios en su capacidad calorífica se registran como cambios en el flujo de calor. La técnica mide la cantidad de calor necesaria para elevar la temperatura de una muestra; luego determina la cantidad de calor requerida para elevar la temperatura de un material de referencia. Esto permite la detección de transiciones como fundidos, transiciones de vidrio, cambios de fase y curado. DSC se utiliza para

determinar la transición de fase térmica en muestras y las interacciones entre los componentes.

Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una muestra, el principio de separación se basa en la distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria (columna),

Esta separación se da debido a la diferencia en las afinidades relativas de diferentes moléculas por la fase móvil y la fase estacionaria utilizada en la separación.

Dispersión de luz dinámica

Las partículas pequeñas en una dispersión o solución están sujetas al movimiento browniano. El DLS es impulsado por colisiones con las moléculas de disolvente presentes, que están en constante movimiento debido a su energía térmica. La velocidad del movimiento browniano se puede medir directamente a partir del patrón de luz dispersa producido por las partículas en movimiento. La muestra se ilumina mediante un rayo láser y las fluctuaciones de la luz dispersa se detectan a un ángulo de dispersión conocido θ mediante un detector de fotones rápidos.

Espectrofotómetro FT IR

FT IR es una técnica utilizada para obtener un espectro infrarrojo. La técnica se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, convirtiéndola en vibración molecular. Esta absorción corresponde específicamente a los enlaces presentes en la molécula. Cuando la radiación de infrarrojos alcanza una muestra, parte de la radiación es

absorbida por la muestra y otra parte la atraviesa (se transmite). La señal resultante en el detector es un espectro que representa la «huella» molecular de la muestra. La utilidad de la espectroscopia de infrarrojos se debe a que distintas estructuras químicas (moléculas) producen distintas huellas espectrales.

Espectrofotómetro UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis se basa en la absorción de luz ultravioleta o luz visible que tienen los compuestos químicos a cierta longitud de onda para determinar su concentración. La luz incidente es capaz de efectuar la excitación de los electrones en el átomo o molécula en estado fundamental a niveles más altos de energía dando lugar a la absorbancia del compuesto a una longitud de onda específica.

La ley de Beer-Lambert establece que la concentración de una sustancia en solución es directamente proporcional a la 'absorbancia', de la solución.

Absorbancia = constante x concentración x longitud de la celda

La ley solo es cierta para la luz monocromática, es decir, la luz de una sola longitud de onda o una banda estrecha de longitudes de onda, y siempre que el estado físico o químico de la sustancia no cambia con la concentración. Cuando la radiación monocromática pasa a través de una solución homogénea en una celda, la intensidad de la radiación emitida depende sobre el espesor de la celda y la concentración de la solución.

III. METODOLOGÍA

3.1. Equipo y materiales

Equipos

Agitador magnético VWR Dyla-Dual

Analizador térmico SDT Q600 V20.9 Build 20. TA instruments

Balanza analítica Denver Instrument M-200

Bomba para jeringa RAZEL™, R-99.E

Cromatografo HPLC Ultimate 3000 Thermo Scientific

Detector de luz dinámica, Zetasizer Nano ZS, Malvern instruments, ZEN3500 con láser verde 532 nm

Disolutor Distek 2100c (Basel, Switzerland)

Equipo de filtración con membrana milipore superlco, Life sciences GHP agrodisc 25mm

Espectrofotómetro UV-Vis, Beckman Coulter DU® 520

Homogeneizador, Sistema Polytron PT1600E, 7mm, Kinematica, acoplamiento tipo E, PTDA07/2EC-E107

Liofilizador Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 ciclos

Mezclador 16700, Thermolyne

Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo, Modelo JSM-7800F Prime

Potenciómetro, 430 Corning

Purificador de agua MiliQ. PURELAB Option ELGA DV25

Purificador de agua, Barnstead Sybron, modelo D2604

Rota vapor, BUCHI R-215

Sonicador, Branson 5510

Syrenge filter 0.2um, filtros Suport-100 0.2um 47mm PN60210, Suport-100 0.1um 47mm PN60310

Transformada de Fourier espectroscopia infrarrojo, Thermo Scientific modelo Nicolet Is5

Ultracentrifuga Beckman Coulter, JA 20

Materiales

Acetato de etilo. EM SCIENCE, reactivo grado analítico

Acetato de metilo. Sigma Aldrich, reactivo grado analítico, ≥98%

Acetonitrilo. Fermont, reactivo grado HPLC

Acido fórmico 90%, Baker PCS, reactivo grado analítico

Agua MiliQ

Alcohol isopropílico, FAGA Lab, reactivo grado analítico

Amortiguador salino de fosfatos

Clorhidrato de propranolol. Spectrum, reactivo grado analítico

Metanol. FAGA Lab, reactivo grado analítico

Metanol. Fermont, reactivo grado HPLC

Mowiol® 4-88 (Polivinil alcohol), Mw ~31,000 Da. De Sigma Aldrich, reactivo grado analítico

Oleato de potasio 20%. Mw: 320.55g/mol. Eastchem, reactivo grado analítico

Tween® 80, Sigma-Aldrich, reactivo grado analítico

3.2. Formación del oleato de propranolol a partir de clorhidrato de propranolol y la sal potásica del ácido oleico

Oleato de propranolol fue preparado por adición de oleato de potasio a clorhidrato de propranolol (250 mg) en solución acuosa a una relación molar de (1:1) en orden de generar un complejo equimolar (Rowley, Orbes, Ork, Yqvist, & Amber, 1999). La solución de oleato de potasio a partir del reactivo al 20% fue preparada en agua a 677.29 mg/mL para tener una concentración efectiva de oleato de potasio de 135.4 mg/mL, clorhidrato de propranolol en solución acuosa se preparó a una concentración de 125 mg/mL, de estas soluciones se tomaron 2 mL de cada una para proceder a la formación de la sal oleato de propranolol.

La sal lipídica (SL) se formó agregando gota el oleato de potasio en solución al clorhidrato de propranolol en solución. El procedimiento se realizó como sigue: en un tubo de ensaye colocar exactamente 2 mL de clorhidrato de propranolol y colocar el tubo sobre un vortex, cargar una jeringa (con ajuga) con 2 mL de oleato de potasio y colocar sobre bomba para jeringa (RAZEL™, R-99.E) programar a una velocidad de ~ 0.25 mL/min y mantener agitación en vortex tras agregar cada gota de oleato de potasio al tubo que contiene el fármaco, al término de la adicción calentar en baño maría a 40°C por 30 segundos y proceder a centrifugar a 3,400 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, seguir con una decantación de la fase acuosa y agregar 1 mL de agua para disolver el exceso de propranolol que se encuentre libre en la fase acuosa, mezclar en vortex y centrifugar nuevamente por 5 minutos a 3,400 rpm, al término de la centrifugación con cuidado de no mezclar las fases calentar por 10 segundos a 40°C esto sirve para observar en coloración blanquecina la sal lipídica y decantar la fase acuosa, proteger el tubo de la luz y evaporar el exceso de humedad en estufa de vacío a presión reducida y temperatura de 30°C por 24 h, al finalizar este paso se obtuvo una cera semisólida a la cual se

le registró el peso para futuros cálculos y se almacenó en refrigeración (4-8°C) con desecante. Almacenar el sobrenadante en un matraz volumétrico aforado a 10 mL para futuro cálculo de propranolol no conjugado en sal utilizando la recta de calibración de propranolol en agua.

3.3. Caracterización de la sal oleato de propranolol

Determinación de % de rendimiento

Se determinó el porcentaje de rendimiento de la sal lipídica formada mediante diferencia de peso medido en balanza analítica, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{w_1}{w_2} \times 100 \quad (1)$$

Donde w_1 corresponde al peso del producto obtenido experimentalmente y w_2 al peso teórico de los reactivos utilizados.

Cuantificación de contenido de fármaco en la sal lipídica

La preparación de la sal oleato de propranolol para su lectura se realizó como sigue. Pesar exactamente 25 mg de producto, traspasar a un matraz volumétrico de 25 mL y disolver con aproximadamente 20 mL de metanol, sonicar por 5 minutos, aforar con metanol y mezclar [1 mg/mL], tomar una alícuota de 1 mL de solución

anterior y traspasar a un matraz volumétrico de 10 mL y aforar con PBS pH 7.4 esta solución tendrá una concentración final de [0.1 mg/mL equivalente a 100 ug/mL].

Para el método HPLC filtrar y depositar directamente a un vial para HPLC, leer por cromatografía líquida de alta resolución a 291 nm con n=3. ($y = 0.193x - 0.2265$)

Para el método espectrofotométrico UV-Vis leer en celda de cuarzo a 290 nm con n=3. ($y = 0.0191x - 0.0128$)

Aplicar la siguiente fórmula

$$\text{Contenido de fármaco} = \frac{\text{cantidad de fármaco testeada en la SL}}{w \text{ total de la SL}} \times 100 \quad (2)$$

Donde la cantidad probada en la sal lipídica se obtiene del cálculo de concentración a partir de la absorbancia medida.

Método espectrofotómetro UV-VIS

Para conocer las posibles interferencias de absorción en este método la sal oleato de propranolol y sus reactivos de referencia (clorhidrato de propranolol y oleato de potasio) fueron caracterizados con espectrofotómetro UV-Vis (Beckman Coulter DU® 520) para determinar λ_{\max} de propranolol y realizar la correcta cuantificación del fármaco mediante método espectrofotométrico, Para esto se realizaron dos curvas estándares una en medio acuoso y otra en medio PBS pH 7.4, se realizó (a) un barrido de propranolol de concentración conocida [0.05 mg/mL equivalente a 50 ug/mL] desde 200-340 nm, previo a la lectura de los puntos de la curva estándar (las muestras se prepararon de la misma manera que para la curva estándar) y (b) un barrido del oleato de potasio a una concentración de [0.05 mg/mL

equivalente a 50 ug/mL] y (c) curva estándar de concentración conocida con n=3. Ver metodóloga 3.9 de preparación de muestras para curva estándar.

Espectrofotómetro FT IR

Transformada de Fourier espectroscopia infrarrojo fue llevada a cabo usando Thermo Scientific modelo Nicolet Is5 desde 4000 a 700 cm^{-1} . La sal lipídica fue colocada directamente sobre la superficie del cristal y analizadas a temperatura ambiente, previamente secadas durante 24 h a RT y presión reducida para eliminar el exceso de humedad.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Oleato de propanolol fue analizada por DSC (SDT Q600 V20.9 Build 20) en alúmina pan a 2°C/min con arrastre de nitrógeno 100 mL/min en un rango de 25-200 °C.

3.4. Diseño experimental

Utilizando el software Statgraphics se aplica un diseño experimental. Los atributos son diseño de superficie de respuesta factorial de tres niveles 3^2 . El diseño base consta de 2 factores experimentales (Tabla 2), 3 bloques, 3 respuestas, 33 corridas incluyendo 2 puntos centrales por bloque, con 25 grados de libertad para el error y completamente aleatorizado (Tabla 3).

Tabla 2 Descripción de factores experimentales en diseño factorial 3^2

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuo
PVA: Tween 80	-1.0	1.0	%	Sí
Sal lipídica	80	120	mg	Sí

El diseño factorial estudiara los efectos de dos factores, factor A: contenido de PVA:Tween 80 en relación porcentual (2:3) y factor B: contenido de sal lipídica; sobre las respuestas Tamaño (nm) y EE (%). El diseño deberá ser ejecutado en 3 bloques. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

Tabla 3 Tabla de datos de experimentos del diseño factorial

<i>Corrida</i>	<i>Bloque</i>	<i>PVA:Tween80</i>	<i>Sal lipídica</i>	<i>Bloque</i>	<i>PVA:Tween80</i>	<i>Sal lipídica</i>	<i>Bloque</i>	<i>PVA:Tween80</i>	<i>Sal lipídica</i>
1	1	0	100	2	0	100	3	0	100
2	1	-1	100	2	-1	100	3	-1	100
3	1	-1	80	2	-1	80	3	-1	80
4	1	1	120	2	1	120	3	1	120
5	1	-1	120	2	-1	120	3	-1	120
6	1	0	80	2	0	80	3	0	80
7	1	0	100	2	0	100	3	0	100
8	1	1	80	2	1	80	3	1	80
9	1	0	100	2	0	100	3	0	100
10	1	0	120	2	0	120	3	0	120
11	1	1	100	2	1	100	3	1	100

Como indica la Tabla 2 el factor PVA:Tween 80 en relación porcentual constante 2:3 se establece el nivel bajo como -1, el central 0 y el alto como 1. Los valores porcentuales para los valores descritos son (1.5 : 2.25), (2 : 3), (2.5 : 3.75)

respectivamente . El factor contenido de sal lipídica se encuentra explícitamente descrito en la Tabla 2, valor bajo 80 mg, central 100 mg y alto 120 mg.

