

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

SÓLIDAS (SLN) QUE CONTIENEN CAPSAICINA

POR EL MÉTODO EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

QFB. PAOLA CERVANTES COVARRUBIAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ARACELY SERRANO MEDINA

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

JULIO 2016

HOJA DE APROBACIÓN

DEDICATORIA

A mis padres Javier y Ana por su amor y esfuerzo incondicional

♪ ♪ Caminito de la escuela ♪ ♪

Por qué en los libros siempre se aprende cómo vivir mejor.

AGRADECIMIENTOS

Como parte de este proyecto es importante mencionar aquellas personas e instituciones que me guiaron o apoyaron ya sea con conocimientos, con instalaciones, con su tiempo, con préstamo de equipos o material, durante la aplicación de técnicas, con tramites, con su alegría, con su paciencia, por recibirme con ansias, con aprecio o con esa actitud positiva que hace de las personas un mejor ser para desarrollarse y desarrollar sus habilidades, a todos ellos gracias.

En especial a mi tutor y coordinador de este proyecto el Dr. José M. Cornejo Bravo, por confiar en mi al aceptarme en su grupo de investigadores, y cada día posterior por darme la oportunidad de aprender de él y aprender de mi misma a trabajar en lo que me apasiona.

Con amor agradezco infinitamente a mis padres, a ellos con pocas palabras les puedo decir “Gracias por forjar en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida”

A mis maestros por su tiempo y enseñanzas, a la Dra. Aracely Serrano Medina a la Dra. Gabriela Carrillo.

A mis queridos compañeros de posgrado a Kenia Palomino por ayudarme con tantas dudas, a Ayla Bea, a Hector Magaña mis compañeros de Biofarmacia por todos los detalles.

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.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica por apoyarme con infraestructura para desarrollar algunos análisis. A la Dra. Karla Suarez y Ricardo Valdez por su tiempo.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

A continuación se mencionan las publicaciones y trabajos presentados producto de este proyecto de investigación:

Carteles:

XLVIII Congreso Nacional y VI Internacional de Ciencias Farmacéuticas, a celebrarse del 6 al 9 de septiembre de 2015, en Cancún, Quintana Roo.

43a Sesión anual y Exposición de la Sociedad de Liberación Controlada a celebrarse del 17-20 de julio de 2016, en el centro de convenciones del estado de Washington, Seattle, Washington, U.S.A.

ÍNDICE

CONTENIDO

HOJA DE APROBACIÓN	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
PUBLICACIONES Y CONGRESOS	V
ÍNDICE	VI
Contenido de figuras.....	X
Contenido de tablas	XII
Lista de abreviaturas	XIII
Resumen	XVI

..... CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

..... 1

1.1. Dolor	1
1.1.1. Dolor neuropático	1
1.1.2. Dolor musculoesquelético	2
1.2. Clasificación del dolor	2
1.2.1. Según su duración.....	4
1.2.2. Según su patogenia	4
1.2.3. Según la localización	5
1.2.4. Según el curso.....	5
1.2.5. Según la intensidad.....	5
1.3. Epidemiología y demografía.....	5
1.2.1 Dolor neuropático	6
1.2.2 Dolor musculoesquelético	7

..... CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN

..... 8

2.1. Hipótesis	10
2.2. Objetivos	10
2.2.1. General.....	10
2.2.2. Específicos:.....	10
2.3. Impactos.....	11

2.3.1.	Social	11
2.3.2.	Económico	11
.....CAPITULO III ANTECEDENTES		13
.....		13
3.1.	Tratamiento del dolor.....	13
3.1.1.	Fármacos no opioides	13
3.1.2.	Fármacos opioides débiles.....	14
3.1.3.	Fármacos opioides fuertes	14
3.1.4.	Fármacos coadyuvantes.....	14
3.2.	Capsaicina.....	16
3.2.1.	Propiedades fisicoquímicas	16
3.2.2.	Historia de la capsaicina.....	17
3.2.3.	Farmacocinética.....	17
3.2.4.	Tratamiento con capsaicina	18
3.2.5.	Mecanismo de acción	19
3.2.6.	Efectos adversos y contraindicaciones	20
3.3.	Ruta de administración de fármacos	21
3.3.1.	Vía oral	21
3.3.2.	Vía parenteral	21
3.3.3.	Vía tópica.....	22
3.3.4.	Vía mucosal	22
3.4.	Anatomía de la piel	23
3.4.1.	Propiedades de la barrera de la piel	25
3.5.	Nanosistemas de liberación de fármacos	26
3.5.1.	Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)	26
3.5.2.	Dendrímeros	26
3.5.1.	Liposomas.....	27
3.5.2.	Micelas poliméricas	27
3.5.3.	Nanocápsulas	27
3.5.4.	Nanoemulsiones	27
3.5.5.	Nanoesferas	28
3.5.6.	Nanopartículas	28
3.6.	Métodos de preparación de nanopartículas lipídicas solidas	29

3.7.	Descripción breve de los reactivos empleados	30
3.7.1.	Lípidos	30
3.7.2.	Mowiol® 4-88	31
3.8.	Fundamento de técnicas de análisis	31
3.8.1.	Medición del tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica	31
3.8.2.	Medición del potencial Zeta por el Nano Zetasizer.....	31
3.8.3.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	32
.....CAPITULO IV METODOLOGÍA		
.....		33
4.1.	Reactivos e instrumentos	33
4.1.1.	Reactivos y solventes	33
4.1.2.	Instrumentos de medición.....	33
4.1.3.	Otros instrumentos.....	34
4.2.	Estudio preliminar de preparación de SLN sin fármaco	34
4.3.	Diseño de experimento	35
4.4.	Preparación de SLN cargadas con capsaicina.....	36
4.4.1.	Purificación de nanopartículas.....	36
4.4.2.	Liofilización.....	37
4.4.3.	Reconstitución	37
4.4.4.	Determinación del tamaño de partícula por DLS	37
4.4.5.	Potencial Z.....	38
4.4.6.	Microscopia electrónica de barrido	38
4.5.	Estudio de estabilidad	38
4.6.	Cargado de fármaco (%DL) y eficiencia de encapsulación (%EE).....	38
4.7.	Estudios de liberación in-vitro en bolsa de diálisis.....	39
4.8.	Análisis de datos	39
.....CAPÍTULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
.....		40
5.1	Determinación del tamaño de partícula por DLS en SLN no cargadas	40
5.2	Diseño experimental	41
5.3	Caracterización física de SLN-CAP	41
5.3.1	Determinación de tamaño medio de nanopartícula e índice de polidispersidad..	41

5.1.	Análisis sobre la influencia de los factores experimentales en el tamaño medio de nanopartícula	42
5.4	Determinación de las formulaciones óptimas	45
5.5	Determinación del potencial Z de las nanopartículas	46
5.6	Micrografías de las nanopartículas (SEM)	46
5.7	Estudio del efecto del tiempo en el tamaño medio de nanopartícula.....	47
5.8	Eficiencia de encapsulación (% EE) y cargado de fármaco (% DL)	49
5.9	Estudios de liberación in-vitro en bolsa de diálisis.....	49
.....CAPÍTULO VI CONCLUSIÓN		52
.....CAPÍTULO VII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA		54
.....CAPITULO VIII ANEXOS		57
8.1	Tamaño medio por intensidad de las partículas no cargadas contra tiempo. Comparación de distintos lípidos.	57
8.2	Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, grafico superior formulación A (10:150:7), gráfico inferior formulación B (30:150:3)	58
8.3	Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación C (20:200:5), gráfico inferior formulación D (10:250:3)	59
8.4	Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación E (30:250:7), gráfico inferior formulación F (30:150:7)	60
8.5	Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación G (10:150:3), gráfico inferior formulación H (20:200:5)	61
8.6	Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación I (30:250:3), gráfico inferior formulación J (10:250:7)	62
8.7	Análisis de varianza para tamaño medio	63
8.7.1	ANOVA- MeAc (A-E).....	63
8.7.2	ANOVA-EtAc (F-J).....	64
8.8	Cálculo para obtener el %DL de capsaicina	65
8.9	Cálculo para obtener el %EE	65
8.10	Cálculo para obtener % Rendimiento.....	65
8.11	Curva estándar de CAP en EtOH 20%	66
8.12	Curva estándar de CAP en PBS(pH:7.4):EtOH (1:1)	67

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura No. 1 Escala facial de dolor de Wong Baker, 0:sin dolor, 2: duele un poco, 4:duele un poco mas, 6: duele aun mas, 8: duele mucho, 10: el peor dolor.	3
Figura No. 2 Diagrama de los tipos de dolor.....	4
Figura No. 3 Escalera analgésica de la Organización mundial de la salud	15
Figura No. 4 Estructura química de capsaicina	16
Figura No. 5 Anatomía de la piel. Muestra la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo.	24
Figura No. 6 Representación esquemática de una Nanopartícula Lipídica Solida.....	28
Figura No. 7 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de nanopartícula. Formulaciones elaboradas con MeAc. $\alpha=0.05$	43
Figura No. 8 Diagrama de efectos principales para tamaño. Formulaciones elaboradas con MeAc.	43
Figura No. 9 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de nanopartícula. Formulaciones elaboradas con EtAc. $\alpha=0.06$	44
Figura No. 10 Diagrama de efectos principales para tamaño. Formulaciones elaboradas con EtAc.	45
Figura No. 11 Micrografías de SLN por microscopia electrónica de transmisión formulación (I) SLN-CAP 30% w, 250mg Gelucire. Izquierda barra 1 μ m, derecha barra 2 μ m.	47
Figura No. 12 Influencia del tiempo en el tamaño de SLN-CAP A) Formulaciones elaboradas con MeAc. B) Formulaciones elaboradas con EtAc.....	48
Figura No. 13 Análisis para cuantificar la fracción liberada de capsaicina en medio PBS pH: 7.4:EtOH (1:1) con respecto al tiempo. Comparacion de solucion de CAP y formulaciones de SLN-CAP preparadas a partir del diseño de experimento. Gráfico superior MeAc. Gráfico inferior EtAc.....	50

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1 Diseño de Screening, Saturated half fraction 2^{3-1} a partir de dos factores experimentales y una variable de respuesta. (n=3).....	36
Tabla 2 Distribución de tamaño de partícula e índice de polidispersidad de formulaciones de SLN-no cargadas, PVAL Mw~70,000 al 5% w/v	40
Tabla 3 Distribución de tamaño de partícula e índice de polidispersidad de formulaciones de SLN-no cargadas, PVAL Mw~31,000 al 5% w/v. Disolvente EtAc.....	40
Tabla 4 Diseño de Screening, Saturated half fraction 2^{3-1} a partir de dos factores experimentales y una variable de respuesta. Formulaciones de SLN-CAP.....	41
Tabla 5 Distribución del tamaño de partícula de formulaciones de SLN-CAP, muestra simple, dilución 1:10 (n=3)	41
Tabla 6 Valores de los factores experimentales optimizados para obtener SLN-CAP de tamaño medio de 100nm.....	45
Tabla 7 Cargado de capsaicina en las formulaciones de SLN y eficiencia de encapsulación...49	

LISTA DE ABREVIATURAS

% w/w	Porcentaje peso/peso
% w/v	Porcentaje peso/volumen
°C	Grados centígrados
aa	Aminoácidos
ADT	Antidepresivos tricíclicos
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AR	Artritis reumatoide
BSA	Albumina de suero bovino
CAP	Capsaicina
Dh	Diámetro hidrodinámico
DL	Cargado de fármaco
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
EE	Eficiencia de encapsulación
EtAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
Fig.	Figura
h	Horas
HLB	Balance lipofílico hidrofílico
IASP	Asociación Internacional para el estudio del dolor
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INC	Instituto Nacional del Cáncer
IR	Índice de refracción
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

kDa	Kilodalton
MeAc	Acetato de metilo
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
Mw	Peso molecular
MWCO	Peso molecular límite
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
NLC	Acarreadores lipídicos nano estructurados
nm	Nanómetros
nm	Nanómetros
NPD	Neuropatía periférica diabética
NPs	Nanopartículas
OA	Osteoartritis
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer salino de fosfatos
PDI	Índice de polidispersidad
pH	Potencial de hidrogeno
pKa	Potencial de la constante de acides
PVAL	Polivinil alcohol
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
SC	Estrato corneo
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
SN	Sistema nervioso

SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
TRP	Potencial transitorio del receptor
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
W	Peso

RESUMEN

Dolor es una sensación desencadenada por el sistema nervioso, se ha sugerido que este problema de salud pública afecta del 25 al 29% de la población general a nivel internacional, el dolor neuropático y musculoesquelético son causas comunes de dolor. La presencia de estos tipos de dolor y la presencia de otras enfermedades crónicas son a la vez de forma independiente relacionadas con limitaciones funcionales, en términos de mal funcionamiento físico, problemas para realizar actividades de la vida diaria y restricciones en la participación.

La capsaicina es un alcaloide natural, con efecto analgésico que se utiliza esencialmente por vía tópica en distintos padecimientos donde existe dolor, capsaicina causa irritación, picazón y escozor cutáneo en los tejidos en los que entra en contacto, pese a esto produce una desensibilización en los nociceptores cutáneos, esta desensibilización es la base de su efecto analgésico por periodos prolongados. En base esto se propuso un sistema de liberación que proteja al fármaco y disminuya los efectos no deseados.

Se prepararon nanopartículas lipídicas solidas con distintos lípidos (Gelucire® 44/14, Compritol® 888 ATO y Galeol™ mono y di-glicéridos), obteniendo NPs de 187 nm con el lípido Gelucire®, por lo que se prosiguió a optimizar la formulación desarrollando un diseño experimental que incluía dos factores experimentales y una variable de respuesta, para cada solvente estudiado, obteniéndose tamaños de hasta 103.7 nm con PDI de 0.23, encontrándose la formulación óptima para obtener NPs de aproximadamente 100 nm en 30% w/w de CAP, y 3% w/v de PVAL, la cantidad de Gelucire® si difiere para cada solvente siendo 150mg para MeAc y 250mg para EtAc. El estudio de estabilidad mostro que se forman aglomerados al paso del

tiempo, los cuales ocurren en menor tiempo a medida que el % de CAP incrementa. Se logró cargado de fármaco de hasta el 8%, con promedio de 3.6% y EE promedio de 88.9%.

