

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS DE ENROFLOXACINA

Tesis presentada por los Bachilleres:

Alfaro Molina, Willy Javier

Cahuana Melo, Jhonatan Moisés

Para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

Asesora:

Dra. Nieto Montesinos, Rita Milagros

Arequipa- Perú

2021

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 06 de Abril del 2021

Dictamen: 002628-C-EPFyB-2021

Visto el borrador del expediente 002628, presentado por:

2011200131 - ALFARO MOLINA WILLY JAVIER

2011200651 - CAHUANA MELO JHONATAN MOISES

Titulado:

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
POLIMERICAS CARGADAS CON ENROFLOXACINA**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**0270 - RAMIREZ ORELLANA JUAN ANDRES
DICTAMINADOR**



**0838 - CARDENAS GARCIA JAIME DANTE
DICTAMINADOR**



**1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico en primer lugar a dios todo poderoso, que me acompaña siempre, a mi familia que, gracias a sus consejos y palabras de aliento, me ayudaron a crecer como persona. A mis padres, hermanas y hermano, por su apoyo, confianza y amor. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante. A mi padre, Milar, por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado, inculcándome desde pequeño los valores que debo seguir, apoyándome, y aconsejándome siempre. A mi madre, Juana, por hacer de mí una mejor persona a través de sus sabios consejos, enseñanzas y amor. A mis hermanas Mariela, Carolina, Karla y mi hermano Gonzalo por estar siempre presentes, cuidándome, aconsejándome y brindándome su aliento.

Willy Javier Alfaro Molina

La presente tesis se la dedico a Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer. A mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida. A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

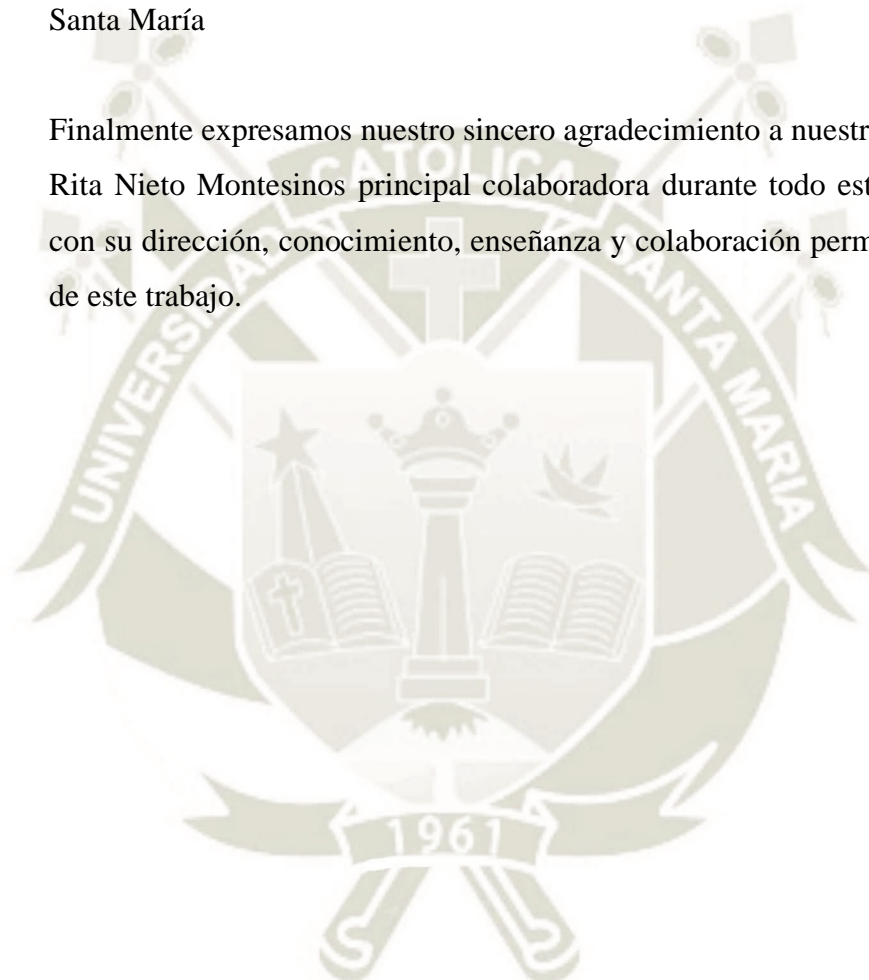
Jhonatan Moisés Cahuana Melo

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres por brindarnos todo para lograr este título profesional, a nuestros familiares y amigos que con su apoyo nos dieron el impulso para lograr esta meta.

Nuestro profundo agradecimiento a todos los docentes y personal administrativo de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María

Finalmente expresamos nuestro sincero agradecimiento a nuestra asesora, la Dra. Rita Nieto Montesinos principal colaboradora durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.



ÍNDICE

	Pág. N°
DICTAMEN APROBATORIO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	xii
HIPÓTESIS.....	xiii
OBJETIVOS.....	xiv
Objetivo General	xiv
Objetivos Específicos.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1. ENROFLOXACINA.....	2
1.1 Farmacocinética.....	3
1.2 Mecanismo de acción.....	4
1.3 Mecanismo de resistencia.....	7
1.4 Formas farmacéuticas convencionales.....	9
2. NANOMEDICINA.....	10
3. NANOPARTÍCULAS.....	11
3.1 Nanopartículas inorgánicas.....	12
3.2 Nanopartículas orgánicas.....	12
4. POLÍMEROS DE ORIGEN NATURAL.....	14
4.1 Quitosán.....	15
4.2 Alginato de sodio.....	15
4.3 Gelatina.....	16
5. POLÍMEROS DE ORIGEN SINTÉTICO.....	16
5.1 Ácido poliláctico.....	17
5.2 Ácido poliglicólico.....	17
5.3 Copolímero del ácido láctico y glicólico.....	18
5.4 Policaprolactona.....	19
5.5 Polietilenglicol.....	20
6. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	20
6.1 Método de emulsión y evaporación de solventes.....	21
6.2 Método de precipitación.....	21
6.3 Método por aspersion	21
6.4 Método de electrospray.....	22