3.5. Preparación de nanopartículas lipídicas mediante la adaptación del método de emulsión-difusión

Prueba de solubilidad de la sal lipídica en diferentes solventes

En orden de determinar la solubilidad de oleato de potasio, en dos diferentes solventes se realizó una prueba cualitativa, se evaluó acetato de metilo que tiene una alta miscibilidad en agua y acetato de etilo el cual tiene una baja solubilidad en agua, 33 y 8,5 referido a 100 partes de agua respectivamente, se evaluó también la solubilidad en IPA la cual esta reportada ser altamente soluble para compuestos lipofílicos y se ha utilizado para preparar liposomas (Roberts, Parikh, Blower, & Agrawal, 2018), como control negativo se utilizó agua y se evalúa también la solubilidad en medio PBS pH 7.4 para futuros experimentos. Primero se saturó el solvente con agua MiliQ por 5 minutos. Aproximadamente 100 mg de oleato de potasio fueron disueltos en 3 mL de solvente saturado o agua a una concentración de [3.33 % w/v], sellados y se mantuvieron agitando por 12 h a temperatura ambiente. De forma visual se determinó que si la muestra presenta transparencia se

asocia con una correcta disolución de la sal lipídica en el solvente (Quintanar-Guerrero, Tamayo-Esquivel, Ganem-Quintanar, Allémann, & Doelker, 2005).

Preparación de NPs mediante adaptación de método emulsión-difusión

La preparación de las nanopartículas de oleato de propranolol se realizó de acuerdo al método adaptado emulsión difusión (Quintanar-Guerrero et al., 2005).

Saturar el solvente y el agua por 5 minutos a temperatura ambiente (RT) en un embudo de separación antes de su uso con el fin de garantizar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos.

Para una formulación en nivel central (Factor A nivel 0 (2:3), Factor B nivel 100 mg). Pesar **100 mg** de oleato de propranolol, disolver en **5 mL** de solvente saturado de agua (75:25), esta fase se designará como fase orgánica-interna (FI).

Emulsionar agregando gota a gota ~ 0.5 mL/min (0.45) la FI con **10 mL** de solución acuosa saturada con disolvente que contiene una baja concentración [**2 % w/v**] del estabilizador PVA (medio de dispersión) a RT o **2 % w/v** y Tween 80 al 3% v/v. Utilizando un agitador mecánico a 5000 rpm y mantener emulsionando por 5 min posterior a la adición de la FI (Polytron PT1600E). Al finalizar este paso se obtiene una emulsión aceite en agua (O/W). (tiempo promedio de emulsión 16 minutos)

A la emulsión aceite en agua, agregar **30 mL** de agua simple (medio de dilución) y dejar agitando por 10 min más, con el fin de permitir la difusión del solvente en la fase continua, causando la agregación del lípido en nanopartícula. Tiempo total de emulsión de 26 minutos. Eliminar el disolvente utilizando un rota

evaporador (BUCHI R-210) con presión reducida a 30°C por 15 min y aforar a 50 mL con matraz volumétrico.

Purificación mediante método de centrifugación con membrana

La preparación en fresco de NPs se purificó mediante centrifugación con unidades PALL que contiene una membrana ultracel de celulosa regenerada y alta recuperación con corte de peso molecular de 100,000 Da de acuerdo al método descrito por Roberts et al. (Roberts et al., 2018). La muestra fue mezclada para asegurar la correcta homogenización y posteriormente es adherida al tubo. Los tubos fueron centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 6,000 x g (Ultracentrifuga Beckman Coulter, JA 20). Seguido de cada filtración, la solución de NPs fue rediluida al volumen inicial y los tubos son lavados con alcohol isopropílico al 70% v/v en dos rondas a 4 °C por 10 minutos a 6,000 x g, y enjuagados con agua MiliQ posterior a cada ronda.

Tabla 4 Seguimiento de rondas para la purificación de NPs con unidades PALL

<i>Ronda</i>	<i>Solución adherida</i>	<i>x g</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Fracción restante</i>	<i>Purificación de NPs (%)</i>
1 y 2	5 mL de IPA	6000	10		-
3	10 mL de NPs frescas	6000	10	0.70	30
4 y 5	5 mL de IPA	6000	10	0.49	-
6	Recolección de ronda 3, aforada a 10 mL	6000	10		
7 y 8	5 mL de IPA	6000	10	0.34	-
9	Recolección de ronda 6, aforada a 10 mL	6000	10		
10 y 11	5 mL de IPA	6000	10		-
12	Recolección de ronda 9, aforada a 10 mL	6000	10	0.24	76
13 y 14	5 mL de IPA	6000	10		-
15	Recolección de ronda 12, aforada a 10 mL	6000	10	0.16	86

Liofilización

Las muestras purificadas provenientes de la concentración en unidades pall fueron recolectada y se congelaron en viales de vidrio y se liofilizaron a presión reducida a -48°C durante 48 horas (Liofilizador Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco).

3.6. Caracterización de NPs de oleato de propranolol

Reconstitución

Las NPs liofilizadas se reconstituyen con el volumen necesario de agua MiliQ, para obtener una concentración igual a la preparada inicialmente, aproximadamente 0.1-0.5 % w/v.

Se pesó 10 mg de muestra pura y se dispersó en 1 mL de agua MiliQ con agitación mecánica por 24 horas a 100 rpm 25 grados

Determinación del tamaño de partícula por DLS

La técnica de dispersión de luz dinámica se utiliza para determinar el tamaño e índice medio de polidispersidad de las partículas. La preparación de la muestra se realizó de la siguiente manera, para muestras frescas se toma 1.0 mL de la solución y se afora a 10 mL con agua MiliQ para tener una concentración de ~ 5 mg/mL , de esta dilución se toma una alícuota de 1 mL y se introduce en la celda para DLS. Para muestras resuspendidas tomar la cantidad requerida para una concentración aproximada de 0.1 – 0.5 % w/v igualando las condiciones de

concentración de una muestra fresca. Transferir a una celda transparente y colocar en la rejilla del instrumento, la muestra es analizada bajo los siguientes parámetros:

Material: PVA, IR: 1.480. Absorción: 0.010. Dispersante: Agua. Temperatura: 25°C. Viscosidad: 0.8872.

El análisis se realiza a partir de muestras simples y muestras resuspendidas, cada muestra se mide por triplicado.

Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo

Para conocer la morfología de NPs en formulación acuosa los sistemas se estudiarán por FESEM, 2 µL de muestra fresca son colocados sobre una rejilla de Lacey carbón de 400 mesh, se deja secar completamente a temperatura ambiente, después es introducida a la cámara de muestra donde se procede a observar la superficie.

Calorimetría diferencial de barrido

Calorimetría diferencial de barrido se describe como una técnica que pretende comprobar la pureza de fármacos y otros compuestos, caracterizando la fase sólida y confirmando las interacciones fisicoquímicas. Las transformaciones térmicas y las fases de transición de las NPs serán estudiadas con calorímetro. (Silva et al., 2015)

Colocar la cantidad de muestra necesaria, previamente liofilizada y sellada en un contenedor de aluminio. Clorhidrato de propranolol libre, oleato de potasio, oleato de propranolol, y NPs-propranolol, serán estudiados. Los resultados se muestran en una curva de flujo de calor vs temperatura.

Eficiencia de encapsulación

La determinación de eficiencia de encapsulación y cargado de fármaco se llevó a cabo de acuerdo al siguiente método (Das, Ng, Kanaujia, Kim, & Tan, 2011), tomar

10 mL de formulación de nanopartículas fresca y disolver en 10 mL de metanol agitar en vortex por 1 minuto para extraer el fármaco del lípido, proceder a centrifugar la mezcla a 5000 rpm por 15 minutos, del sobrenadante tomar una alícuota de 1 mL y aforar a 10 con PBS medir la concentración por HPLC. Este dato lo llamaremos cantidad de fármaco en la formulación fresca.

Para determinar la cantidad de fármaco disuelto en la fase acuosa, analizar la fracción filtrada del proceso de purificación. Después de la centrifugación la cantidad de fármaco libre soluble es analizada por HPLC. El filtrado aproximadamente contiene 20 mL de solución aforar la fracción filtrada a 25 mL con PBS y cuantificar por HPLC. Aplicar las siguientes ecuaciones para determinar cargado de fármaco y eficiencia de encapsulación.

$$DL \% = \frac{\text{cantidad de fármaco en la formulación} - \text{fármaco libre}}{w \text{ total de las NPs purificadas}} \times 100 \quad (3)$$

$$EE \% = \frac{DL * w \text{ total de las NPs purificadas}}{\text{cantidad inicial adherida de SL en las NPs} * \text{contenido de fármaco en SL}} \times 100 \quad (4)$$

Estudio de estabilidad de NPs con respecto al tiempo

La estabilidad física se determina almacenando las formulaciones de NPs frescas en refrigeración a 4°C por 30 días, en intervalos de 1, 7, 15 y 30 días, adicional se reporta el valor pasados más de 9 meses, el tamaño de partícula y PDI se determina, las muestras se realizan por triplicado.

3.7. Estudios de liberación *in vitro*

La liberación de propranolol es estudiada usando el método de bolsa de diálisis MW 12-14 KDa. en medio PBS pH 7.4 a 37°C, 100 rpm, figurando las condiciones

fisiológicas. Cuidadosamente 25 mg de NPs son adheridas a 5 mL de PBS y colocadas en el medio de difusión. En un periodo de 24 h con intervalo inicial de 0.5, 1, y cada 2 h posteriormente, se toma un alícuota de 1 mL de medio y se reemplaza con medio fresco a un volumen total de 50 mL. La cuantificación de fármaco se realiza por método espectrofotométrico UV-visible a 290nm (Singh et al., 2015).

3.8. Estudios de permeabilidad

Las nanopartículas de oleato de propranolol son incorporadas a un hidrogel con base de carbopol y se procede a medir la difusión pasiva del fármaco a través de una membrana semipermeable utilizando celda Franz.

Preparación de la membrana

Piel extirpada de abdomen humano fue donada por pacientes sometidos a cirugías plásticas previo consentimiento informado, inmediatamente después de ser extirpada, el tejido graso fue retirado con tijera y bisturí, la piel fue lavada tres veces con solución fisiológica, cortada en círculos de 2cm de diámetro, secada, empacada en papel aluminio dentro de bolsa plástica y finalmente almacenada a -20°C hasta su posterior uso. Para llevar a cabo la permeación, la piel humana fue previamente descongelada en solución fisiológica por 12 horas (4-8°C) y posteriormente montada como membrana sobre la celda Franz con la epidermis hacia el compartimento donador.

Las nanopartículas previamente resuspendidas en agua por 12 horas son incorporadas en el hidrogel, ~200µl de gel con NPs son colocados directamente sobre la piel en un área superficial de 0.7854cm², en una concentración aproximada de fármaco de 0.5mg en el compartimento donador, mantener una temperatura de

la cámara del receptor de 36.5°C, las cámaras de los receptores se llenan con solución tampón de fosfato (pH 7.4), colocar la preparación del gel sobre el área disponible para la difusión. A intervalos de tiempo tomar muestras de la cámara receptora, utilizando una jeringa, y reponer el mismo volumen con medio fresco, medir las concentraciones de propranolol en la muestra. La cuantificación se realiza por HPLC con detector UV a 291 nm.

Solución de clorhidrato de propranolol en medio acuoso fue evaluada directamente sobre la piel a las mismas condiciones que las formulaciones de nanopartículas.

3.9. Estudio de citotoxicidad de las nanopartículas

Se realizó el estudio de citocompatibilidad en la línea celular de fibroblastos embrionarios murinos BALB / 3T3 (ATCC CCL - 163) y cáncer de cuello uterino humano HeLa (ATCC CCL- 2). Las pruebas fueron realizadas en placas de 96 pocillos donde se colocaron 50, 000 células por mL, utilizando medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, 1% de solución de penicilina/estreptomicina.

La placa se colocó en incubación por 12 horas, una vez transcurridas a las células se añadieron en serie las concentraciones (0.1, 1 y 10 mg/ml) de nanopartículas las cuales fueron resuspendidas con anterioridad, se colocaron en una atmosfera humidificada con 5% CO₂ y 37 °C por 24 horas. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento, todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado. Una vez concluido el tiempo se utilizó el kit MTT (Roche, Suiza) para cuantificar la proliferación celular, por último se obtienen las absorbancias por medio de un lector de microplacas a una longitud de onda de

620nm Multiskan FC, Thermo Scientific, (Waltham, MA, EE. UU.). Se calculó la viabilidad celular usando la siguiente ecuación:

$$Citocompatibilidad(\%) = \left(\frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) (100) \quad (5)$$

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

3.10. Curvas estándar de propranolol

Método espectrofotométrico UV-Vis

La preparación de las muestras se realizó como sigue. Pesar exactamente 25 mg de fármaco puro, traspasar a un matraz volumétrico de 25 mL y disolver con ~ 20 mL de metanol, sonicar durante 5 minutos y llevar al aforo con metanol, mezclar. A esta solución la nombraremos solución estándar [1 mg/mL], almacenar en vial de vidrio en refrigeración hasta su posterior uso. A partir de la solución estándar se realizan las curvas estándares de propranolol en i) agua o ii) PBS pH: 7.4. aforando con la solución correspondiente. Realizar diluciones como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 5 Diluciones de curva estándar

Vial	Volumen de alícuota μ L	Volumen de aforo	[concentración] μ g/mL
1	50	10	5
2	100	10	10

3	200	10	20
4	300	10	30
5	400	10	40
6	500	10	50
7	600	10	60

Leer las muestras en celda de cuarzo a una $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$, con $n=3$.

