

**ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES OPERACIONALES EN EL
PROCESO DE NANOENCAPSULACIÓN DE CARBAMAZEPINA MEDIANTE LA
TÉCNICA DE NANOPRECIPITACIÓN**

SEBASTIÁN GUERRERO ESCALANTE

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

2017

**ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES OPERACIONALES EN EL
PROCESO DE NANOENCAPSULACIÓN DE CARBAMAZEPINA MEDIANTE LA
TÉCNICA DE NANOPRECIPITACIÓN**

SEBASTIÁN GUERRERO ESCALANTE

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

**TUTOR
CONSTAIN SALAMANCA MEJÍA, Ph. D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA**

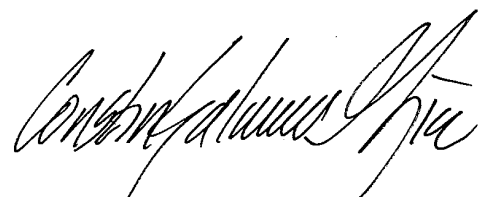
2017

APROBADO POR:



Dr. Gustavo Rivera – 01-12-2017

Evaluador



Constain Salamanca Mejía, Ph.D
Tutor del Proyecto

Cali, Valle del Cauca

Diciembre 01 de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco a mi madre, quien fue mi motor impulsor, mi inspiración y la principal persona sin la cual alcanzar este logro habría sido imposible. Por sus consejos, por su apoyo y por la confianza que depositó en mi, al brindarme esta oportunidad le agradezco infinitamente. Asimismo, le agradezco a mi tutor Constain Salamanca por su guía y por la ayuda prestada en la realización de este proyecto, por los regaños y las enseñanzas que aportaron no solo a mi desarrollo académico sino también personal. Al profesor Christian Yarce por haber sido un amigo más, por la disposición que siempre tuvo para ayudarme y escucharme y por todo el conocimiento que me brindó a lo largo de todo este proyecto. Al profesor Álvaro Barrera, por haberme escuchado tantas veces, por el ánimo y las palabras de aliento que me dio en los momentos de desesperación. A María Camila por brindarme su amistad incondicional, por su preocupación y cariño y por soportarme incluso en mis momentos de mayor estrés. A María del Mar e Isabella, mis amigas y compañeras del GIFF, por haber hecho de esta experiencia algo inolvidable, por haber llorado, sufrido y reído junto a mi y por el apoyo que me brindaron hasta el último día de este proyecto. A mis amigos, en general, por sus buenos deseos, por acompañarme siempre y por haber sido no compañeros de carrera sino también compañeros de vida durante toda esta experiencia.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE GRÁFICAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ANEXOS	10
3. INTRODUCCIÓN.....	13
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
4.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PERTINENCIA DEL PROYECTO	14
4.2. Marco teórico y Estado del Arte	16
4.2.1. Estado del Arte	16
4.2.2. Marco teórico.....	17
4.2.2.1. Aspectos generales de la carbamazepina	17
4.2.2.2. Nanopartículas	18
4.2.2.2.1. Generalidades de las nanocápsulas.....	18
4.2.2.2.2. Síntesis mediante el Método de Nanoprecipitación.....	19
4.2.2.2.3. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas	22
4.2.2.2.3.1. Potencial zeta.....	22
4.2.2.2.3.2. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad.....	23
4.2.2.2.3.3. Porcentaje o eficiencia de encapsulación	24
4.2.2.3. Ensayos de liberación in-vitro	25
4.3. OBJETIVOS	28
4.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
4.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.4. METODOLOGÍA PROPUESTA.....	29
4.4.1. Diseño Experimental	29
4.4.2. Materiales	30
4.4.3. Obtención de las nanocápsulas	30
4.4.3.1. Nanoprecipitación de la carbamazepina	30
4.4.4. Concentración de las nanocápsulas	31
4.4.5. Purificación de las nanocápsulas	32
4.4.6. Caracterización de las nanocápsulas.....	32
4.4.7. Optimización del proceso de nanoprecipitación	33
4.4.8. Estudio de liberación de la carbamazepina:.....	33
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.5.1. Obtención de las nanocápsulas mediante el método de nanoprecipitación	34
4.5.2. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas	35

4.5.2.1. Comportamiento de las nanocápsulas en relación a la agitación del sistema.....	35
4.5.2.2. Comportamiento de las nanocápsulas en relación a la cantidad de polímero utilizado.....	38
4.5.2.3. Comportamiento de las nanocápsulas en relación a la cantidad de estabilizante utilizado.....	42
4.5.3. Análisis estadístico mediante la Metodología de Superficies de Respuesta:.....	46
4.5.4. Estudio de liberación de la carbamazepina a partir de las nanocápsulas	49
4.6. CONCLUSIONES:.....	52
4.7. RECOMENDACIONES:.....	54
4.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	55
5. ANEXO:.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición sugerida para la preparación de nanocápsulas mediante nanoprecipitación.	20
Tabla 2. Diseño experimental para el método de nanoprecipitación.	29
Tabla 3. Formulación para la síntesis de las nanocápsulas por nanoprecipitación.	30
Tabla 4. Valores de pH para los sistemas obtenidos.	42
Tabla 5. Resultados del ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta en función de los factores estudiados.	47
Tabla 6. Eficiencia de liberación para los sistemas estudiados.	51
Tabla 7. Resultados para la ecuación de la recta de la curva de calibración de la carbamazepina.	59
Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos para cada tratamiento del diseño estadístico utilizado.	60

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comportamiento de: a) diámetro hidrodinámico b) potencial zeta y c) porcentaje de encapsulación, respecto a la agitación del sistema.	36
Gráfica 2. Comportamiento de: a) diámetro hidrodinámico b) potencial zeta y c) porcentaje de encapsulación, respecto a la cantidad de PCL en el sistema. .	39
Gráfica 3. Comportamiento de: a) diámetro hidrodinámico b) potencial zeta y c) porcentaje de encapsulación, respecto a la cantidad de poloxámero 188 en el sistema.	43
Gráfica 4. Perfil de liberación de la carbamazepina a partir del sistema de nanocápsulas número 1.	49
Gráfica 5. Perfil de liberación de la carbamazepina a partir del sistema de nanocápsulas número 3.	50
Gráfica 6. Perfil de liberación de la carbamazepina a partir del sistema de nanocápsulas número 10.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la carbamazepina. (DrugBank, 2005).....	17
Figura 2. Diferentes estructuras nanoparticulares: (a) núcleo líquido, (b) matriz polimérica y (c) principio activo en dispersión molecular (Tomado y adaptado de Mora et al., 2009).	19
Figura 3. Esquema general del montaje utilizado para el método de nanoprecipitación.	22
Figura 4. Esquema general de la formación del potencial zeta (ζ). (Tomado y adaptado de http://www.scai.uma.es)	23
Figura 5. Esquemización de las Celdas de Franz: a) Celda Vertical y b) Celda Horizontal. (Disponible en http://permegear.com/side-bi-side-cells).	27
Figura 6. A. Apariencia traslucida de la fase acuosa, B. Apariencia traslucida de la fase orgánica, C. Aparición del efecto Tyndall por la adición de la fase orgánica en la acuosa (tomado de Rivera, 2017).	35
Figura 7. Reacción de hidrolisis de los triglicéridos del mygliol.....	38
Figura 8. Esquema general de la hidrólisis del PCL.....	41
Figura 9. Curva de calibración de la carbamazepina en agua. Tomado de (Tascon, 2016).	59

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de la carbamazepina.	59
Anexo 2. Parámetros de la ecuación de la recta de la curva de calibración de la carbamazepina.....	59

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Esta investigación se enfocó en determinar las condiciones operacionales óptimas definidas como concentración de material polimérico, estabilizante y velocidad de agitación para la síntesis de nanocápsulas de fármacos polares (usando carbamazepina como modelo), mediante la técnica de nanoprecipitación. Se planteó un diseño de Superficies de Respuesta para establecer las condiciones apropiadas de contenido de policaprolactona, poloxámero 188 y las revoluciones por minuto (agitación del sistema). Se definieron como variables de respuesta el diámetro hidrodinámico, el potencial zeta y el porcentaje de encapsulación como parámetros para evaluar el efecto de las variables operacionales sobre el proceso de nanoencapsulación. Se encontró que los valores de potencial zeta de las nanocápsulas oscilaban entre -13,2 mV y -45,6 mV, los de diámetro hidrodinámico estuvieron alrededor de 208,6 nm y 474,7 nm y la eficiencia de encapsulación fue superior a 99,0%. A pesar de que las variables operacionales tuvieron un efecto sobre los variables de respuesta, dicho efecto no fue significativo a nivel estadístico y por tanto no fue posible su optimización. Finalmente, se realizaron estudios de liberación mediante Celdas de Franz verticales (debido a su proyección como vehículos de fármacos) y se encontró que la eficiencia de encapsulación fue de alrededor de 62%.

Palabras clave: Nanoprecipitación, carbamazepina, eficiencia de liberación, eficiencia de encapsulación y caracterización fisicoquímica.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to determine the optimal processing conditions regarding the polymeric material and stabilizer's concentration and the stirring velocity for preparing nanocapsules by the nanoprecipitation method using carbamazepine as the active compound. A Surfaces Response Methodology was used to establish optimal conditions of polycaprolactone and poloxamer 188 content as well as stirring velocity. Response parameters were used to evaluate the effect of the preparing conditions upon the nanoprecipitation process, which included particle size, zeta potential and encapsulation efficiency. It was found that zeta potential values were between -13,2 mV to -45,6 mV, particle size values were between 208,6 nm to 474,7 nm and the encapsulation efficiency values were up to 99%. In spite of the fact operational conditions had effect on the response parameters, this effect was found no to be statistically significant and hence optimization was not possible to achieve. Furthermore, release studies were conducted by using the Franz Cells methodology, since this type of systems are aimed to serve as new dosage forms. The release efficiency was found to be about 62% and the release profiles showed a biphasic behavior, thus corroborating that nanoparticles with shelter-core morphology were synthesized.

Keywords: Nanoprecipitation, carbamazepine, release efficiency, encapsulation efficiency and physicochemical characterization.

3. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las nanocápsulas son consideradas sistemas de vehiculización de fármacos prometedores, ya que, entre otras bondades, permiten la liberación controlada de principios activos, aumentan su estabilidad fisicoquímica y gracias a su tamaño subcelular, mejoran los procesos de absorción de los activos aumentando su biodisponibilidad (lo que es especialmente conveniente para aquellos fármacos cuya solubilidad y absorción es poca en el organismo). Pese al gran auge que se ha venido presentando en relación a la investigación sobre estos nuevos sistemas, no existe un consenso acerca de las condiciones experimentales en las que deban desarrollarse estas nanocápsulas y de hecho, son muy pocos los trabajos dedicados al estudio del efecto que tienen dichas condiciones experimentales sobre las propiedades de las nanocápsulas; lo cual es fuente de variabilidad en los resultados y hace imposible discernir si esta disparidad es producto de las características fisicoquímicas del fármaco o de la falta de estandarización del proceso.