6.5 Método de desplazamiento de solventes.....	22
7. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	23
7.1 Tamaño de partícula.....	23
7.2 Índice de polidispersión.....	24
7.3 Potencial zeta.....	24
7.4 Porcentaje de eficiencia de encapsulación de fármaco.....	25
7.5 Cinética de liberación del fármaco.....	27
7.6 pH.....	28
8. HIDROGELES POLIMÉRICOS.....	30
9. CARACTERIZACIÓN DE GELES.....	31
9.1 Medición de la viscosidad.....	31
9.2 pH.....	33
CAPÍTULO II	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
1. MATERIALES.....	35
1.1 Material de vidrio.....	35
1.2 Material de laboratorio.....	35
1.3 Equipos de laboratorio.....	35
1.4 Reactivos.....	36
2. MÉTODOS.....	37
2.1 Formulación de nanopartículas cargadas de enrofloxacin.....	37
2.2 Formulación del gel mucoadhesivo.....	38
2.3 Caracterización de nanopartículas cargadas de enrofloxacin.....	39
2.4 Caracterización de nanopartículas cargadas de enrofloxacin en gel mucoadhesivo.....	41
2.5 Porcentaje de eficiencia de encapsulación	42
2.6 Cinética de liberación <i>in vitro</i>	44
CAPÍTULO III.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
1. ELECCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN.....	47
1.1 caracterización de nanopartículas cargadas con enrofloxacin.....	56
2. PORCENTAJE DE EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE ENROFLOXACINA	59
3. ESTUDIO DE CINÉTICA DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	59
CONCLUSIONES.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág. Nº
Figura 1 Estructura química del anillo 4 quinolónico, enrofloxacina y ciprofloxacino	2
Figura 2 Interacciones críticas entre fluoroquinolonas y la topoisomerasa IV...	6
Figura 3 Mecanismos de resistencia a las quinolonas.....	8
Figura 4 Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas.....	14
Figura 5 Estructura del Quitosan.....	15
Figura 6 Estructura del Alginato de Sodio.....	16
Figura 7 Estructura de la Gelatina.....	16
Figura 8 Estructura Ácido Poliláctico.....	17
Figura 9 Estructura Ácido Poliglicólico.....	18
Figura 10 Estructura Copolímero del ácido láctico y glicólico.....	19
Figura 11 Estructura de la Policaprolactona.....	20
Figura 12 Estructura del Polietilenglicol.....	20
Figura 13 Representación esquemática de la técnica DLS.....	20
Figura 14 Modelo de la doble capa eléctrica.....	25
Figura 15 Electrodo de membrana de vidrio.....	29
Figura 16 Estructura de un gel polimérico.....	30
Figura 17 Viscosímetro de Ostwald.....	32
Figura 18 Tamaño e índice de polidispersión de las distintas formulaciones...	49
Figura 19 Prueba de Anderson-Darling (normalidad de datos).....	52
Figura 20 Prueba de varianzas iguales (Bartlett).....	53
Figura 21 Análisis de varianzas (F-FISHER).....	54
Figura 22 Comparación múltiple de medias (DUNNETT).....	55
Figura 23 Perfiles de liberación in vitro control (CONTROL), nanopartículas cargadas con enrofloxacina (NPs) y nanopartículas cargadas con enrofloxacina en gel mucoadhesivo 1%(NPs-GEL 1%). La liberación de fármaco (%) se estabiliza a las 240 horas, los datos después de este tiempo no se muestran (n = 3).....	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág. N°
Tabla 1 Soluciones aportadas por la nanomedicina a los problemas que surgen en el uso de formas farmacéuticas convencionales.....	10
Tabla 2 Rangos de viscosidad para una solución acuosa de Carboximetilcelulosa al 2% a temperatura ambiente.....	33
Tabla 3. Formulaciones de nanopartículas poliméricas cargadas de Enrofloxacin (n = 3).....	37
Tabla 4 Formulaciones de gel de nanopartículas poliméricas cargadas de Enrofloxacin (n = 3).....	39
Tabla 5 Resultados de los ensayos de las diferentes formulaciones de los componentes de la formulación de nanopartículas poliméricas. (n=3).....	48
Tabla 6 Formulación final de las nanopartículas poliméricas. (n=3).....	52
Tabla 7 Perfil de viscosidad de dos formulaciones gel sin partículas cargadas de enrofloxacin.....	57
Tabla 8 Tamaño de partícula y potencial zeta de la formulación final de nanopartículas cargadas con enrofloxacin y en gel mucoadhesivo. (n=3).....	58
Tabla 9 Eficiencia de encapsulación de formulación final de nanopartículas poliméricas cargadas con enrofloxacin y en gel mucoadhesivo. (n=3).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

ENR: Enrofloxacin

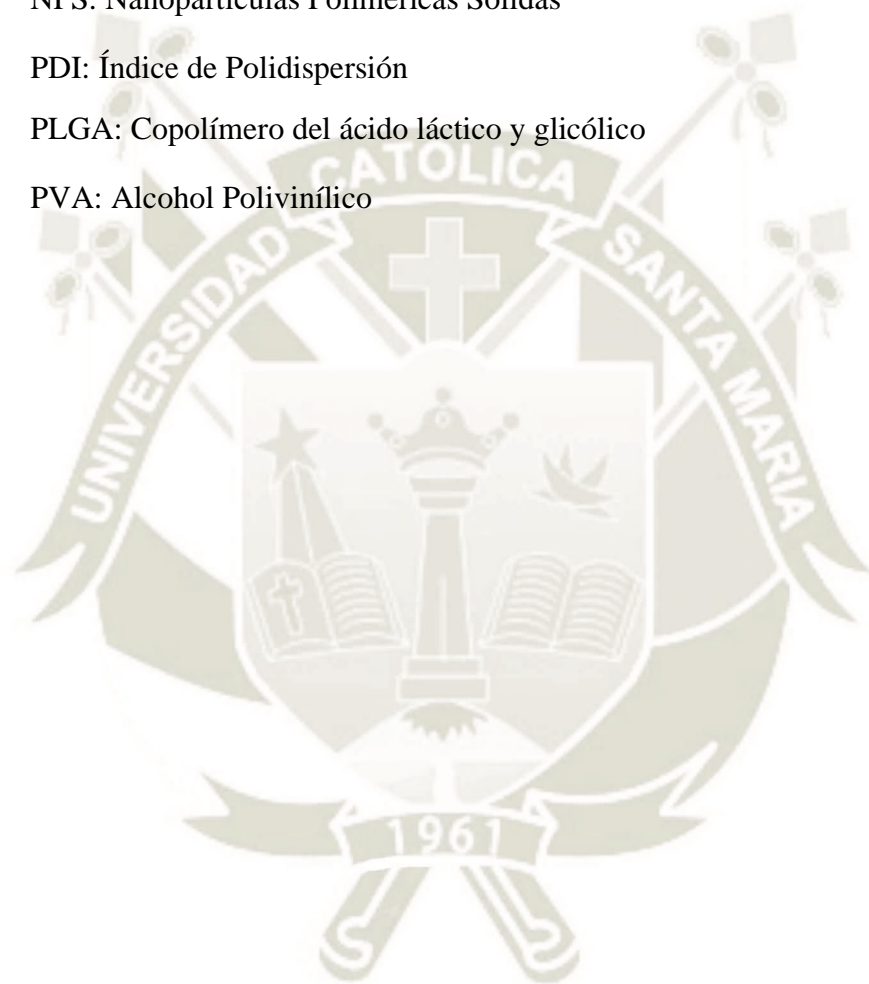
HPLC: Cromatografía Líquida de alta Resolución