Método cromatografía líquida de alta resolución

Para el método cromatográfico se utilizó una columna tradicional C18 $3\mu\text{m}$ 300 Å $4.6 \times 150\text{mm}$ marca Acclaim 300. La fase móvil es una mezcla ácido fórmico (0.1%) y acetonitrilo con los siguientes gradientes

Tabla 6 Gradientes de método cromatográfico

<i>Tiempo min</i>	<i>Flujo mL/min</i>	<i>% Acetonitrilo</i>	<i>% Acido fórmico</i>
1.5	1	3	97
3	1	9	91
6	1	30	70
7.5	1	50	50
10.2	1	90	10
10.5	1	40	60
12	1	3	97

La preparación de las muestras se realizó bajo las mismas concentraciones que para el método espectrofotométrico. Pesar exactamente 25 mg de fármaco puro, traspasar a un matraz volumétrico de 25 mL y disolver con ~ 20 mL de metanol, sonicar durante 5 minutos y llevar al aforo con metanol, mezclar. A esta solución la nombraremos solución estándar [1 mg/mL], almacenar en vial de vidrio en refrigeración hasta su posterior uso. A partir de la solución estándar se realizan la

curva estándar de propranolol en PBS pH: 7.4. Realizar diluciones como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 7 Diluciones para curva HPLC

<i>Vial</i>	<i>Volumen de alícuota uL</i>	<i>Volumen de aforo</i>	<i>[concentración] µg/mL</i>
1	50	10	5
2	100	10	10
3	200	10	20
4	300	10	30
5	400	10	40
6	500	10	50
7	600	10	60

Proceder a filtrar las muestras con filtro pall 0.2 µm y depositar directamente a un vial para HPLC, leer por cromatografía líquida de alta resolución a 291 nm con n=3.

3.11. Análisis de datos

Todos los datos experimentales se expresan como la media \pm desviación estándar, el análisis estadístico se realiza utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVLI, las diferencias se consideran significativas con $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1. Formación del oleato de propranolol

Oleato de propranolol fue obtenido como un compuesto ceroso de color blanquecino. Se observó sólido en refrigeración con un peso aproximado de 541.7 ± 32 mg. Repetible con (n=4).

El porcentaje de rendimiento del complejo formado de acuerdo a la ecuación (1) se observa en la Tabla 11. Se obtuvo un valor promedio de 34 % de rendimiento con respecto al peso total de los productos.

Tabla 8 Determinación de % de rendimiento de formación de sal lipídica

Muestra	W1 mg	W2 mg	% Rendimiento
S-a	512.3	1604.5	31.9
S-b	532.7	1604.5	33.2
S-c	534.3	1604.5	33.2
S-d	587.3	1604.5	36.6
Promedio ± SD			33.7 ± 2

Se determinó la solubilidad de la sal lipídica en diferentes disolventes, se observó una completa solubilidad en minutos en IPA seguida de MeOAc, a los 60 minutos en acetato de etilo se observó soluble la mayor parte de la sal con fracciones lipídicas al fondo las cuales se solubilizaron a las 12 horas. En medio acuoso se corroboró la insolubilidad de la sal lipídica y en medio PBS se observó la precipitación de sólidos debido a la presencia de iones que provocan la precipitación de oleato (Somasundaran & Zhang, 2000).

Tabla 9 Determinación de la solubilidad de oleato de propranolol en diferentes disolventes

Disolvente	W sal lipídica	Solubilidad	
Agua	99.9	No	Solución blanquecina turbia
PBS pH 7.4	102.3	No	Formación de precipitados blancos

<i>Alcohol isopropílico</i>	96.1	Si	Completamente solubilizado
<i>Acetato de metilo</i>	101.6	Si	Soluble
<i>Acetato de etilo</i>	101.8	Si	Pequeñas gotitas transparentes al fondo

La Figura 7 muestra a la sal lipídica en [100 mg/3 mL] de disolvente, de izquierda a derecha se muestra agua, PBS, alcohol isopropílico, acetato de metilo y acetato de etilo respectivamente.

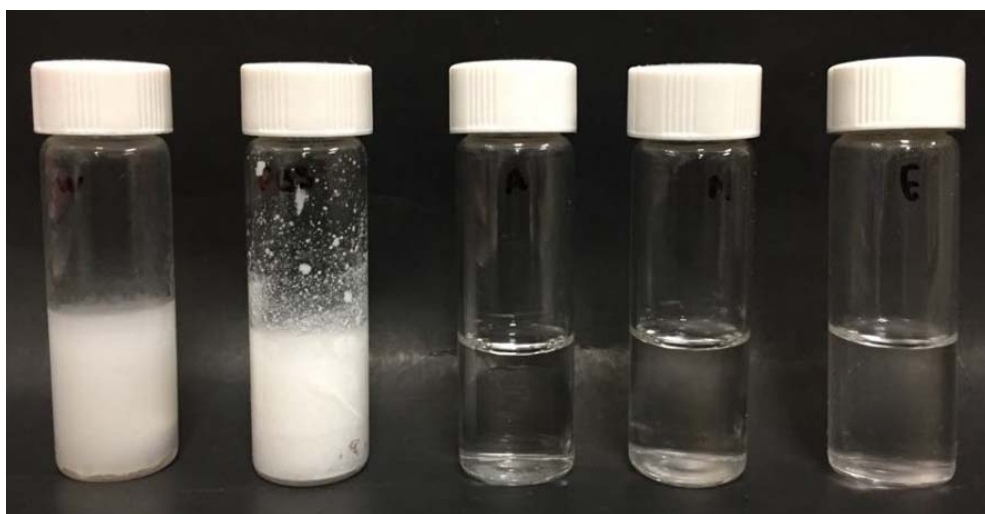


Figura 4 Solubilidad de la sal lipídica en disolventes. Agua, PBS, IPA, MeOAc y EtOAc de izquierda a derecha respectivamente.

4.2. Caracterización del oleato de propranolol

Determinación de contenido de fármaco

Aplicando la fórmula 2 para obtener la cantidad de fármaco en la sal lipídica se realizó como sigue

$$\text{Contenido de fármaco} = \frac{\text{Cantidad de fármaco en la sal lipídica}}{\text{Peso total de la sal de lípido}} \times 100$$

Donde la cantidad testeada fue de 183 ± 17 mg obtenida de la ecuación de regresión ($y = 0.1751x - 0.5991$). El peso total de la sal lipídica promedio de 542 ± 32 mg, obteniéndose un contenido de fármaco en la sal lipídica es de 33.8 ± 3 mg ,

indicando que aproximadamente el 34 % del contenido total de la sal corresponde a propranolol.

Espectrofotómetro FT IR

La interacción del fármaco con el ácido graso es revisada por comparación de IR de las mezclas binarias de oleato de potasio y Propranolol HCl y de las sustancias puras de referencia. El espectro obtenido para Propranolol HCl, oleato de potasio y la sal lipídica oleato de propranolol se muestran en la figura 8 y 9.

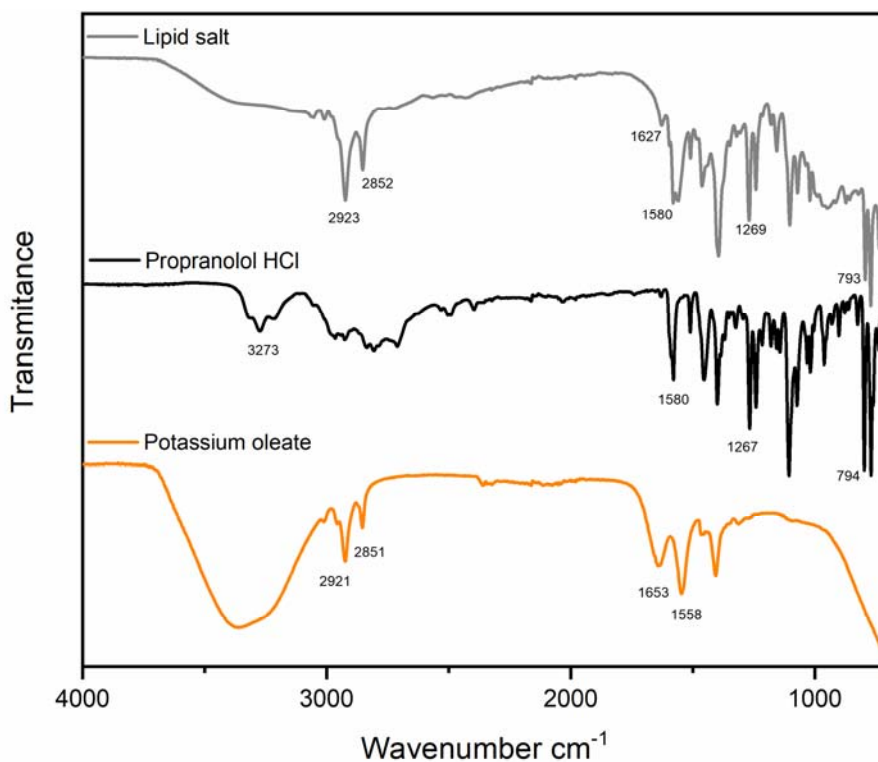


Figura 5 Espectro infrarrojo de la sal lipídica oleato de propranolol y sus reactivos de referencia clorhidrato de propranolol y oleato de potasio

El clorhidrato de propranolol presenta algunos grupos funcionales presentes en su estructura como amina secundaria, éter, alcohol secundario y naftaleno, por ejemplo. Las aminas exhiben una zona de absorción muy característica (debido a la vibración de alargamiento OH o NH) en el rango de 3000-3700 cm^{-1} . a la izquierda de las absorciones CH. Si la amina tiene dos hidrógenos en el nitrógeno ($-\text{NH}_2$), la absorción del NH aparece como un pico doble. Si sólo hay un H sobre el N, únicamente se observa un pico.

En 3273 cm^{-1} ocurre la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo (secundario). La vibración en 1580 cm^{-1} (1579) se atribuye a la deformación angular simétrica en el plano de N-H. Las aminas alifáticas secundarias presentan bandas de absorción de la unión C-N no conjugada en 1235 cm^{-1} (1241) y 1030 cm^{-1} . Estas bandas son originarias de la deformación axial del grupo C-N y están acopladas con la deformación axial de las conexiones adyacentes de la molécula. La banda correspondiente a la deformación angular simétrica en el plano de N-H puede observarse en 1579 cm^{-1} . En 1105 cm^{-1} ocurre una banda intensa que se debe a la deformación axial asimétrica de C-O-C. Los grupos alquil-aril-éteres muestran una banda de deformación axial asimétrica de C-O-C en 1267 cm^{-1} , con la deformación axial simétrica apareciendo en 1031 cm^{-1} . La vibración de deformación axial de C-O de alcoholes se encuentra en 1241 cm^{-1} . Esta deformación se acopla con la vibración de deformación axial del C-C adyacente. La vibración de deformación angular en el plano de la conexión O-H ocurre en 1330 cm^{-1} . Tanto en alcoholes primarios como en secundarios, la deformación angular en el plano de OH se acopla con las vibraciones de deformación angular simétrica fuera del plano de CH,

generando dos bandas de absorción, una alrededor de 1448 cm^{-1} y otra en 1330 cm^{-1} . La señal a 795 cm^{-1} (794) corresponde al naftaleno α -sustituido. El grupo carbonilo de la sal del ácido carboxílico presenta dos señales $1610\text{--}1550/1420\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, se pueden observar a 1558 y 1423 cm^{-1} (Chaturvedi, Umadevi, & Vaghani, 2010; Coates, 2004; Pereira Sato & Ferreira, 2015).

En compuestos lipídicos las vibraciones de los CH_2 se encuentran en las bandas 2922 y 2852 cm^{-1} , los complejos muestran señales características de ambas referencias la presencia de CH_2 asimétricos a 2923 y 2852 , la presencia del grupo éter a 1269 cm^{-1} , la tensión N-H a 1580 cm^{-1} y el grupo naftaleno a 793 cm^{-1} , la señal del estiramiento del alqueno cis, di sustituido se presenta en el rango de $1660\text{--}1620$, para el oleato de potasio se presenta a 1653 cm^{-1} y en la sal lipídica a 1627 cm^{-1} lo que sugiere la presencia de ambos compuestos formando un complejo.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico de mezclas molares de oleato de propranolol y sus referencias fueron analizadas por DSC de temperatura ambiente hasta 180°C . La figura 10 muestra un evento térmico a $\sim 50^\circ\text{C}$ presente en los complejos correspondiente a la temperatura justo por debajo de la fase sólida, este evento endotérmico con la máxima entalpia a 49.6°C sin la presencia del evento

endotérmico característico de propranolol esto sugiere la formación de un complejo equimolar (Rowley et al., 1999) correspondiente a la sal lipídica.