Debido a lo anterior, y teniendo presente la importancia que tiene hoy en día la nanotecnología en las áreas de investigación y desarrollo de los laboratorios farmacéuticos, este proyecto pretendió estudiar el proceso de nanoencapsulación de fármacos apolares, mediante la técnica de nanoprecipitación, utilizando como modelo experimental la carbamazepina. De esta forma, se buscó establecer el efecto que tienen las variables operacionales definidas como concentración del material polimérico, concentración del agente estabilizante y velocidad de agitación del sistema sobre parámetros de calidad y estabilidad de las nanocápsulas, a saber: potencial zeta, diámetro hidrodinámico y porcentaje de encapsulación del fármaco. Una vez realizados los experimentos; los cuales se alternaron entre cinco velocidades de agitación y cinco concentraciones de agente estabilizante y material polimérico, los resultados obtenidos fueron analizados mediante la metodología de superficies de respuesta a fin de obtener un intervalo

de condiciones operacionales mediante el cual se optimicen los parámetros de calidad y estabilidad mencionados anteriormente. Finalmente, debido a la proyección de estos sistemas como nuevas formas de dosificación de fármacos, se realizaron estudios de liberación utilizando Celdas de Franz Verticales, con el fin de determinar la capacidad de cesión del activo (carbamazepina), a partir de los sistemas nanoparticulares.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

4.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PERTINENCIA DEL PROYECTO

En las últimas décadas, la investigación sobre nanotecnología enfocada al desarrollo de nuevos sistemas de vehiculización de fármacos ha experimentado un crecimiento exponencial y ha abierto un nuevo horizonte de posibilidades en relación a sus posibles aplicaciones clínicas debido a sus grandes ventajas sobre los sistemas de vehiculización tradicionales. En este contexto, destacan como ventajas la protección del principio activo frente a su degradación fisicoquímica y microbiológica, la posibilidad de modificar la liberación del fármaco (obteniéndose de esta forma un sistema de liberación modificada), el mejoramiento en los procesos de absorción del fármaco (que se relaciona directamente con el aumento de la biodisponibilidad del mismo, lo que constituye un punto esencial para fármacos de baja hidrosolubilidad en los que su biodisponibilidad es baja), entre otras. Por lo tanto, la investigación sobre las aplicaciones farmacotécnicas de estos sistemas nanoparticulares se hacen primordiales en las áreas de investigación y desarrollo en cuanto a que pueden dar solución a los problemas que actualmente se presentan con las formas farmacéuticas tradicionales.

Dentro de los métodos de preparación de las nanocápsulas, destaca notablemente en la literatura el método de nanoprecipitación debido a su simplicidad procedimental, bajo costo asociado, alta reproducibilidad y eficiente encapsulación del activo. Experimentalmente, se ha encontrado que las condiciones de preparación de las nanocápsulas juegan un papel crítico en las características finales de las nanocápsulas –que se relacionan directamente con la estabilidad y calidad de las mismas- siendo relevantes frente a este respecto la velocidad de agitación del sistema y la proporción y naturaleza de las fases agregadas en el proceso de formación de estas nanocápsulas. A pesar de lo anterior, son muy pocos los estudios enfocados a la estandarización del proceso de nanoprecipitación y de hecho, no existe un consenso actual sobre los parámetros operacionales que deberían ser utilizados al preparar estos sistemas, generándose de esta forma una fuente de variabilidad que hace difícil la comparación y extrapolación de los resultados obtenidos.

Como respuesta a la problemática anterior, y teniendo en cuenta la necesidad de seguir desarrollando investigación sobre el tema, el enfoque de esta propuesta de investigación es evaluar el efecto de las variables operacionales sobre el proceso de nanoprecipitación de fármacos apolares, utilizando como modelo el fármaco carbamazepina, con el fin de determinar mediante la metodología de superficies de respuesta, los intervalos con los cuales se controlan y optimizan los parámetros de calidad y estabilidad de las nanocápsulas, a fin de escalar su uso a investigaciones posteriores sobre el tema.

4.2. Marco teórico y Estado del Arte

4.2.1. Estado del Arte

El presente proyecto de investigación aborda un tema que ha venido presentando un particular interés en las últimas décadas: los sistemas nanoparticulares como vehículos para la administración de fármacos, debido a la posibilidad que ofrecen de dar solución a problemas presentados con algunos fármacos y que las formas farmacéuticas tradicionales no logran sortear (Rivera, 2017).

Actualmente, se tiene conocimiento de un sinfín de técnicas mediante las cuales pueden obtenerse estos sistemas como la técnica de nanoprecipitación (Jingking, 2017), emulsificación-difusión (Montanheiro, 2013), entre otros. De hecho, es muy amplio el espectro de fármacos sobre los cuales se han realizado investigaciones que actualmente existe la posibilidad de encapsular diferentes núcleos de alimentos con el fin de utilizar la nanotecnología como sistema de dosificación de suplementos y alimentos funcionales (Galindo M. Q., 2017)

Asimismo, es grande el número de auxiliares de formulación (excipientes), que se han estudiado con el fin de conseguir (o por lo menos tratar) la formulación más adecuada para su uso futuro en humanos. En este orden de ideas, es pertinente mencionar algunos trabajos que dan cuenta del estado actual de la investigación sobre nanotecnología aplicada a la Química Farmacéutica; estos son: *Folic acid functionalized reduction-responsive magnetic chitosan nanocapsules for targeted delivery and triggered reléase of drugs* (Shuangling et al., 2017), *Calvedilol-loades nanocapsules: mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa* (Ferreira et al., 2017) y *Starch-based nanocapsules fabricated through layer-by-layer assembly for oral delivery of protein to lower gastrointestinal tract* (Zhang et al., 2017).

4.2.2. Marco teórico

4.2.2.1. Aspectos generales de la carbamazepina

La carbamazepina (CBZ) es un derivado del iminoestilbeno con un grupo carbonilo ubicado en la posición cinco, que es fundamental para su actividad antiepiléptica. Este principio activo presenta cuatro formas polimórficas: la I, la II y la III anhidras y la IV dihidratada; las formas I y III son las principales (Braga & Poppi, 2004). Clínicamente ha sido utilizado por más de 40 años para el tratamiento de la epilepsia y neuralgia trigémina (Martindale, 1999). La carbamazepina pertenece a la clase II dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS por sus siglas en inglés) y su biodisponibilidad es limitada debido a su baja tasa de disolución en el tracto gastrointestinal (posee una solubilidad en agua de 113 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 25°C). De hecho, su solubilidad y tasa de disolución son los factores determinantes en su biodisponibilidad y estos varían entre las diferentes formas polimórficas de la carbamazepina (Sethia and Squillante, 2002). Debido a su marcada apolaridad, la carbamazepina es comúnmente utilizada como modelo experimental en investigaciones en tecnología farmacéutica.

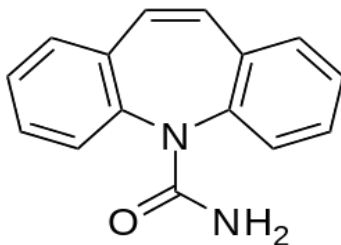


Figura 1. Estructura química de la carbamazepina. (DrugBank, 2005).

4.2.2.2. *Nanopartículas*

4.2.2.2.1. *Generalidades de las nanocápsulas*

Las nanocápsulas pueden definirse como sistemas coloidales sólidos, cuyo tamaño se encuentra dentro de la escala nanométrica, es decir, en el rango entre 1-1000 nm. Pertenecen a un colectivo denominado nanopartículas, el cual comprende no sólo a las nanocápsulas, sino también, a las denominadas nanoesférás (Pinto et al, 2006). La diferencia entre estos dos sistemas particulados radica en la morfología y arquitectura del cuerpo. Las nanoesférás están formadas por una densa matriz de polímero, mientras que las nanocápsulas se encuentran formadas por una membrana polimérica que rodea un núcleo líquido (Quintanar et al, 1998). Vistas desde una perspectiva general, las nanocápsulas pueden ser descritas como sistemas nanovesiculares que exhiben una estructura tipo núcleo-corteza formando una cavidad dentro de la cual el principio activo es contenido (Letchford and Burt, 2007). Esta cavidad puede contener el activo en forma líquida, sólida o como una dispersión molecular (Fessi et al., 1989). Asimismo, esta cavidad puede ser lipofílica o hidrofóbica, de acuerdo con el método de preparación y los materiales de partida usados para su síntesis. Es importante mencionar que se han descrito sistemas en los cuales el fármaco se encuentra adsorbido en la superficie de las nanocápsulas o embebido en el polímero que forma la membrana de la misma (Khoee and Yaghoobian, 2008) (Fig. 2).

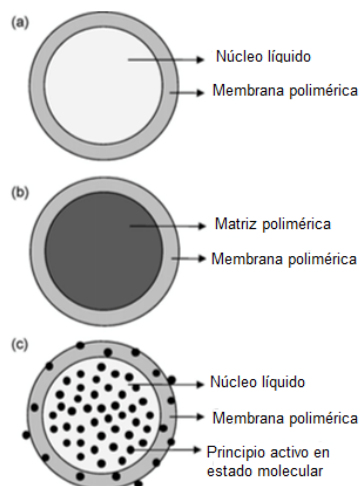


Figura 2. Diferentes estructuras nanoparticulares: (a) núcleo líquido, (b) matriz polimérica y (c) principio activo en dispersión molecular (Tomado y adaptado de Mora et al., 2009).

Hoy en día, las nanocápsulas son consideradas sistemas promisorios para su uso como nuevas formas farmacéuticas, debido entre otras cosas, a su capacidad para liberar el principio activo (Cruz et al., 2006), su tamaño subcelular que permite una mayor captación celular en comparación con otros sistemas particulados (Furtado et al., 2001), la estabilidad que le confieren al activo frente a la degradación (Ourique et al., 2008) y la posibilidad de ser biocompatibles evitando de esta forma efectos adversos asociados a la toxicidad tisular (Pinto et al., 2006).

4.2.2.2.2. Síntesis mediante el Método de Nanoprecipitación

El método de nanoprecipitación es llamado también el método de desplazamiento de solvente o de la deposición interfacial. De acuerdo a Fessi et al. (1988), la síntesis de nanocápsulas requiere tanto una fase acuosa como una orgánica. La fase orgánica consiste, esencialmente, de una solución formada por un solvente – o una mezcla de ellos- e.g etanol, acetona, entre otros; un compuesto capaz de

formar películas como los polímeros (sintéticos, hemisintéticos o naturales), el principio activo, aceite y un tensoactivo lipofílico. Por otra parte, la fase acuosa se compone de un solvente polar –o una mezcla de ellos- y uno o más surfactantes. Los polímeros comúnmente usados son poliésteres biodegradables, principalmente poli-ε-caprolactona (PCL), poli(lactida) (PLA) y poli(lactida-co-glicolida) (PLGA). Es importante mencionar que los polímeros sintéticos debido a su alta pureza son preferidos sobre los polímeros naturales, ya que permiten una mayor reproducibilidad de los resultados (Khoee and Yaghoobian, 2008).

Tabla 1. Composición sugerida para la preparación de nanocápsulas mediante nanoprecipitación.

Material	Composición sugerida
Principio activo	10-25 mg
Polímero	0,2-0,5% del solvente
Aceite	1,0-5,0% del solvente
Surfactante w/o	0,2-0,5% del solvente
Solvente	25 mL
Agente estabilizante	0,2-0,5% del solvente orgánico
Solvente orgánico	50 mL

En el método de la nanoprecipitación, las nanocápsulas se obtienen en forma de suspensión coloidal, la cual se forma cuando la fase orgánica es agregada de forma lenta (y con agitación moderada) a la fase acuosa (Figura 4). Las variables claves en este proceso son aquellas que se relacionan con la adición de la fase orgánica a la acuosa a saber: la tasa de adición de la fase orgánica, la tasa de agitación de la fase acuosa y el método utilizado para la adición de la fase orgánica. Asimismo, las características de las nanocápsulas dependen, o mejor, son influenciadas por la naturaleza y concentración de los componentes utilizados para su síntesis (Legrand et al., 2007).

A la luz de la Teoría de Sugimoto's sobre la precipitación de polímeros (Sugimoto, 1987), Lince et al. (2008) aseveran que el proceso de formación de las nanocápsulas en el método de nanoprecipitación comprende tres etapas: nucleación, crecimiento y agregación. La tasa de duración de cada etapa determina el tamaño de las nanocápsulas y el tiempo que transcurre entre la nucleación y el crecimiento es vital para la uniformidad en el tamaño de las mismas. Idealmente, las condiciones operativas del proceso deberían permitir una tasa alta de nucleación fuertemente dependiente de la sobresaturación (que es la fuerza motriz de este fenómeno) y una baja tasa de crecimiento.