Los estudios de liberación muestran que la formulación B libera el total del fármaco en 48 h, esta formulación contiene 30% w/w de CAP, 150mg de Ge4lucire® y 3% w/v de PVAL, DL: 4.2% y EE: 78%, lo que indica que la formulación óptima puede seguirse estudiando para una posible liberación transdermal.

Capítulo I Introducción

1.1.DOLOR

El dolor es una sensación desencadenada por el sistema nervioso, el cual puede ayudar a diagnosticar algún problema. Sin dolor las personas podrían lastimarse gravemente o tener algún problema médico sin darse cuenta (U.S. National Library of Medicine, 2016). Una vez que se trata el problema el dolor suele desaparecer sin embargo existen condiciones en las que el dolor sigue presente y esto afecta negativamente a quien lo padece.

1.1.1. Dolor neuropático

El dolor neuropático se define como el causado por daño estructural o disfunción neuronal del sistema nervioso central (SNC) o periférico; persiste aunque el estímulo haya desaparecido. Según la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP por sus siglas en inglés) se define como "el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somato sensorial".

El dolor neuropático es causado por el daño estructural y la disfunción de las neuronas del SNC o periférico. Cualquier proceso que dañe los nervios, como las afecciones metabólicas, traumáticas, infecciosas, isquémicas, tóxicas o inmunitarias, puede ocasionar dolor neuropático. Además, el dolor neuropático puede deberse a compresión nerviosa o al procesamiento anormal de las señales dolorosas por el cerebro o la médula espinal.

El dolor neuropático puede ser periférico (consecuencia directa de lesiones o enfermedades que afecten a los nervios periféricos, a los ganglios de las raíces dorsales o a las raíces dorsales) o central (consecuencia directa de lesiones o enfermedades que afecten al SNC)

Algunas de las afecciones neuropáticas comunes observadas en el adulto, son la neuropatía diabética, la neuralgia posherpética o la neuralgia del trigémino. (Huijer, 2012)

1.1.2. Dolor musculoesquelético

El dolor musculoesquelético es una consecuencia conocida del esfuerzo repetitivo, el uso excesivo y los trastornos musculoesqueléticos relacionados con el trabajo. Estas lesiones incluyen una variedad de trastornos que provocan dolor en los huesos, articulaciones, músculos o estructuras circundantes. El dolor puede ser agudo o crónico, focal o difuso. El dolor de espalda baja es el ejemplo más común de dolor musculoesquelético crónico (Casado, 2009). El dolor musculoesquelético crónico se define como dolor en los músculos, tendones, articulaciones y ligamentos por más de 3 meses, esta condición frecuentemente se caracteriza por presentar dolor desproporcional (Coppieters, 2016). Otros ejemplos de dolor musculoesquelético incluyen tendinitis y tendinosis, neuropatías, mialgia y fracturas por estrés.

1.2. CLASIFICACIÓN DEL DOLOR

El dolor es muy variable en la descripción, el carácter y la intensidad entre los individuos. Para el propósito de comprender, predecir, y tratar el dolor, se han utilizado una variedad de sistemas de clasificación. Entre ellos se encuentran la escala verbal propuesta por Keele en 1948, donde el paciente elige una palabra que mejor cuantifique la intensidad del dolor, ej. Ligero, moderado, intenso, mucho, insoportable, etc., esta palabra se asocia con un número.

Existe también la escala visual analógica introducida por Huskinson en 1976, se compone de un dibujo de una línea recta vertical u horizontal donde un extremo corresponde a nada de dolor y el otro al máximo dolor.

También se introdujo la escala numérica por Downie en 1978, donde el paciente asigna un número regularmente de 0 a 10 al dolor que presenta, donde cero es no hay dolor y 10 el máximo dolor.

La escala facial de Wong y Baker se desarrolló para comprender la cantidad de dolor en niños en esta se utilizan caras para mejor expresión. (Fig. 1)



Figura No. 1 Escala facial de dolor de Wong Baker, 0: sin dolor, 2: duele un poco, 4: duele un poco mas, 6: duele aun mas, 8: duele mucho, 10: el peor dolor.

La escala de grises de Luesher utiliza como variante la intensidad de color para cuantificar en una paleta con tonalidades entre la ausencia de dolor (color blanco) hasta muy doloroso (color negro).

La escala luminosa analógica de Nayman utiliza colores con intensidad de luz variante que van desde la ausencia de dolor (blanco) hasta dolor máximo (violeta), otras escalas también pueden utilizar este y otros parámetros de forma simultanea para valorar la cantidad de dolor en el paciente.

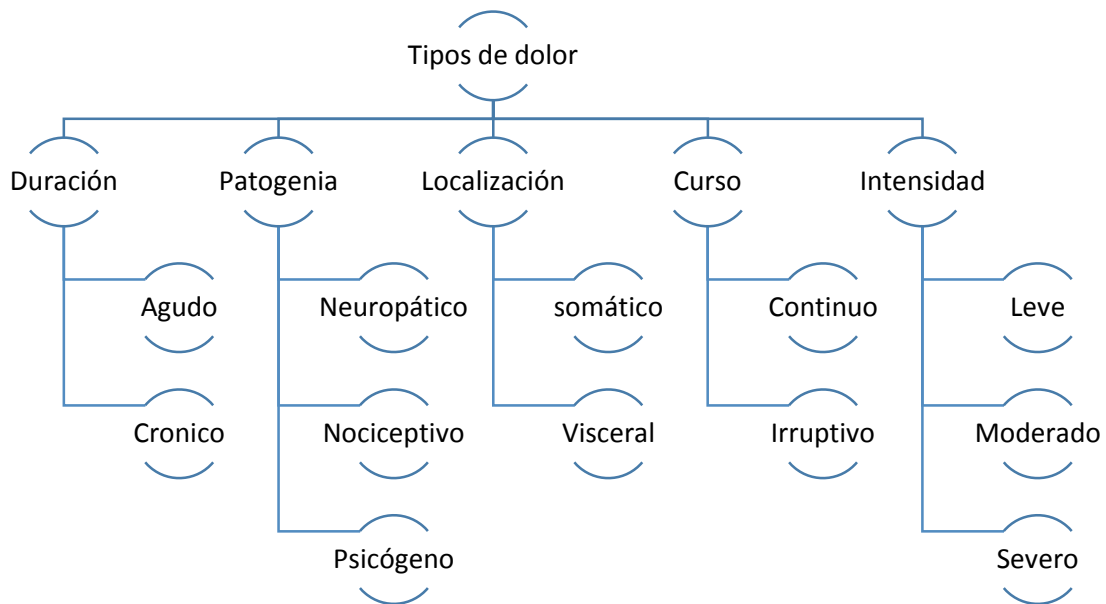


Figura No. 2 Diagrama de los tipos de dolor.

1.2.1. Según su duración

Agudo: El dolor agudo comienza repentinamente y es limitado con el tiempo.

Crónico: Se manifiesta en forma persistente, episódica o recurrente, su intensidad o severidad afecta la funcionalidad o las condiciones de vida del enfermo que lo padece, y es atribuible a un proceso de enfermedad.

1.2.2. Según su patogenia

Neuropático: Dolor “iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso”.

Nociceptivo: Debido a la lesión de estructuras sensibles al dolor.

Psicógeno: El paciente describe problemas psicológicos en términos de daño tisular, como depresión o ansiedad.

1.2.3. Según la localización

Somático: Aparece cuando un estímulo dañino excita los receptores nociceptivos en piel, muslos o articulaciones, regularmente es bien localizado y no hay dificultades para describirlo.

Visceral: Aparece cuando un estímulo dañino excita los receptores nociceptivos que están en las vísceras, este dolor es mal localizado, puede irradiarse a zonas alejadas a donde se generó.

1.2.4. Según el curso

Continuo: Persistente a lo largo del día y no desaparece.

Irruptivo: Es una exacerbación aguda del dolor de rápida aparición, corta duración y de moderada a elevada intensidad, en pacientes con dolor de fondo estable.

1.2.5. Según la intensidad

Leve: Puede realizar actividades habituales.

Moderado: Interfiere en las actividades habituales.

Severo: Interfiere con el descanso.

1.3. EPIDEMIOLOGIA Y DEMOGRAFÍA

En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 5% de los padecimientos atendidos por médicos de primer contacto, son dolorosos por definición. En pacientes de edad avanzada los problemas relacionados con el dolor son más comunes que cualquier otra queja.

El dolor también es común en los hogares de ancianos. Entre el 45% y el 80% de los residentes del hogar de ancianos puede tener dolor considerable. Muchos tienen múltiples quejas de dolor y múltiples fuentes potenciales de dolor. Sin embargo, los estudios han sugerido que la

prevalencia del dolor en las personas mayores residentes en la comunidad puede ser tan alta como del 25% a 56%.

1.2.1 Dolor neuropático

La neuralgia es más común en las personas de edad avanzada, pero puede ocurrir a cualquier edad. La neuralgia post-herpética y la neuralgia del trigémino son las formas más comunes de neuralgia. Otras neuralgias periféricas como la neuropatía periférica diabética, es una complicación de la diabetes y se caracteriza por síntomas y/o signos de disfunción nerviosa periférica.

La diabetes mellitus es una causa importante de neuropatía periférica y representa casi la mitad de todos los casos. En un estudio, informó una prevalencia del 70% en los pacientes con diabetes tipo 2 durante 25 años o más. Teniendo en cuenta que la prevalencia de diabetes en los Estados Unidos es de aproximadamente 24 millones de personas, estos estudios sugieren que al menos 15 millones de estadounidenses desarrollarán neuropatía periférica diabética (NPD) en su vida. Si se incluyen las personas con prediabetes, este número puede superar los 20 millones. Estudios recientes han estimado que la prevalencia de la NPD dolorosa en los diabéticos es del 20% de lo que se deduce que casi 5 millones de personas en los Estados Unidos sufren NPD sintomática.

El dolor continuo, dolor que persiste o dolor fuera de proporción con el daño tisular, con el tiempo, a menudo resulta en discapacidad sustancial y trastornos psicológicos.

El dolor se asocia con un número de resultados negativos en las personas de edad avanzada. La depresión, disminución de la socialización, la alteración del sueño, caídas, los eventos adversos de los medicamentos, rehabilitación lenta, y el aumento de la utilización de

servicios de salud y los costos han sido asociados ya sea con la presencia de dolor o de su tratamiento en las personas mayores.

1.2.2 Dolor musculoesquelético

En un estudio realizado en 800 pacientes que acuden por primera vez al servicio de reumatología se concluyó que el 80% eran mujeres, con edad de 44.78 ± 14.9 años y los principales diagnósticos fueron osteoartritis (OA) en un 29.4%, y artritis reumatoide (AR) en un 22.3%. (Álvarez-Hernández, 2006)

La prevalencia del dolor de espalda se ha informado de 21% a 49.5%; dolor en las articulaciones del 20.5% al 71%; y dolor de cabeza de 1.2% a 50% en personas mayores de 65 años. En general, las causas más comunes de dolor en personas de edad avanzada están probablemente relacionados con los trastornos musculoesqueléticos, como el dolor de espalda y artritis.

Capítulo II Justificación

El dolor persistente es altamente prevalente, costoso y con frecuencia incapacitante en la vida posterior, se ha sugerido que este problema de salud pública afecta del 25 al 29% de la población general a nivel internacional (Covarrubias-Gómez, 2010).

Es más atribuible a causas músculo esqueléticas y neuropatías, usualmente involucra múltiples sitios y rara vez se produce en ausencia de otras comorbilidades. El dolor musculoesquelético en su mayoría se refiere a dolor en las articulaciones (OMS, 2003) y el dolor neuropático se refiere a aquel dolor que resulta de un funcionamiento anormal del sistema sensitivo, a nivel periférico o central. Se ha identificado que el dolor neuropático es el tipo más frecuente en los sujetos con dolor crónico; sin embargo, su prevalencia en la población general se estima entre el 1% y el 8%. (Covarrubias-Gómez A.) La prevalencia del dolor musculoesquelético se estima en 19.6%. (Alvarez-Nemegyei, 2011)

Ambos padecimientos son más comunes en mujeres y en personas de edad avanzada, las formas más comunes son artritis reumatoide, Osteoartritis, dolor de espalda baja, neuralgia post-herpética, neuralgia del trigémino y neuropatía periférica diabética.

Estos tipos de dolor y la presencia de otras enfermedades crónicas (comorbilidad) son a la vez de forma independiente relacionadas con limitaciones funcionales, en términos de mal funcionamiento físico, problemas para realizar actividades de la vida diaria y restricciones en la participación . Estos padecimientos indican que los adultos mayores están en especial riesgo de convertirse en impedimentos funcionales y pueden necesitar más atención en el cuidado de la salud.

Una alternativa para el tratamiento de dolor neuropático y condiciones asociadas tales como la OA y la AR es la capsaicina (CAP) tópica, un fármaco con el que se ha reportado una mejoría en 80% de los pacientes españoles estudiados con dolor neuropático (Vidal, 2004)

Tras la aplicación sobre la piel capsaicina provoca mayor sensibilidad, seguido de un periodo de sensibilidad reducida y después de aplicaciones repetidas, una desensibilización persistente. Actualmente se han desarrollado parches de capsaicina de alta concentración (8%) con la intención de aumentar la cantidad de capsaicina entregada y proporcionar hasta 12 semanas de alivio con dos aplicaciones, esta rápida liberación fue pensada para mejorar la tolerabilidad por que los nociceptores cutáneos son desfuncionalizados rápidamente, también se encuentran disponibles formulaciones de capsaicina a bajas concentraciones en cremas y gel. (Derry, 2013)

La administración tópica de CAP en piel humana es conocida por su efecto de depleción de la sustancia P (SP) presente en las fibras C, la cual está relacionada con los mecanismos dolorosos, actuando como antagonista de la SP sobreviene una acción analgésica. Pese a esto la aplicación es limitada debido a la inducción de eritema acompañada de picadura, quemazón y sensaciones de dolor (Agrawal, 2015) por la activación de receptores TRPV1 de superficie, estos efectos pueden ocasionar un desapego al tratamiento. Sin embargo al encapsular capsaicina en un vehículo de transporte como lo son las nanopartículas lipídicas solidas (SLN) se pretende disminuir o eliminar los efectos no deseados, conservando sus propiedades farmacológicas y prolongando los tiempos de alivio debido a la capacidad de retención de nanopartículas lipídicas en las capas de la piel.