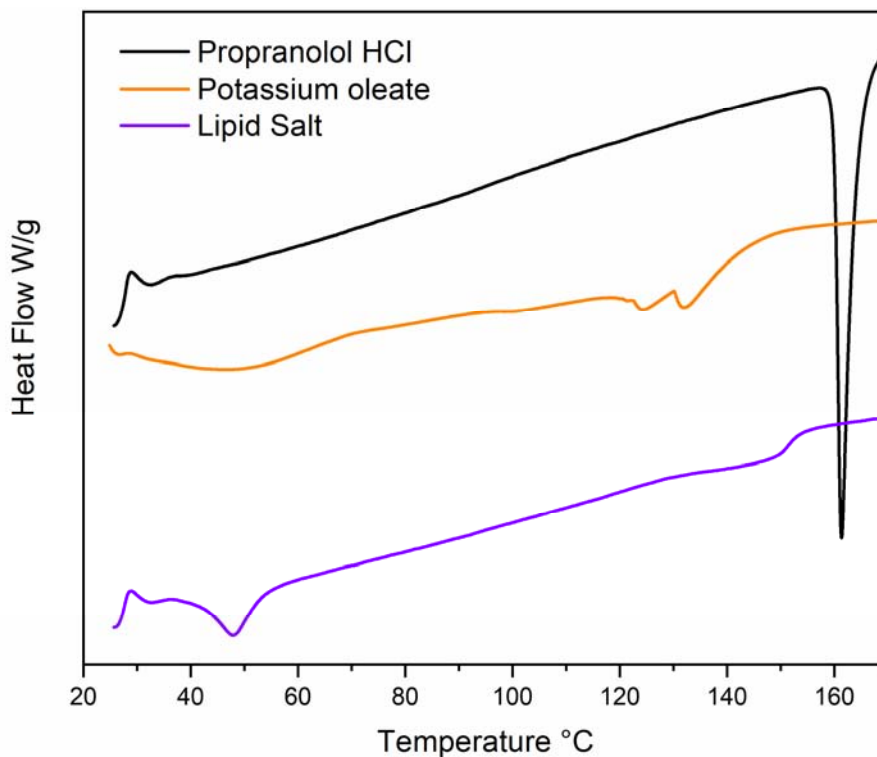


Figura 6 Calorimetría diferencial de barrido de propranolol HCl, referencias y sal lipídica

4.3. Caracterización de NPs de oleato de propranolol

Determinación de apariencia física de las formulaciones

La Tabla 13 muestra la composición de las formulaciones elaboradas previas al diseño factorial, se describe su apariencia física la cual se ha reportado que una coloración azulada se asocia a la obtención de nanopartículas de tamaños pequeños.

Tabla 10 Composición de las formulaciones preliminares de NPs. Muestra la apariencia cualitativa de las formulaciones frescas

<i>Disolvente</i>	<i>FI</i>		<i>FA</i>		<i>Medio Difusión</i>	<i>Apariencia</i>	<i>V_T</i>
	<i>W_{Sal} lipídica mg</i>	<i>Volumen de solvente</i>	<i>W_{PVA} mg</i>	<i>Volumen de agua saturada</i>			
<i>Alcohol isopropílico</i>	96.1	5 mL	100	10 mL	Agua 20 mL	Turbia +++	35 mL
<i>Acetato de metilo</i>	101.6	5 mL	100	10 mL	Agua 20 mL	Turbia +	35 mL
<i>Acetato de etilo</i>	101.8	5 mL	100	10 mL	Agua 20 mL	Turbia ++	35 mL
<i>MeOAc:IPA 75:25</i>	100	5 mL	200 + Tween 80	10 mL	Agua 30 mL	Clara azulada	45 mL

+++ máximo + mínimo

La Figura 11 muestra las soluciones en fresco de NPs en suspensión previo a la evaporación de solvente preparadas con Oleato de propranolol 100 mg y emulsionadas con 1% PVA. De izquierda a derecha se observa NPs preparadas con alcohol isopropílico, acetato de metilo y acetato de etilo respectivamente, en las tres formulaciones se puede apreciar turbidez que creemos está asociada a una

incompleta disolución de la sal lipídica en el solvente y esto se traduce en una precipitación de lípido en el paso de la difusión de solvente a la fase acuosa.



Figura 7 Formulación en fresco de NPs. Preparadas con IPA, MeOAc, EtOAc respectivamente. 1% PVA, 2 % de Tween en FA y 100 mg de sal lipídica en FI se mantuvieron constantes.

La Figura 12 muestra de izquierda a derecha la formulación elaborada con acetato de metilo en la fase interna y 2 % PVA, seguida de una formulación con alcohol isopropílico y 1 % de PVA, y por último formulación con alcohol isopropílico: acetato de metilo y mezcla de 2 %PVA y 3 % Tween 80. En la primera formulación elaborada con el solvente acetato de etilo se observa blanquecina indicando que la sal lipídica se encuentra suspendida en el medio acuoso esto puede ser debido a que, aunque la sal lipídica es soluble en el solvente, en el paso de emulsión cuando

la nanopartícula se forma el exceso de medio acuoso interfiere con la solubilidad de la sal lipídica propiciando que la sal lipídica se precipite.

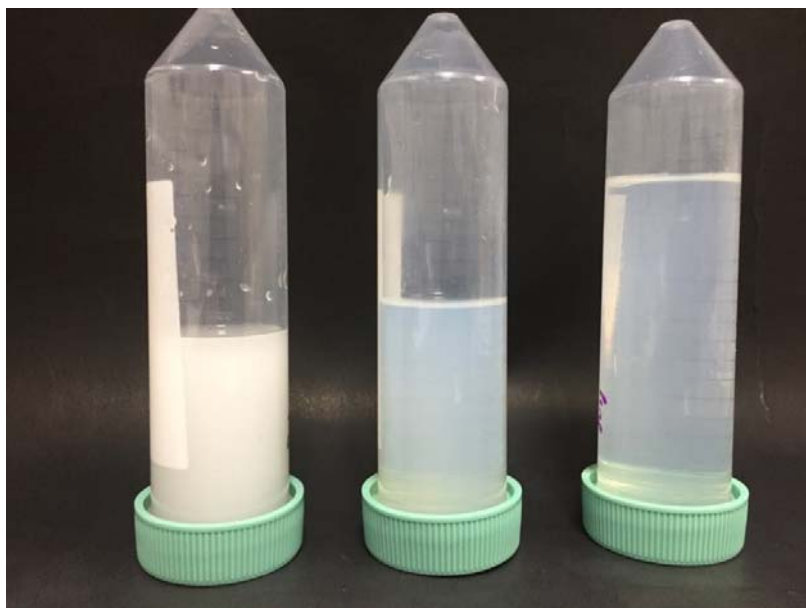


Figura 8 Formulación en fresco de NPs. Preparadas con EtOAc (2% PVA), IPA (1% PVA) y mezcla de EtOAc:IPA (2:3 % PVA:Tween 80) respectivamente.

Determinación del tamaño de partícula por DLS

Las muestras frescas aforadas a 50 mL a una concentración ~0.5 % w/v. fueron analizadas con la técnica de dispersión de luz dinámica. En la siguiente tabla se muestra el tamaño promedio de NPs y el PDI \pm la desviación estándar respectiva a la medición, medido por DLS de las corridas 1 a 11.

Tabla 11 Tamaño de partícula al día 1 de muestras preparadas (2:1) PVA:Teen y fase orgánica con 25% IPA, se muestra el tamaño y PDI promedio \pm desviación estándar

Corrida	Tamaño nm		PDI		
1	149.2	\pm 31.7	0.226	\pm	0.034
2	97.4	\pm 2.5	0.366	\pm	0.021
3	142.3	\pm 12.1	0.226	\pm	0.030
4	106.2	\pm 0.2	0.177	\pm	0.015
5	88.5	\pm 3.9	0.295	\pm	0.035
6	122.9	\pm 5.3	0.192	\pm	0.034
7	104.4	\pm 12.7	0.190	\pm	0.048

8	121	±	12.6	0.271	±	0.023
9	113.3	±	5.1	0.153	±	0.019
10	103.9	±	3.0	0.136	±	0.032
11	139.9	±	2.5	0.263	±	0.004

La tabla 14 muestra los valores promedio de las NPs para las diferentes corridas del experimento, se puede observar que dos de las formulaciones con tamaño más pequeño (corrida 2 y 5) tienen el PDI más alto esto puede deberse al bajo contenido de PVA:Tween 80 en ambas, la corrida 9 que está dentro de las más pequeñas tiene un valor medio de PVA:Tween 80, los valores altos de surfactante marcados en color verde mayoritariamente muestran valores altos de PDI a excepción de la corrida 4 la cual parece estabilizar la alta concentración de surfactantes con la alta cantidad de sal lipídica (120 mg). En la mayoría de las corridas los valores se mantuvieron cercanos a 100 nm (2, 4, 5, 7, 9 y 10) donde de acuerdo a la teoría sugiere una correcta distribución al tejido diana a través de los capilares y capacidad para penetrar a través de membranas y piel (Battaglia & Ugazio, 2019; Nobile & Nobile, 2017).

DSC

El pico de fusión endotérmico del compuesto propranolol puro se muestra a 161°C, de igual forma esta señal no está presente en las nanopartículas lo que sugiere que la forma cristalina del compuesto puro propranolol fue transformado a

un estado amorfo o desordenado después de encapsularse en las nanopartículas lipídicas(Singh et al., 2015).

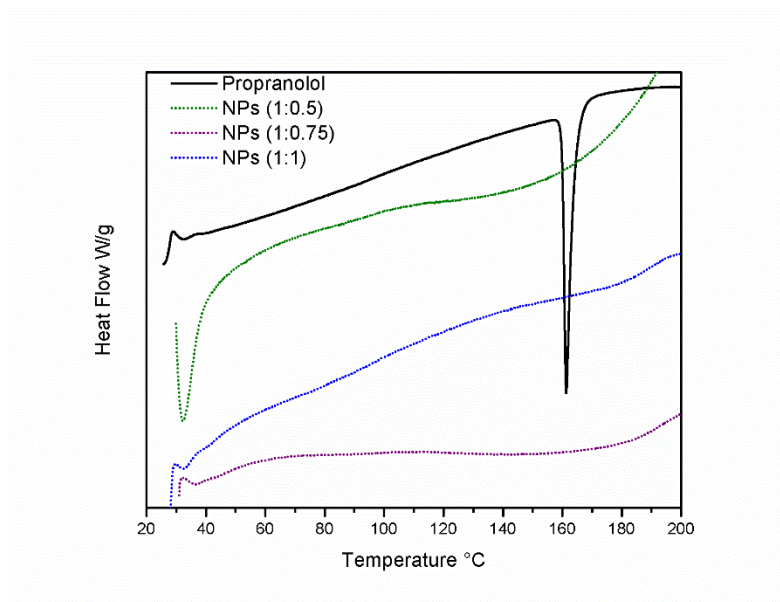


Figura 9 Calorimetría diferencial de barrido de propranolol clorhidrato y NPs preparadas con sal lipídica

Eficiencia de encapsulación y cargado de fármaco

La eficiencia de encapsulación y el cargado de fármaco se llevó a cabo mediante el método de ultra centrifugación. Cuantificando por HPLC el contenido de fármaco en la formulación fresca y el contenido de fármaco en la fase libre es decir

aquel que no reacciono en nanopartícula Los resultados se muestran en la tabla 15 aplicando la ecuación 3 y 4.

$$DL \% = \frac{\text{cantidad de fármaco en la formulación fresca} - \text{fármaco libre}}{w \text{ total de las NPs purificadas}} \times 100$$

$$EE \% = \frac{DL * w \text{ total de las NPs purificadas}}{\text{cantidad inicial añadida de SL en las NPs} * \text{contenido de fármaco en SL}} \times 100$$

Donde la cantidad de fármaco en la formulación fresca y el fármaco soluble libre son calculados mediante la curva del método HPLC, la cantidad inicial de fármaco añadido durante la preparación fue de 80,100,120 mg de sal lipídica multiplicada por el % de cargado que fue de 33.8 % obtenido en el punto 4.2, lo que representaría un 27.0, 33.8 y 40.6 mg de propranolol aplicables para las corridas que corresponda

El peso total de las NPs se expresa como el peso después de purificar con unidades PALL y ajustado al volumen total de la formulación a 50 mL.