Por otra parte, el proceso de formación de las nanocápsulas se explica mediante la convergencia de dos teorías: la Teoría de Transferencia de Masas entre dos Líquidos de Davies y el Efecto de Gibbs-Marangoni (McManamey et al., 1973). Quintanar et al. Explica que la rápida formación de las nanocápsulas es un proceso dirigido fundamentalmente por una diferencia entre tensiones superficiales. Es bien sabido, que un líquido con alta tensión superficial (fase acuosa) tira más fuertemente sobre sus alrededores en comparación con un líquido de baja tensión superficial (solvente de la fase orgánica). Esta diferencia entre tensiones superficiales ocasiona una turbulencia y un desbalance térmico en el sistema, llevando a la formación continua de remolinos de solvente en las interface de ambos líquidos. Por consiguiente, se observa una migración violenta debido a la miscibilidad mutua entre los solventes; la fase orgánica fluye fuera de las regiones de baja tensión superficial y el polímero tiende a agregarse sobre la superficie del aceite, formando así las nanocápsulas. De acuerdo con esta explicación, la formación de las nanocápsulas se debe a la agregación del polímero en gotas de emulsión estabilizadas.

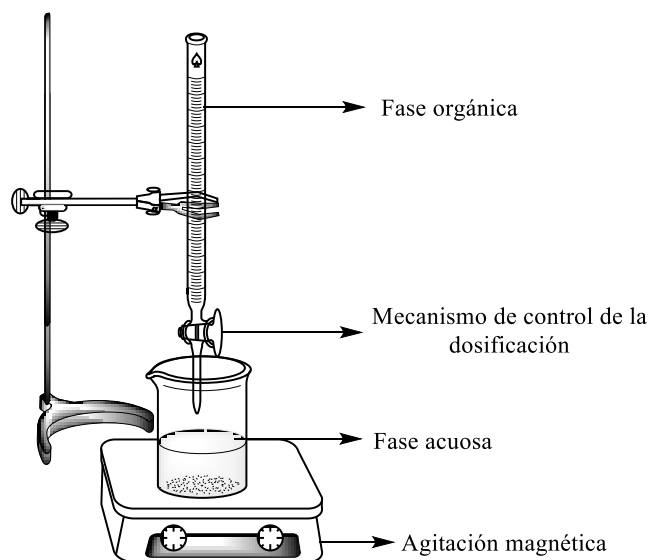


Figura 3. Esquema general del montaje utilizado para el método de nanoprecipitación.

4.2.2.2.3. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas

4.2.2.2.3.1. Potencial zeta

El potencial zeta (ζ) puede entenderse como el valor del potencial eléctrico en la frontera entre la capa de Stern y la capa difusa, de acuerdo con el modelo de la doble capa eléctrica. La capa de Stern es la primera capa -adyacente a la partícula cuya superficie está cargada- rígida y formada por contraiones. La capa difusa es la segunda capa, adyacente a la capa de Stern y formada por el balance dinámico de los contraiones repelidos por la capa de Stern y atraídos por la partícula cargada superficialmente. La magnitud del potencial zeta es un indicativo de la estabilidad fisicoquímica de un sistema coloidal mediante interacciones electrostáticas. Si todas las partículas en suspensión tienen un valor de potencial zeta muy alto (indistintamente de si este sea positivo o negativo), se producirá repulsión electrostática evitando de esta forma que las partículas se agreguen entre ellas. Por el contrario, si las partículas tienen valores bajos de potencial zeta

la repulsión entre ellas será baja, permitiéndose de esta forma la ocurrencia de fenómenos de agregación, los cuales desestabilizan la suspensión al punto de generarse la precipitación de la misma (Bhattacharjee, 2016). De acuerdo a la literatura, la frontera de estabilidad en las suspensiones se encuentra alrededor de ± 30 mV; suspensiones con valores de potencial zeta positivos mayores a 30 mV o negativos menores a -30 mV se consideran estables frente a los fenómenos de agregación.

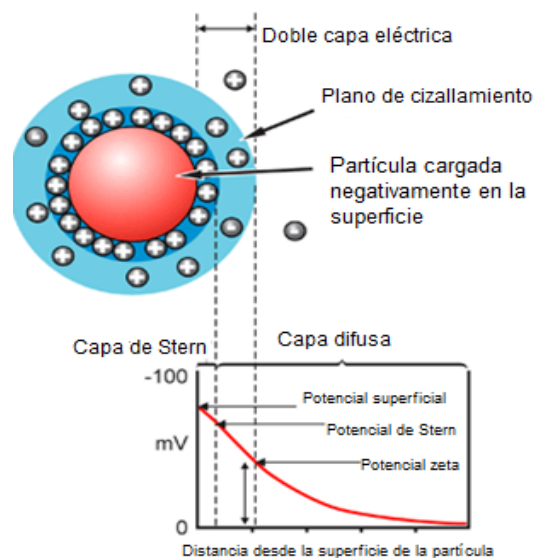


Figura 4. Esquema general de la formación del potencial zeta (ζ). (Tomado y adaptado de <http://www.scai.uma.es>)

4.2.2.2.3.2. *Tamaño de partícula e índice de polidispersidad*

El tamaño de partícula puede determinarse por dispersión de luz dinámica, esta técnica se basa en que la luz dispersada por partículas con movimiento browniano tiene un desplazamiento minúsculo de su longitud de onda por el habitual efecto Doppler; el desplazamiento es tan pequeño que sólo puede medirse por medio de rayos láser, que son estrictamente monocromáticos y muy intensos. El desplazamiento en la longitud de onda, que se muestra como un ensanchamiento

de línea, se usa para determinar el coeficiente de difusión de las partículas, el que a su vez permite calcular su radio de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein (Genaro, 2003). Sin embargo, el radio que se calcula con esta ecuación corresponde al radio hidrodinámico, que comprende a la partícula más el agua de hidratación adherida. Cabe aclarar que no es posible separar el efecto de la hidratación sobre el radio hidrodinámico por medio de esta técnica de dispersión de luz.

La Ecuación de Stokes-Einstein se representa matemáticamente como (1)

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Donde,

d(H): diámetro hidrodinámico

D: coeficiente de difusión

k: constante de Boltzmann

T: temperatura absoluta

η viscosidad

El índice de polidispersidad, por otra parte, es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños (Lancheros et al., 2014).

4.2.2.2.3.3. *Porcentaje o eficiencia de encapsulación*

La eficiencia de encapsulación (EE) es el porcentaje de fármaco que es incorporado, por absorción y/o adsorción en las nano-cápsula. Aunque existen diversos métodos para determinar la EE, la mayoría de ellos se basan en separar

las nano-cápsulas del fármaco no encapsulado, para a continuación medir la concentración del fármaco en una o ambas partes.

En cualquier caso, la eficiencia de encapsulación se calcula siguiendo la ecuación (2).

$$EE = \left(\frac{CCE}{CN + CCE} \right) * 100 \quad (2)$$

donde,

EE: eficiencia de encapsulación

CCE: fármaco encapsulado

CN: fármaco no encapsulado

Una de las técnicas utilizadas para conocer la eficiencia de la encapsulación consiste en separar el fármaco no encapsulado mediante ultrafiltración, utilizando filtros de ultracentrifugación de corte variable. En este caso, se puede escoger el tamaño de poro del filtro, dependiendo del tamaño del compuesto que se ha encapsulado. De esta manera, el fármaco no encapsulado pasará a través de la membrana, y las nano-cápsulas quedarán retenidas (Miladi et al., 2015).

4.2.2.3. *Ensayos de liberación in-vitro*

Como ocurre con la mayoría de las formas de dosificación (formas farmacéuticas), la calidad del producto final y su desempeño debe ser verificado a partir de múltiples experimentos *in vivo* y/o *in vitro*. Dentro de estos, los experimentos relacionados con la cinética de liberación del fármaco provee información crítica acerca del comportamiento de la forma farmacéutica y es un parámetro clave para evaluar la seguridad y eficacia del producto. Debido al costo, tiempo, laboriosidad y necesidad de sujetos animales o humanos para la realización de pruebas *in vivo* de la cinética de liberación de los fármacos, los ensayos *in vitro* han ganado

especial atención como ensayos alternativos para valorar el desempeño de los productos terminados. De hecho, los ensayos de liberación *in vitro* son comúnmente usados como predictores del comportamiento *in vivo* de formas farmacéuticas tradicionales como las tabletas y las cápsulas y más recientemente, con formas farmacéuticas innovadoras como por ejemplo microesferas biodegradables inyectables (Buch, 2010). Generalmente, los estudios *in vitro* son desarrollados a 37°C (temperatura fisiológica), aunque el uso de temperaturas mayores ha sido explorado con el fin de caracterizar –dentro de un rango más amplio- la liberación del fármaco. Algunos de los objetivos clave de los estudios de liberación *in vitro* son los siguientes:

- a. Evaluar el efecto de la formulación y los métodos de manufactura en el producto final.
- b. Servir como un ensayo rutinario para el control de la calidad del producto final.
- c. Soportar los claims consignados en la etiqueta de los productos.
- d. Establecer una relación/correlación *in vitro-in vivo* (IVIVC/R).
- e. Asegurar la bioequivalencia entre productos bajo los lineamientos de SUPAC.

Sin lugar a duda, los ensayos de liberación *in vitro* constituyen una importante herramienta analítica y es usada para investigar y establecer el comportamiento del sistema durante las distintas etapas del desarrollo de un fármaco. Cuando se diseña de forma correcta, un perfil de liberación *in vitro* puede proveer información fundamental acerca de la forma farmacéutica y la forma en la que ésta se comporta, así como también, de su cinética y la forma en la que el fármaco es liberado a partir de la misma, permitiendo de esta forma un enfoque científico-racional en el desarrollo de productos farmacéuticos. A partir de todo lo anterior, se hace clara la razón por la cual este tipo de ensayos toman gran relevancia en el estudio de sistemas como las nanocápsulas (Amann, 2010).

Cabe mencionar que estos ensayos suelen ser conducidos, en su mayoría, bajo la metodología establecida por la Farmacopea Estadounidense (USP), en la cual se emplean equipos disolutores con aditamentos especiales, según las características del estudio a realizar. Sin embargo, recientemente se ha venido implementando la Metodología de Celdas de Franz como otra forma de realizar los ensayos de liberación *in vitro*, debido a su facilidad operativa y bajo costo asociado (Alves, 2016).

En síntesis, las Celdas de Franz están constituidas por dos compartimentos denominados compartimento donador (donde se ubica la molécula estudiada) y compartimento aceptor (hacia donde permea la molécula estudiada). Los compartimentos se encuentran separados por una membrana (cuya composición varía de acuerdo a la naturaleza de la molécula a estudiar y el objetivo del ensayo) y habitualmente presenta dos configuraciones: una vertical y una horizontal. Como regla general, las celdas verticales son utilizadas en estudios de preformulación donde se requiere evaluar la permeabilidad de fármacos de aplicación transdérmica mientras que las horizontales se utilizan para evaluar no sólo la permeabilidad transdérmica, sino también, la intestinal (Aguilera, 2000).

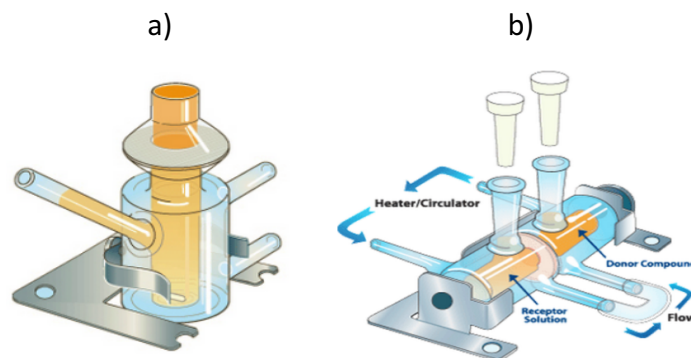


Figura 5. Esquematación de las Celdas de Franz: a) Celda Vertical y b) Celda Horizontal. (Disponible en <http://permegear.com/side-bi-side-cells>).

4.3. OBJETIVOS

4.3.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones operacionales óptimas, a escala de laboratorio, para el proceso de nanoencapsulación de carbamazepina mediante la técnica de nanoprecipitación.

4.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la concentración del polímero policaprolactona sobre las variables de respuesta del proceso de nanoprecipitación de la carbamazepina (diámetro hidrodinámico (D_H), el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación).
2. Evaluar el efecto de la concentración del estabilizante poloxámero 188 sobre las variables de respuesta del proceso de nanoprecipitación de la carbamazepina (diámetro hidrodinámico (D_H), el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación).
3. Evaluar el efecto de la velocidad de agitación del sistema sobre las variables de respuesta del proceso de nanoprecipitación de la carbamazepina (diámetro hidrodinámico (D_H), el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación).
4. Realizar la evaluación de la liberación de carbamazepina desde las nanocápsulas, utilizando la metodología de Celdas de Franz verticales.