El método de preparación de SLN conocido como de emulsión-difusión a demostrado ser un método eficiente y factible de escalar por lo que en este proyecto se optimizará este método para encapsular capsaicina en SLN. Altamente compatible con las características fisicoquímicas del fármaco.

2.1.HIPÓTESIS

Es posible obtener nanopartículas lipídicas sólidas a base de lípidos y tensoactivos, que contengan Capsaicina utilizando el método de emulsión-difusión con propiedades farmacéuticas adecuadas para la liberación tópica del fármaco.

2.2.OBJETIVOS

2.2.1. General

Obtener SLN de tamaño nanométrico que contengan capsaicina, comparando los resultados entre distintos lípidos, solventes y tensoactivos ya estudiados, con la visión de administrarse tópicamente en forma de hidrogel, evitando los efectos irritantes en la piel y alargando los tiempos de alivio.

2.2.2. Específicos:

- 1) Obtener mediante el método emulsión-difusión SLN de tamaño nanométrico que contengan capsaicina.
- 2) Medir el tamaño medio de nanopartícula y determinar la estabilidad del sistema.
- 3) Comparar los resultados obtenidos entre las distintas variables de estudio.
- 4) Evaluar cuales son los sistemas que mejor se comportan respecto al cambio de variables y optimizar la formulación.

- 5) Caracterizar las nanopartículas (NPs) en cuanto a cargado de fármaco (DL) y eficiencia de encapsulación (EE).
- 6) Realizar los estudios de liberación in-vitro.

2.3.IMPACTOS

2.3.1. Social

El dolor crónico tiene gran impacto en la participación en el mercado laboral y la productividad, y es una causa frecuente de abandono prematuro del mercado laboral. Del mismo modo, el dolor persistente de los niños es causa de ausentismo escolar y de ausentismo laboral de los padres y cuidadores.

El dolor no tratado afecta no solo a quien lo padece, sino también a su familia, a su comunidad y a la sociedad en su conjunto. Ello es así porque el dolor se acompaña de otros síntomas, tales como la depresión, la ansiedad o limitaciones físicas, y de un aislamiento social de los pacientes y sus familiares.

Se ha señalado que el manejo efectivo del dolor mejora las condiciones generales del paciente, facilita una recuperación más rápida y disminuye la estancia hospitalaria. (Guevara-López, 2007)

2.3.2. Económico

El IMSS gasta entre 33 mil y 44 mil pesos anuales en medicamentos para cada paciente que es atendido por dolor neuropático. (Vidal, 2004) Sin duda, el tratamiento adecuado del dolor en el niño y el adulto reduce los costos para la sociedad, tiene repercusiones positivas en la

utilización racional de los servicios del sistema de salud y genera un beneficio tanto económico como social para el país.

Capítulo III Antecedentes

3.1. TRATAMIENTO DEL DOLOR

Para tratar adecuadamente el dolor es importante diagnosticar la causa que lo produce, ya que los fármacos utilizados varían dependiendo la etiología, posteriormente es preciso valorar el estado general del paciente, la presencia o no enfermedades concomitantes o de circunstancias añadidas que puedan influir en la existencia dolorosa de cada individuo. Existen múltiples compuestos analgésicos y se pueden dividir en antiinflamatorios no esteroideos (AINES), opiáceos y fármacos coadyuvantes. En 1982 la Organización mundial de la salud (OMS) diseñó un tratamiento coordinado para aliviar el dolor oncológico con un número limitado de medicamentos eficaces, de fácil acceso, baratos y aplicables con un sencillo protocolo denominado “escalera analgésica de la OMS” (Fig.3) , el cual consiste en un tratamiento escalonado, iniciando con la utilización de fármacos de potencia analgésica baja y termina con la administración de opioides potentes tras un ascenso progresivo, hasta conseguir el alivio del dolor. (Bravo, 2005)

3.1.1. Fármacos no opioides

En el primer escalón en caso de dolor leve el paracetamol e ibuprofeno son los fármacos de elección en pacientes pediátricos. (Huijjer, 2012)

AINES han demostrado ser eficaces en el tratamiento crónico de dolor de espalda baja así como debido a osteoartritis; sin embargo, en general los AINES se consideran mínimamente eficaces en el tratamiento de otros tipos de dolor como el dolor neuropático. Se puede considerar

la adicción de un AINES a un régimen con opiáceos para economizar el uso de los últimos. (Beal, 2016)

3.1.2. Fármacos opioides débiles

Entre los opioides débiles la codeína, dihidrocodeína y tramadol son utilizados. (Huijjer, 2012)

3.1.3. Fármacos opioides fuertes

Morfina, Meperidina, Metadona, Fentanyl, Buprenorfina, Oxycodona, Butorfanol y Nalbufina. (FEDELAT, 2016)

Efectos adversos no deseados, tales como tolerancia a opioides, dependencia, estreñimiento, depresión respiratoria, deterioro de la capacidad cognitiva, supresión inmune, endocrinopatías relacionadas con opioides, son sólo algunas de las alteraciones físicas conocidas asociadas con el uso crónico de medicamentos opiáceos. (Beal, 2016)

3.1.4. Fármacos coadyuvantes

Los fármacos adyuvantes tienen indicaciones primarias distintas del dolor, pero poseen propiedades analgésicas en algunas afecciones dolorosas y pueden administrarse junto con los analgésicos para potenciar el alivio del dolor.

Antidepresivos: Antidepresivos tricíclicos (ADT) como la amitriptilina o la nortriptilina e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) son respaldados para el uso en adultos.

Anticonvulsiantes: El uso de la carbamazepina en el tratamiento del dolor neuropático es frecuente en el adulto. La gabapentina está registrada como anticonvulsiante para niños de

más de 3 años. Ketamina es utilizada en dosis subcutáneas (bajas) como adyuvante de los opioides potentes.

Anestésicos locales: En el adulto hay algunas pruebas de que la lidocaína intravenosa y su análogo oral, la mexiletina, son más eficaces que el placebo para reducir el dolor neuropático. (Huijer, 2012)

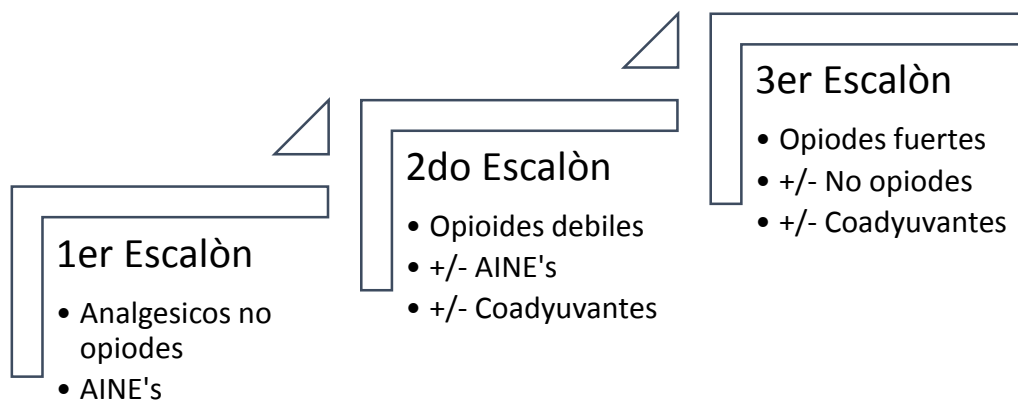


Figura No. 3 Escalera analgésica de la Organización mundial de la salud

3.2. CAPSAICINA

La capsaicina ((6E)-N-(4-Hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida) es un alcaloide natural, componente activo que da el sabor picante característico de los chiles, plantas que pertenecen al género *Capsicum*, forma parte de una clase de sustancias relacionadas conocidas como capsaicinoides y se cree que estas sustancias químicas son producidas por la planta como una defensa natural contra los herbívoros y los hongos. Posee parte de la vainillil (4-hidroxi-3-metoxibencil) y esto le confiere su actividad biológica. Estructuralmente posee un anillo de benceno y largas cadenas hidrofóbicas con un grupo amida (Hayman, 2008) (Fig. 4). Es un irritante para los mamíferos y produce una sensación de ardor en los tejidos en los que entra en contacto.

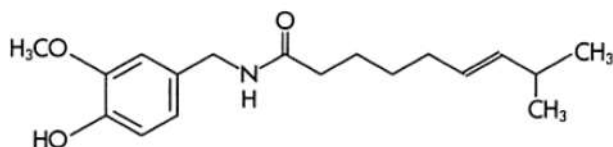


Figura No. 4 Estructura química de capsaicina

3.2.1. Propiedades fisicoquímicas

Formula: C₁₈H₂₇NO₃

Peso: 305.4 kDa

pKa: 9.76 (predicho)

Punto de fusión: 62-65°C

Punto de inflamabilidad: 113°C

Punto de ebullición: 210-220°C

Apariencia: Polvo blanco cristalino.

Soluble en etanol (≥ 30 mg/ml), éter, cloroformo, benceno, DMSO (≥ 30 mg/ml), DMF (≥ 30 mg/ml), y PBS (pH 7.2) (≥ 0.1 mg/ml), insoluble en agua.

3.2.2. Historia de la capsaicina

El compuesto fue aislado por primera vez en forma impura en 1816 por Christian Friedrich Bucholz. Lo llamó "capsicina," por el género *Capsicum* del que se extrajo. John Clough Umbral, que había aislado la capsaicina en forma casi pura, le dio el nombre de "capsaicina" en 1876, pero fue Karl Micko quien aislo capsaicina en su forma pura en 1898. Endre Högyes en 1878 observó la sensación de ardor e hiperemia producida por un extracto de *Capsicum* cuando se aplica sobre la piel humana. La composición química de capsaicina se determinó por primera vez por EK Nelson en 1919. La capsaicina fue sintetizada por primera vez en el laboratorio en 1930 por E. Spath y SF Darling, en 1961 las sustancias similares fueron aisladas de cultivos de chiles por los japoneses químicos S. Kosuge y Y. Inagaki. Posteriormente numerosos estudios en animales revelaron una caída en la presión arterial, aumento de la saliva y la secreción gástrica y el aumento de la actividad intestinal después de una inyección intravenosa de extracto de *Capsicum*. Como resultado, la capsaicina ha sido un agente farmacológico emocionante y su utilidad en diferentes condiciones clínicas sigue siendo explorada.

3.2.3. Farmacocinética

La mayoría de los estudios farmacocinéticos de la distribución de la capsaicina son los que se llevan a cabo después de la administración tópica, debido a las implicaciones terapéuticas importantes de esta ruta.

La capsaicina tópica se absorbe bien y rápidamente a través de la piel en humanos, la vida media de la capsaicina es de aproximadamente 24 horas. Dihidrocapsaicina es el principal metabolito de capsaicina. Dihidrocapsaicina y sus metabolitos son excretados por riñón, capsaicina es también depurada renalmente. (Hayman, 2008)

3.2.4. Tratamiento con capsaicina

La capsaicina se utiliza esencialmente por vía tópica en distintos padecimientos, también se utiliza en la investigación como un generador de dolor en modelos experimentales.

- Tratamiento del dolor ligero a moderado asociado a la OA o AR en adultos y niños mayores de 2 años a concentraciones al 0.025% o 0.075% tópicamente sobre las áreas dolorosas 4 veces al día.
- Tratamiento del dolor postmastectomía en adultos a concentración al 0.025% aplicada tópicamente 4-5 veces al día durante 4 semanas.
- Tratamiento de la mialgia o artralgia asociada a magulladuras, dolor de espalda, esguinces, etc. en adultos y niños mayores de 2 años a concentraciones al 0.025% o 0.075% sobre las áreas afectadas no más de 3 o 4 veces al día.
- Tratamiento del dolor neuropático asociado a la neuropatía diabética en adultos a concentración al 0.075% administrada 4 veces al día.
- Tratamiento de la neuralgia post-herpética en adultos a concentración al 0.025% aplicada tópicamente 4-5 veces al día sobre las áreas afectadas.

3.2.5. *Mecanismo de acción*

3.2.5.1. Nociceptores

Los nociceptores son los receptores periféricos del dolor que por medio de neurotransmisores envían sus mensajes al SNC. Su principal función es diferenciar los estímulos inocuos de los lesivos, esta función la realizan ignorando los estímulos de baja intensidad y codificando el estímulo lesivo dentro de un rango de intensidades y trasmitiéndolo al SNC. Histológicamente son terminaciones periféricas de las neuronas bipolares. Las fibras nerviosas son de 2 tipos, fibras A- α (fibras mielínicas) y fibras C (fibras amielínicas), la velocidad de conducción es rápida conduciendo señales de dolor de corta latencia y de velocidad lenta transmitiendo los estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos y químicos, respectivamente, estas últimas siendo polimodales y el grupo más numeroso. (Romera, 2000)

3.2.5.2. Receptores de superficie TRPV1

Los Capsaicinoides ejercen sus efectos mediante la activación del receptor TRPV1, consiste de 838 aa (peso molecular 95kDa) y contiene una subunidad sensible al calor que media la sensación de ardor inducida por capsaicina. (Hayman, 2008)

Los receptores del tipo TRP (potencial receptor transitorio) solo responden a temperatura, acidosis, estímulos dolorosos y osmolaridad. Capsaicina, protones, calor ($>43^{\circ}\text{C}$) y agonistas endógenos pueden activarlo ya sea directa o indirectamente. (Hayman, 2008)

La exposición tópica de capsaicina provoca una excitación neuronal inicial conduciendo a las sensaciones de calor, ardor, escozor o picazón atribuida a la liberación de la sustancia P, un neurotransmisor liberado por las fibras nerviosas estimuladas.

Después de esta estimulación inicial, hay un período refractario en el que se reduce la sensibilidad de las fibras nerviosas y, después las altas concentraciones de capsaicina o aplicaciones repetidas pueden producir un efecto local persistente en los nociceptores cutáneos, que se describe mejor como desfuncionalización, constituido por reducción de la actividad espontánea y una pérdida de capacidad de respuesta a una amplia gama de estímulos sensoriales. Esta desensibilización es la base de su efecto analgésico.