Tabla 12 Cargado de fármaco y eficiencia de encapsulación de las corridas 1 a 9

<i>Corrida</i>	<i>Cantidad de SL (mg)</i>	<i>Contenido de F en SL (mg)</i>	<i>PVA:Tween 80</i>	<i>w NPs purificadas (mg)</i>	<i>DL %</i>	<i>EE %</i>
3	80	27.1	-1	42	31 ± 2	48 ± 4
6	80	27.1	0	30	56 ± 8*	50 ± 7
8	80	27.1	1	54	31 ± 0.5	41 ± 1
1	100	33.8	0	46	41 ± 5	56 ± 7
2	100	33.8	-1	34	50 ± 2*	63 ± 3
7	100	33.8	0	46	36 ± 6	48 ± 8
9	100	33.8	0	47	50 ± 7	69 ± 9
11	100	33.8	1	57	38 ± 5	54 ± 7
4	120	40.6	1	59	56 ± 8*	81 ± 12
5	120	40.6	-1	35	52 ± 4*	67 ± 5

10	120	40.6	0	48	53 ± 6	75 ± 8
----	-----	------	---	----	--------	--------

* contenido por encima del límite teórico esperado en 48 %

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar, se puede observar las condiciones de elaboración de las corridas ordenadas de menor a mayor contenido de sal lipídica, y calculado el contenido de fármaco en la sal lipídica de acuerdo al punto 4.2. El análisis de varianza para DL indica un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para la cantidad de sal lipídica $p = 0.0013$, donde a mayor contenido de sal lipídica mayor cargado de fármaco sin embargo algunos datos se presentan como anómalos ya que el límite teórico esperado se estima en 48 % por lo que la optimización se establece en este valor y esto se traduce en una optimización de la formulación para obtener el máximo cargado de fármaco en 109 mg de sal lipídica y una relación de PVA:Tween 80 de -0.56 que se traduce a una relación porcentual de $\sim (1.75 : 2.62)$.

El análisis de varianza para EE indica que el factor sal lipídica es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) influyendo positivamente a aumentar la EE, al igual que la relación de ambos factores (sal lipídica y PVA:Tween) influye positivamente. El factor PVA:Tween por si solo no afecta la eficiencia de encapsulación, el contenido de sal lipídica a mayor cantidad mayor eficiencia según los efectos principales descritos en la figura 14. La optimización de esta respuesta

se establece en un valor de 1 para el factor A (PVA:Tween 80) y 120 mg de sal lipídica para obtener la máxima eficiencia.

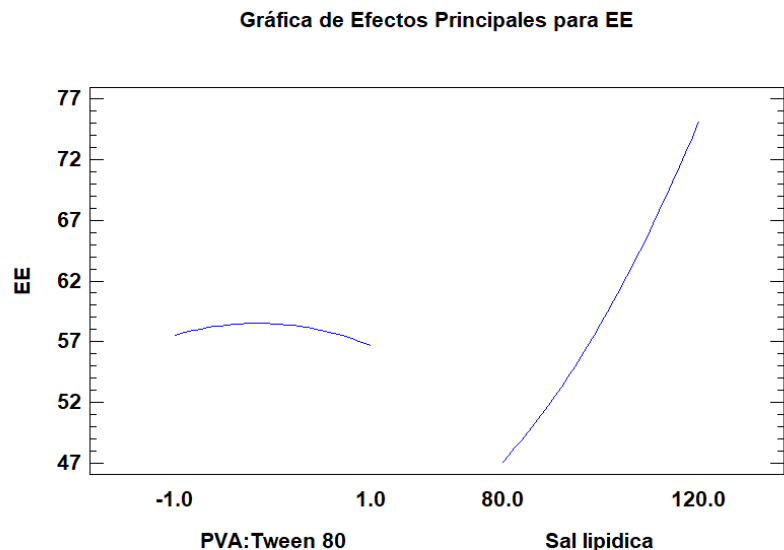


Figura 10 Gráfica de efectos principales para eficiencia de encapsulación

Estudio de estabilidad de NPs con respecto al tiempo

La estabilidad con respecto al tiempo se determinó en las formulaciones 1 a 11 en los días 7, 15, 30, 60 días y hasta 9 meses posteriores a la preparación, los datos de promedio y PDI \pm desviación estándar se muestran en la Tabla 16.

Tabla 13 Análisis de tamaño para estabilidad de NPs con respecto al tiempo

Corrida	Tamaño nm								
	Día								
	1	7	15	30	> 270				
1	149.2 \pm 31.7	139.6 \pm 5.6	162.8 \pm 16	132.8 \pm 2.6	131.4 \pm 2.6				
2	97.4 \pm 2.5	89.9 \pm 0.3	99.8 \pm 6.4	91.1 \pm 0.5	131.1 \pm 2.6				
3	142.3 \pm 12.1	131 \pm 7.9	150.1 \pm 25.5	126.2 \pm 4.9	141.2 \pm 5.9				
4	106.2 \pm 0.2	104.1 \pm 1	138.8 \pm 25.2	105.9 \pm 1.1	109.9 \pm 4.7				
5	88.5 \pm 3.9	85.3 \pm 3.1	82.6 \pm 3.3	84.6 \pm 1.7	88.2 \pm 5.5				
6	122.9 \pm 5.3	119.4 \pm 5	115.8 \pm 4.8	123.6 \pm 15.6	120.4 \pm 8.8				
7	104.4 \pm 12.7	97.5 \pm 1.6	97.9 \pm 1.2	101.1 \pm 2.5	107.7 \pm 0.2				
8	121 \pm 12.6	162.8 \pm 5.2	113.1 \pm 5.6	117.5 \pm 3.1	102.9 \pm 2.2				
9	113.3 \pm 5.1	111.1 \pm 3.3	108.9 \pm 1.6	110 \pm 0.9	115.7 \pm 8.1				

10	103.9 ± 3	103.4 ± 1.6	102.8 ± 3.3	159.9 ± 25.1	102.8 ± 1.4
11	139.9 ± 2.5	137.7 ± 1.5	135.4 ± 4.1	158.5 ± 15.5	149.5 ± 5.5

Se observa en la Tabla 16 que la estabilidad de las formulaciones almacenadas en refrigeración es continua hasta los 9 meses sin diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ de acuerdo a la t-test, lo que indica que las concentraciones de surfactantes son adecuadas comportándose igual las corridas con bajo o alto contenido de surfactantes y también aquellas con bajo o alto contenido de sal lipídica, solo una formulación corrida 2 tuvo un aumento significativo ($p = < 0.001$) con una diferencia de medias de 43.7 unidades de acuerdo a la t-test.

4.4. Optimización de la formulación de NPs

Se analizó el diseño experimental factorial de 3 niveles: 3^2 , los datos de ANOVA se muestran a continuación.

Tabla 14 Análisis de Varianza para Tamaño

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:(PVA:Tween 80)	756.605	1	756.605	2.29	0.1431
B:Sal lipídica	3839.8	1	3839.8	11.60	0.0022
AA	10.2358	1	10.2358	0.03	0.8618
AB	1138.8	1	1138.8	3.44	0.0754
BB	310.699	1	310.699	0.94	0.3419
Bloques	463.601	2	231.8	0.70	0.5059
Error total	8274.76	25	330.99		
Total (corr.)	14851.4	32			

R-cuadrada = 44.2832 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 28.6824 porciento

Error estándar del est. = 18.1931

Error absoluto medio = 12.1007

Estadístico Durbin-Watson = 2.25595 (P=0.6637)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.14988

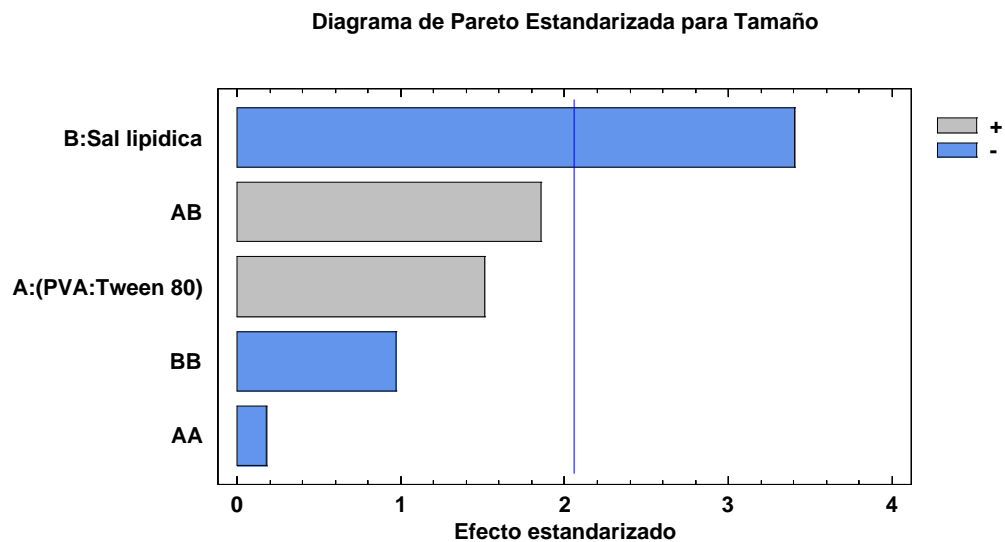


Figura 11 Diagrama de Pareto estandarizado para Tamaño

De acuerdo a la tabla 17 el factor sal lipídica es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) lo que nos indica que afecta al tamaño de partícula con un 95 % de confianza, de acuerdo al diagrama de Pareto (Figura 15) se observa que la influencia es negativa es decir disminuye el tamaño, el grafico de efectos principales para tamaño nos indica que para el factor A, a menor concentración de surfactantes es decir utilizando la relación PVA:Tween 80 (1.5 : 2.25), tiende a disminuir el

tamaño y para el factor sal lipídica una concentración de 120 mg es decir el nivel alto tiene una tendencia a disminuir el tamaño, esta misma información se puede apreciar en la Figura 17 superficie de respuesta las curvaturas sobre la superficie indican el área donde podemos mejorar el diseño para establecer condiciones más exactas que nos puedan permitir aumentar el valor de regresión para predecir con mayor exactitud el resultado de tamaño.

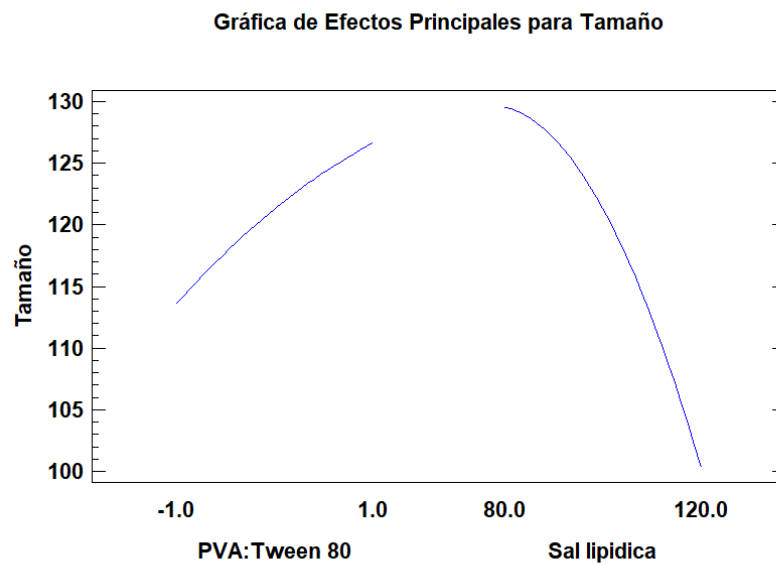


Figura 12 Grafico de efectos principales para tamaño

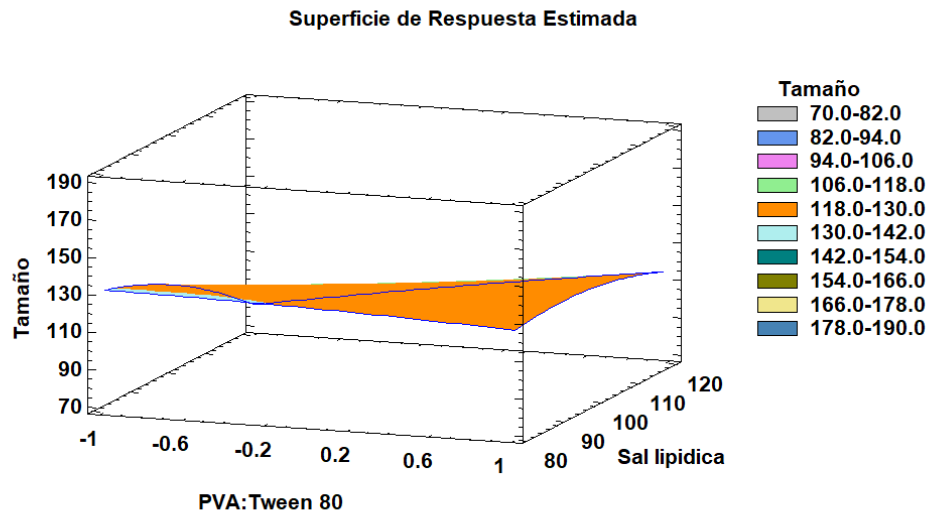


Figura 13 Grafico de superficie de respuesta estimada para tamaño de partícula

4.5. Estudios de liberación invitro

Se estudió la liberación de propranolol usando el método de bolsa de diálisis MW 12-14 KDa. en medio PBS pH 7.4 a 37°C, 100 rpm, figurando las condiciones fisiológicas. Los resultados se muestran en las siguientes figuras.