4.4. METODOLOGÍA PROPUESTA

Para el desarrollo experimental de esta propuesta de investigación se empleó la metodología de superficies de respuesta ya que, como se mencionó previamente en este documento, es la que permite la optimización de las variables de respuesta lo que va en línea con el objetivo generar de este trabajo. Los experimentos se plantearon como un diseño central compuesto construido a partir de un diseño factorial 2^3 , lo que quiere decir que se evaluaron tres variables operacionales en dos diferentes niveles cada una. Estas variables fueron definidas como: concentración del material polimérico, concentración del agente estabilizante y velocidad de agitación del sistema.

4.4.1. Diseño Experimental

Tabla 2. Diseño experimental para el método de nanoprecipitación.

Tratamiento	Agitación (rpm)	Polímero (mg)	Estabilizador (mg)
1	200	150	100
2	500	150	100
3	200	400	100
4	500	400	100
5	200	150	250
6	500	150	250
7	200	400	250
8	500	400	250
9	98	275	175
10	602	275	175
11	350	65	175
12	350	485	175
13	350	275	49
14	350	275	301
15	350	275	175
16	350	275	175
17	350	275	175
18	350	275	175
19	350	275	175
20	350	275	175

Los valores de los puntos centrales son 350 rpm para la velocidad de agitación, 275 mg para la concentración del polímero y 175 mg para la concentración del estabilizador y los puntos axiales se definieron como 98 rpm y 602 rpm para la velocidad de agitación, 65 mg y 485 mg para la concentración del polímero, y 49 mg y 301 mg para la concentración del estabilizador.

4.4.2. *Materiales*

Se utilizó carbamazepina materia prima como el principio activo a encapsular (proveniente de Laboratorios Sigma-Aldrich), policaprolactona (PCL) de 45000 Da como el material polimérico para la formación de la membrana de las nanocápsulas (proveniente de igual forma de Laboratorios Sigma-Aldrich), Miglyol como aceite para formar el núcleo de las nanocápsulas, acetona como solvente para la fase orgánica, Poloxámero 188 como el estabilizante de las nanocápsulas (surfactante) y agua ultrapura como el solvente de la fase acuosa.

4.4.3. *Obtención de las nanocápsulas*

4.4.3.1. ***Nanoprecipitación de la carbamazepina***

La metodología para la síntesis de las nanocápsulas se basó en el diseño propuesto por Fessi et al. (1989). Se prepararon dos fases cuya composición se encuentra consignada en la tabla 3 de este documento.

Tabla 3. Formulación para la síntesis de las nanocápsulas por nanoprecipitación.

Material	Composición
Fase orgánica	
Principio activo (Carbamazepina)	150 mg
Solvente (Acetona)	25 mL
Polímero (PCL)	65 – 485 mg
Miglyol	4 mL

Fase acuosa	
No solvente (Agua destilada)	50 mL
Estabilizador (Poloxamer 188)	49 – 301 mg

El desarrollo de las nanocápsulas se realizó como se describe a continuación: se preparó la fase orgánica añadiendo la cantidad correspondiente de policaprolactona (la cual dependió del tratamiento a trabajar) en 25 mL de acetona y se agitó a 500 rpm durante una hora; este recipiente se denominó recipiente A. Por otro lado, en un recipiente que se rotuló como B se disolvieron 150 mg de carbamazepina en 4 mL de Miglyol, agitando el sistema a una velocidad de 500 rpm. Una vez alcanzada la disolución completa, el contenido del recipiente B se adicionó al del recipiente A y se agitó por 30 minutos más, conservando la velocidad de 500 rpm. Simultáneamente, se preparó la fase acuosa, la cual estaba contenida en un recipiente rotulado como C. Para esto, se disolvió la cantidad correspondiente de poloxámero 188 en 50 mL de agua ultrapura y se agitó a una velocidad de 500 rpm hasta alcanzar una disolución completa. Cuando se terminó con la preparación de ambas fases, se procedió a la síntesis de las nanocápsulas agregando de manera controlada la fase orgánica a la acuosa (se utilizó un sistema de dosificación que permitió la adición de la fase orgánica a una tasa de 2 mL/min). Cabe aclarar que previamente se cambió la velocidad de agitación del recipiente C a aquella correspondiente al tratamiento que se estaba trabajando. Una vez adicionada la fase orgánica, el sistema se dejó agitando durante 10 minutos más.

4.4.4. Concentración de las nanocápsulas

Para concentrar las nanocápsulas, es decir, eliminar el solvente orgánico se hizo uso de la técnica de rotaevaporación. De esta forma, se inició con un vacío de 400 mbar y este se disminuyó a una tasa de 100 mbar/10 minutos hasta un vacío final de 100 mbar. La velocidad de agitación del sistema fue de 155 rpm y se mantuvo

a una temperatura de 55°C (con el fin de evaporar la mayor cantidad de acetona). El tiempo total de rotaevaporación fue de 45 minutos.

4.4.5. Purificación de las nanocápsulas

La purificación de las nanocápsulas se realizó mediante un sistema de filtración al vacío, utilizando un filtro cualitativo. Una vez filtrado todo el sistema se procedió a medir su volumen final mediante una probeta esmerilada.

4.4.6. Caracterización de las nanocápsulas

Para la caracterización de las nanocápsulas se determinó el valor de tres parámetros (denominados variables de respuesta del proceso) a saber: diámetro hidrodinámico (D_H), el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación.

Para la determinación del potencial zeta (ζ) y el diámetro hidrodinámico (D_H), se utilizó el equipo Z-Sizer Nano-ZSP. Se preparó una dilución de 5:5000 (v/v) a partir de la suspensión obtenida en 4.4.5 y se procedió posteriormente a ajustar las condiciones del equipo para realizar las respectivas mediciones. Por otra parte, para la determinación del porcentaje de encapsulación se transfirió una porción de la suspensión obtenida en 4.4.5 a un tubo VWR con filtro de 0,2 μm y se sometió a un proceso de centrifugación mediante una microcentrífuga Hettich a una velocidad de 9700 RPM. Posteriormente, la cantidad de carbamazepina en el sobrenadante se determinó mediante medidas de absorbancia (a una longitud de onda de 285 nm), utilizando un espectrofotómetro Shimadzu acoplado a una termocupla. La medida de absorbancia se transformó en concentración de carbamazepina mediante una curva de calibración y finalmente, mediante la ecuación (2) se obtuvo el valor del porcentaje de encapsulación de carbamazepina para cada tratamiento.

4.4.7. Optimización del proceso de nanoprecipitación

La optimización del proceso de nanoprecipitación se realizó mediante el uso del software estadístico Minitab. Así, los resultados de diámetro hidrodinámico (D_H), potencial zeta (ζ) y porcentaje de encapsulación obtenidos para cada tratamiento fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar la significancia de cada una de las condiciones operacionales sobre las variables de respuesta. Finalmente, se obtuvo la ecuación de optimización para el proceso de nanoprecipitación de carbamazepina.

4.4.8. Estudio de liberación de la carbamazepina:

El estudio de liberación se realizó utilizando La Metodología de Celdas de Franz. Para esto, se adicionó una cantidad de cada uno de los tres sistemas a analizar en el compartimento donador y posteriormente, se midió la absorbancia de pequeñas muestras tomadas del compartimento aceptor (a 285 nm), en los siguientes tiempos: 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h y 168 h (1 semana). Una vez obtenidos los resultados de absorbancia, estos se transformaron a valores de concentración mediante una curva de calibración (ver anexo 2) con los cuales se determinó, ulteriormente, el porcentaje de fármaco liberado teniendo en cuenta la concentración inicial del mismo en el compartimento donador y la cantidad máxima utilizada para la preparación de las nanocápsulas (150 mg). Los resultados para el porcentaje de liberación se graficaron respecto al tiempo, para construir el perfil de liberación de la carbamazepina desde estos sistemas y finalmente, a partir del AUC de cada perfil y utilizando la ecuación (3), se calculó la eficiencia de liberación para cada uno de los tres sistemas. Es pertinente mencionar que la membrana utilizada para el estudio fue una membrana de celulosa de 76 mm y se utilizó agua como medio de

disolución para el compartimento aceptor. Todo el estudio se realizó a una condición de temperatura de 37,5°C para simular condiciones fisiológicas.

$$E. L = \frac{AUC}{R} * 100 = \frac{\int_0^t y dt}{y_{100} * t} * 100 \quad (3)$$

donde,

E.L: Eficiencia de liberación.

AUC: Área bajo la curva.

R: Área rectangular descrita por el 100% de liberación.

y: Porcentaje disuelto en el tiempo t.

y₁₀₀: Porcentaje disuelto del 100%.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Obtención de las nanocápsulas mediante el método de nanoprecipitación

Como se mencionó previamente en este documento, la síntesis de las nanocápsulas implica la adición de una fase (fase orgánica) a otra (fase acuosa), mediante un sistema de dosificación. Cuando esta adición controlada toma lugar, es posible observar un cambio en la apariencia de la fase acuosa (que hasta antes de iniciar la adición, como se observa en la figura 5, era traslúcida), tornándose totalmente opaca. El cambio observado en la apariencia del sistema es un indicativo de la formación de las nanocápsulas y obedece al denominado Efecto Tyndall (el cual es característico de sistemas coloidales). Básicamente, al darse la síntesis de las nanocápsulas, las partículas presentes en el nuevo sistema pasan a tener un tamaño que está comprendido entre 1nm y 1000nm (la escala nanométrica), lo que genera que dichas partículas (denominadas coloidales) presenten fenómenos de dispersión de luz y se hagan visibles al ser impactadas por un haz de luz, generando de esta forma la opalescencia del medio (Morcillo, 2006).

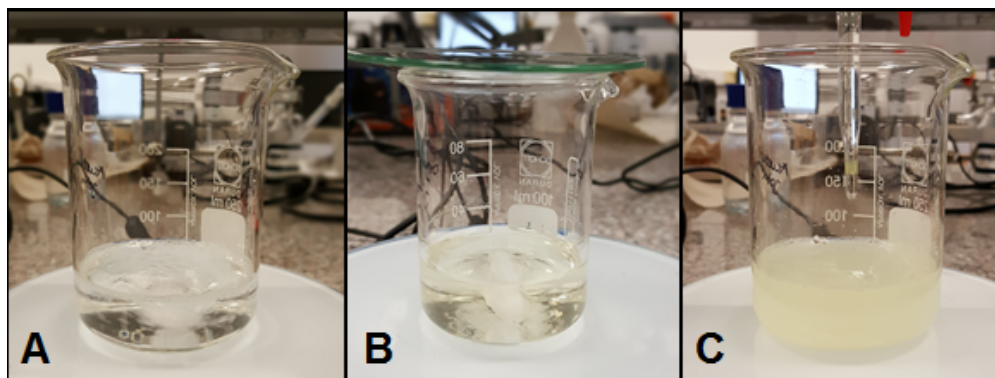


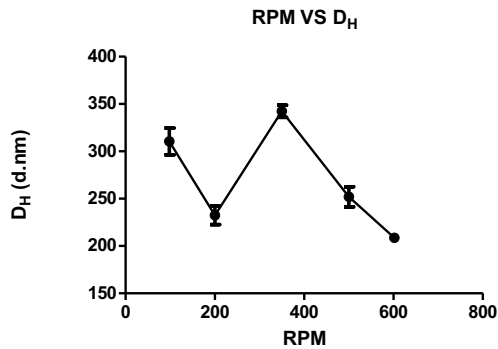
Figura 6. A. Apariencia traslucida de la fase acuosa, B. Apariencia traslucida de la fase orgánica, C. Aparición del efecto Tyndall por la adición de la fase orgánica en la acuosa (tomado de Rivera, 2017).