NPS: Nanopartículas Poliméricas Sólidas

PDI: Índice de Polidispersión

PLGA: Copolímero del ácido láctico y glicólico

PVA: Alcohol Polivinílico



RESUMEN

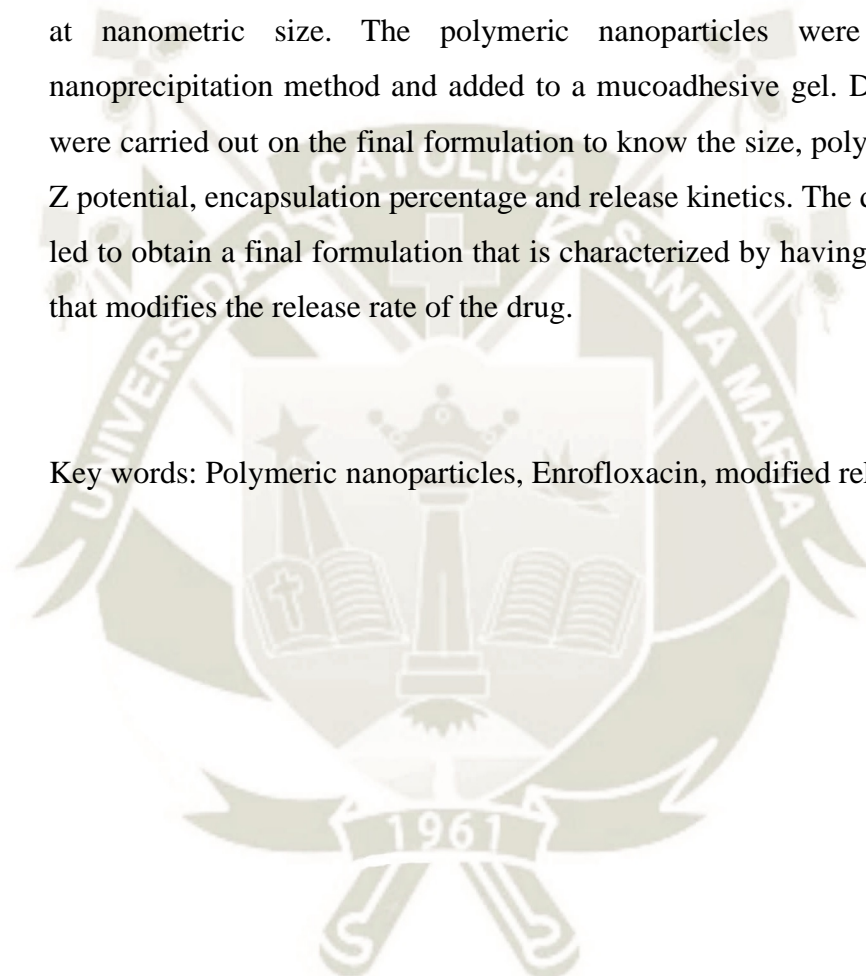
La presente investigación busca obtener una formulación de nanopartículas poliméricas que contengan enrofloxacina como alternativa en el tratamiento antimicrobiano, que al momento de su liberación en el organismo tenga un efecto prolongado y sostenido en un tiempo mucho mayor en comparación con las preparaciones antibióticas convencionales. Esto como resultado de utilizar polímeros biodegradables a lo largo del proceso de elaboración y de trabajar a tamaño nanométrico. Las nanopartículas poliméricas fueron elaboradas por el método de nanoprecipitación y adicionadas a un gel mucoadhesivo. Se realizó distintos análisis a la formulación final para conocer la talla, índice de polidispersión, potencial Z, porcentaje de encapsulación y la cinética de liberación. Los diferentes análisis condujeron a obtener una formulación final que se caracteriza por tener un sistema de liberación que modifica la velocidad de liberación del fármaco.

Palabras claves: Nanopartículas poliméricas, enrofloxacina, liberación modificada.

ABSTRACT

The present research seeks to obtain an formulation of polymeric nanoparticles containing enrofloxacin as an alternative in antimicrobial treatment, which at the time of its release in the body has a prolonged and sustained effect in a much longer time compared to conventional antibiotic preparations. This as a result of using biodegradable polymers throughout the manufacturing process and working at nanometric size. The polymeric nanoparticles were made by the nanoprecipitation method and added to a mucoadhesive gel. Different analyzes were carried out on the final formulation to know the size, polydispersion index, Z potential, encapsulation percentage and release kinetics. The different analyzes led to obtain a final formulation that is characterized by having a release system that modifies the release rate of the drug.

Key words: Polymeric nanoparticles, Enrofloxacin, modified release.



INTRODUCCIÓN

La enrofloxacin es una fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para ser usada en medicina veterinaria. Se caracteriza por presentar actividad antimicrobiana, incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales. En la actualidad para la enrofloxacin existen informes de efectos tóxicos en algunas especies animales. Se han informado efectos tóxicos de enrofloxacin sobre los sistemas nervioso, cardiovascular y gastrointestinal de los animales, así como condrotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo, genotoxicidad, carcinogénesis y fototoxicidad. Asimismo, cabe resaltar que los animales que son tratados con enrofloxacin en altas dosis y en intervalos cortos de tiempo presentan contaminación en los productos derivados de los mismos que son para consumo humano y puede conllevar a crear resistencia a los antibióticos en los consumidores.

La enrofloxacin se caracteriza por poseer un amplio espectro de acción, que se basa en su efecto bactericida, su buena absorción por vía digestiva, amplia distribución en los tejidos, prolongada vida media, prolongado efecto post antibiótico. Debido a las reacciones adversas y aparente toxicidad de la enrofloxacin, su uso ha sido prohibido en humanos, aunque se emplea habitualmente en animales como antibiótico de amplio espectro. Representa, sin lugar a dudas, una buena alternativa terapéutica para el manejo clínico en medicina veterinaria. Es así que este documento propone una formulación de nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin que presente una liberación sostenida y prolongada mejorando su función terapéutica, reduciendo las dosis necesarias, así como las reacciones adversas y toxicidad (1, 2, 3).

HIPÓTESIS

Dado que estudios anteriores han demostrado de los efectos tóxicos en órganos de animales, así como la contaminación de los productos derivados debido a la aplicación de altas dosis en intervalos cortos de tiempo. Este proyecto pretende formular nanopartículas cargadas con enrofloxacin a partir de matrices poliméricas de liberación modificada que por su tamaño de partícula nanométrico brindará un vehículo de transporte altamente efectivo y menos tóxico. Es probable que éstas se puedan optimizar dándole forma farmacéutica de gel mucoadhesivo que permitirá que la liberación del fármaco sea prolongada y sostenida.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar y caracterizar una formulación de nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin que presenten una liberación sostenida y prolongada.

Objetivos específicos:

1. Formular y elaborar nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin.
2. Caracterizar las nanopartículas poliméricas en suspensión y nanopartículas poliméricas en gel mucoadhesivo en función de la talla, el índice de polidispersión, potencial zeta y porcentaje de encapsulación.
3. Evaluar la cinética de liberación de las nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin.



CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1. Enrofloxacin

La enrofloxacin es una fluoroquinolona utilizada como agente quimioterápico, antibacteriano, de uso exclusivo en veterinaria debido a su elevada toxicidad. Como se observa en la figura 1, la enrofloxacin deriva del ácido nalidíxico y tiene un núcleo básico denominado dihidroquinolina o anillo 4 quinolónico. Además del núcleo central típico de la quinolona, son claves los radicales periféricos de la molécula, que modulan la actividad antibacteriana. Los distintos sustituyentes tienen influencia sobre algunos parámetros relevantes para la actividad de la molécula, ya sea su afinidad a las dianas, su espectro de acción, su farmacocinética, o su penetración intracelular. Aunque algunas propiedades antibacterianas se pueden asociar con algunos de los radicales, la molécula actúa en conjunto, y los diversos radicales variables pueden actuar de forma positiva o negativa.(1)