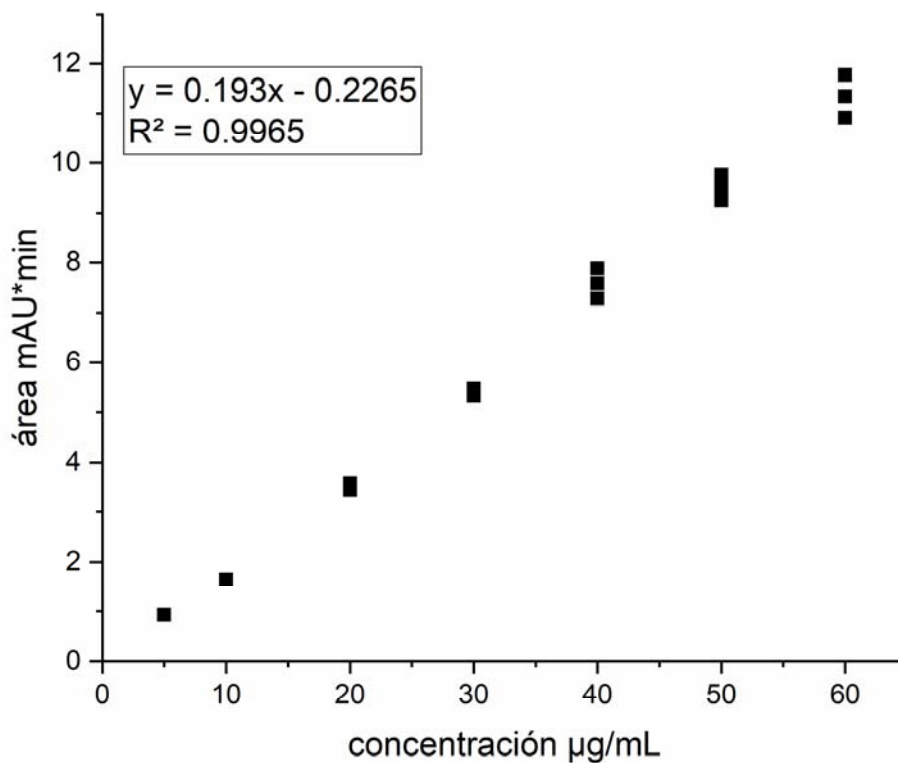


Figura 14 Análisis para cuantificar la fracción liberada de propranolol en bolsa MWCO 12-14 KDa medio PBS pH:7.4. método cromatográfico UV

4.6. Estudios de permeabilidad

A intervalos de tiempo alícuotas de 1 ml fueron tomadas del compartimento receptor, la concentración fue detectada en el HPLC

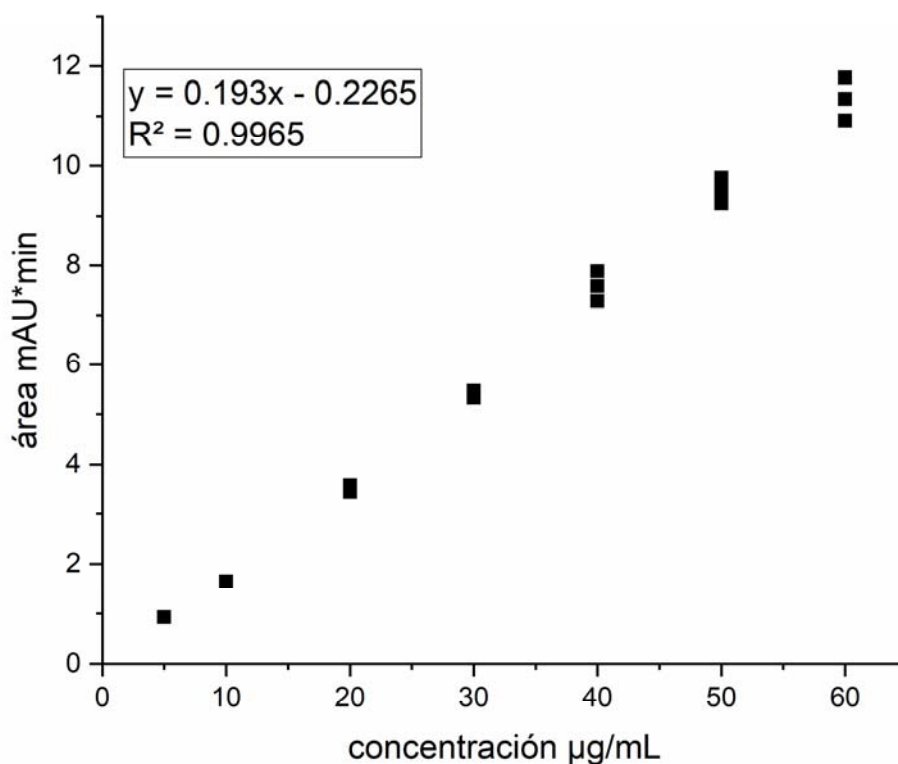


Figura 15 Análisis para cuantificar la fracción liberada de propranolol en celda Franz medio PBS pH:7.4. método HPLC

4.7. Estudio de citotoxicidad de las nanopartículas

Se evaluó la toxicidad de las nanopartículas usando el método de MTT en líneas celulares BALB / 3T3 y HeLa. La figura 20 muestra el porcentaje de viabilidad celular de las formulaciones de NPs corridas 2, 3 y 5 comparadas con propranolol clorhidrato se observa que a una concentración de 0.1 μg de NPs las células tienen una viabilidad de 85 70 y 106 % respectivamente comparadas con propranolol libre

el cual tiene muerte celular de aproximadamente 90 % en las tres concentraciones evaluadas para la línea celular de HeLa, en el caso de la línea celular 3T3 figura 21, la viabilidad celular desde 92, 114 y 124 % para las NPs corrida 2, 3 y 5 respectivamente, el propranolol libre en esta línea celular también mostro muerte celular cercana al 90 % en todas las concentraciones. Este efecto de inhibición de viabilidad celular de propranolol se debe a sus características de apoptosis propias del fármaco, entre ellas la disminución de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Albiñana et al., 2015).

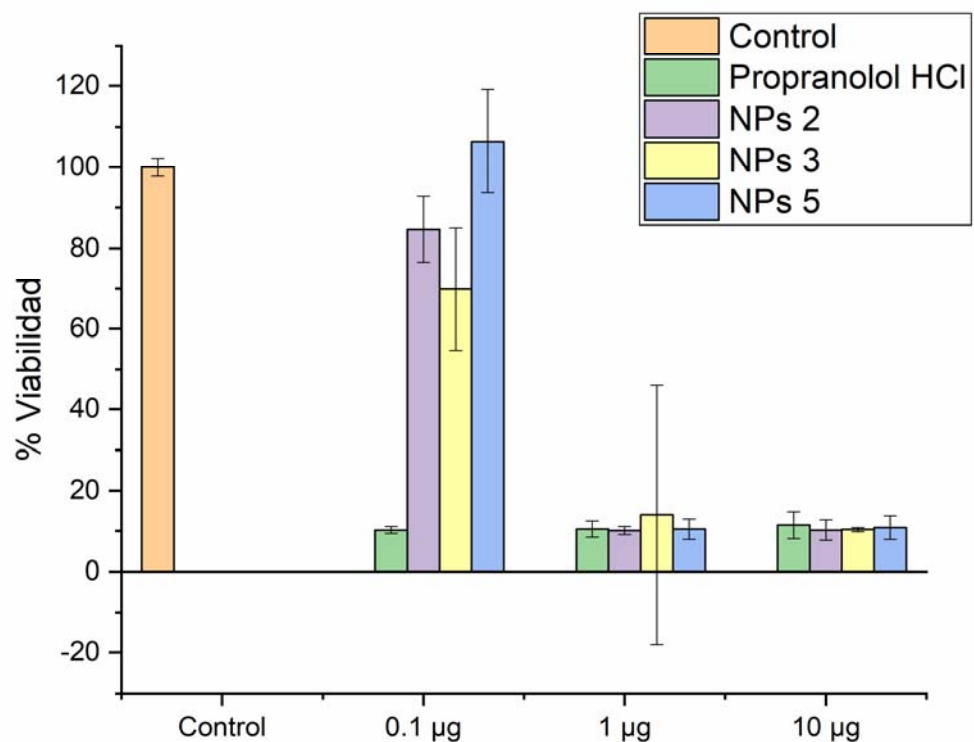


Figura 16 Porcentaje de viabilidad celular en línea HeLa, evaluación de NPs vs propranolol HCl

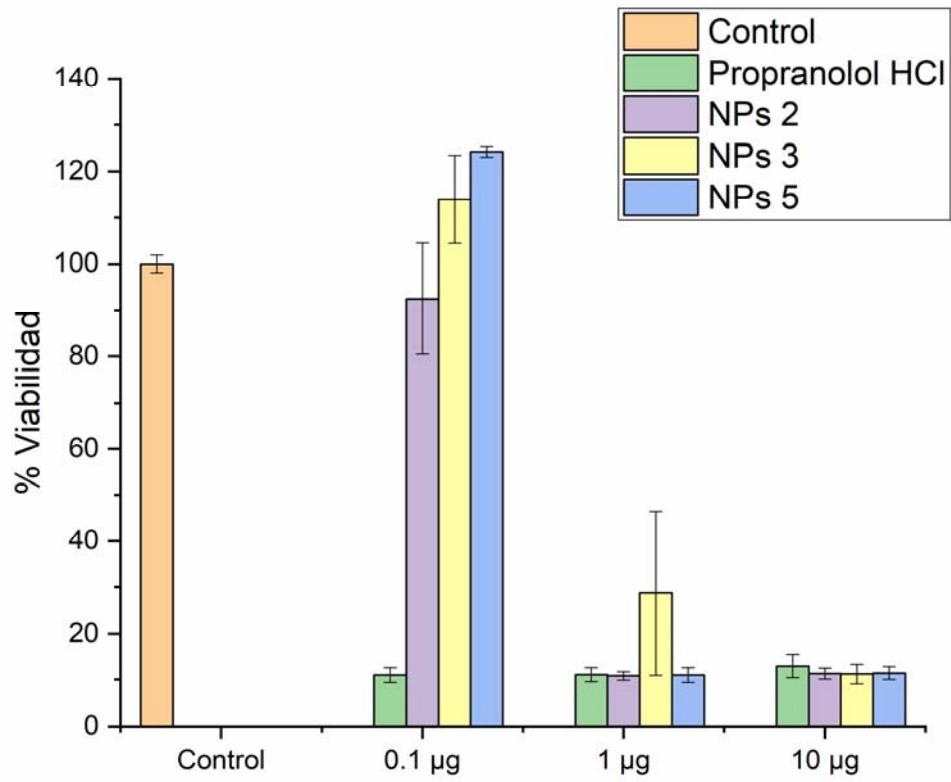


Figura 17 Porcentaje de viabilidad celular en línea 3T3, evaluación de NPs vs propranolol HCl

4.8. Curvas estándares de propranolol

Las absorbancias de la curva estándar de propranolol en agua y PBS por el método espectrofotométrico UV-Vis se muestran en las tablas 16 y 16

Tabla 15 Absorbancias de curva estándar de propranolol en agua método espectrofotométrico UV

Vial	[concentración] ug/mL	Absorbancia			Promedio \pm STD
1	5	0.068	0.094	0.090	0.084 \pm 0.014
2	10	0.179	0.173	0.155	0.169 \pm 0.012
3	20	0.350	0.362	0.376	0.363 \pm 0.013
4	30	0.522	0.556	0.541	0.540 \pm 0.017
5	40	0.741	0.744	0.793	0.759 \pm 0.029
6	50	0.942	0.933	0.938	0.938 \pm 0.004
7	60	1.135	1.121	1.128	1.128 \pm 0.007