4.5.2. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas

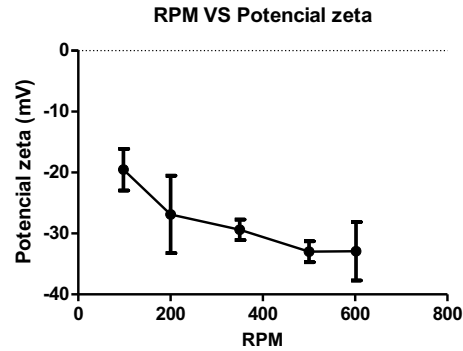
4.5.2.1. Comportamiento de las nanocápsulas en relación a la agitación del sistema.

Una de las variables analizadas en este trabajo de investigación fue la velocidad de agitación del sistema durante el proceso de adición de la fase acuosa sobre la orgánica. A pesar de que todos los artículos de investigación en nanosistemas reportan que el sistema se mantiene con agitación constante, son muy pocos los que especifican el valor de esta agitación y de hecho, son aún menos los que se centran en estudiar su efecto sobre las nanocápsulas (a pesar de ser una variable de presencia constante). Para estudiar esta variable, se procedió a utilizar los puntos axiales y centrales del diseño experimental propuesto y compararlos con el cambio en el diámetro hidrodinámico (D_H), el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

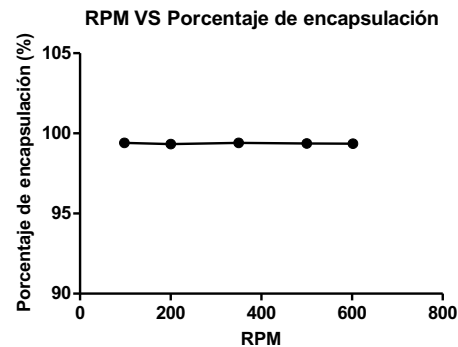
A)



B)



C)



Gráfica 1. Comportamiento de: a) diámetro hidrodinámico b) potencial zeta y c) porcentaje de encapsulación, respecto a la agitación del sistema.

Al analizar la gráfica 1a, es pertinente mencionar (antes de entrar a discutir los fenómenos fisicoquímicos asociados al comportamiento observado), que los valores de diámetro hidrodinámico para las nanocápsulas obtenidas (los cuales oscilaron entre 208,6 nm y 475,0 nm), concuerdan con los resultados reportados para este tipo de sistemas cuando son preparados mediante la técnica de nanoprecipitación (que van desde 205 nm hasta 512 nm) (Dalenc on, 1997). Ahora bien, respecto al comportamiento del diámetro hidrodinámico es posible decir que éste aumenta al pasar de niveles bajos a intermedios de agitación y que disminuye progresivamente al pasar de niveles intermedios a niveles altos de agitación. La

formación de las nanocápsulas mediante la técnica de nanoprecipitación está regida por la ley de transferencia de masas en los líquidos y por la diferencia de tensiones superficiales entre los solventes utilizados (principios que son resumidos dentro de la Ley de Gibbs-Marangoni). La disminución en el tamaño de las nanocápsulas cuando los valores de agitación del sistema se hacen muy grandes obedece al favorecimiento del micro-mezclado en el sistema (que hace referencia a un proceso de mezclado pero a escala molecular). A medida que la velocidad de agitación se incrementa, también lo hace la eficiencia de micro-mezclado, facilitando de esta forma la transferencia de masa entre las fases del sistema y aumentando, concomitantemente, la velocidad con la que ocurre este proceso. Este aumento en la velocidad del proceso de difusión disminuye el tiempo disponible para la agregación de polímero (PCL), sobre las gotas de mygliol y por tanto, al existir menor cantidad de polímero agregado, el tamaño de la nanocápsula obtenida también disminuye (Zhang, 2006).

Por otra parte, la gráfica 1b muestra un descenso en el potencial zeta a medida que los valores de agitación aumentan. La explicación de este fenómeno obedece al mismo principio mencionado anteriormente y que se relaciona con el micro-mezclado. Debido al aumento en la transferencia del agua a la fase orgánica y al proceso de mezcla a nivel molecular, la interacción entre el agua y el mygliol (contenido en la fase orgánica) se ve aumentada. El mygliol se forma a partir de la esterificación del glicerol con los ácidos octanóico y decanóico, cuyos valores de pK_a son 4,85 y 4,9, respectivamente (Moffat et al, 1965). En consecuencia, este aceite tiene la capacidad de hidrolizarse, proceso que se ve representado en la figura 7. Debido al aumento de la interacción entre el mygliol y el agua, los procesos de hidrólisis de los ésteres del mygliol -que dan lugar al valor negativo del potencial zeta (y que se discutirá ulteriormente en este documento)- se ven incrementados y por tanto, al hidrolizarse una mayor cantidad de mygliol el potencial zeta tenderá a hacerse más negativo.

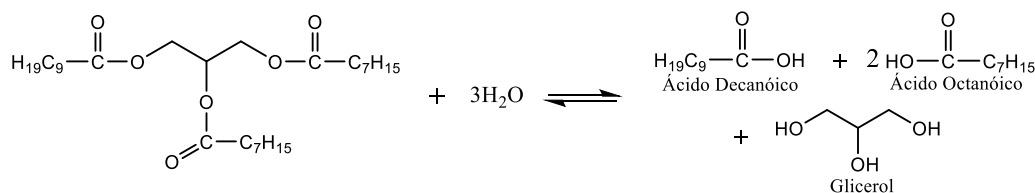
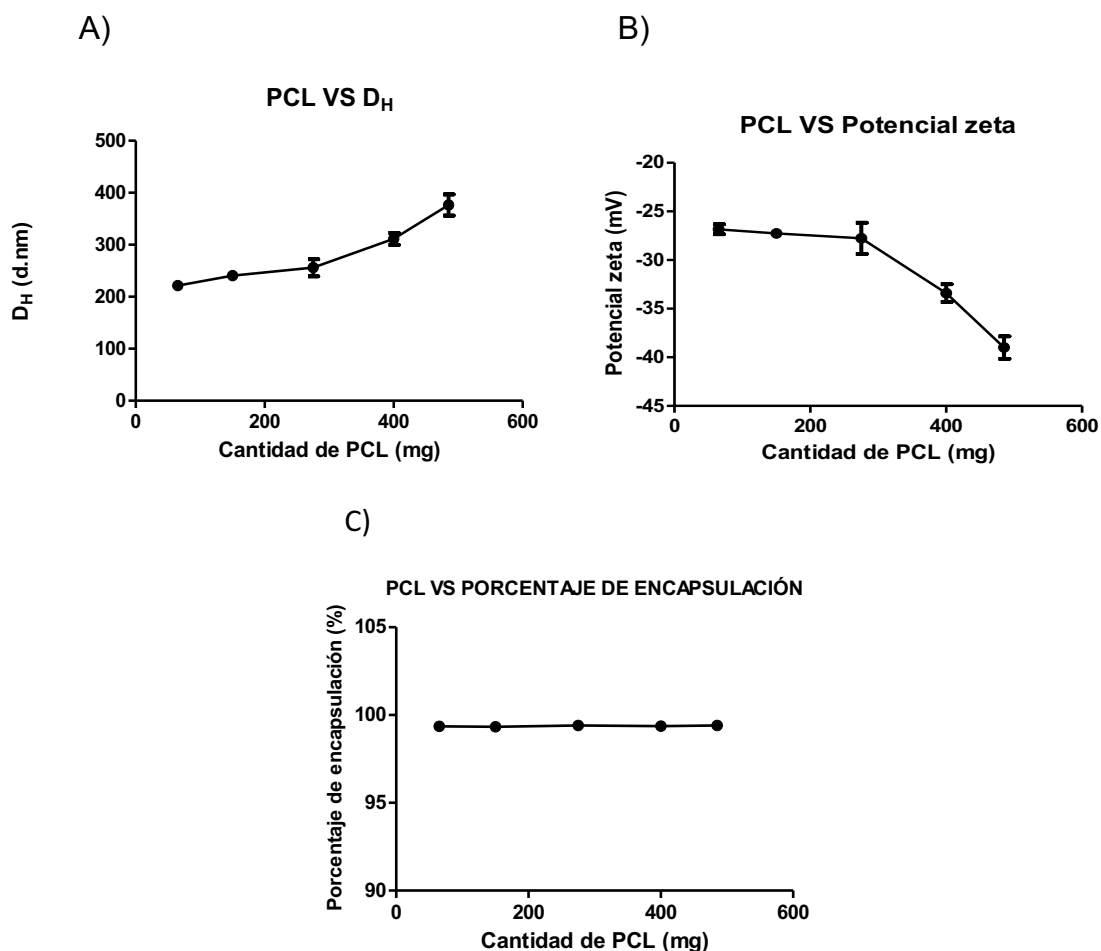


Figura 7. Reacción de hidrolisis de los triglicéridos del mygliol.

Finalmente, la gráfica 1c muestra un comportamiento prácticamente constante del porcentaje de encapsulación en relación a la agitación del sistema. La razón de este comportamiento puede obedecer al hecho de que el fármaco se encuentra disuelto en el mygliol (que es cubierto por la película polimérica) y no debe efectuar procesos de difusión para ser encapsulado. Debido a esto, la velocidad de agitación del sistema no afecta la cantidad de fármaco encapsulado ya que la variable no se encuentra sujeta a las leyes de transferencia de masa de líquidos (o a la Teoría de Gibbs-Marangoni).

4.5.2.2. Comportamiento de las nanocápsulas en relación a la cantidad de polímero utilizado

De acuerdo a la bibliografía, existen tres polímeros utilizados casi de forma universal como agentes formadores de la membrana de las nanocápsulas los cuales corresponden a: PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico), PCL (poli-ε-caprolactona) y PLA (ácido poliláctico). Para el caso particular de esta investigación, se utilizó PCL como agente formador de membrana en una concentración que varió entre 2 mg/mL y 7 mg/mL (65 mg-485 mg), concentraciones que se encuentran dentro de los rangos establecidos para este polímero dentro de la literatura (1,3 mg/mL a 24 mg/mL). A continuación se presentan los resultados obtenidos para esta variable:



Gráfica 2. Comportamiento de: a) diámetro hidrodinámico b) potencial zeta y c) porcentaje de encapsulación, respecto a la cantidad de PCL en el sistema.

Respecto a la gráfica 2A, es posible observar un comportamiento creciente del tamaño de las nanocápsulas a medida que se incrementa la concentración de PCL en la fase orgánica. La explicación de esta tendencia puede abordarse desde los siguientes factores fisicoquímicos: cuando se aumenta la cantidad de polímero, concomitantemente se incrementa la viscosidad de la fase orgánica. Esto a su vez genera la resistencia difusional de los componentes de la fase orgánica, la cual se hace más marcada a medida que la concentración de polímero aumenta. De esto se sigue una disminución en la efectividad de la transferencia de masas entre los líquidos (agua y acetona), lo que no sólo tiene repercusiones en el tamaño de

partícula (su aumento) ya que el polímero dispone de más tiempo para agregarse, sino también, en el porcentaje de encapsulación (aumento de la eficiencia de encapsulación), debido a que la migración del fármaco desde el aceite hacia el sistema se ve restringida por la viscosidad del medio (hecho que es crucial, ya que sólo el fármaco contenido en el aceite podrá ser encapsulado) (Das, 2010). A este último respecto, y a propósito de la gráfica 2C, es pertinente mencionar que existe una concentración crítica de polímero a partir de la cual la eficiencia de encapsulación empieza a disminuir, ya que la viscosidad de la solución polimérica se base tan grande hasta el punto en que se restringe la difusión del solvente (acetona) hacia el no solvente (agua), lo que causa una disminución significativa en la cantidad de nanocápsulas formadas (y por tanto, se reduce el porcentaje de encapsulación al existir una mayor cantidad de fármaco libre) (Sonam, 2014). Es posible mencionar que dicha concentración no fue alcanzada en esta investigación y por tanto, la eficiencia de encapsulación se mantuvo constante en relación al aumento de la cantidad de polímero en el sistema.