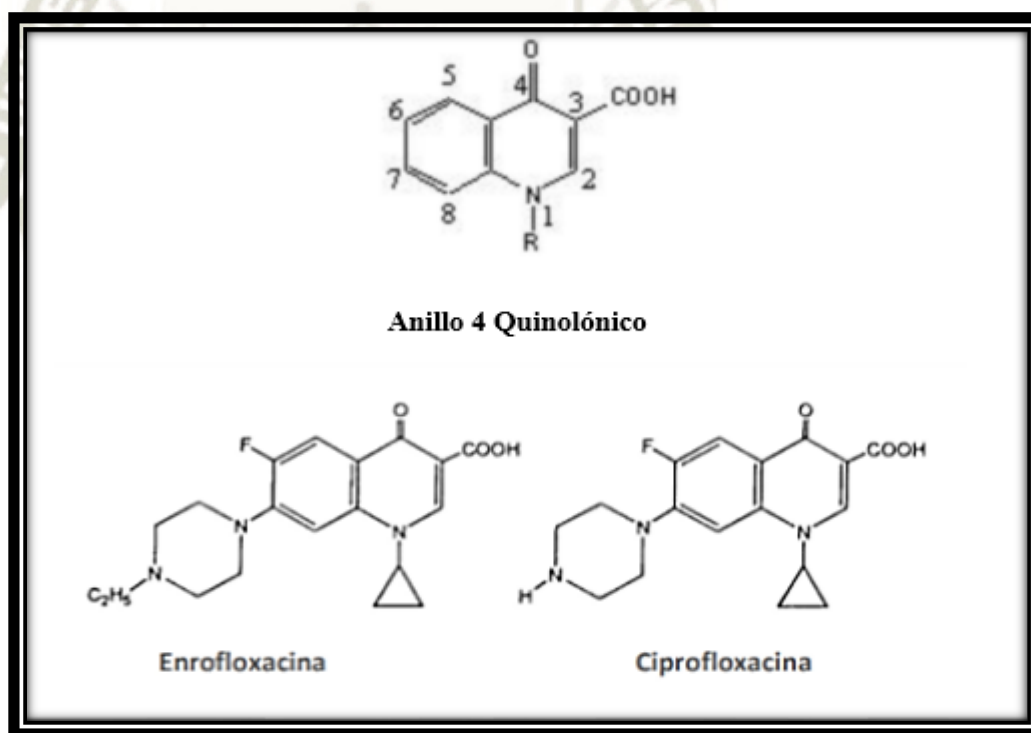


FIGURA 1: Estructura química del anillo 4 quinolónico, enrofloxacin y ciprofloxacin (1)

La relación estructura-actividad de esta molécula, ha motivado la síntesis de compuestos con distintos radicales. El flúor en posición 6 mejora la unión al ADN girasa bacteriana y hace que su penetración celular sea hasta 70 veces superior a

las quinolonas que no poseen flúor, aumentando su eficacia frente a Gram negativos y ampliando su espectro de actividad contra Gram positivos (1). El anillo 4-etilpiperazin-1-il, en posición 7, le confiere mayor potencia, en relación de las quinolonas que tienen en esta posición moléculas lineales. Como se muestra en la figura 1 en posición 3 del anillo, C3 tiene presencia de un grupo carboxilo, fundamental para la unión de la quinolona con las topoisomerasas bacterianas. En la posición 4 del anillo, C4 presenta un grupo ceto que aumenta la absorción digestiva y la biodisponibilidad (1). La enrofloxacin puede existir en cuatro posibles formas dependiendo del pH dado: como catión ácido, especie neutra no ionizable, una intermedia o zwitterion y como ion básico, de esta manera a pH bajo tanto el grupo 7 piperazínico y el grupo 3 carboxílico se encuentran protonados, mientras que a pH alto ninguno está protonado. La enrofloxacin es ligeramente soluble en agua, en etanol y ácido clorhídrico 0.1 N y bastante soluble en hidróxido de sodio 1 N (2).

1.1 Farmacocinética de enrofloxacin

La enrofloxacin se absorbe eficientemente en gran variedad de animales domésticos después de su administración oral o parenteral. Su alta biodisponibilidad (cercana al 60 %) resulta en concentraciones plasmáticas terapéuticas adecuadas, semivida de eliminación relativamente larga (mayor a las 6 horas), volumen de distribución alto y excelente penetración tisular (incluyendo fagocitos). Se elimina fundamentalmente por metabolismo hepático y excreción renal (3).

A. Absorción

La absorción de enrofloxacin es muy variable de acuerdo a dos criterios; según la especie animal y según la forma farmacéutica. Existe una variación de la biodisponibilidad después de la administración oral de enrofloxacin entre animales poligástricos (vacas, ovejas, vicuñas, entre otros) y monogástricos (perros, gatos, conejos, entre otros) del 10 % al 80 %. En efecto, en algunos casos se exige el uso de dosis mayores por vía oral para alcanzar el éxito terapéutico. La

biodisponibilidad intramuscular es del 96 % con una concentración máxima de 3 horas después de la administración (4).

B. Distribución

Se alcanzan altas concentraciones de enrofloxacin en saliva y secreción nasal; en mucosa, epitelio y secreción bronquial, así como en el hígado y en el tracto urinario. Penetran en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares, resultando en concentraciones mayores a las séricas. La enrofloxacin llega con rapidez a la glándula mamaria. Las concentraciones en líquido peritoneal son significativamente menores que las concentraciones séricas, y las concentraciones en cerebro, cristalino, humor vítreo y humor acuoso son de 10 al 20 % de las concentraciones encontradas en el suero (5).

C. Metabolismo y excreción

La enrofloxacin es eliminada del organismo principalmente por metabolismo hepático, y excretada en bilis y orina a altas concentraciones de fármaco activo (fármaco inalterado o metabolito activo) (6). En animales la excreción renal es variable, aunque ocurre filtración glomerular para la fracción no ligada, y también secreción tubular activa. La filtración glomerular y la secreción tubular permiten alcanzar altas concentraciones urinarias. Posiblemente otros sitios de metabolismo son la ubre o los macrófagos. El efecto de primer paso hepático es bajo, aproximadamente del 7 % (7).

1.2 Mecanismo de acción de enrofloxacin

La enrofloxacin y las fluoroquinolonas son antibióticos cuyo blanco terapéutico primario son la ADN girasa en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos(8). Al inhibir la actividad de la ADN girasa, la enrofloxacin interfiere en el empaquetamiento, la replicación y la transcripción del ADN y al inhibir la topoisomerasa IV interfiere en la relajación y desvinculación del ADN después de la replicación(9). La ADN girasa es un heterotetrámero con dos subunidades (A y B). La subunidad A (Gyr A) es

responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y reunión de ADN; y la subunidad B (Gyr B) es la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción con Gyr A y ATP (10).

La ADN girasa introduce enrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción. La inhibición de la ADN girasa puede categorizarse dentro de los siguientes cinco tipos: Mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr A, mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr B, intercalación en el ADN, unión al hueco menor del ADN y quelación no específica. La enzima ADN girasa actúa a través del enrollamiento de la doble cadena del ADN alrededor de sí mismo, ruptura del ADN en las dos hebras con la formación de un segmento de apertura a través del cual se pasa el ADN sin cortar y finalmente reunión del ADN (11, 12).

Las moléculas de quinolona, unidas en complejos tetraméricos (Figura 2), se acoplan a las hebras de ADN y a determinados puntos de las subunidades (A y B) de la girasa y estabilizan el complejo ternario de girasa ADN-fluoroquinolona-ADN, impidiendo su reversión y poniendo en marcha una serie de procesos, incluso hoy todavía desconocidos, que desembocan en la lisis celular.(13)

Por otro lado, la topoisomerasa IV es una proteína tetramérica compuesta también por dos pares de subunidades (A y B), y presenta una potente actividad decatenante. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN y la inhibición de estas funciones conduce a la muerte celular (14).