3.2.5.3. Sustancia P

La sustancia P es un neuropéptido de 11 aa presente en el cerebro y también a nivel periférico en piel, iris, glándulas salivales y vía nigroestriatal. Cuando ocurre una lesión se descargan enzimas proteolíticas que liberan sustancias que excitan nociceptores periféricos, al excitarse los receptores se descargan sustancias que incrementan la percepción del dolor tales como la sustancia P, en la piel esta se descarga desde las terminales nerviosas de las fibras C,

Se ha demostrado que la capsaicina libera la sustancia P a partir de neuronas nociceptivas aferentes, sus propiedades analgésicas están mediadas por la depleción de la sustancia P lo que conduce a la desensibilización de pequeñas neuronas sensoriales aferentes. Después de esta estimulación inicial, hay un período refractario en el que se reduce la sensibilidad de las fibras nerviosas y, después de la aplicación repetida, una desensibilización persistente atribuido a la sustancia P.

3.2.6. *Efectos adversos y contraindicaciones*

Los principales efectos adversos son irritación, picazón y escozor cutáneo al administrar capsaicina por vía tópica.

3.3. RUTA DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Las vías de administración de fármacos están directamente relacionadas con las formas farmacéuticas para conseguir la máxima eficacia de un medicamento, las vías más frecuentemente utilizadas son las siguientes: (Toro, 2008)

3.3.1. Vía oral

Las formas orales pueden de solidas a liquidas, el medicamento a través del esófago llega al estómago y desde allí pasa al intestino delgado, donde la mayoría de los fármacos inician su absorción sistémica.

3.3.2. Vía parenteral

3.3.2.1. Intravenosa

Se deposita el fármaco directamente al torrente circulatorio venoso.

3.3.2.2. Intraarterial

El fármaco se introduce directamente dentro del torrente circulatorio arterial.

3.3.2.3. Intradérmica

Se inyecta directamente a la zona de transición dermoepidérmica.

3.3.2.4. Subcutánea

Se inyecta el medicamento en el tejido conjuntivo.

3.3.2.5. Intramuscular

Se inyecta el medicamento en el músculo (habitualmente en glúteos).

3.3.2.6. Intracardiaca

Aplicación directa sobre el músculo cardiaco.

3.3.2.7. Intraarticular

El fármaco es inyectado directamente en una articulación.

3.3.2.8. Intratecal

Vía para acceder a determinadas zonas del sistema nervioso (SN).

3.3.3. *Vía tópica*

La administración de fármacos se realiza directamente sobre la piel o a través de ella con esta vía se pretende una acción local y existen diferentes formulaciones posibles para penetrar y depositar el fármaco hasta la capa dérmica deseada.

3.3.4. *Vía mucosal*

Las mucosas son tejidos epidérmicos abiertos al exterior del organismo, están mayormente vascularizados y con humedad mayor que la piel típica.

3.3.4.1. Bucal

La ventaja de esta vía es su accesibilidad y elevada permeabilidad, se utiliza para fármacos donde está implicado un intenso metabolismo durante el proceso de absorción.

3.3.4.2. Oftálmica

Vía útil para tratar afecciones oculares locales.

3.3.4.3. Nasal

Se utiliza en dos formas para administrar fármacos de manera local y también para algunos tratamientos sistémicos con productos de difícil absorción como péptidos.

3.3.4.4. Pulmonar

El medicamento es introducido directamente a los pulmones inhalándose, la forma farmacéutica es en aerosol y el diámetro de partícula es un factor influyente en la profundidad y el trayecto en el tracto pulmonar. Existen tres formas de medicamentos para inhalar: los aerosoles, los nebulizadores y los dispositivos de polvo seco.

3.3.4.5. Rectal

El medicamento se introduce por el orificio rectal, la forma común es en supositorios. Esta zona es muy vascularizada por lo que se consigue una distribución del medicamento a todo el organismo.

3.3.4.6. Vaginal

Se utiliza para tratamientos de acción local por infecciones o inflamaciones vaginales. El medicamento se introduce en el canal vaginal.

3.4. ANATOMÍA 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)

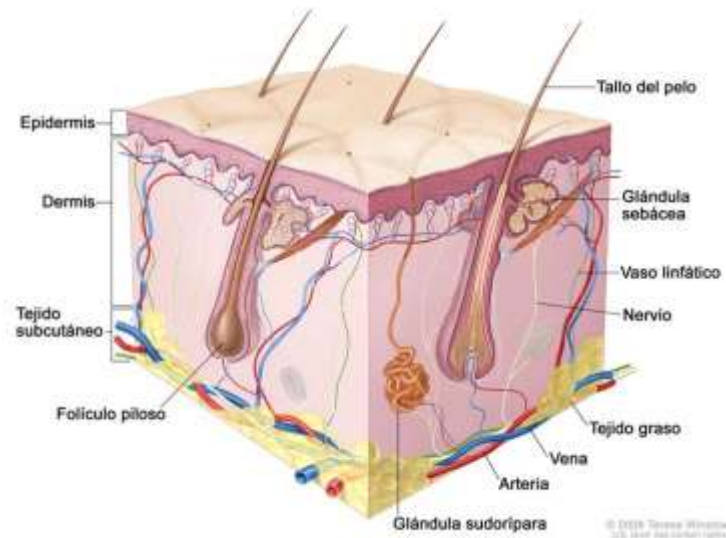


Figura No. 5 Anatomía de la piel. Muestra la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo.

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 (muertos y aplanadas) embebidas en una matriz laminar agua:lípido (Manca, 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 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.

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, 2016)

Folículo piloso: 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)

3.4.1. 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. (Prow, 2011)

3.5. NANOSISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

En las últimas décadas (70's) 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 (Enrique Lallana, 2012)

3.5.1. Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)

Los NLC en formulación tópica son una alternativa para la liberación de sustancias con poca solubilidad en agua específicamente para fármacos altamente lipofílicos y altamente solubles en lípidos líquidos, en este sistema el lípido líquido es incorporado en el núcleo de un lípido sólido y el fármaco es solubilizado en la parte lipídica líquida. (Nnamani, 2014)

3.5.2. Dendrímeros

Es una clase de polímeros monodispersos con estructuras intrínsecas bien definidas, y muy ramificada, en contraste con los polímeros tradicionales, los dendrímeros tienen estructuras núcleo-coraza que consta de tres componentes arquitectónicos básicos: un núcleo, capas interiores llamadas “generaciones” y grupos funcionales terminales (Ikhuoria, 2013) altamente modificables, que permiten la formación de NPs orgánicas o nanoclusters (Chen, 2013).

La carga de superficie de los dendrímeros puede ser regulada para mejorar la liberación de pequeños fármacos. En un estudio reportado se manipulo la carga de superficie, adicionando múltiples grupos aminos, ácidos carboxílicos, grupos hidroxilos, estos grupos de dendrímeros

lograron penetrar una alta concentración de 5-fluorouracilo comparada con el control (miristato de isopropilo). (Prow, 2011)

3.5.1. Liposomas

Los liposomas son un sistemas de liberación de fármacos de escala nanométrica, son vesículas esféricas formadas por una bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos biodegradables, colesterol y otros materiales. Los compuestos solubles en agua pueden ser atrapados en su núcleo hidrofílico. (Chen H. W., 2011)

3.5.2. Micelas poliméricas

Son estructuras núcleo-coraza formadas a partir de polímeros anfifílicos ensamblados, las cuales han sido objeto de estudio para la solubilidad y liberación específica de fármacos hidrofóbicos (Aliabadi, 2007). Dependiendo de la composición copolimérica del bloque pueden formarse no solo micelas esféricas también bicapas, cilindros y vesículas. (Yan Wang, 2015)

3.5.3. Nanocápsulas

Las nanocápsulas (NC) son formulaciones vesiculares en el cual la sustancia aceitosa esta confinada en una cavidad que consiste de líquido en el núcleo, rodeado por una membrana polimérica. (Surassmo, 2010)

3.5.4. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones (NE) consisten en dos líquidos inmiscibles, generalmente aceite y agua, que son preparados con gotas de tamaño pequeño, el tamaño de las gotas esta normalmente en el rango de 20 a 500 nm, si se reduce el tamaño de gota en el aceite por debajo de los 100 nm la nanoemulsión tiene potencial de ser translúcida. (Surassmo, 2010)

3.5.5. *Nanoesferas*

Son partículas huecas o nano cápsulas de tamaño nanométrico que pueden encapsular grandes cantidades de agentes terapéuticos o de diagnóstico y liberarlos en un estado posterior (Liu, 2015).

3.5.6. *Nanopartículas*

En los años 90's las nanopartículas 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.

3.5.6.1. Nanopartículas poliméricas

Las primeras nanopartículas reportadas fueron basadas en polímeros no biodegradables como metilmetacrilato, poliacrilamida, poli estireno, etc., la toxicidad crónica en tejidos y la respuesta inmunológica llevo hacia la búsqueda de otros polímeros, posteriormente se encontró que las nanopartículas poliméricas biodegradables pueden liberar fármacos y macromoléculas sin efectos tóxicos. (Vijayan, 2013)

3.5.6.2. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

Las nanopartículas lipídicas solidas 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.

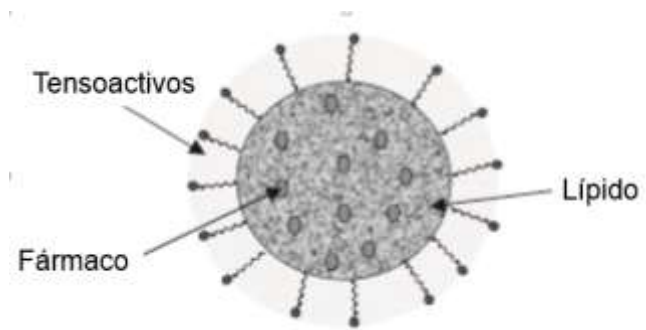


Figura No. 6 Representación esquemática de una Nanopartícula Lipídica Solida

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

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 encuentre. (Villafuerte Robles, 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, 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.

3.6. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Las SLN pueden ser producidas por distintos métodos, los más comunes son:

- Homogenización a alta presión técnica en caliente y en frío
- Emulsión de disolvente/ evaporación
- La homogeneización de alto cizallamiento y / o de ultrasonido
- Micro emulsión

En estos métodos hay factores que pueden conducir a una alta toxicidad, crecimiento de partículas, inestabilidad física, requerir altas concentraciones de tenso activos o tener que eliminar grandes cantidades de agua del producto final.

3.7.DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS

3.7.1. Lípidos

Compritol® 888 ATO: Se recomienda para uso en formulaciones farmacéuticas administradas por vía oral, tópica o rectal/vaginal. Puede usarse en formas de dosificación sólidas orales de liberación modificada (matriz de lípidos para liberación prolongada, liberación retardada). Efectivo lubricante para comprimidos y cápsulas. Puede utilizarse en procesos de capa para proporcionar una barrera de lípidos para la protección de activos sensibles y para mejorar la compatibilidad de ingredientes. Químicamente inerte y altamente compatible con otros ingredientes.

Galeol™ mono y di glicéridos: Se recomienda para uso en formulaciones farmacéuticas administradas por vía oral, tópica o rectal/vaginal. Puede ser utilizado por vía dermal como agente de consistencia (espesante). Para la administración de fármacos orales en las formulaciones de cápsulas como portador de aceite, como agente de enmascaramiento de sabor o agente de liberación modificada.

Gelucire® 44/14: Surfactante no iónico dispersable en agua, compuesto por esterres de PEG bien caracterizados, una pequeña fracción de glicéridos y PEG libres. Capaces de auto-emulsionar en contacto con medio acuoso formando una dispersión fina es decir una microemulsión. Solubilizante y agente humectante: puede mejorar la solubilidad y la

humectabilidad de los ingredientes farmacéuticos activos in-vitro e in-vivo. Mejora de biodisponibilidad asociada con solubilidad de fármacos in-vivo facilitando la absorción.

3.7.2. Mowiol® 4-88

Es un hidrocoloide mucoadesivo soluble en agua basado en polivinil alcohol (Mw~31,000).

3.8. FUNDAMENTO DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS

3.8.1. Medición del tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica

El proceso de dispersión de luz dinámica también conocido como espectroscopia de correlación de fotón (DLS y PCS, por sus siglas en ingles), mide el movimiento Browniano y lo relaciona al tamaño de partícula. Esto lo hace iluminado las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada.

El rango de medición del tamaño de partícula en el equipo Nano Zetasizer ZS es de 0.3nm a 10µm con una sensibilidad de 0.1mg/ml (lisozima). El parámetro del índice de polidispersidad (PDI) es adimensional, valores de PDI menores a 0.05 son raramente vistos en la práctica. Los valores de PDI mayores a 0.5 indican una amplia distribución en la muestra.

3.8.2. Medición del potencial Zeta por el Nano Zetasizer

Existe una capa eléctrica doble alrededor de cada partícula. La capa que está fuertemente unida alrededor de la partícula se llama capa Stern. La capa que se encuentra afuera o más alejada, en donde los iones están más débilmente unidos se llama capa difusa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución. Cuando la partícula se mueve, los iones que están hacia adentro del límite de la capa difusa, se mueven junto con la

partícula. Los iones que están hacia afuera de este límite no se mueven junto con la partícula, a este límite se le llama corte de la superficie hidrodinámico o plano de desplazamiento. El potencial que hay en este límite se le conoce como potencial Zeta.

Los equipos series Nano Zetasizer, calculan el potencial zeta determinando la movilidad electroforética y usando la ecuación de Henry. La movilidad electroforética se obtiene haciendo una electroforesis en la muestra y midiendo la velocidad de la partícula usando el velocímetro Laser Doppler. La sensibilidad del equipo Nano Zetasizer ZS es de 10mg/mL (BSA).

3.8.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido funciona con un haz de electrones producido por una fuente de electrones (cañón). El haz de electrones se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas. La variación morfológica de la muestra entrega diversas señales (electrones secundarios, electrones retrodispersados, emisión de rayos X, etc.) que son recogidas por distintos detectores; los cuales permiten la observación, caracterización y microanálisis superficial de materiales. Entre las limitaciones de esta técnica de análisis son que las muestras deben ser conductoras y estar libres de humedad y no es posible observar la estructura interna y detalles ultraestructurales de las muestras.