De igual forma, el aumento en el tamaño de las nanocápsulas a medida que se incrementa la concentración de PCL está ligado con el número de cadenas poliméricas por unidad de volumen de solvente. Debido a que existe un mayor número de cadenas de polímero por unidad de volumen de solvente (acetona), al difundir dentro de la fase acuosa, la acetona se encuentra cargada con un mayor número de estas cadenas que se agregan y por tanto, las nanocápsulas se hacen más grandes en cuanto a tamaño (Galindo, 2004). El fenómeno anteriormente se ve favorecido en cuanto a que el aumento en la concentración del polímero incrementa a su vez las interacciones polímero-polímero, por lo que una mayor cantidad de cadenas del mismo permanecen asociadas durante el proceso de difusión que da lugar a la formación de las nanocápsulas (Guhagarkar, 2009).

Por otro lado, a partir de la gráfica 2B se infiere que el potencial zeta disminuyó a medida que se incrementó la concentración de PCL. Frente a este tema existen varias consideraciones que deben ser tenidas en cuenta. Inicialmente, se observa que los valores de potencial zeta de las nanocápsulas oscilan entre -19,5 mV y -

45,6 mV. Estos valores negativos son particularmente interesantes si se piensa que el polímero utilizado es de carácter neutro (ver anexo 3) así como lo es el estabilizante empleado (ver anexo 4). Previamente en este documento (ver sesión 4.5.2.1), se comentó que el valor negativo que presentan las nanocápsulas sintetizadas viene dado por la hidrólisis de los ésteres del mygliol. Si bien esto es cierto, para explicar la disminución del potencial zeta con el aumento en la concentración de PCL debe analizarse otro fenómeno: la hidrólisis misma del PCL. En la figura 8 se describe, de forma global, la ocurrencia de la hidrólisis de PCL. Se observa que el producto de esta hidrólisis es un ácido ionizable, el ácido hexanóico (cuyo pK_a es de 4,88) (Hassandadeh, 2015). Por tanto, los valores negativos de potencial zeta en las nanocápsulas estarán dados, de igual forma, por la desprotonación del ácido hexanóico si el pH del medio es mayor a su pK_a . En la tabla 4 se resume el valor de pH para cada uno de los sistemas nanoparticulares sintetizados. Como se puede apreciar, el pH de todos los sistemas se encuentra por encima del valor de 4,88 (pK_a del ácido hexanóico). Por tanto, en solución, las moléculas del ácido hexanóico se van a encontrar en su respectiva forma desionizada (como carboxilatos), con una carga neta negativa. A partir de esto, es pertinente aseverar que a medida que se aumenta la concentración del PCL, existe una mayor cantidad de grupos ésteres para ser hidrolizados (y posteriormente desprotonados) y en consecuencia, habrá un mayor número de cargas negativas en la superficie de las nanopartículas produciendo, finalmente, el aumento en el valor absoluto del potencial zeta (o lo que es lo mismo, disminuyendo su valor).

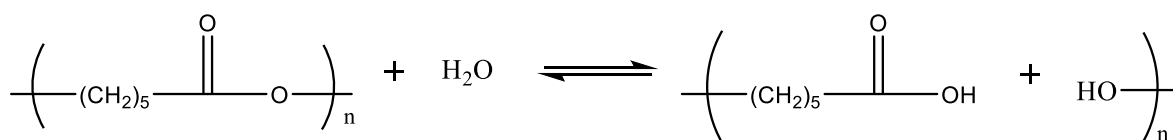


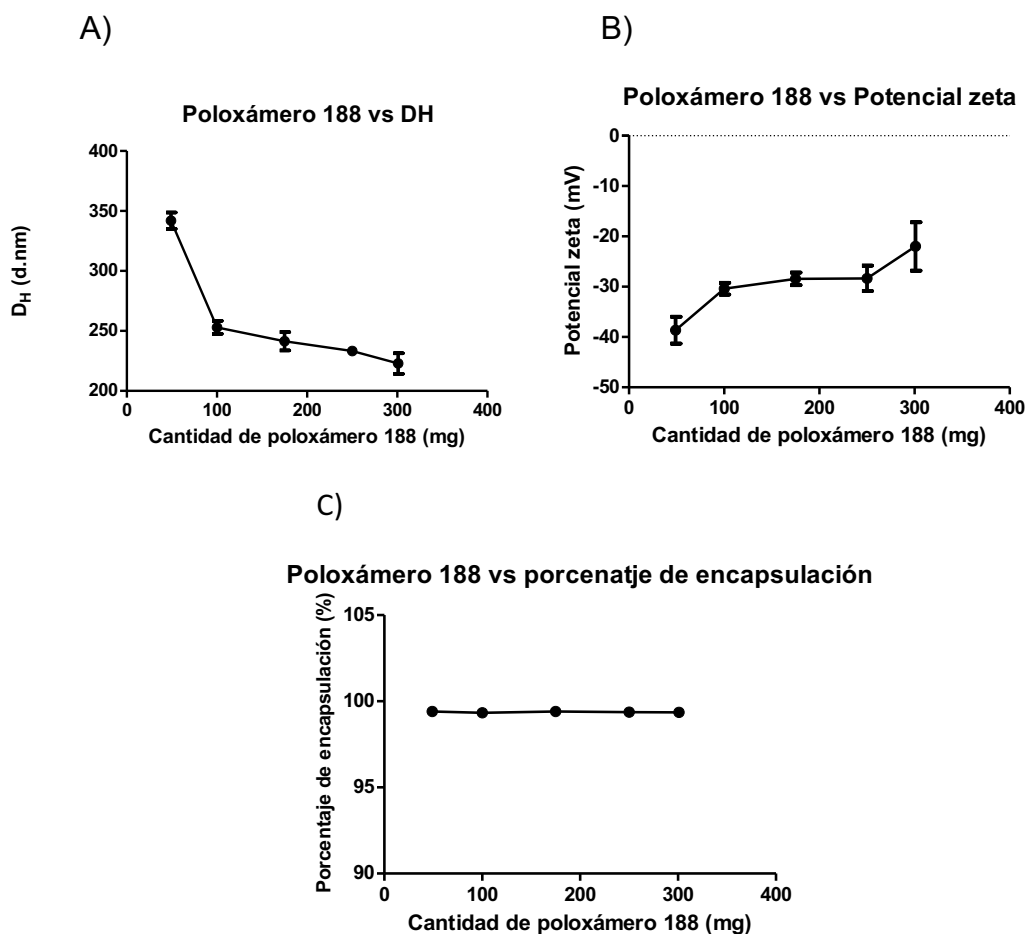
Figura 8. Esquema general de la hidrólisis del PCL.

Tabla 4. Valores de pH para los sistemas obtenidos.

SISTEMA	VALOR DE PH
1	5,31
2	5,25
3	5,15
4	5,30
5	5,44
6	5,85
7	5,70
8	5,68
9	5,60
10	5,84
11	5,15
12	5,38
13	5,28
14	5,32
15	5,26
16	5,44
17	5,37
18	5,31
19	5,94
20	5,91

4.5.2.3. Comportamiento de las nanocápsulas en relación a la cantidad de estabilizante utilizado.

Es habitual encontrar en la literatura que para la síntesis de las nanocápsulas se hace uso de estabilizantes, dentro de los cuales destacan el poloxámero 188, el alcohol polivinílico y el polisorbato 80. A pesar de su uso común en los procesos de nanoprecipitación de fármacos, la síntesis de las nanocápsulas es posible sin la adición de un estabilizante al sistema. Sin embargo, el valor real del estudio de esta variable obedece a la importancia que tiene para garantizar la estabilidad física de la suspensión obtenida (evitando especialmente la agregación de las nanocápsulas en suspensión) (Fessi, 1988). Los resultados obtenidos para el estudio de esta variable se presentan a continuación:



Gráfica 3. Comportamiento de: a) diámetro hidrodinámico b) potencial zeta y c) porcentaje de encapsulación, respecto a la cantidad de poloxámero 188 en el sistema.

Como se aprecia en la gráfica 3A, las nanocápsulas presentaron una disminución en su tamaño, a medida que se aumentó la concentración de poloxámero 188. Este hecho se relaciona con la condición de surfactante del poloxámero. Es de común acuerdo que los surfactantes (también llamados agentes tensoactivos), tienen la característica de disminuir la tensión superficial de los líquidos (o cuando hablamos de un sistema multicomponente, de las interfaces asociadas a los mismos). Anteriormente se mencionó que la formación de las nanocápsulas, en la técnica de nanoprecipitación, está regida por la Teoría de Gibbs-Marangoni en donde básicamente la diferencia en tensiones superficiales entre los líquidos del sistema genera una migración de los componentes de la fase acuosa a la orgánica

y finalmente, se forman las nanocápsulas. La eficiencia con la que este proceso ocurra dependerá, en gran medida, de la diferencia entre las tensiones superficiales de los líquidos utilizados. Por tanto, el aumento progresivo en la concentración de poloxámero 188 en agua genera una disminución en la tensión superficial de la misma y esto a su vez entorpece el proceso de difusión hacia la fase orgánica. Como existe una menor difusión de la fase acuosa, los procesos de precipitación del polímero PCL se hacen menos frecuentes (debido a la mayor estabilidad interfacial) y por tanto, una menor cantidad del mismo se agrega sobre la superficie de las gotas de mygliol, lo que tiene como consecuencia final la disminución en el diámetro hidrodinámico de las nanocápsulas sintetizada (Khayata, 2012).

La explicación anterior se sustenta en otro fenómeno fisicoquímico relacionado con la interacción no solvente-solvente, que matemáticamente se expresa como (4), donde V_{solvente} es el volumen molar del solvente, R la constante universal de los gases, T la temperatura del sistema, δ_{solvente} y δ_{agua} corresponden a los parámetros de solubilidad total del solvente y del agua, respectivamente. A partir de la ecuación (4) es posible inferir que para un proceso con volumen molar del solvente constante e isotérmico, $\chi_{\text{solvente-agua}}$ se hace menor en la medida en que la diferencia entre los parámetros de solubilidad del solvente y el agua tiendan a cero (o lo que es lo mismo, a medida que dichos parámetros se igualen). El cumplimiento de esta igualdad indica una mayor afinidad entre el solvente y el agua debido a que la difusión entre los líquidos se hace más eficaz. Frente a esto, el poloxámero 188 reduce las interacciones desfavorables entre el agua y la acetona, favoreciendo termodinámicamente el proceso de mezcla entre estos dos componentes (hecho que se acentúa a medida que aumenta la concentración del tensioactivo). Por tanto, los parámetros de solubilidad se hacen similares y el valor de $\chi_{\text{solvente-agua}}$ disminuye, lo que según Crucho y Barros se asocia con la disminución en el tamaño de las partículas obtenidas.

$$\chi_{\text{solvente} - \text{agua}} = \frac{V_{\text{solvente}}}{RT} (\delta_{\text{solvente}} - \delta_{\text{agua}})^2 \quad (4)$$

Ahora bien, respecto a la gráfica 3B se puede observar un aumento en el potencial zeta a medida que se incrementa la concentración de poloxámero (aunque el cambio no es muy marcado). Este comportamiento puede atribuirse a los fenómenos mencionados anteriormente en esta sesión por los cuales se disminuye la cantidad de polímero que se agrega en la nanocápsula, así como también, la cantidad de agua que migra hacia la fase orgánica. Como resultado, los procesos hidrolíticos tanto del PCL como del mygliol se ven disminuidos en cuanto a ocurrencia y eso a su vez reduce la carga negativa superficial de las nanocápsulas, lo que se manifiesta como un incremento en el potencial zeta. Sin embargo, y como ya se mencionó, este fenómeno no es suficiente para disminuir de forma contundente los procesos de hidrólisis (ni de desionización), por lo que no se observa un exabrupto en la gráfica, sino que por el contrario, el cambio observado es leve.

Por último, respecto a la gráfica 3C se observa un comportamiento constante del porcentaje de encapsulación en relación a la cantidad de poloxámero en el sistema. Como regla general, se entiende que la adición de un tensoactivo al sistema favorece la solubilidad del fármaco (apolar) en el medio acuoso, lo que disminuye su disponibilidad dentro del mygliol y consecuentemente, la cantidad que es encapsulada dentro de las nanopartículas. Esto produce, como resultado final, un descenso en la eficiencia de encapsulación. No obstante, este efecto no se vio para los sistemas analizados y podía atribuirse a la naturaleza de la carbamazepina, ya que es un fármaco considerablemente apolar y por tanto, las concentraciones de poloxámero utilizadas pueden haber sido insuficientes para minimizar las interacciones desfavorables (de repulsión) de la carbamazepina y el agua, favorecer termodinámicamente su mezcla (y disolución) y por tanto, afectar de forma marcada la nanoencapsulación de la misma (Shah, 2014).