Interacción enrofloxacin y blanco terapéutico

La interacción de la enrofloxacin y otras quinolonas con la topoisomerasa bacteriana, como se muestra en la figura 2, se da cuando el cetoácido en la posición C3 y C4 del fármaco, quela un ion de magnesio no catalítico (Mg^{+2}) que se coordina con cuatro moléculas de agua. Dos de estas moléculas de agua están situadas lo suficientemente cerca de serina y ácido glutámico (Ser84 y Glu88) de la enzima para formar enlaces de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina y dos moléculas de agua, así como el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico y una molécula de agua (15).

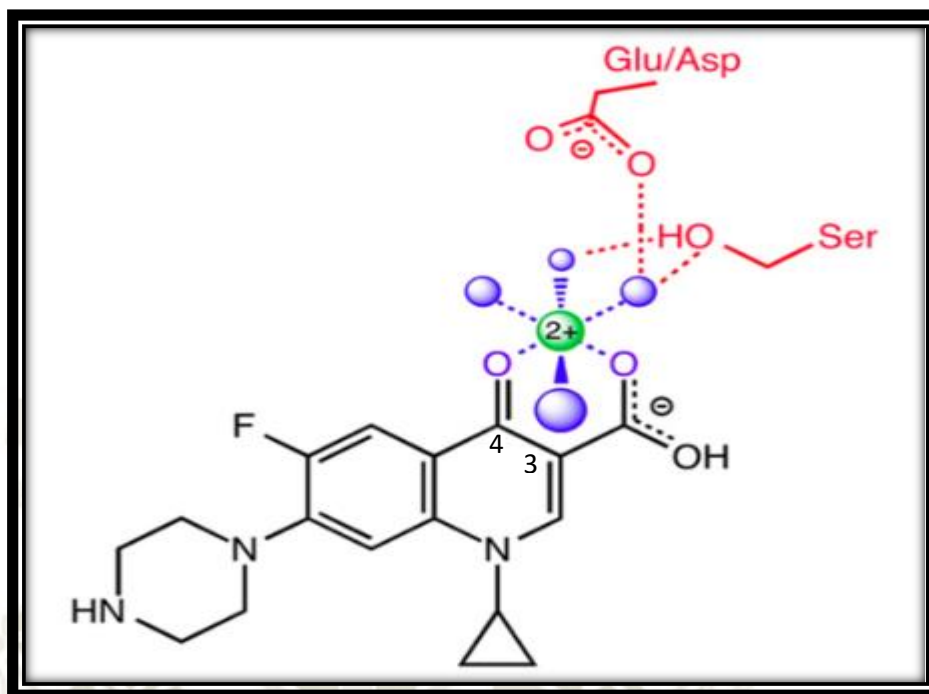


FIGURA 2: Interacciones críticas entre fluoroquinolonas y la topoisomerasa IV (16).

Estudios recientes han caracterizado el papel del puente iónico agua-metal, que media la interacción quinolona-enzima. Los hallazgos indican que la mutación de la serina o del residuo ácido restringe la variedad de iones metálicos que se pueden usar para apoyar la actividad del fármaco y disminuye la afinidad de la quinolona - complejo de enzimas para el ion Mg^{+2} no catalítico. Además, la mutación de cualquiera de los residuos disminuye significativamente la afinidad de la girasa o la topoisomerasa IV a las quinolonas, y la mutación de ambos residuos (Ser84 y Glu88) elimina la capacidad de las quinolonas para estabilizar los complejos de escisión (17).

Estos estudios confirman la existencia del puente entre agua e iones metálicos y proporciona evidencia de que la serina y los residuos ácidos actúan como puntos de anclaje que coordinan el puente hacia la enzima. Además, demuestran que el puente iónico agua-metal es la interacción primaria entre las quinolonas y las enzimas bacterianas de tipo II (18).

1.3 Mecanismos de resistencia a enrofloxacin

La enrofloxacin y las otras fluoroquinolonas de segunda generaci3n son fármacos de primera línea frente a numerosas infecciones. Sin embargo, su amplio espectro, gran actividad y buena tolerabilidad propiciaron una amplia difusi3n de su uso, originándose la aparici3n de resistencia tanto en microorganismos Gram negativos, especialmente en *P. aeruginosa* y *E. coli*, y en microorganismos Gram positivos como *S. aureus* (19, 20). La resistencia a la acci3n de las fluoroquinolonas est3 relacionada básicamente a tres mecanismos:

1.3.1. Resistencia mediada por el blanco terapéutico

Los aminoácidos comúnmente mutados son la serina y los residuos ácidos que anclan el puente i3nico del agua y el metal (Mg^{+2}). Así la interrupci3n del puente de iones agua-metal causa la resistencia a la quinolona. En general, la girasa mutante y la topoisomerasa IV mantienen la actividad de escisi3n del ADN en ausencia de fármacos (15, 17). Sin embargo, las quinolonas muestran poca capacidad para aumentar los niveles de escisi3n del ADN mediada por enzimas (15, 17). Además, la uni3n del fármaco y la enzima se reduce significativamente, y las quinolonas pierden gran parte de su capacidad para inhibir la ligadura del ADN o la forma estable ternaria enzima-ADN- fármaco (12).

1.3.2. Resistencia mediada por plásmidos

Tres familias de genes est3n asociadas con la resistencia mediada por plásmidos. Los primeros son los genes *Qnr*, que forman parte de la familia de proteínas de repetic3n de pentapéptidos. Éstas disminuyen la uni3n de la girasa y la topoisomerasa IV al ADN; por lo tanto, protegen las células de las quinolonas al reducir el número de dianas enzimáticas disponibles en el cromosoma (21). La segunda proteína codificada por el plásmido asociada con la resistencia a quinolonas es *aac (6)-Ib-cr*. Ésta proteína es una variante de un aminoglucósido acetiltransferasa que contiene dos mutaciones puntuales específicas, W102R y D179Y (22). La enzima acetila el nitr3geno no sustituido del anillo 4-

etilopiperazin-1-il C7 que se encuentra en las quinolonas como se definió en la figura 1 (Pág. 2), lo que disminuye la actividad del fármaco. El tercer grupo de proteínas de resistencia a quinolonas codificadas por plásmidos está compuesto por bombas de flujo de salida. Hasta ahora, se han identificado tres: OqxAB, QepA1 y QepA2 (23).

1.3.3. Resistencia mediada por cromosomas

Para alcanzar sus objetivos, las quinolonas deben cruzar la pared celular y la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas. En las bacterias Gram negativas, las quinolonas deben atravesar una barrera de membrana externa adicional (Figura 3). Por lo tanto, el influjo de fármacos en las especies Gram-negativas se facilita mediante los canales de proteínas llamados porinas. Entonces la mutación mediada por cromosomas resulta de la sobre-expresión de las porinas o la sobre-expresión de las bombas de eflujo celular, las cuales disminuyen las concentraciones celulares de quinolonas (24, 25).