Capítulo IV Metodología

4.1. REACTIVOS E INSTRUMENTOS

4.1.1. Reactivos y solventes

Acetato de etilo (EtAc)

Acetato de metilo (MeAc)

Agua MiliQ

Alcohol etílico (EtOH)

Amortiguador salino de fosfatos (PBS)

Capsaicina de alta pureza

Capsaicina estándar

Compritol® 888 ATO

Galeol™ Mono y Diglicerido

Gelucire® 44/14

Mowiol® 4-88 Mw~31,000

Poli vinil alcohol Mw~70,000

4.1.2. Instrumentos de medición

Balanza analítica Denver Instrument M-200

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

Espectrofotómetro UV-Vis, Beckman Coulter DU520, Single Cell module

Espectrofotómetro UV-Vis, HACH PR 6000

Microscopio electrónico de barrido, Carl Zeiss, EVO MA15

Potenciómetro, 430 Corning

4.1.3. Otros instrumentos

Agitador magnético VWR Dyla-Dual

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

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

Homogeneizador, Sistema Polytron PT1600E, 7mm, Kinematica, acoplamiento tipo E, PT-
DA07/2EC-E107

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

Mezclador 16700, Thermolyne

Purificador de agua, Barnstead Sybron, modelo D2604

Rota vapor, BUCHI R-210

Sonicador, Branson 5510

Ultracentrifuga Beckman Coulter, JA 20

4.2. ESTUDIO PRELIMINAR DE PREPARACIÓN DE SLN SIN FÁRMACO

La preparación de las SLN sin fármaco a partir de 3 lípidos distintos, Gelucire® 44/14, Compritol® 888 ATO y Galeol™ mono y di-glicéridos se realizó de acuerdo a los datos previos. (Quintanar-Guerrero, 2005) Saturar el solvente y el agua por 10 minutos a temperatura ambiente antes de su uso con el fin de garantizar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. Pesar 200 mg de lípido y disolver en 10 ml de solvente saturado de agua, esta fase se designó

como fase orgánica-interna. Emulsionar con 20 ml de solución acuosa saturada con disolvente que contiene 5% w/v del estabilizador (medio de dispersión), utilizando un agitador mecánico a 5000 rpm por 10 min. Al finalizar este paso se obtuvo una emulsión aceite en agua.

A la emulsión aceite en agua, agregar 80 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 nanopartículas. Cuando el calentamiento fue requerido para disolver el lípido ambas fases fueron mantenidas a esta temperatura y el paso de difusión fue realizado ya sea a temperatura ambiente o a la temperatura bajo el cual el lípido fue disuelto. Eliminar el disolvente por rota evaporación con presión reducida a 40°C por 30 min.

4.3. DISEÑO DE EXPERIMENTO

Utilizando el software Statgraphics Centurion XVI, se creó un diseño de Screening, Saturated half fraction 2^{3-1} , con una resolución de III para cada solvente a partir de tres factores experimentales (Cantidad de lípido, % de estabilizante y % de CAP) y una variable de respuesta (tamaño medio de nanopartícula o diámetro hidrodinámico (Dh)). Se propusieron valores por encima y por debajo de las cantidades típicas reportadas para los factores cantidad de lípido y estabilizante, con una variación no mayor al 40%, dejándose como punto central la formulación típica reportada. (Quintanar-Guerrero, 2005) La cantidad de CAP se propuso entre 10 y 30% w/w con respecto al lípido y un punto central, obteniendo la siguiente matriz de datos:

Tabla 1 Diseño de Screening, Saturated half fraction 2³-1 a partir de dos factores experimentales y una variable de respuesta. (n=3)

Acetato de metilo			Acetato de etilo		
Capsaicina %	Gelucire® mg	PVAL %	Capsaicina %	Gelucire® mg	PVAL %
10	150	7	30	150	7
30	150	3	10	150	3
20	200	5	20	200	5
10	250	3	30	250	3
30	250	7	10	250	7

4.4. PREPARACIÓN DE SLN CARGADAS CON CAPSAICINA

La preparación se llevó a cabo como se menciona en el apartado 4.2, con una ligera modificación, siguiendo la matriz de datos de la Tabla 1. Una vez saturado el solvente a temperatura ambiente (RT), se disolvió el lípido Gelucire® previamente calentado a 60°C, en solvente saturado a RT. Emulsionar con 20 ml de solución acuosa saturada y emulsionar a 5000 rpm por 10 min. Agregar 80 ml de agua simple a la emulsión, mantener la agitación por 10 min más y finalmente eliminar el disolvente por rota evaporación con presión reducida a 40°C por 30 min. Al finalizar la preparación de muestras estas fueron filtradas con filtro de nylon de 0.2µm, la preparación se realizó por triplicado.

4.4.1. Purificación de nanopartículas

Una vez preparadas las nanopartículas, estas se purificaron mediante centrifugación con filtro de corte de peso molecular de 30,000 a una velocidad de 4,000 rpm durante 30 minutos a RT.

4.4.2. Liofilización

Las muestras purificadas y muestras simples se congelaron en viales y se liofilizaron dentro del portamuestras del equipo durante 48 horas para volúmenes menores a 10 ml y 60 horas para volúmenes mayores.

4.4.3. Reconstitución

Las NPs liofilizadas se reconstituyeron con el volumen necesario de agua MiliQ, para obtener una concentración igual a la obtenida inicialmente, aproximadamente 0.1% w/v

4.4.4. Determinación del tamaño de partícula por DLS

La técnica de dispersión de luz dinámica se utilizó para determinar el tamaño e índice medio de polidispersidad de las partículas de la siguiente manera, para muestras simples se tomó 1.0 ml y se aforo a 10 ml con agua MiliQ, de esta dilución se tomó una alícuota de 1 ml. Para muestras resuspendidas tomar la cantidad requerida para un concentración aproximada de 0.1% w/v. Transferir a una celda transparente y colocar en la rejilla del instrumento, la muestra fue analizada bajo los siguientes parámetros:

Material: NIPAAm

IR: 1.420

Absorción: 0.010

Dispersante: Agua

Temperatura: 25C

Viscosidad: 0.8872

IR: 1.330

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

4.4.5. Potencial Z

El análisis de potencial Zeta se determina para conocer la carga de superficie de la nanopartícula.

4.4.6. Microscopia electrónica de barrido

Para conocer la morfología de SLN-CAP en formulación acuosa los sistemas fueron estudiados por SEM, ya que la muestra no es conductora se coloca una capa conductora de cobre para conducir los electrones, una gota de muestra se coloca sobre la placa y se deja secar completamente a temperatura ambiente, después es introducida a la cámara de muestra donde se aplica un proceso de recubrimiento, y se procede a observar la superficie.

4.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

La estabilidad física se determina almacenando las formulaciones de SLN-CAP a temperatura ambiente y en refrigeración a 4°C por 90 días, en intervalos de 1, 6, 15, 30, 60 y 90 días, el tamaño de partícula, PDI y potencial Z se determina, las muestras fueron realizadas por triplicado.

4.6. CARGADO DE FÁRMACO (%DL) Y EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (%EE)

La EE y DL se evaluó utilizando un método de ultracentrifugación. Pesar la cantidad necesaria para obtener una solución a 2mg/ml de NPs en EtOH 20%, agitar en vortex hasta disolver los sólidos y traspasar a un tubo cónico, ultracentrifugar a 20,000 rpm por 20 min a 20°C. Leer la absorbancia en espectro a $\lambda=278\text{nm}$, y extrapolar la concentración en la curva de

calibración (XX). La concentración obtenida corresponde a DL, calculado de acuerdo a la siguiente fórmula

Ecuación 1

$$\%DL = \frac{\text{Cantidad de CAP en NPs liofilizadas}}{\text{Cantidad de NPs liofilizadas}} \times 100$$

Ecuación 2

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad exp CAP}}{\text{Cantidad inicial de CAP}} \times 100$$

4.7. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN-VITRO EN BOLSA DE DIÁLISIS

Todas las formulaciones fueron preparadas como se describe previamente y puestas en un frasco de vidrio que contenía 25 ml de PBS pH7.4:EtOH (1:1), se colocó en membrana de diálisis (MWCO:15,000) 2 ml de medio con 20 mg de NPs , el medio fue mantenido a 37°C en baño de agua a 50 rpm, después 1 ml de muestra fue tomada del medio a los 5, 15, 30, 45 y 60 min, y después a 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas, y remplazada con medio fresco a la misma temperatura, las muestras fueron analizadas por UV a $\lambda=280\text{nm}$ y extrapoladas a la curva de calibración (Anexo 8.12)

4.8. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos experimentales se expresan como la media \pm desviación estándar, el análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion, la diferencia se consideran significativas con $P < 0.05$

Capítulo V Resultados y discusión

5.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DLS EN SLN NO CARGADAS

Se prepararon SLN-no cargadas a partir de 3 lípidos distintos Gelucire®, Compritol® 888 ATO y Galeol™ mono y di-glicéridos, utilizando como estabilizante poli vinil alcohol de Mw~70,000 Tabla 2, y PVAL Mw~31,000 Tabla 3.

Tabla 2 Distribución de tamaño de partícula e índice de polidispersidad de formulaciones de SLN-no cargadas, PVAL Mw~70,000 al 5% w/v

Disolvente	Gelucire®		Compritol®		Galeol™	
	Dh (nm)	PDI	Dh (nm)	PDI	Dh (nm)	PDI
EtAc	982.6 ± 1068	0.54±0.28	7871.7 ± 1442	0.84±0.28	3128.0 ± 156	0.84± 0.10
MeAc	509.6 ± 613	0.50±0.30	nt		nt	

nt: no medido

Tabla 3 Distribución de tamaño de partícula e índice de polidispersidad de formulaciones de SLN-no cargadas, PVAL Mw~31,000 al 5% w/v. Disolvente EtAc

Gelucire®		Compritol®		Galeol™	
Dh (nm)	PDI	Dh (nm)	PDI	Dh (nm)	PDI
187.3 ± 22	0.28±0.06	1561.0 ± 356	0.38±0.08	2730.5 ± 1239	0.89±0.16

De acuerdo a los datos previos (Quintanar-Guerrero, 2005) en lotes preparados a temperatura controlada en el paso de dilución a temperatura ambiente, se formaron partículas de tamaños mayores en todos los lotes. La difusión del solvente provoca una súper saturación local cerca de la interface y las nanopartículas se forman.

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El software estadístico a partir de los datos ingresados con la menor cantidad de corridas nos arroja un diseño Saturated half fraction 2^{3-1} , con una resolución de III para cada solvente. Se obtuvo la siguiente matriz de formulaciones:

Tabla 4 Diseño de Screening, Saturated half fraction 2^{3-1} a partir de dos factores experimentales y una variable de respuesta. Formulaciones de SLN-CAP.

Acetato de metilo				Acetato de etilo			
Capsaicina %	Gelucire® mg	PVAL %	Formulación	Capsaicina %	Gelucire® mg	PVAL %	Formulación
10	150	7	A	30	150	7	F
30	150	3	B	10	150	3	G
20	200	5	C	20	200	5	H
10	250	3	D	30	250	3	I
30	250	7	E	10	250	7	J

5.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE SLN-CAP

5.3.1 Determinación de tamaño medio de nanopartícula e índice de polidispersidad

Tabla 5 Distribución del tamaño de partícula de formulaciones de SLN-CAP, muestra simple, dilución 1:10 (n=3)

Acetato de metilo			
Formulación	Dh (nm)		PDI
A (10:150:7)	4523.3	± 693.5	0.35 ± 0.14
B (30:150:3)	104.8	± 9.8	0.26 ± 0.02
C (20:200:5)	152.2	± 73.9	0.34 ± 0.06
D (10:250:3)	4421.3	± 82.4	0.26 ± 0.01
E (30:250:7)	103.7	± 11.8	0.23 ± 0.07

Acetato de etilo

Formulación	Dh (nm)			PDI	
F (30:150:7)	111.8	±	42.7	0.22	± 0.03
G (10:150:3)	122.0	±	20.9	0.30	± 0.23
H (20:200:5)	131.1	±	51.0	0.21	± 0.04
I (30:250:3)	141.7	±	14.9	0.21	± 0.00
J (10:250:7)	1587	±	1344.2	0.53	± 0.24

Los resultados de la tabla 5 muestran el tamaño promedio en la formación de SLN-CAP con valor de 120nm y 112nm de las formulaciones B, C y E realizadas con el solvente MeAc y, F, G, H e I, con el solvente EtAc, respectivamente. Las formulaciones A, D y J se descartan ya que tienden a presentar una distribución multimodal.

5.1. ANÁLISIS SOBRE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES EXPERIMENTALES EN EL TAMAÑO MEDIO DE NANOPARTÍCULA

El análisis estadístico del diseño para MeAc nos dice que el único factor influyente en el tamaño medio de nanopartícula es el % de CAP al 95% de confianza (Anexo 8.5.1), como se observa en la Fig. 7 la cantidad de CAP influye de manera negativa en el tamaño es decir que en mayor % el tamaño medio disminuye. (Fig. 8) Para los efectos Gelucire® y PVAL no existe diferencia estadísticamente significativa en sus diferentes formulaciones.

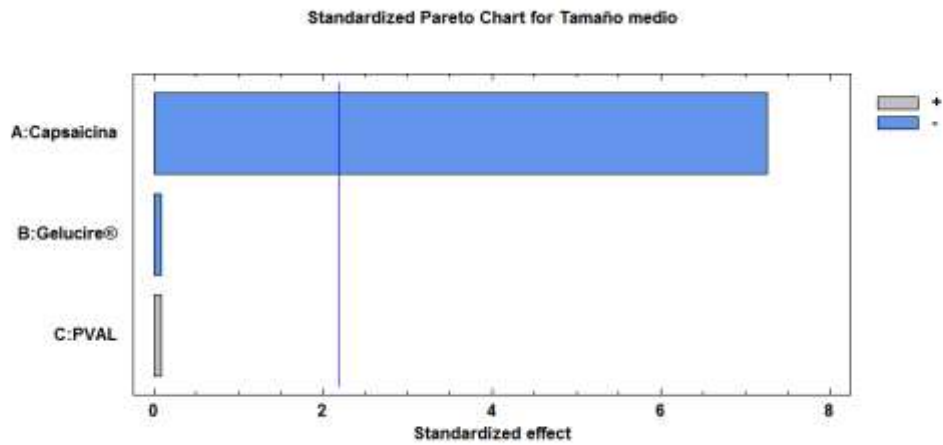


Figura No. 7 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de nanopartícula. Formulaciones elaboradas con MeAc. $\alpha=0.05$

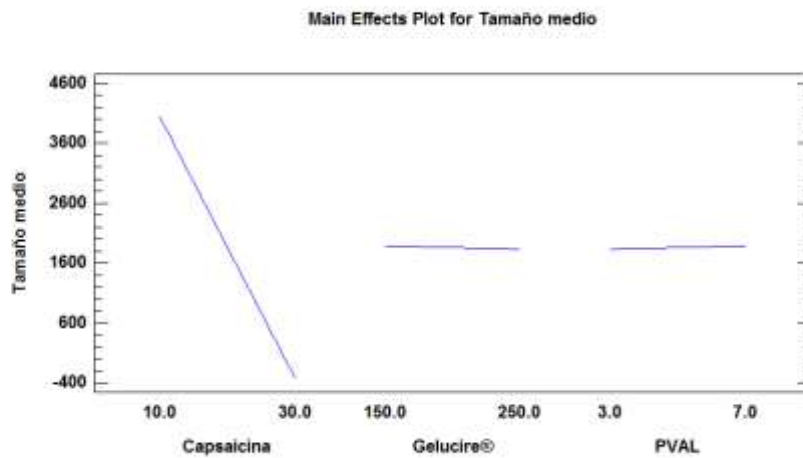


Figura No. 8 Diagrama de efectos principales para tamaño. Formulaciones elaboradas con MeAc.