A pesar de las tendencias observadas para las nanocápsulas en relación con cada una de las variables independientes analizadas en esta investigación, como se explica en el siguiente apartado, ninguna de ellas tuvo significancia estadística. De ahí se sigue que si bien, fisicoquímicamente producen cambios, estas variaciones observadas no son representativas a nivel estadístico a tal punto de indicar que al moverse entre un valor de dicha variable y otro, los efectos sobre las nanocápsulas son estadísticamente considerables.

4.5.3. Análisis estadístico mediante la Metodología de Superficies de Respuesta:

El auge actual en investigación sobre nanocápsulas como sistemas de vehiculización de fármacos (debido a sus múltiples ventajas sobre las formas farmacéuticas tradicionales), ha contribuido enormemente al entendimiento de los procesos fisicoquímicos involucrados en su formación (independiente de la técnica mediante la cual sean sintetizadas). Sin embargo, y a pesar del conocimiento que se tiene actualmente sobre la influencia de las condiciones de preparación de los nanosistemas sobre sus características finales, son muy pocos los estudios enfocados a la estandarización del proceso. A partir de esta problemática, en este trabajo de investigación se propuso realizar un diseño de Superficies de Respuesta con el fin de encontrar los intervalos óptimos referentes a la agitación del sistema, la cantidad de polímero formador de la membrana y la cantidad de estabilizante con los cuales se maximizaban (o se controlaban), las características de desempeño y calidad de las nanocápsulas (entendidas como el porcentaje de encapsulación, el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta). Como se mencionó anteriormente, los experimentos se plantearon a partir de un diseño factorial 2^3 compuesto, se realizaron 20 tratamientos diferentes y de cada uno de ellos se obtuvo la información correspondiente a las variables de respuesta definidas en el diseño experimental. A continuación se presentan los resultados obtenidos para el análisis de varianza (ANOVA), del diseño realizado:

Tabla 5. Resultados del ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta en función de los factores estudiados.

Termino	D _H (nm)		ζ (mV)		%EE		POLIDISPERSIDAD	
	Coeficiente	Valor P	Coeficiente	Valor P	Coeficiente	Valor P	Coeficiente	Valor P
<i>b</i> ₀	350.7	0,000	-27,71	0,000	99,4231	0,000	0,4447	0,000
<i>b</i> ₁	26.3	0,390	2,17	0,467	- 0,0239	0,516	0,0059	0,926
<i>b</i> ₂	7.0	0,816	8,05	0,019	- 0,1304	0,004	0,0317	0,622
<i>b</i> ₃	-11.4	0,704	-6,02	0,062	0,0117	0,748	-0,0286	0,656
<i>b</i> ₁₁	- 31.3	0,528	-3,83	0,434	-0,0546	0,369	0,103	0,334
<i>b</i> ₂₂	- 130.6	0,021	-2,13	0,660	-0,0371	0,537	-0,049	0,641
<i>b</i> ₃₃	- 109.0	0,046	1,07	0,825	- 0,0511	0,399	0,042	0,686
<i>b</i> ₁₂	-42.3	0,526	0,07	0,991	0,0060	0,940	0,249	0,098
<i>b</i> ₁₃	1.4	0,983	- 12,21	0,081	-0,1471	0,088	-0,122	0,393
<i>b</i> ₂₃	5.8	0,930	-4,23	0,517	- 0,0053	0,947	-0,104	0,463
R ²	56,47%		64,25%		66,02%		40,15%	
R ² -adj	17,29%		32,08%		35,45%		0,00%	

*b*₀ = coeficiente de regresión, *b*_{*i*} = coeficiente lineal, *b*_{*ij*} = coeficiente cuadrático y *b*_{*ij*} = coeficiente de interacción. D_H = Y1, ζ = Y2 y %EE = Y3.

Se acude a la Metodología de Superficies de Respuesta cuando es sabido que una variable de respuesta de interés es influenciada por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de la metodología es diseñar un experimento que proporcione valores razonables para la variable de respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores estudiados que optimizan el valor de la variable de respuesta (Atkinson, 2007).

Para poder optimizar los valores óptimos de la variable de respuesta, es necesario que los factores estudiados (o en su defecto sus interacciones), produzcan variaciones estadísticamente significativas, esto es, que exista evidencia estadística de que hay una diferencia (independientemente de que ésta sea grande, importante o radicalmente diferente). Para evaluar la significancia de los

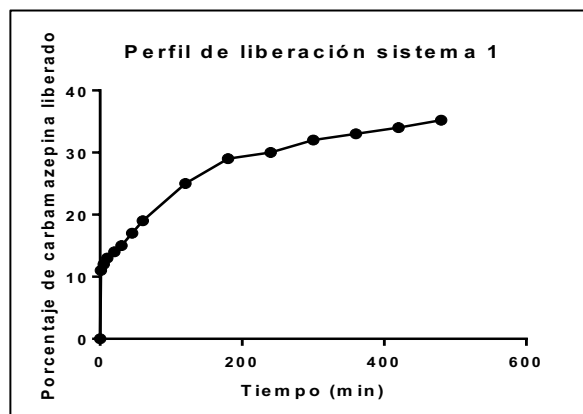
factores estudiados se hizo uso del valor p proporcionado por el análisis de varianza. Para esto, se parte de dos hipótesis denominadas nula y alternativa. En la primera se establece que todos los coeficientes de regresión son iguales a cero (lo que equivale a decir que ningún factor es significativo). Por otro lado, la segunda hipótesis establece que al menos uno de los coeficientes de regresión es diferente de cero (es decir, que es significativo). El valor p se utiliza para rechazar la hipótesis nula. Si dicho valor –obtenido para cada coeficiente– es menor que el nivel de significancia (entendido en este caso particular como 0,05), entonces se rechaza la hipótesis nula. Al observar la tabla 5, se concluye que ningún valor p es menor que 0,05 y por tanto, no es posible (a este nivel de significancia), rechazar la hipótesis nula.

A partir de lo anterior se entiende que ninguno de los factores estudiados en este trabajo investigativo (cantidad de PCL, cantidad de poloxámero 188 y velocidad de agitación del sistema) es significativo frente a las variables de respuesta de interés (potencial zeta, diámetro hidrodinámico y porcentaje de encapsulación). Este resultado reviste de una especial significancia si se tienen en cuenta las condiciones inicialmente mencionadas, bajo las cuales se investiga sobre nanosistemas. Como se mencionó, no existe un consenso acerca de los valores que idealmente deberían ser utilizados (con respecto a las variables operacionales), para sintetizar nanosistemas. El resultado proporcionado por el análisis estadístico permite aseverar que no es crítico el control de los valores usados a la hora de realizar la experimentación ya que, no importa cual sea el valor que se asigne o se utilice, este no ocasionará una variación significativa sobre los resultados obtenidos a pesar de que se observen tendencias de comportamiento. Por tanto, las variaciones observadas en las diferentes investigaciones si corresponden a características propias de los sistemas y no a las condiciones bajo las cuales se preparan, lo que da un nivel mayor de validez a los resultados obtenidos y elimina, de igual forma, una forma de variabilidad muy grande (que hasta ahora no se había considerado apropiadamente).

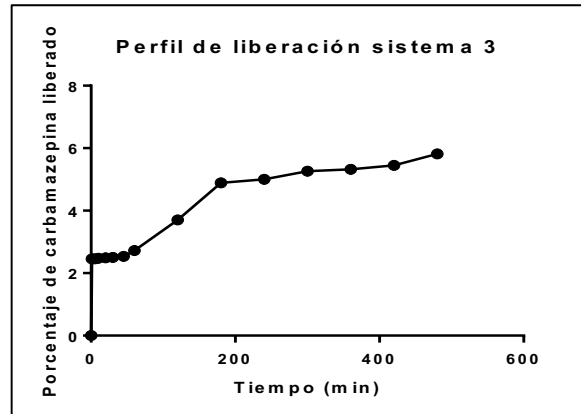
4.5.4. Estudio de liberación de la carbamazepina a partir de las nanocápsulas

Para evaluar la idoneidad de los sistemas nanoparticulares como vehículos para la administración de fármacos se hace necesario no sólo que estos presenten parámetros de desempeño y estabilidad adecuados (valores de potencial zeta grandes, bajo índice de polidispersidad, tamaños pequeños, entre otros), sino también, que tengan la capacidad de liberar el principio activo a partir de su matriz. En este orden de ideas se realizan los ensayos de liberación, con el fin de evaluar la eficiencia con la que se libera el principio activo (que para este caso corresponde a la carbamazepina) a partir de la forma farmacéutica (que en este caso particular corresponde a las nanocápsulas).

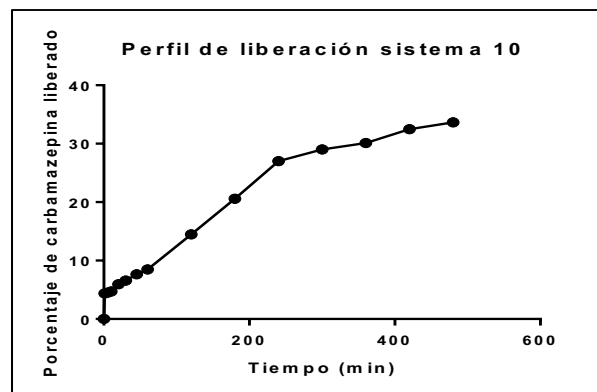
De manera similar a como se evalúan los perfiles de disolución in vitro, se evaluó la liberación de la carbamazepina en este estudio. Los valores de fármaco liberado se calcularon a partir de la absorbancia de muestras tomadas a determinados tiempos en el compartimento aceptor de las Celdas de Franz que posteriormente fueron convertidos en datos de concentración a partir de una curva de calibración (ver anexo 2). A continuación se presentan los perfiles de liberación de la carbamazepina a partir de tres sistemas escogidos por sus características de estabilidad y desempeño:



Gráfica 4. Perfil de liberación de la carbamazepina a partir del sistema de nanocápsulas número 1.



Gráfica 5. Perfil de liberación de la carbamazepina a partir del sistema de nanocápsulas número 3.



Gráfica 6. Perfil de liberación de la carbamazepina a partir del sistema de nanocápsulas número 10.

A partir de los datos obtenidos en las gráficas 4, 5 y 6 se observa que para que la liberación de la carbamazepina sea equivalente al 100% debe transcurrir aproximadamente una semana (a excepción del sistema 3, en donde la liberación no superó el 10%). Esto permite pensar que las nanocápsulas obtenidas funcionan, principalmente, como un sistema de liberación modificada y no como un sistema de liberación inmediata. Adicionalmente, al observar las tres gráficas obtenidas para los perfiles de liberación, se aprecia un comportamiento bifásico, en donde inicialmente se da una liberación acusada que con el tiempo de hace

menos pronunciada (especialmente para el sistema número 3). Este perfil bifásico sugiere que la fracción más grande de carbamazepina se encuentra encapsulada en el núcleo de las nanocápsulas y no absorbida en la superficie de las mismas. Por tanto, el proceso de liberación de la carbamazepina está dado por la desintegración de la superficie de las nanocápsulas mediante erosión superficial, conducida por la hidrólisis del material polimérico (PCL) (Lenaerts, 1984). De esto se sigue que la liberación sea lenta para el caso particular de este fármaco, ya que para pasar al exterior (desde el núcleo de la nanocápsula), debe enfrentarse a las interacciones desfavorables que su naturaleza apolar le confieren respecto a la carga existente en el sistema y se concluye que para el caso de las nanocápsulas de carbamazepina, la estructura corresponde al tipo núcleo-coraza.

Finalmente, a partir de los perfiles de liberación obtenidos, se calculó el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés), para determinar la eficiencia de liberación de las nanocápsulas. Los resultados se presentan en la tabla a continuación:

Tabla 6. Eficiencia de liberación para los sistemas estudiados.