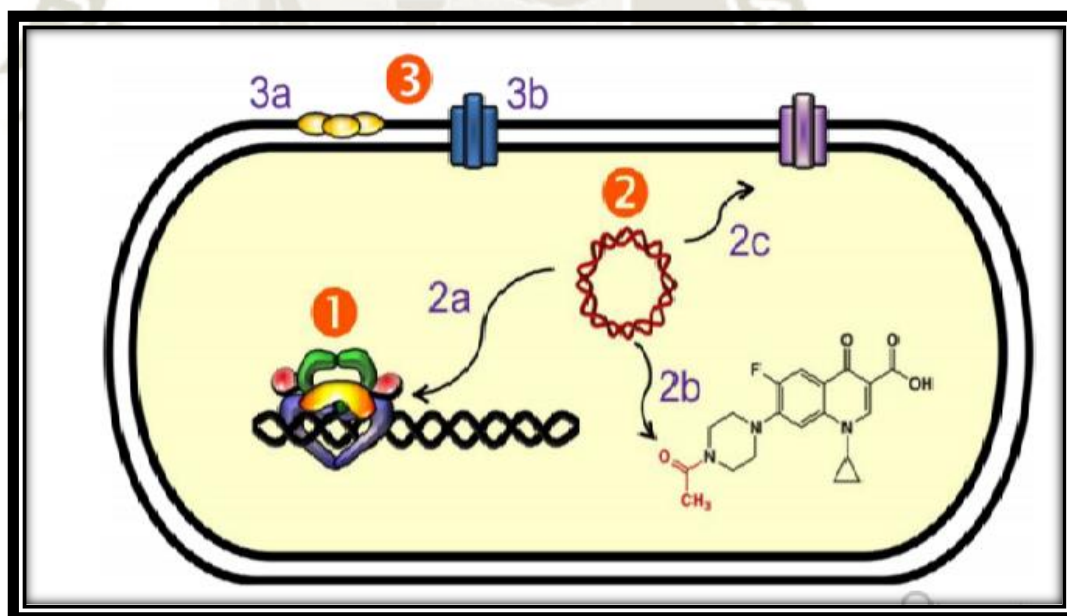


FIGURA 3: Mecanismos de resistencia a las quinolonas. (1) Resistencia mediada por el objetivo. Las mutaciones en la girasa y la topoisomerasa IV debilitan las interacciones quinolona-enzima. (2) Resistencia mediada por plásmidos (2a) Las proteínas Qnr (amarillas) disminuyen la unión de topoisomerasa-ADN y protegen los complejos de enzima-ADN de las quinolonas. (2b) aac (6')-Ib-cr es una aminoglucósido acetiltransferasa que acetila el nitrógeno libre en el anillo C7 de las quinolonas disminuyendo su efectividad. (2c) Las bombas de flujo de salida codificadas por plásmidos disminuyen la

concentración de quinolonas en la célula. (3) Resistencia mediada por cromosomas. (3a) La subexpresión de porinas en especies Gramnegativas disminuye la captación de fármacos. (3b) La sobreexpresión de las bombas de flujo de salida codificadas por cromosomas disminuye la retención de fármaco en la célula (24).

1.4 Formas farmacéuticas convencionales en base a Enrofloxacin

Entre las fluoroquinolonas ampliamente usadas en medicina veterinaria, una de las principales es la enrofloxacin cuya fórmula es contenida en presentaciones comerciales que se mencionan a continuación:

- **ENROFLOXACINA al 10 %:** Para bovinos. Este medicamento se debe aplicar por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea una dosis de 5 mg/kg de peso, cada 24 horas por 3 a 5 días consecutivos.
- **ENROFLOX[®] 20 L.A.:** Enrofloxacin 200 mg. Este medicamento se debe aplicar por vía subcutánea o intramuscular.
- **BAYTRIL INYECTABLE 5 %:** Enrofloxacin 50 mg. Se debe administrar en forma intramuscular, subcutánea o intravenosa, a una dosis de 2.5 mg/kg, lo que equivale a 1 mL por cada 20 kg de peso.

Cabe mencionar que estas alternativas terapéuticas presentan desventajas como se menciona enseguida.

- En la mayoría de las especies animales el volumen de distribución de las fluoroquinolonas es alto, siendo mucho mayor que el alcanzado por los betalactámicos y aminoglucósidos (5). Esto permitirá que la enrofloxacin penetre en los tejidos y alcance concentraciones intracelulares muy elevadas, causando una mayor incidencia de efectos adversos sobre el sistema nervioso, cardiovascular y gastrointestinal (26).

- En determinadas especies de mamíferos ocasionan lesiones renales y articulares. En caninos en crecimiento puede producir, problemas en el desarrollo de los huesos largos por inhibición del crecimiento del cartílago (27).
- La enrofloxacin es muy irritante cuando se administra por vía intramuscular, ocasionando un marcado aumento de la creatinquinasa en suero e inflamación y dolor en el sitio de inyección. Esto indica generalmente que el músculo está siendo destruido por algún proceso anormal, tal como una distrofia muscular o una inflamación (27, 28).

2. Nanomedicina

Con el objetivo de contrarrestar determinados problemas de las formas farmacéuticas convencionales (Tabla 1) surgió la nanomedicina lo que ha implicado la aplicación de la nanotecnología al mundo de la formulación de medicamentos. La nanomedicina propone nuevas formas farmacéuticas de administración de fármacos y propicia que estos sean capaces de actuar de un modo mucho más específico y selectivo.

Tabla 1. Soluciones aportadas por la nanomedicina a los problemas que surgen en el uso de formas farmacéuticas convencionales (29).

Problemas	Ventajas de Nanosistema
Baja solubilidad	Proporcionan al fármaco un ambiente hidrofóbico o hidrofílico, aumentando así su solubilidad en el vehículo de administración.
Daño del tejido al producirse la extravasación	La aplicación regulada de los sistemas de liberación de formulaciones de nanopartículas que evita el contacto directo del fármaco al tejido disminuye o elimina el daño a los tejidos producido por la extravasación accidental de formulaciones convencionales.
Baja biodisponibilidad	Protegen al fármaco frente a la degradación prematura o pérdida de actividad, posibilitando incluso el empleo de dosis menores.
Poca especificidad	Se funcionalizan de acuerdo al blanco terapéutico a tratar y así reducir los efectos

	secundarios que se puedan producir y el daño en órganos o tejidos sanos.
Falta de selectividad para tejidos	Los sistemas de liberación pueden aumentar la concentración del medicamento en el tejido blanco terapéutico.

De este modo, entre los avances de la nanomedicina, se encuentra el desarrollo de los nanosistemas de liberación de fármacos y direccionamiento de los mismos. Estos sistemas actúan transportando los fármacos a través del organismo, protegiéndolos de la degradación prematura no deseada, a la vez que se facilita su difusión a través de las barreras biológicas y, por lo tanto, favoreciendo el acceso a las células del blanco terapéutico (30).

Sin embargo, la aplicación de esta nueva tecnología también presenta desventajas, como es el alto coste que tiene el proceso de preparación, originado, fundamentalmente, por el bajo rendimiento en condiciones experimentales de laboratorio. Los procesos aún no son adecuados para todos los fármacos y los pasos post-preparativos, como la purificación, conservación, y el análisis del disolvente residual debe ser investigado exhaustivamente para cada proceso. Existe también la falta de estabilidad de algunos componentes activos y la liberación no reproducible de ciertos fármacos. En el ámbito biomédico se debe considerar la biocompatibilidad, la respuesta inmune o seguridad a largo plazo (31, 32).

A continuación, se hace mención sobre uno de los principales vehículos desarrollados para el transporte de fármacos para uso farmacéutico.