El análisis estadístico del diseño para EtAc nos dice que no existen factores influyentes en el tamaño medio de nanopartícula al 95% de confianza (Anexo 8.5.2) sin embargo los efectos Gelucire® y Capsaicina se encuentra muy cercanos al nivel de significancia siendo ambos

influyentes al 94% de confianza, como se observa en la Fig. 9 la cantidad de Gelucire® influye de manera positiva en el tamaño es decir que en mayor cantidad de Gelucire®, el tamaño medio aumenta. (Fig. 10) Contrario a lo anterior la cantidad de CAP influye de manera negativa es decir que a mayor % de CAP el tamaño medio disminuye. Para los efectos PVAL no existe diferencia estadísticamente significativa en sus diferentes formulaciones, este efecto tiende a aumentar el tamaño de NPs a mayor cantidad. Fig. 10

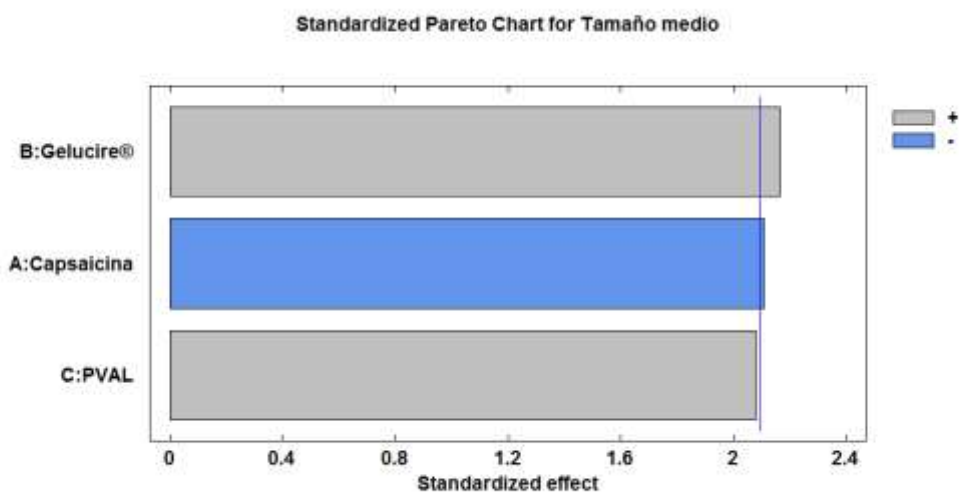


Figura No. 9 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de nanopartícula. Formulaciones elaboradas con EtAc. $\alpha=0.06$

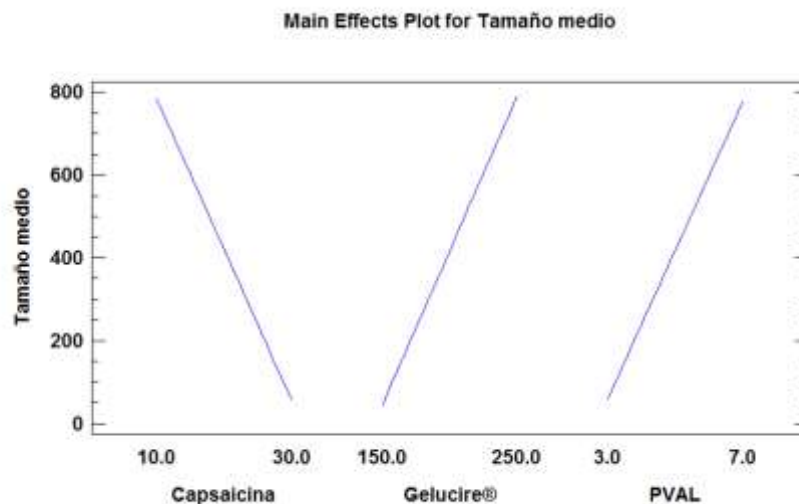


Figura No. 10 Diagrama de efectos principales para tamaño. Formulaciones elaboradas con EtAc.

5.4 DETERMINACIÓN DE LAS FORMULACIONES ÓPTIMAS

Para lograr mantener un tamaño medio de nanopartículas de 100nm se justifica a través del experimento realizar la formulación como sigue en la tabla 6.

Tabla 6 Valores de los factores experimentales optimizados para obtener SLN-CAP de tamaño medio de 100nm

			MeAc	EtAc
Factor	Bajo	Alto	Optimo	Optimo
Capsaicina %	10.0	30.0	28.07	29.31
Gelucire® mg	150.0	250.0	150.98	249.56
PVAL %	3.0	7.0	3.11	3.05

Como se observa en los valores óptimos de los factores en ambos diseños el efecto Capsaicina y PVAL se mantienen alto y bajo respectivamente, sin embargo existe un contraste entre ambos diseños con el factor Gelucire® esto se debe posiblemente a la solubilidad de la CAP en el solvente, es conocido que MeAc tiene cierta solubilidad en agua comparado con EtAc el cual es completamente insoluble, es decir que EtAc logra incorporar una mayor cantidad de Gelucire®, y está disponible en solución para dispersarse en medio acuoso.

5.5 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL Z DE LAS NANOPARTÍCULAS

Los lípidos utilizados para formular nanopartículas solidas lipídicas no presentan carga de superficie por lo que, la nanopartícula como tal arroja un potencial Z de cero.

5.6 MICROGRAFÍAS DE LAS NANOPARTÍCULAS (SEM)

Para conocer la morfología de las nanopartículas preparadas, estas se sometieron a microscopia electrónica de barrido, en la figura A y B que corresponde a la formulación I se observan estructuras sólidas en forma redondeada de tamaño nanométrico, esto puede ser confirmado con las mediciones del tamaño de partícula (dispersión de luz dinámica).

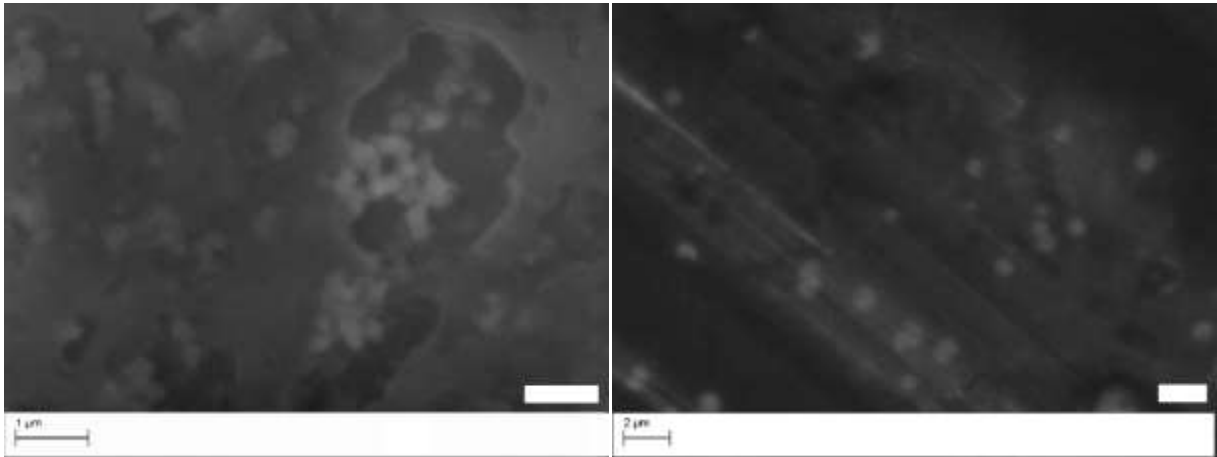


Figura No. 11 Micrografías de SLN por microscopía electrónica de transmisión formulación (I) SLN-CAP 30% w, 250mg Gelucire. Izquierda barra 1μm, derecha barra 2μm.

5.7 ESTUDIO DEL EFECTO DEL TIEMPO EN EL TAMAÑO MEDIO DE NANOPARTÍCULA

La evaluación de la estabilidad en el tamaño de nanopartícula en muestras almacenadas de 2-8°C muestra que con el tiempo se forman aglomerados los cuales ocurren en menor tiempo a medida que el % CAP se incrementa.

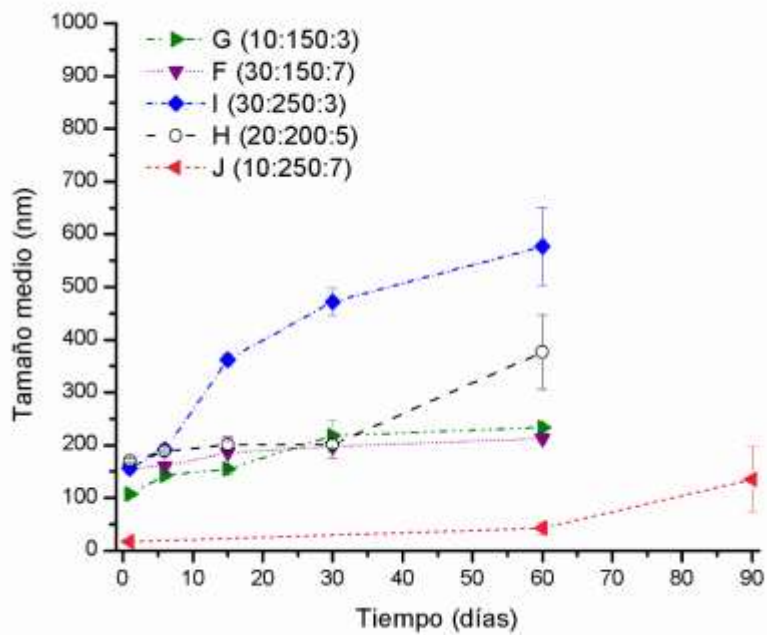
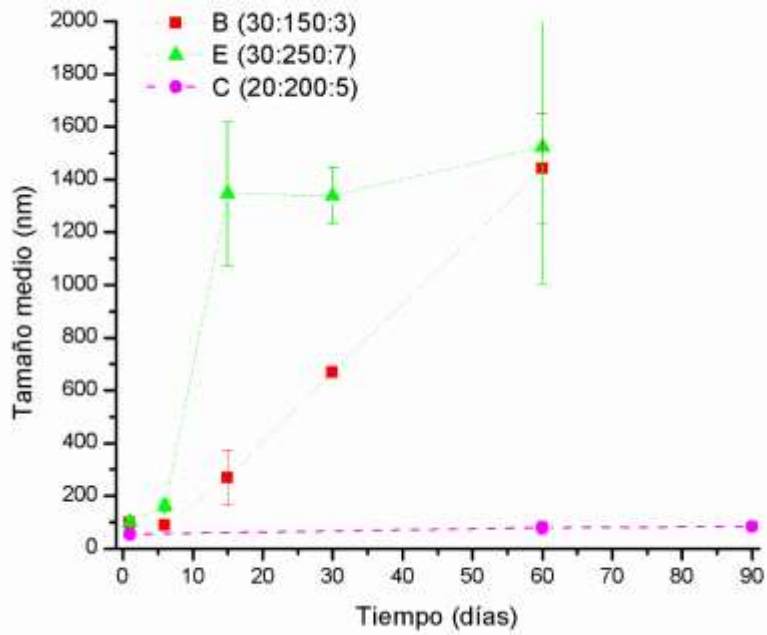


Figura No. 12 Influencia del tiempo en el tamaño de SLN-CAP A) Formulaciones elaboradas con MeAc. B) Formulaciones elaboradas con EtAc.

5.8 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (% EE) Y CARGADO DE FÁRMACO (% DL)

En la tabla 6 se muestran los resultados de eficiencia de encapsulación y cargado de fármaco, en los sistemas formulados con EtAc los %EE fueron mayores al 95%, los sistemas desarrollados con MeAc encapsularon una cantidad menor comparada con los anteriores (>60%), con un cargado de fármaco en todos los sistemas mayor al 2%.

Tabla 7 Cargado de capsaicina en las formulaciones de SLN y eficiencia de encapsulación.

Formulación	DL %	EE %	Rendimiento %
B (30:150:3)	4.2 ± 0.1	78.1 ± 2.7	53.1
C (20:200:5)	2.6 ± 0.3	83.1 ± 8.5	60.0
E (30:250:7)	2.6 ± 0.1	61.2 ± 2.3	51.0
F (30:150:7)	2.8 ± 0.1	95.8 ± 4.4	72.4
G (10:150:3)	2.1 ± 0.1	103.5 ± 5.5	50.7
H (20:200:5)	3.1 ± 0.1	97.8 ± 3.2	80.9
I (30:250:3)	8.2 ± 0.5	102.7 ± 6.9	74.9

Nota: reportado como la media ± desviación estándar; n = 3

5.9 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN-VITRO EN BOLSA DE DIÁLISIS

El experimento se llevó a cabo simulando las condiciones fisiológicas (pH: 7.4, 37°C, oscilaciones a 50 rpm) con el objetivo de analizar la liberación de las formulaciones. La cantidad de CAP fue cuantificada por método UV a una longitud de onda de 280 nm, el resultado fue extrapolado a la curva de calibración.

Una difusión paulatina fue observada en las formulaciones de SLN-CAP llegando a su máxima difusión a las 48h, 24h y 48h para las formulaciones B, C y E respectivamente, y a las 24h aproximadamente para las formulaciones F, H e I, la solución de CAP se difunde al medio

en 24h tiempo similar a las formulaciones de SLN-CAP lo que indica que la solubilidad de CAP afecta la liberación al medio.