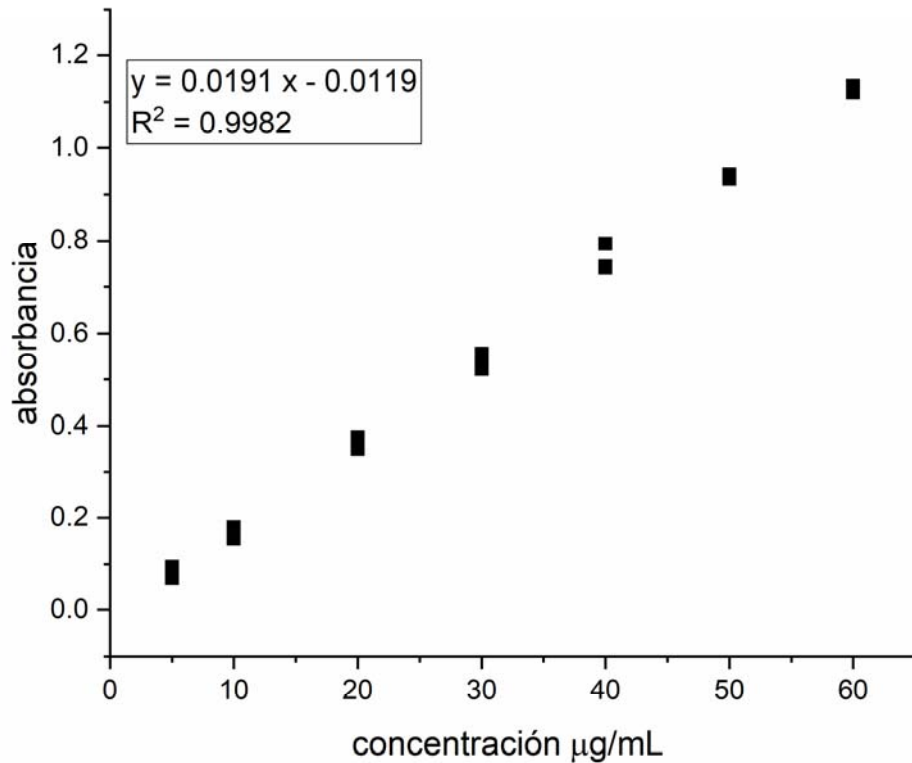


Figura 18 Curva estándar de propranolol en agua método espectrofotométrico

Resultado Medio PBS pH 7.4

Tabla 16 Absorbancias de curva estándar de propranolol en PBS método espectrofotométrico UV

Vial	[concentración] ug/mL	Absorbancia			Promedio ± STD
1	5	0.099	0.086	0.087	0.091 ± 0.007
2	10	0.202	0.174	0.18	0.185 ± 0.015
3	20	0.392	0.351	0.354	0.366 ± 0.023
4	30	0.592	0.546	0.523	0.554 ± 0.035
5	40	0.731	0.724	0.722	0.726 ± 0.005
6	50	0.972	0.916	0.913	0.934 ± 0.033
7	60	1.153	1.154	1.156	1.154±0.002

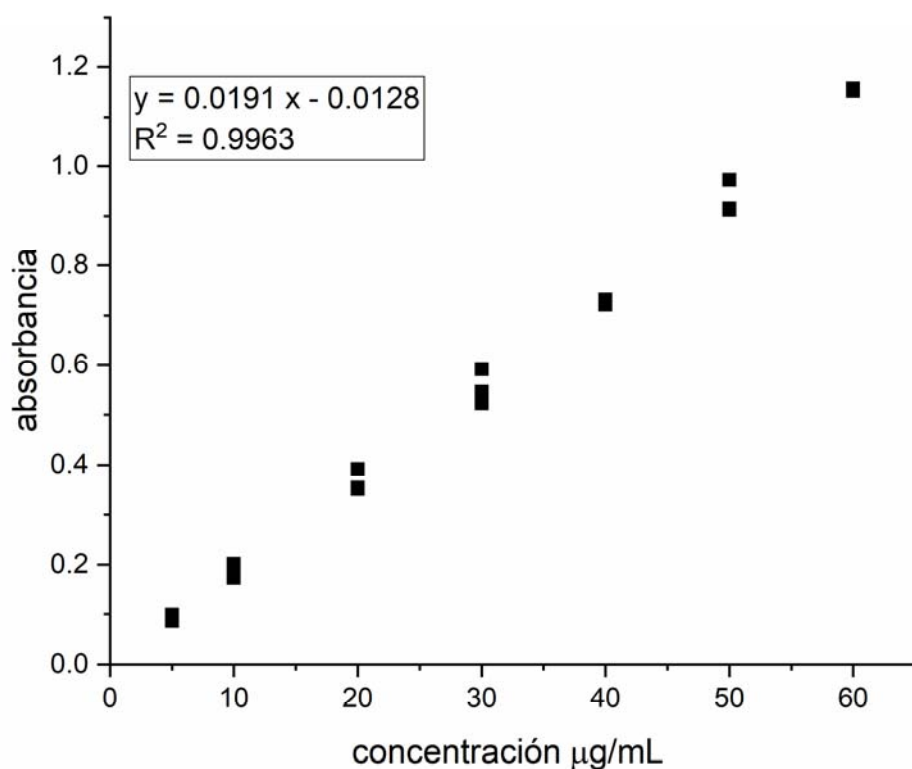


Figura 19 Curva estándar de propranolol en PBS pH 7.4 método espectrofotométrico

Tabla 17 Mili unidades de absorbancia por minuto de curva estándar de propranolol en PBS método cromatográfico

Vial	[concentración] ug/mL	Área mAU*min			Promedio ± STD
1	5	0.9281	0.9305	0.9257	0.9281 ± 0.0024
2	10	1.6467	1.6457	1.6476	1.6467 ± 0.0010
3	20	3.5021	3.5668	3.4374	3.5021 ± 0.0647
4	30	5.3993	5.4672	5.3313	5.3993 ± 0.0680
5	40	7.5786	7.8827	7.2744	7.5786 ± 0.3042
6	50	9.5072	9.7584	9.2559	9.5072 ± 0.2513
7	60	11.3443	11.7762	10.9124	11.3443 ± 0.4319

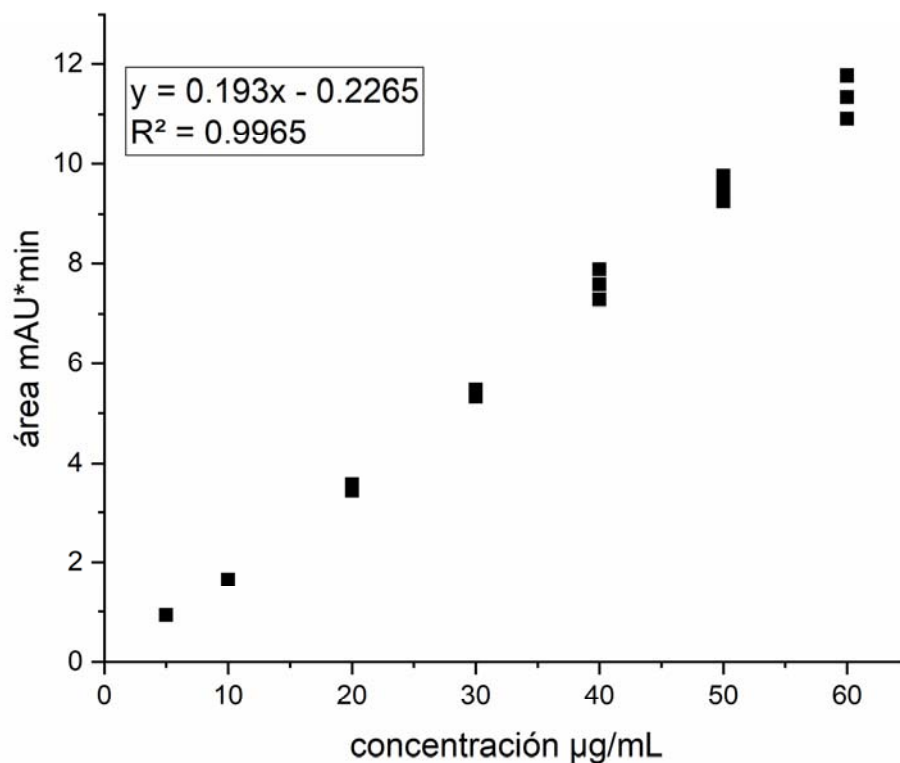


Figura 20 Curva estándar de propranolol en PBS método cromatográfico

V. CONCLUSIONES

Se logró preparar el oleato de propranolol a partir de clorhidrato de propranolol y la sal de potasio del ácido oleico con un porcentaje de rendimiento del 34 % y un contenido de fármaco de 34 % medido por método cromatográfico de alta resolución.

Se logró la caracterización del compuesto oleato del propranolol por espectrofotómetro FT IR, y se compararon con el clorhidrato de propranolol y el oleato de potasio por el mismo método donde se encontraron señales características para la presencia del complejo de sal lipídica.

Se logró la preparación de NPs lipídicas mediante la adaptación del método de emulsión-difusión de solvente a temperatura ambiente utilizando una mezcla de MeOAc:IPA (75:25) para la correcta dilución de la sal lipídica en la fase orgánica y su seguida dispersión en la fase acuosa, se utilizó un mezcla en % 2:3 de PVA:Tween para la fase acuosa.

Se logró la optimizar la formulación de nanopartículas en dos principales variables tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, aplicando un diseño experimental para la optimización donde se encontró que para ambas respuestas el factor sal lipídica es estadísticamente significativo con un menor tamaño y mayor EE a altas cantidades de sal lipídica. El tamaño de partícula para la obtención de datos del diseño experimental fue realizado con la técnica de DLS y la EE fue cuantificada por método cromatógrafo de alta resolución con una fase móvil de ácido fórmico: acetonitrilo en diferentes gradientes de concentración.

También fue posible medir la estabilidad de las nanopartículas con respecto al tiempo hasta un periodo mayor a 9 meses donde se encontró que en 10 de las 11

formulaciones no existe diferencia significativa en el cambio de tamaño del día 1 vs 270 siendo un indicador de la estabilidad de la formulación.

Se evaluó la dispersión del fármaco por calorimetría diferencial de barrido para la sal lipídica y las NPs así como sus reactivos de referencia y se logró estudiar la toxicidad de las NPs por un método MTT encontrándose una viabilidad celular cercana a 100 para una concentración de 0.1 ug y con el aumento de la concentración de fármaco una disminución hasta valores cercanos a 10 % de viabilidad para las NPs.

REFERENCIAS

- Chen Kang, Y. S. (2016). Delivery of Nanoparticles for Treatment of Brain Tumor. *Current Drug Metabolism*, 745-754.
- E., S. (LLC 2011). Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery Methods in Molecular Biology. En S. E.. McNeil. Springer Science+Business Media.
- Enciclopedia médica A.D.A.M. (14 de 4 de 2015). *MedlinePlus*. Obtenido de https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/9703.htm
- Enrique Lallana, A. S.-H.-T.-M. (2012). Click Chemistry for Drug Delivery Nanosystems. *Pharm Res.* 29, 1-34.
- K., W. (2010). Lesiones vasculares. En *Dermatología en Medicina General* (7 ed., págs. 1164-118). Argentina: Editorial Panamerica.
- Manca, M. L. (2016). Combination of argan oil and phospholipids for the development of an effective liposome-like formulation able to improve skin hydration and allantoin dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 204-211.
- McGuinness SM., F. I. (2011). Infantile hemangiomas. . En *En C. McGuinness SM. Pediatric Dermatology* (4th ed., págs. 1528-1545). Philadelphia, EUA: Elsevier.
- NCI. (31 de Marzo de 2016). Obtenido de National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/paciente/tratamiento-piel-pdq>
- Prow, T. W. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 470–491.
- Quintanar-Guerrero, D. T.-E.-Q. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2),, 211-218.
- Vijayan, V. R. (2013). Optimization and characterization of repaglinide biodegradable polymeric nanoparticle loaded transdermal patches: In vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 150–155.
- Villafuerte Robles, L. G. (2008). Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(1), 38–52.
- Al-Haddad, C., El Salloukh, N. A., & El Moussawi, Z. (2019). B-Blockers in the Treatment of Periocular Infantile Hemangioma. *Current Opinion in Ophthalmology*, 30(5), 319–325. <https://doi.org/10.1097/icu.0000000000000591>
- Albiñana, V., Villar Gómez De Las Heras, K., Serrano-Heras, G., Segura, T., Perona-Moratalla, A. B., Mota-Pérez, M., ... Botella, L. M. (2015). Propranolol reduces viability and induces apoptosis in hemangioblastoma cells from von Hippel-Lindau patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0343-5>
- Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>
- Babiak-Choroszczak, L., Giżewska-Kacprzak, K., Dawid, G., Gawrych, E., & Baglaj, M. (2019).