3. Nanopartículas

Las nanopartículas son estructuras cuyo tamaño varía entre 1 y 1000 nanómetros y pueden desempeñar múltiples funciones en el organismo. Pueden ser utilizados con fines diagnósticos o de tratamiento. En este último caso, las nanopartículas dirigen los fármacos selectivamente hacia el lugar de acción. Esto permite adaptar las propiedades farmacocinéticas de un medicamento a las necesidades terapéuticas de una situación fisiopatológica determinada (33). Las nanopartículas pueden utilizarse como forma de administración de una gran diversidad de fármacos, entre los que se incluyen fármacos hidrofílicos e

hidrofóbicos de pequeño tamaño, pero también vacunas y macromoléculas biológicas (33, 34). Otra ventaja del uso de nanopartículas actualmente es posibilitar una liberación controlada del fármaco (34).

De acuerdo a su composición, las nanopartículas se pueden dividir en dos grandes grupos: nanopartículas inorgánicas y nanopartículas orgánicas; los cuales a su vez engloban una gran variedad de tipos.

3.1 Nanopartículas inorgánicas

Dentro de este grupo podemos encontrar algunos de los sistemas de nanopartículas inorgánicas que están formados por metales y materiales inertes, como son las nanopartículas de sílice, oro, plata, óxido de hierro, quantum dots (QD), nanotubos de carbono, entre otros (35, 36).

3.2 Nanopartículas orgánicas

Son aquellas estructuras que están constituidas por compuestos de tipo orgánico y que representan algunos de los vehículos para fármacos más estudiados. En este grupo encontramos:

- **Liposomas:** Son pequeñas vesículas esféricas formados por una bicapa lipídica que permiten la encapsulación de fármacos hidrofílicos en el compartimento acuoso interno o fármacos hidrofóbicos en la membrana lipídica. A pesar de estar ampliamente estudiados, una de sus principales desventajas es la debilidad mecánica de su membrana, así como la oxidación que pueden sufrir los lípidos de la membrana liposomal (37).
- **Micelas:** Son agregados coloidales de moléculas ambifílicas. Las micelas están formadas por una parte interna hidrofóbica y una externa hidrofílica. Es la parte hidrofóbica que permite la internalización de fármacos de carácter apolar para su vehiculización (38). Una desventaja es que una vez producidas no se pueden agregar compuestos que optimicen su especificidad y selectividad.

- Nanopartículas poliméricas: Las nanopartículas poliméricas tienen una arquitectura conformada por polímeros de preferencia biocompatibles y no tóxicos. El desarrollo de nanopartículas se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de fármacos, ya que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por períodos de tiempo sostenido. Los polímeros naturales (proteínas o polisacáridos) no han sido ampliamente utilizados para este fin, ya que varían en pureza, y a menudo requieren entrecruzamientos para aumentar la estabilidad física del sistema, lo que podría desvirtuar la encapsulación de fármacos. En consecuencia, los polímeros sintéticos han recibido mayor atención en este ámbito. Los más utilizados son ácido poli láctico (PLA) donde en la figura 8 (Pág.17) se muestra su monómero, ácido poliglicólico (PGA) cuyo monómero se muestra en la figura 9 (Pág 18), y sus copolímeros, ácido poli (láctico co-glicólico) (PLGA) del cual su monómero se muestra en la figura 10 (Pág. 19) . Además, estos polímeros son conocidos por su biocompatibilidad y por la posibilidad de manipular la tasa de degradación y, en consecuencia, la velocidad de liberación de fármacos, por aumento de hidrofobicidad o un aumento de hidrofiliidad de las nanopartículas. Entre 1980 y 1990 varios nanosistemas de administración de fármacos fueron desarrollados para optimizar la eficacia de los fármacos y reducir al mínimo los efectos secundarios (39).

Las nanopartículas poliméricas han mostrado mayor estabilidad y capacidad de liberar el fármaco de forma controlada frente a otro tipo de nanopartículas (40).

Dentro de las nanopartículas poliméricas podemos distinguir dos grandes grupos como se puede apreciar en la Figura 4. Por un lado, están las nanoesferas, que están compuestas por una mezcla de polímero y fármaco. Por otro, las nanocápsulas, que están formadas por un núcleo (sólido o líquido) donde se encuentra el fármaco y una cubierta polimérica que lo recubre (41).

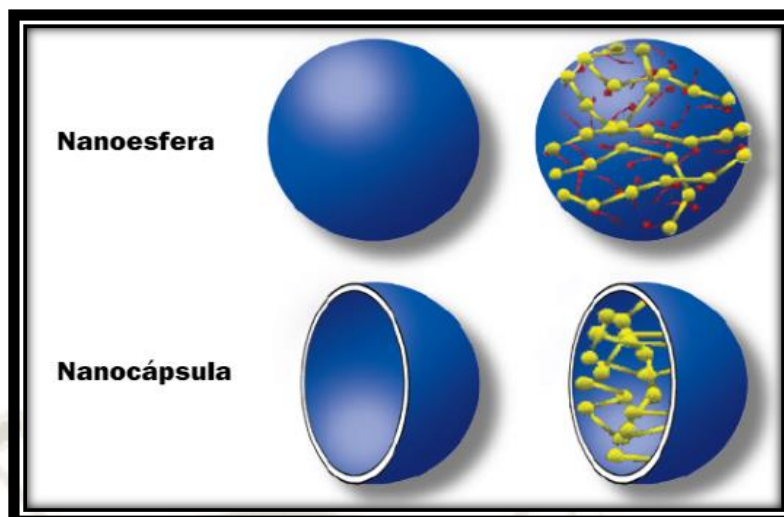


FIGURA 4: Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas (42).

Por lo tanto, los componentes más importantes en la formulación de las nanopartículas poliméricas son los polímeros. Un polímero puede definirse como una macromolécula que se forma por la unión de moléculas más pequeñas, llamadas monómeros, a través de enlaces covalentes (43). Debido a la gran diversidad de polímeros que existe, se pueden clasificar según su origen:

4. Polímeros de origen natural

El uso de polímeros de origen natural sigue siendo muy grande a pesar de los avances realizados en el desarrollo de polímeros biodegradables de origen sintético. La ventaja de los polímeros de origen natural es que tienden a ser más biocompatibles, se obtienen fácilmente y no son tan costosos. La mayor parte de éstos pueden ser utilizados en la formulación de partículas en forma de discos, esferas, películas y cápsulas. Adicionalmente se pueden unir covalentemente a medicamentos. Los polímeros de origen natural pueden variar en su pureza y características dependiendo de la fuente de procedencia (microbiana, vegetal o animal) (44). A continuación, se presenta una breve descripción de algunos de los diferentes polímeros naturales:

4.1 Quitosán

Es un polímero no tóxico, biodegradable y biocompatible que proviene de la hidrólisis de la quitina (Figura 5), la cual a su vez es un polisacárido natural presente en el exoesqueleto de algunos crustáceos, insectos y en la pared celular de algunos hongos. Debido a su solubilidad (soluciones acuosas a pH ácido), el quitosán adopta diferentes formas como fibras, películas, cápsulas, entre otros. Se utiliza en formulaciones para liberación de fármacos. Tiene la propiedad de adherirse a las superficies cargadas negativamente, tales como membranas o mucosas (44, 45).

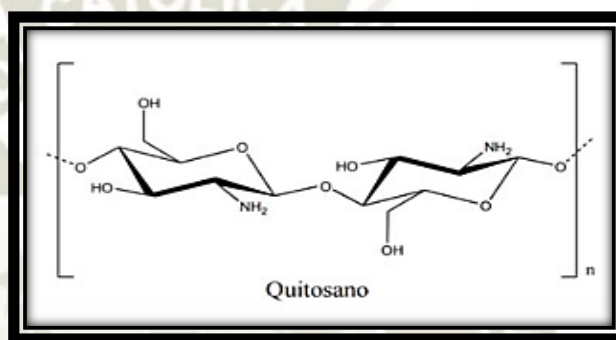


FIGURA 5: Estructura del Quitosán (46).