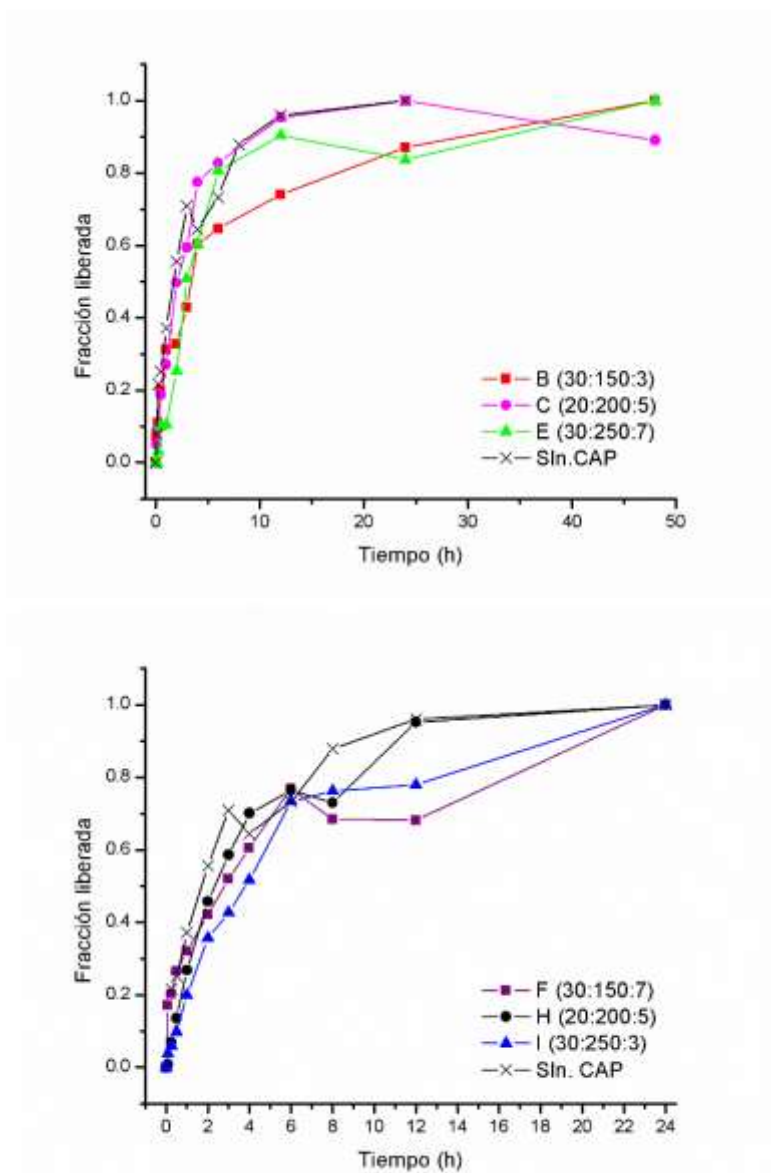


Figura No. 13 Análisis para cuantificar la fracción liberada de capsaicina en medio PBS pH: 7.4:EtOH (1:1) con respecto al tiempo. Comparacion de solucion de CAP y formulaciones de SLN-CAP preparadas a partir del diseño de experimento. Gráfico superior MeAc. Gráfico inferior EtAc.

Capítulo VI Conclusión

Con el método emulsificación-difusión fue posible obtener SLN de Gelucire® preparadas a temperatura ambiente con los distintos solventes estudiados, de tamaño medio <130nm medido por DLS, la morfología de las nanopartículas se observó a través de las micrografías de SEM donde se muestran partículas redondeadas menores a 500nm. Las formulaciones F, G y H presentaron una buena estabilidad hasta los 60 días y 90 días para la formulación C. El tamaño medio de partícula es más propenso a aumentar con el paso del tiempo cuando se tiene alto contenido de lípido en la emulsión. Los cargados de fármaco fueron del 2 al 8 % y eficiencia de encapsulación >80% en la mayoría de las formulaciones.

A bajo contenido de CAP con respecto a Gelucire® preparadas con MeAc fue más evidente el incremento en el tamaño de partícula presentando distribución multimodal (formulaciones A y D),

A cantidades bajas de PVAL (Mw~31,000) se forman SLN más estables y de tamaño promedio de 120nm, esto puede deberse a que el lípido tiene un HLB:11 (moderadamente hidrofílico) y no requiere de altas concentraciones de estabilizante.

Los altos % en peso de capsaicina resultan en formulaciones más estables y con mejor distribución, existe diferencia significativa en el tamaño de partícula al variar la concentración de capsaicina con un 95% de confianza.

De acuerdo al estudio de estabilidad al paso de los días el tamaño de partícula va aumentado en mayor o menor proporción dependiendo la formulación, esto puede ser debido a que se tienden a formar aglomerados y precipitar.

La liberación de CAP cuando se simularon las condiciones fisiológicas fue de 24h para la solución simple de CAP, comparando con las formulaciones solo la formulación B libero de manera constante y paulatina hasta llegar a su máximo en 48h, sin embargo el tiempo de liberación de la solución de CAP nos indica que la solubilidad del fármaco puede afectar la liberación al medio.

Las formulaciones de NPs no cargadas preparadas a temperatura controlada con los lípidos Compritol® y Galeol™ no se lograron obtener tamaños de partícula menores a 1µm, los cuales podrían estar aumentados por la variación de temperatura durante el procedimiento y en el caso de Compritol® su alto punto de fusión comparado con Gelucire®.

El peso molecular del polivinil alcohol afecta de manera positiva aumentando el tamaño de partícula cuando el Mw fue de 70,000. Habiendo una disminución considerable en el tamaño de partícula con el polivinil alcohol de Mw~31,000 y el lípido Gelucire®.

Capítulo VII Referencia bibliográfica

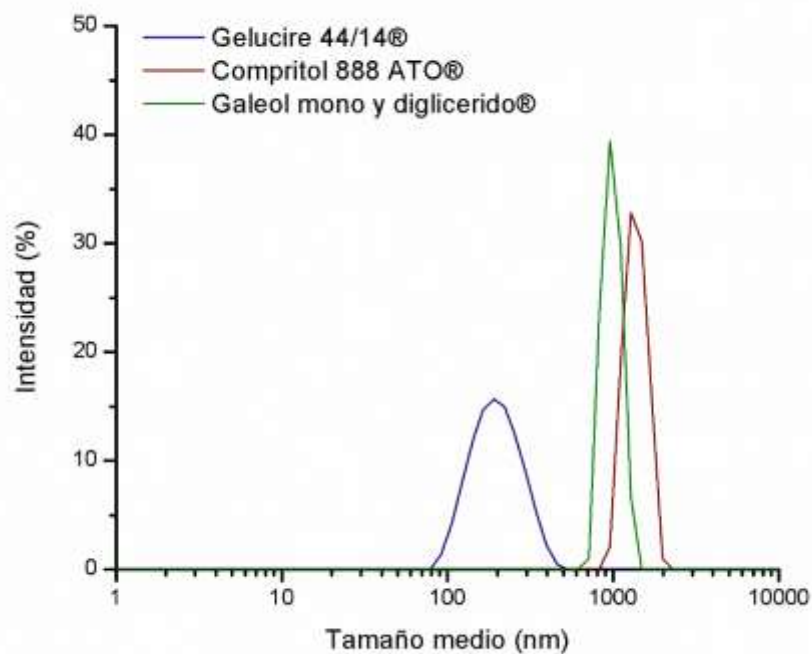
- Agrawal, U. G. (2015). Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 43(1), 33–39.
- Aliabadi, H. M. (2007). Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: The effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), 158–165.
- Álvarez-Hernández, E. C.-V.-P.-V.-M. (2006). Frecuencia de uso de medicinas complementarias y alternativas en sujetos que acuden por primera vez al servicio de reumatología. Análisis de 800 casos. *Reumatología Clínica*, 2(4), 183-189.
- Alvarez-Nemegyei, J. P.-B.-A.-R. (2011). Prevalence of Musculoskeletal Pain and Rheumatic Diseases in the Southeastern Region of Mexico. A COPCORD-Based Community Survey. *The Journal of Rheumatology Supplement*, 86(0), 21–25.
- Beal, B. R. (2016). An Overview of Pharmacologic Management of Chronic Pain. *Medical Clinics of North America*, 100(1), 65–79.
- Bravo, L. (2005). Manual de farmacoterapia. En L. Bravo. Elsevier España.
- Casado, R. (2009). Dolor musculoesqueletico. *International Association for the Study of Pain*, 72(6), 428–431. Obtenido de Casado, R. (2009). Dolor musculoesqueletico. International Association for the Study of Pain, 72(6),: http://www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/GlobalYearAgainstPain2/MusculoskeletalPainFactSheets/MusculoskeletalPain_Spanish.pdf
- Chen, H. W. (2011). N-trimethyl chitosan chloride-coated liposomes for the oral delivery of curcumin. *Journal of Liposome Research*, 22, 1–10.
- Chen, L. A. (2013). Irradiation- and thermoinduced synthesis of Ag nanoparticles within amphiphilic carbosilane-thioether dendrimers. *J. Mater. Chem. B*, 1(1), , 116–122.
- Coppieters, I. M. (2016). Relations between brain alterations and clinical pain measures in chronic musculoskeletal pain: A systematic review. *The Journal of Pain*.
- Covarrubias-Gómez, A. (s.f.). *Covarrubias-Gómez, A.* . Obtenido de Entendido al dolor neuropático: <http://covarrubias-gomez.org/>
- Covarrubias-Gómez, A. G.-L.-S.-S.-D. (2010). Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 33(4), 207–213.
- Derry, S. S.-R. (2013). Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Database Syst Rev*, 2(2).
- 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.
- FEDELAT. (2016). *Federacion latinoamericana de asociaciones paar el estudio del dolor*. Obtenido de <http://www.fedelat.com/info/2-38-opioides-generalidades.html>
- Guevara-López, U. C.-g.-c.-r.-v. (2007). Parámetros de práctica para el manejo de dolor en México. *Cirujia Y Cirujanos*, (5), 385–407.

- Hayman, M. &. (2008). Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. . *Current Anaesthesia & Critical Care*, 19(5-6), 338–343.
- Huijter, H. A. (2012). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas: <http://doi.org/10.1017/CBO978110741532>
- Ikhuoria, E. L. (2013). Preparation and characterization of nanocomposites of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers with molybdenum(VI) oxide (MoO₃). *Materials Chemistry and Physics*, 139(2-3), 911-916.
- Liu, M. Y. (2015). Preparation and characterization of chitosan hollow nanospheres for anticancer drug curcumin delivery. *Materials Letters*, 150, 115–117.
- 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.
- NCI. (31 de Marzo de 2016). Obtenido de National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/paciente/tratamiento-piel-pdq>
- Nnamani, P. O. (2014). Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 208–217.
- OMS. (2003). *Boletín informativo* .
- 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.
- Romera, E. P. (2000). Neurofisiología del dolor,. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 7: Supl. 11, 11–17.
- Surassmo, S. M. (2010). Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research International*, 43(1), 8–17.
- Tanenberg, R. (2009). Diabetic peripheral neuropathy: Painful or painless. . *Hosp Physician*, 1–8.
- Toro, M. B. (2008). En *Farmacología para fisioterapeutas* (pág. 302). Médica Panamericana.
- U.S. National Library of Medicine. (10 de Mayo de 2016). *MedlinePlus*. Obtenido de <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/pain.html>
- Vidal, M. A.-B. (2004). Capsaicina tópica en el tratamiento del dolor neuropático. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 11(5), 306–318.
- 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.
- Yan Wang, D. D. (2015). Mesoscopic simulation studies on the formation mechanism of drug loaded polymeric micelles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 136, 536-544.

Zhu, Y. W. (2015). Improved oral bioavailability of capsaicin via liposomal nanoformulation: preparation, in vitro drug release and pharmacokinetics in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 38(4), 512–521.

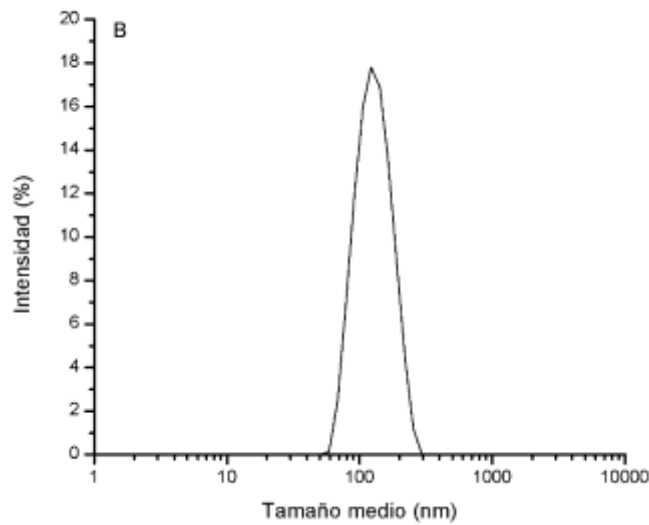
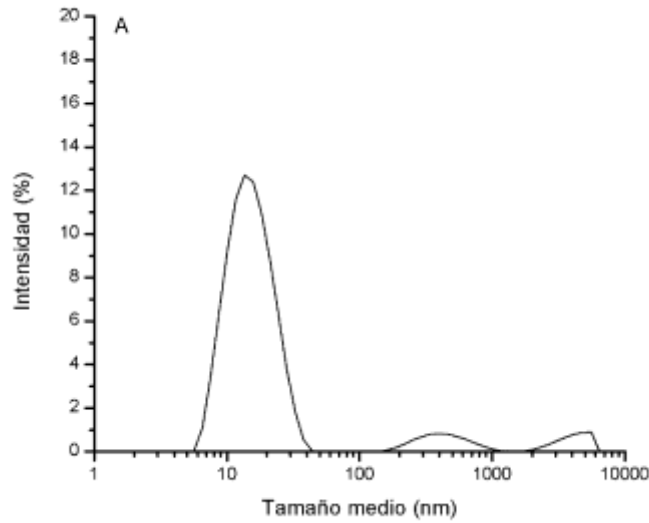
Capítulo VIII Anexos

8.1 *Tamaño medio por intensidad de las partículas no cargadas contra tiempo. Comparación de distintos lípidos.*