Safety assessment during initiation and maintenance of propranolol therapy for infantile hemangiomas. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(3), 381–390. <https://doi.org/10.17219/acem/94136>

- Battaglia, L., & Ugazio, E. (2019). Lipid nano- and microparticles: An overview of patent-related research. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2834941>
- Casiraghi, A., Musazzi, U. M., Rocco, P., Franzè, S., & Minghetti, P. (2016). Topical Treatment of Infantile Haemangiomas: A Comparative Study on the Selection of a Semi-Solid Vehicle. *Skin Pharmacology and Physiology*, 29(4), 210–219. <https://doi.org/10.1159/000447672>
- Castaneda, S., Melendez-Lopez, S., Garcia, E., De la Cruz, H., & Sanchez-Palacio, J. (2016). The Role of the Pharmacist in the Treatment of Patients with Infantile Hemangioma Using Propranolol. *Advances in Therapy*, 33(10), 1831–1839. <https://doi.org/10.1007/s12325-016-0391-9>
- Chantasart, D., Hao, J., & Li, S. K. (2013). Evaluation of skin permeation of β -blockers for topical drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 30(3), 866–877. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0928-9>
- Chaturvedi, K., Umadevi, S., & Vaghani, S. (2010). Floating matrix dosage form for propranolol hydrochloride based on gas formation technique: Development and in vitro evaluation. *Scientia Pharmaceutica*, 78(4), 927–939. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0909-02>
- Cheirif-Wolosky, O., Novelo-Soto, A. D., Orozco-Covarrubias, L., & Sáez-de-Ocariz, M. (2019). Hemangioma infantil: actualización del tratamiento tópico y sistémico. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 76(4), 167–175. <https://doi.org/10.24875/bmhim.19000002>
- Chen, T. S., Eichenfield, L. F., & Friedlander, S. F. (2012). Infantile Hemangiomas: An Update on Pathogenesis and Therapy. *Pediatrics*, 131(1), 99–108. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1128>
- Coates, J. (2004). Encyclopedia of Analytical Chemistry -Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–23. Retrieved from <http://www3.uma.pt/jrodrigues/disciplinas/QINO-II/Teorica/IR.pdf>
- Darrow, D. H., Greene, A. K., Mancini, A. J., Nopper, A. J., Cohen, B. A., Antaya, R. J., ... Urata, M. M. (2015). Diagnosis and management of infantile Hemangioma. *Pediatrics*, 136(4), e1060–e1104. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-2485>
- Das, S., Ng, W. K., Kanaujia, P., Kim, S., & Tan, R. B. H. (2011). Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(1), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.036>
- Drolet, B. A., Frommelt, P. C., Chamlin, S. L., Haggstrom, A., Bauman, N. M., Chiu, Y. E., ... Frieden, I. J. (2012). Initiation and Use of Propranolol for Infantile Hemangioma: Report of a Consensus Conference. *Pediatrics*, 131(1), 128–140. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1691>
- Escobar-Chavez, J., Diaz-Torres, R., Rodriguez-Cruz, I. M., Domínguez-Delgado, Sampere-Morales, Angeles-Anguiano, & Melgoza-Contreras. (2012). Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, (November), 3. <https://doi.org/10.2147/RTD.S32621>
- Förster, M., Bolzinger, M. A., Fessi, H., & Briançon, S. (2009). Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *European Journal of Dermatology*, 19(4), 309–323. <https://doi.org/10.1684/ejd.2009.0676>
- Gaur, P. K., Mishra, S., & Purohit, S. (2013). Solid Lipid Nanoparticles of Guggul Lipid as Drug Carrier for Transdermal Drug Delivery. *BioMed Research International*, 2013, 1–10.

- Goyal, A. K., Singh, R., Chauhan, G., & Rath, G. (2018). Non-invasive systemic drug delivery through mucosal routes. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2), 539–551. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1463230>
- Haggstrom, A. N., Drolet, B. A., Baselga, E., Chamlin, S. L., Garzon, M. C., Horii, K. A., ... Frieden, I. J. (2007). Prospective Study of Infantile Hemangiomas: Demographic, Prenatal, and Perinatal Characteristics. *Journal of Pediatrics*, 150(3), 291–294. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.12.003>
- Jamshidian-Tehrani, M., Nabavi, A., Taghavi, M., Sharif-Kashani, S., Kasaei, A., Sadeghi-Tari, A., ... Nowroozzadeh, M. H. (2019). Clinical and Ultrasonographic Evaluation of Infantile Periocular Hemangioma Treated With Oral Propranolol. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 35(5), 484–486. <https://doi.org/10.1097/iop.0000000000001336>
- Katas, H., Cevher, E., & Alpar, H. O. (2009). Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 369(1–2), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.012>
- Kelchen, M. N., & Brogden, N. K. (2018). In Vitro Skin Retention and Drug Permeation through Intact and Microneedle Pretreated Skin after Application of Propranolol Loaded Microemulsions. *Pharmaceutical Research*, 35(12), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2495-1>
- Kraisit, P., Limmatvapirat, S., Luangtana-Anan, M., & Sriamornsak, P. (2018). Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.006>
- Krowchuk, D. P., Frieden, I. J., Mancini, A. J., Darrow, D. H., Blei, F., Greene, A. K., ... Whelan, M. A. (2019). Clinical practice guideline for the management of infantile hemangiomas. *Pediatrics*, 143(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2018-3475>
- Lallana, E., Sousa-Herves, A., Fernandez-Trillo, F., Riguera, R., & Fernandez-Megia, E. (2012). Click chemistry for drug delivery nanosystems. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0568-5>
- Léaute-Labrèze, C., Boccarda, O., Degrugillier-Chopinnet, C., Mazereeuw-Hautier, J., Prey, S., Lebbé, G., ... Voisard, J. J. (2016). Safety of oral propranolol for the treatment of infantile hemangioma: A systematic review. *Pediatrics*, 138(4). <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0353>
- Léauté-Labrèze, C., Dumas de la Roque, E., Hubiche, T., & Boralevi, F. (2008). Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. *The New England Journal of Medicine*, 358(24), 2649–2651.
- Lee, K. C., & Bercovitch, L. (2013). Update on infantile hemangiomas. *Seminars in Perinatology*, 37(1), 49–58. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2012.11.003>
- Lou, H., Xu, G., & Huo, R. A. N. (2018). Curative effect and safety of propranolol combined with prednisone in the treatment of infantile hemangiomas. 4677–4682. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6035>
- Luu, M., & Frieden, I. J. (2013). Haemangioma: Clinical course, complications and management. *British Journal of Dermatology*, 169(1), 20–30. <https://doi.org/10.1111/bjd.12436>
- Manca, M. L., Matricardi, P., Cencetti, C., Peris, J. E., Melis, V., Carbone, C., ... Manconi, M. (2016). Combination of argan oil and phospholipids for the development of an effective liposome-like formulation able to improve skin hydration and allantoin dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.008>

- Mannschreck, D. B., Huang, A. H., Lie, E., Psoter, K., & Puttgen, K. (2019). Topical timolol as adjunct therapy to shorten oral propranolol therapy for infantile hemangiomas. *Pediatric Dermatology*, 36(3), 283–289. <https://doi.org/10.1111/pde.13816>
- Nobile, S., & Nobile, L. (2017). Nanotechnology for biomedical applications: Recent advances in neurosciences and bone tissue engineering. *Polymer Engineering and Science*, 57(7), 644–650. <https://doi.org/10.1002/pen.24595>
- Pediatr, E., & Tratamiento, D. L. L. R. (2011). *Tratamiento de los hemangiomas infantiles con propranolol Tratamiento de los hemangiomas infantiles con propranolol*. 1–3.
- Pereira Sato, J. A., & Ferreira, F. F. (2015). Caracterização Em Estado Sólido De Medicamentos Genérico, Similar E Referência Do Cloridrato De Propranolol. *Brazilian Journal of Thermal Analysis*, 4(4), 62. <https://doi.org/10.18362/bjta.v4.i4.231>
- Priyanka, K., & Sathali, A. A. H. (2012). Preparation and evaluation of montelukast sodium loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of Young Pharmacists : JYP*, 4(3), 129–137. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.100016>
- Prow, T. W., Grice, J. E., Lin, L. L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., ... Roberts, M. S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 470–491. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.012>
- Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.06.001>
- Raphael, M. F., Breur, J. M. P. J., Vlasveld, F. A. E., Elbert, N. J., Liem, Y. T. B., Kon, M., ... Pasmans, S. G. M. A. (2016). Treatment of infantile hemangiomas: Therapeutic options in regard to side effects and adverse events - A review of the literature. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(2), 199–214. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1130125>
- Roberts, S. A., Parikh, N., Blower, R. J., & Agrawal, N. (2018). SPIN: rapid synthesis, purification, and concentration of small drug-loaded liposomes. *Journal of Liposome Research*, 28(4), 331–340. <https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1381115>
- Rotter, A., & de Oliveira, Z. N. P. (2017). Infantile hemangioma: pathogenesis and mechanisms of action of propranolol. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 15(12), 1185–1190. <https://doi.org/10.1111/ddg.13365>
- Rowley, K. I. J. C., Orbes, R. O. T. F., Ork, P. E. Y., Yqvist, H. Å. N., & Amber, O. L. A. C. (1999). *Oleate Salt Formation and Mesomorphic Behavior in the Propranolol / Oleic Acid Binary System*. 88(6), 4–9.
- Sánchez-Carpintero, I., Ruiz-Rodríguez, R., & López-Gutiérrez, J. C. (2011). Propranolol en hemangiomas infantiles: eficacia clínica, riesgos y recomendaciones. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 102(10), 766–779. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.05.003>
- Satterfield, K. R., & Chambers, C. B. (2019). Current treatment and management of infantile hemangiomas. *Survey of Ophthalmology*, 64(5), 608–618. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.02.005>
- Savard, M., & Gosselin, J. (2006). Epstein-Barr virus immunosuppression of innate immunity mediated by phagocytes. *Virus Research*, 119(2), 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.008>
- Shi, C., Ahmad Khan, S., Wang, K., & Schneider, M. (2015). Improved delivery of the natural anticancer drug tetrandrine. *International Journal of Pharmaceutics*, 479(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.022>

- Silva, C. O., Rijo, P., Molpeceres, J., Figueiredo, I. V., Ascensão, L., Fernandes, A. S., ... Reis, C. P. (2015). Polymeric nanoparticles modified with fatty acids encapsulating betamethasone for anti-inflammatory treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1–2), 271–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.044>
- Singh, I., Swami, R., Jeengar, M. K., Khan, W., & Sistla, R. (2015). p-Aminophenyl-a-d-mannopyranoside engineered lipidic nanoparticles for effective delivery of docetaxel to brain. *Chemistry and Physics of Lipids*, 188, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.03.003>
- Smith, C. J. F., Friedlander, S. F., Guma, M., Kavanaugh, A., & Chambers, C. D. (2017). Infantile Hemangiomas: An Updated Review on Risk Factors, Pathogenesis, and Treatment. *Birth Defects Research*, 109(11), 809–815. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1023>
- Somasundaran, P., & Zhang, L. (2000). FLOTATION | Reagent Adsorption On Phosphates. *Encyclopedia of Separation Science*, (1989), 1562–1572. <https://doi.org/10.1016/b0-12-226770-2/01391-0>
- Sorrell, J., & Chamlin, S. L. (2013). *Topical Timolol 0.5 % Gel-Forming Solution for Small Deep Facial Infantile Hemangiomas*. 30(5), 592–595. <https://doi.org/10.1111/pde.12209>
- Spahn, J. D., & Szefl, S. J. (2008). Pharmacology of the Lung and Drug Therapy. In Lynn Max Taussig & L. I. Landau (Eds.), *Pediatric Respiratory Medicine* (Second, pp. 219–233). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04048-8.50020-7>
- Storch, C. H., & Hoeger, P. H. (2010). Propranolol for infantile haemangiomas: Insights into the molecular mechanisms of action. *British Journal of Dermatology*, 163(2), 269–274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09848.x>
- Tanner, T., & Marks, R. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: Review and comment. *Skin Research and Technology*, 14(3), 249–260. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2008.00316.x>
- Villafuerte Robles, L., García F., B., Garzonn S., M. D. L., Hernández L., A., & Vazquez R., M. L. (2008). Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39(1), 38–52.
- Wang, L., Xia, Y., Zhai, Y., Li, C., & Li, Y. (2012). Topical propranolol hydrochloride gel for superficial infantile hemangiomas. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 32(6), 923–926. <https://doi.org/10.1007/s11596-012-1059-6>
- Wu, H., Wang, X., Zheng, J., Zhang, L., Li, X., Yuan, W. E., & Liu, X. (2019). Propranolol-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for Treatment of Infantile Hemangiomas. *Advanced Healthcare Materials*, 8(9), 1–12. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801261>
- Yang, H., Hu, D.-L., Shu, Q., & Guo, X.-D. (2019). Efficacy and adverse effects of oral propranolol in infantile hemangioma: a meta-analysis of comparative studies. *World Journal of Pediatrics*, (3333). <https://doi.org/10.1007/s12519-019-00285-9>
- Yu, Z., Cai, R., Chang, L., Qiu, Y., Chen, X., Chen, Q., ... Lin, X. (2019). Clinical and radiological outcomes of infantile hemangioma treated with oral propranolol: A long-term follow-up study. *Journal of Dermatology*, 46(5), 376–382. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14853>