Sistema	AUC	Eficiencia de liberación (%)
1	630299	62,5%
3	56313	5,59%
10	627202	62,2%
Referencia*	1008000	

*Para el caso del sistema de referencia, se asumió el 100% de liberación para cada tiempo específico.

A partir de la tabla 6 se infiere que a excepción del sistema 3, la eficiencia de liberación se encuentra alrededor de 62%, lo que permite concluir que los sistemas obtenidos mediante nanoprecipitación de carbamazepina tienen el potencial de ser usados como nuevos sistemas de vehiculización de fármacos.

4.6. CONCLUSIONES:

La concentración de PCL tiene un efecto significativo sobre el diámetro hidrodinámico de las nanocápsulas, haciendo que éste aumenta a medida que la concentración lo hace, y sobre el potencial zeta, provocando una disminución en el mismo a medida que la concentración se hace mayor. Sin embargo, no se observó un efecto significativo sobre el porcentaje de encapsulación de la carbamazepina.

La concentración de poloxámero 188 tiene un efecto marcado sobre el diámetro hidrodinámico de las nanocápsulas, observándose una disminución del mismo a medida que la concentración aumenta. A pesar de que también tiene un efecto sobre el potencial zeta, haciendo que aumente a medida que la concentración de poloxámero 188 lo hace, este efecto no es tan acusado en comparación al observado en el diámetro hidrodinámico. Con respecto al porcentaje de encapsulación de carbamazepina, no se observó que se viera significativamente afectado por la concentración de poloxámero 188.

La velocidad de agitación del sistema tiene una influencia significativamente apreciable sobre el diámetro hidrodinámico y sobre el potencial zeta. Con respecto al primer parámetro, se observó una clara tendencia a disminuir a medida que las revoluciones por minuto aumentaron. Asimismo, con respecto al segundo, se observó que disminuyó a medida que las revoluciones por minuto aumentaron. No obstante, no se observó un efecto significativo sobre el porcentaje de encapsulación de carbamazepina.

El comportamiento bifásico observado en los perfiles de liberación de la carbamazepina permitió inferir que el fármaco se encuentra contenido en el interior de las nanocápsulas y no adsorbido en su superficie. Lo que corroboró, adicionalmente, que dichas nanocápsulas presentan una estructura corteza-núcleo.

Los resultados obtenidos para el parámetro de eficiencia de encapsulación permiten aseverar que los sistemas nanoparticulares sintetizados constituyen un potencial vehículo para la administración de fármacos apolares.

A pesar de que la velocidad de agitación del sistema, la concentración de PCL y la concentración de poloxámero 188 tuvieron un impacto sobre las variables de respuesta analizadas (potencial zeta, diámetro hidrodinámico y porcentaje de encapsulación), estos efectos no demostraron ser significativos estadísticamente. Por tanto, se concluye que la optimización de estos parámetros no es relevante y por tanto, no se requiere un control estricto sobre los valores asignados a dichas variables al momento de realizar la experimentación.

4.7. RECOMENDACIONES:

Se recomienda realizar estudios encaminados a evaluar la significancia estadística que tienen otras variables reportadas como críticas en la literatura entre las que destacan: el peso molecular del polímero utilizado, el tipo de solvente, la relación fase orgánica/acuosa, la temperatura y el pH del sistema. Esto con el fin de determinar la criticidad a la hora de controlar los valores asignados a cada una de las variables y poder ofrecer un panorama general del efecto que tienen las variables operacionales sobre el proceso de nanoprecipitación de fármacos apolares.

Para el caso de la preparación de las nanocápsulas, se recomienda la utilización de un sistema que permita controlar, de forma mucho más precisa, la tasa de adición de la fase orgánica a la acuosa, como por ejemplo una bomba peristáltica, a fin de revestir de mayor validez estadística los datos obtenidos y reducir el error asociado a dicha fuente de variabilidad, incrementando de esta forma el valor de parámetros como el coeficiente de correlación.

Se recomienda realizar estudios de microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscope), o de microscopia de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés, Transmission Electron Microscopy) con el fin de determinar la morfología y configuración de las nanocápsulas y corroborar las aseveraciones realizadas a partir del comportamiento mostrado por los perfiles de liberación de los nanosistemas preparados.

4.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Alves, A. R. (2016). On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. *Talante* (146), 369-374.

Aguilera, A. S. (2000). Diseño de validación de una celda de difusión para estudios de liberación in vitro de biomoléculas. *Biotechnología aplicada* (17), 187-190.

Amann, L. G. (2010). In vitro-in vivo correlations of scalable PLGA-Risperidone implants for the treatment of schizophrenia,”. *Pharmaceutical Research* , 27 (8), 1730-1737.

Atkinson, A. &. (2007). Optimun experimental designs with SAS. *Oxford University Press* , 511.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential-What they are and what they are not. *Journal of Controlled Release* , 1000-1016.

Braga, J. W., & Poppi, R. J. (2004). Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de. *Quim. Nova* , 27 (6), 1004-1011.

Braga, J. &. (2004). Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação. *Quim. Nova* , 27 (6), 1004-1011.

Buch, P. H. (2010). IVIVC for fenofibrate immediate release tablets using solubility and permeability as in vitro predictors for pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* , 99 (10), 4427-4436.

Castillo, W. (2012). Efecto de la dilución y concentración de carboximetilcelulosa sódica en la estabilidad y aceptación general de néctar membrillo. *Universidad Nacional de Trujillo* , 15-23.

Crucho, C. &. (2015). Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer* (68), 41-46.

Cruz, L. S. (2006). Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm* , 313, 198-205.

Dalenc, on, F. A. (1997). Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. *Int. J. Pharm* , 127.

Das, S. S. (2010). Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* , 318-323.

Fessi, H. P. (1988). Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent 274961 A1* .

Fessi, H. P. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm* , 55, 551-554.

Furtado, V. L. (2001). Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* , 22, 2967-2979.

Galindo, M. Q. (2017). Optimization of the emulsification-diffusion method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils. *LWT-Food Science and Technology* , 1-4.

Galindo, S. A. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification- diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research* , 1428-1439.

Gennaro, A. (2003). *Remington Farmacia* (Tomo 1). Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Guhagarkar, S. M. (2009). Nanoparticles of polyethylene sebacate: a new biodegradable polymer. *AAPS PharmSciTech* , 935-952.

Hassandadeh, S. F. (2015). A proof-of-concept for folate-conjugated and quercetin-anchored pluronic mixed micelles as molecularly modulated polymeric carriers for doxorubicin. *Polymer* (74), 193-204.

Jingking, Y. Y. (2017). Optimization of paeonol-loaded poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanocapsules by central composite design with response surface methodology together with the antibacterial properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* , 1-2.

Khayata, N. A. (2012). Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics* , II (423), 419-427.

Khoee, S. &. (2008). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur. J. Med. Chem* , 10, 1010-1016.

Lancheros R., B. J.-S. (01 de Febrero de 2014). *Universitas Scientiarum*. Recuperado el 13 de Abril de 2017, de Sitio web de Pontificia Universidad Javeriana: <http://revistas.javeriana.edu.co/scientarium>.

Legrand, P. L. (2007). Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polyactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* , 344, 33-43.

Lenaerts, V. C. (1984). Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 5 , 65-68.

Letchford, K. &. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Biopharm* , 65, 259-269.

Lince, F. M. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *J. Colloid Interf. Sci* , 322, 505-515.

Mata-Cabrero, F. H. (2010). Predictive models for different roughness parameters during machining process of peek composites using responde surface methodology. *Ingeniería Investigación y Tecnología* , 14, 1-2.

McManamey, W. D. (1973). The influence of molecular diffusion on mass transfer between turbulent liquids. *Chem. Eng. Sci* , 28, 1061-1069.

Miladi, K. S. (2015). Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: from preparation to in vitro studies. *Industrial Crops and Products* 72, 24-33.

Montanheiro, C. F. (2013). Optimization of alfa-tocopherol loaded nanocapsules by thenanoprecipitation method. *Industrial Crops and Products* , 4-7.

Morcillo, J. (2006). *Temas básicos de química* (2ª edición ed.). Alhambra, Granada, España: Alhambra Universidad.

Ourique, A. P. (2008). Tretionoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm* , 352, 1-4.

Pinto, C. N. (2006). Nanoencapsulation: methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2, 8-21.

Quintanar, D. A. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research* , 15 (7), 1056-1062.

Rivera, C. (2017). Estudio del proceso de nanoencapsulación de quercetina por medio de nanoprecipitación. *Universidad Icesi* , 10-12.

Sethia, S. &. (2002). Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. *J. Pharm. Sci* , 91, 1948-1957.

Shah, U. J. (2014). Improvement in antihypertensive and antianginal effects of felodipine by enhanced absorption from PLGA nanoparticles optimized by factorial design. *Materials Science and Engineering: C* , 1 (35), 153-163.

Sonam, C. &. (2014). Taguchi design for optimization and development of antibacterial drug-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* (64), 99-105.

Sugimoto, T. (1987). Preparatio of monodispersed colloidal particles. *Adv. Colloid. Interf. Sci* , 28, 65-108.

Zhang, J. Z. (2006). Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*. , 153-160.

5. Anexo:

6. Anexo 1. Curva de calibración de la carbamazepina.

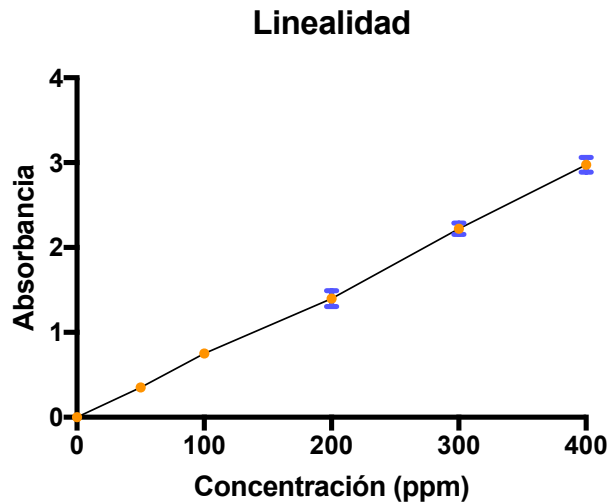


Figura 9. Curva de calibración de la carbamazepina en agua. Tomado de (Tascon, 2016).

5.2.

Anexo 2. Parámetros de la ecuación de la recta de la curva de calibración de la carbamazepina.

Tabla 7. Resultados para la ecuación de la recta de la curva de calibración de la carbamazepina.

ECUACIÓN DE LA RECTA	
Intersección, a:	-0,016
Pendiente, b:	0,007
Coef. Correlación, r:	0,998
Coef. Determinación, r ² :	0,997

5.3. Anexo 3. Resumen de las condiciones utilizadas y los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos.

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos para cada tratamiento del diseño estadístico utilizado.

Corrida	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁ (mg)	X ₂ (mg)	X ₃ (RPM)	Y ₁ D _H (nm)	Y ₂ ζ (mV)	Y ₃ EE (%)
1	150	100	200	222,4	-45,6	99,427
2	150	100	500	210,0	-34,6	99,494
3	400	100	200	244,9	-25,8	99,415
4	400	100	500	288,2	-44,0	99,466
5	150	250	200	223,0	-21,2	99,144
6	150	250	500	272,5	-28,1	99,396
7	400	250	200	239,3	-13,2	99,333
8	400	250	500	237,1	-25,5	99,184
9	275	175	98	310,5	-19,5	99,431
10	275	175	602	208,6	-32,9	99,356
11	65	175	350	297,9	-30,1	99,429
12	485	175	350	376,5	-32,1	99,351
13	275	49	350	222,9	-30,4	99,501
14	275	301	350	253,0	-28,4	99,314
15	275	175	350	346,3	-25,0	99,439
16	275	175	350	333,7	-28,1	99,499
17	275	175	350	251,5	-28,1	99,384
18	275	175	350	396,7	-31,5	99,327
19	275	175	350	474,7	-33,8	99,498
20	275	175	350	295,0	-19,9	99,384

X₁: Cantidad de PCL, X₂: Cantidad de poloxamero 188 y X₃: velocidad de agitación del sistema.