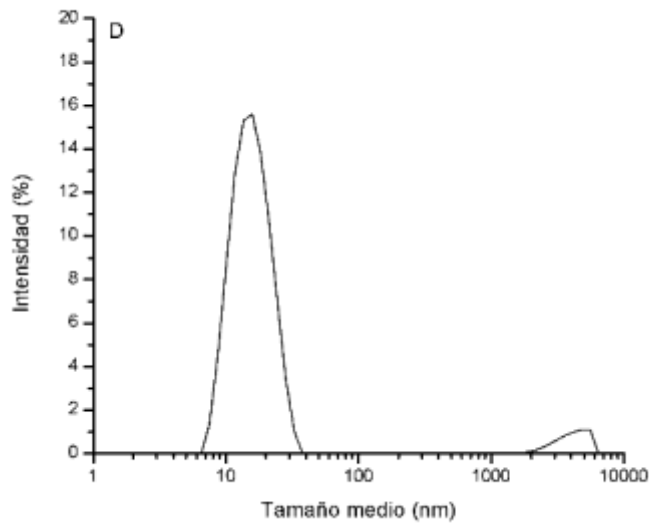
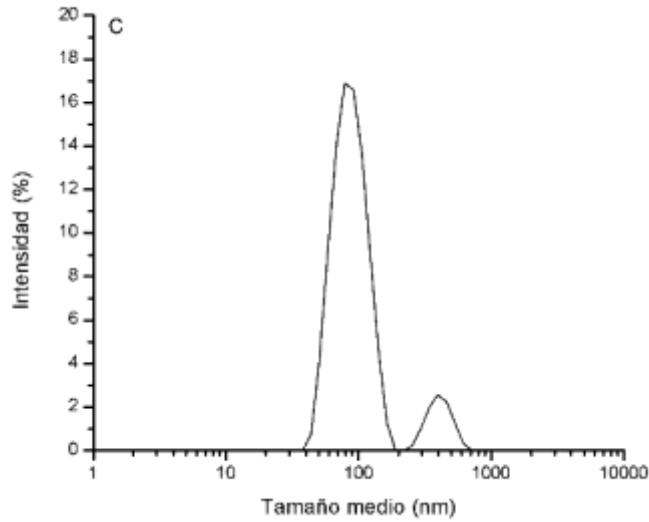
Nota: 200mg de lípido y 5% w/v PVAL Mw~31000.

8.2 *Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, grafico superior formulación A (10:150:7), gráfico inferior formulación B (30:150:3)*



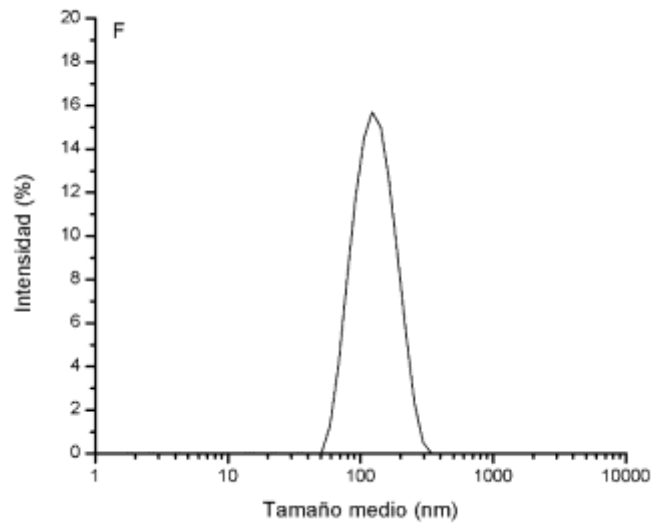
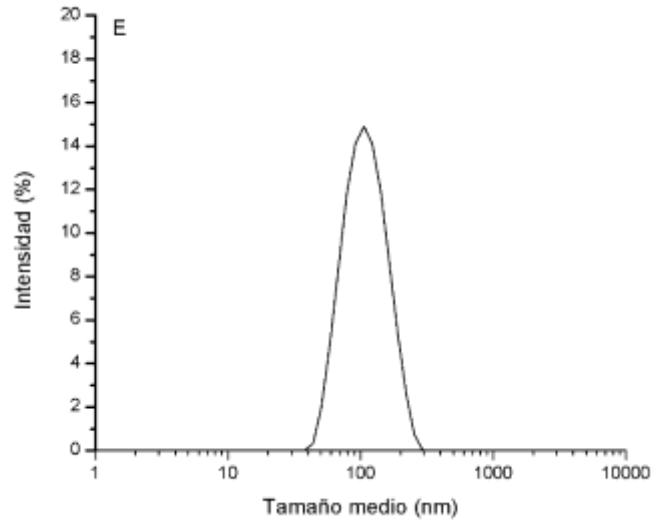
Nota: PVAL Mw~31000, realizado de acuerdo a la formulación correspondiente (Tabla diseño), (%CAP:mgGE:%PVAL)

8.3 *Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación C (20:200:5), gráfico inferior formulación D (10:250:3)*



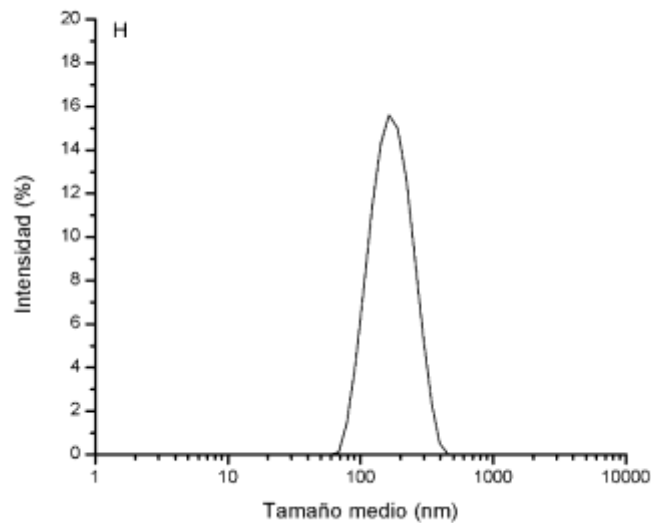
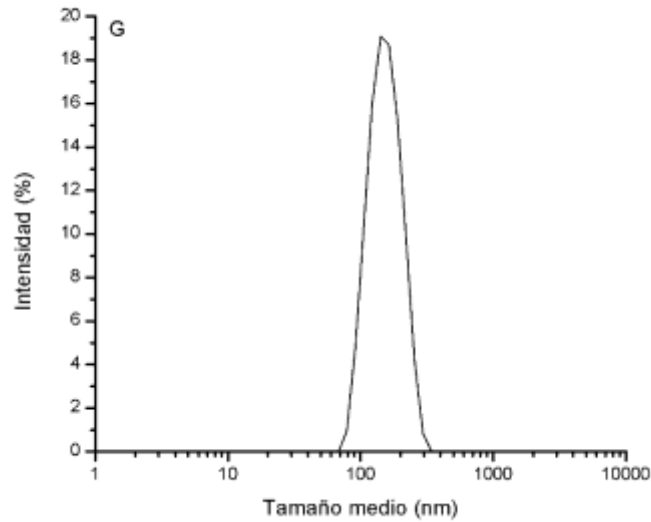
Nota: PVAL Mw~31000, realizado de acuerdo a la formulación correspondiente (Tabla diseño), (%CAP:mgGE:%PVAL)

8.4 *Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación E (30:250:7), gráfico inferior formulación F (30:150:7)*



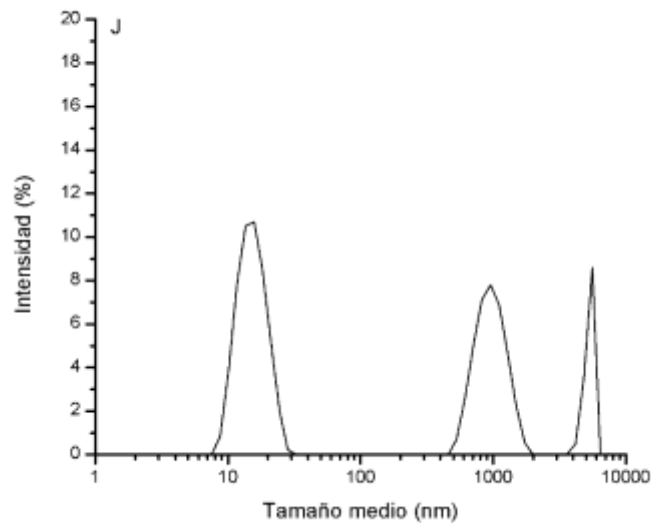
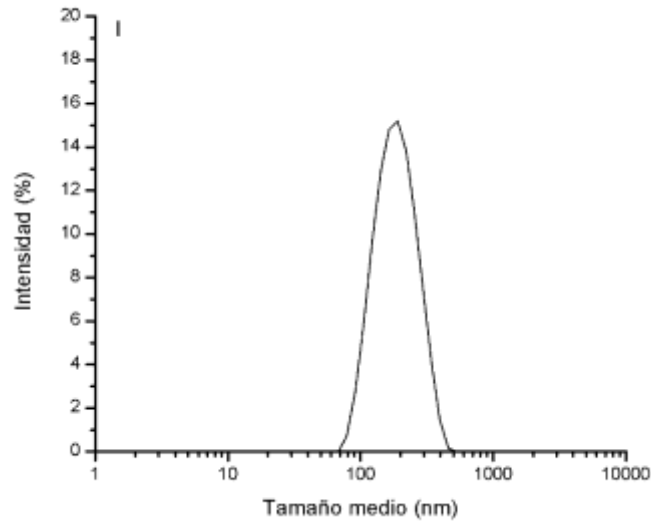
Nota: PVAL Mw~31000, realizado de acuerdo a la formulación correspondiente (Tabla diseño), (%CAP:mgGE:%PVAL)

8.5 *Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación G (10:150:3), gráfico inferior formulación H (20:200:5)*



Nota: PVAL Mw~31000, realizado de acuerdo a la formulación correspondiente (Tabla diseño), (%CAP:mgGE:%PVAL)

8.6 *Tamaño medio por intensidad de las partículas contra tiempo, gráfico superior formulación I (30:250:3), gráfico inferior formulación J (10:250:7)*



Nota: PVAL Mw~31000, realizado de acuerdo a la formulación correspondiente (Tabla diseño), (%CAP:mgGE:%PVAL)

8.7 *Análisis de varianza para tamaño medio*

8.7.1 ANOVA- MeAc (A-E)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: Capsaicina	5.72378E7	1	5.72378E7	52.77	0.0000
B: Gelucire®	7982.52	1	7982.52	0.01	0.9332
C: PVAL	7635.61	1	7635.61	0.01	0.9346
Total error	1.19314E7	11	1.08467E6		
Total (corr.)	6.91849E7	14			

R-squared = 82.7543 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 78.0509 percent

Standard Error of Est. = 1041.48

Mean absolute error = 733.277

Durbin-Watson statistic = 2.40505 (P=0.8138)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.215893

En este caso, un efecto tiene valores de P inferior a 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0%.

8.7.2 ANOVA-EtAc (F-J)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Capsaicina	1.71771E6	1	1.71771E6	4.83	0.0503
B:Gelucire®	1.54952E6	1	1.54952E6	4.36	0.0609
C:PVAL	1.67171E6	1	1.67171E6	4.70	0.0529
Total error	3.91149E6	11	355590.		
Total (corr.)	8.85043E6	14			

R-squared = 55.8045 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 43.7512 percent

Standard Error of Est. = 596.314

Mean absolute error = 298.602

Durbin-Watson statistic = 1.80997 (P=0.4199)

Lag 1 residual autocorrelation = 0.0448658

En este caso, 0 efectos tienen valores de P inferior a 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0%.

8.8 Cálculo para obtener el %DL de capsaicina

Ecuación 1. Concentración de CAP (mg/ml) calculada por medio de la medición de ABS

$$CAP(mg/ml) = \frac{y - b}{m}$$

Ecuación 2. Porcentaje de cargado de fármaco

$$\%DL = \frac{Cant. CAP en NPs liofilizadas (g)}{Cant. NPs liofilizadas (g)} \times 100$$

8.9 Cálculo para obtener el %EE

Ecuación 3. Porcentaje de eficiencia de encapsulación

$$\%EE = \frac{Cant. CAP cuantificada exp. (mg)}{Cant. CAP teorica i (mg)}$$

Ecuación 4. Cantidad de CAP cuantificada experimentalmente

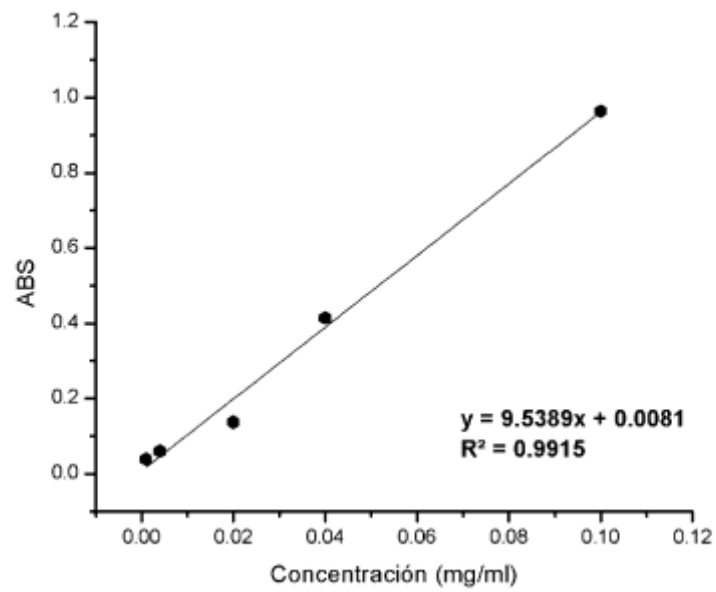
$$CAP \text{ exp}(mg) = Cant. solidos \text{ totales } i(g) * (\%DL) * 1000$$

8.10 Cálculo para obtener % Rendimiento

Ecuación 5. Porcentaje de rendimiento de NPs

$$\%Rendimeinto = \frac{\% DL * W \text{ total de NPs}}{\text{Contenido inicial de CAP}}$$

8.11 Curva estándar de CAP en EtOH 20%



8.12 Curva estándar de CAP en PBS(pH:7.4):EtOH (1:1)