4.2 Alginato de sodio

Es un polisacárido obtenido principalmente a partir de algas y algunas bacterias. Tiene estructura lineal y está compuesto principalmente por ácido manurónico y ácido glucurónico unido por enlaces α y β (1-4) (Figura 6). Es un polímero de tipo aniónico e hidrofílico. Puede encapsular compuestos activos que sean inestables en solventes orgánicos (proteínas y péptidos) y forma geles reversibles que pueden ser inestables en la presencia de iones monovalentes presentes en el suero fisiológico (44).

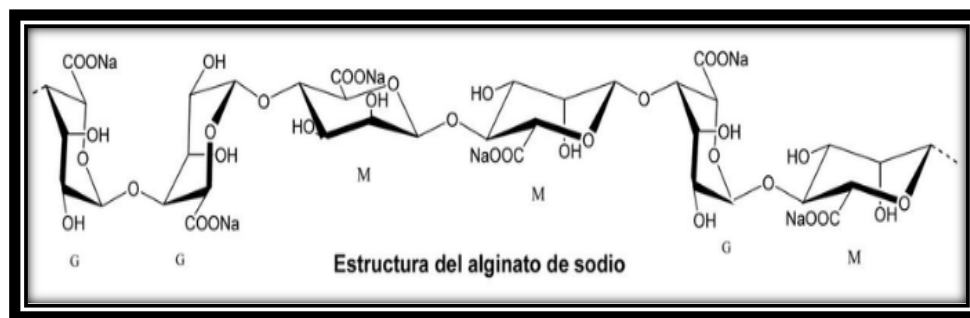


FIGURA 6: Estructura del Alginato de Sodio (47).

4.3 Gelatina

Se obtiene por hidrólisis ácida o básica del colágeno, proteína de triple hélice con un alto contenido de glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 7). Sus propiedades cambian de acuerdo con el método para extracción y purificación. Se puede entrecruzar con glutaraldehído para incrementar su estabilidad, pero se ha encontrado que disminuye la velocidad de liberación del fármaco y genera respuesta inmune (48, 49).

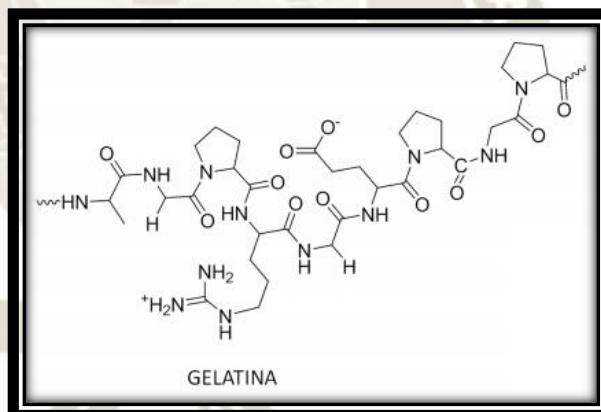


FIGURA 7: Estructura de la Gelatina (50).

5. Polímeros de origen sintético

La gran mayoría de los polímeros sintéticos de aplicación médica son fabricados a partir de monómeros de origen natural para facilitar su biodegradabilidad. Su ventaja, frente a los naturales radica en que se puede controlar su síntesis y, con ésta, sus propiedades y pesos moleculares, así son

empleados en nuevos desarrollos de tratamientos y sistemas de diagnóstico de enfermedades (48).

A continuación, se realiza una breve descripción de los polímeros sintéticos más empleados en la fabricación de nanopartículas:

5.1 Ácido poliláctico (PLA)

Es un polímero termoplástico, amorfo y semicristalino, ampliamente estudiado en sistemas de liberación de fármacos, para la fabricación de suturas biodegradables y en ingeniería de tejidos como soporte reabsorbible. Es un polímero aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para uso humano. Su biodegradación es ideal desde el punto de vista toxicológico, ya que se degrada por hidrólisis que puede ser acelerada *in vivo* por un grupo de enzimas (cutinasa), que lo transforman en ácido láctico el cual es incorporado en el metabolismo a través de procesos fisiológicos a nivel celular (48, 51).

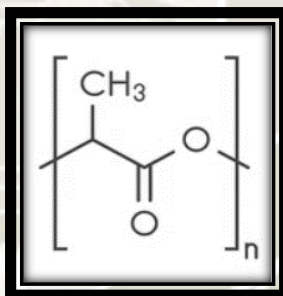


FIGURA 8: Estructura de Ácido Poliláctico (52).

5.2 Ácido poliglicólico (PGA)

Es un poliéster lineal y alifático, degradable por hidrólisis y empleado para suturas absorbibles y como material de fijación ósea (clavos óseos). Se degrada dentro del organismo en sustancias no tóxicas asimilables siguiendo la ruta de los ácidos tricarbónicos. Por acción de enzimas llamadas esterasas se degrada de manera más rápida *in vivo* que *in vitro* (48).

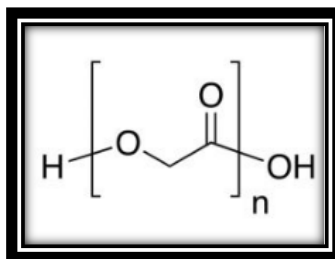


FIGURA 9: Estructura de Ácido Poliglicólico (53).

5.3 Copolímero del ácido láctico y glicólico (PLGA)

Típicamente, el PLGA se produce mediante una copolimerización catalizada de apertura de anillo de LA y GA (54). El PGA es un polímero hidrofílico cristalino con baja solubilidad en agua y alta velocidad de degradación en condiciones fisiológicas. Por el contrario, el PLA es un polímero rígido e hidrófobo con baja resistencia mecánica. Como copolímero de ambos, PLGA hereda las propiedades intrínsecas de sus monómeros constitucionales donde el contenido polimérico, basado en la relación LA/GA y peso molecular, afecta fuertemente su tasa de degradación. Así podemos encontrar en proporciones PLGA (LA/GA 50/50), PLGA (LA/GA 65/35), PLGA (LA/GA 75/25) y PLGA (LA/GA 85/15); en donde la proporción PLGA (LA/GA 50/50) tiene el tiempo más corto de descomposición (1 mes) y el PLGA (LA/GA 85/15) el más largo (6 meses) (55). Por ejemplo, con un aumento en la relación LA / GA, aumenta la hidrofobia global de PLGA, lo que conduce a una menor degradación y, por lo tanto, a una tasa de liberación de fármaco más lenta (56). A pesar del mayor potencial de carga de fármacos de las formulaciones de mayor tamaño, lograr un rango menor de tamaño nanométrico, es esencialmente importante para la capacidad de los nanopartículas de superar las barreras biológicas y llegar al blanco terapéutico. En este contexto, un estudio señaló el impacto del peso molecular de cuatro copolímeros de PLGA (LA/GA 50/50) con diferentes pesos moleculares de 14.5, 45.0, 85.0 y 213.0 kDa en la degradación polimérica y la velocidad de liberación (57). Con el aumento de peso molecular, la degradación de nanopartículas de PLGA, así como la liberación de fármaco disminuyeron con una liberación de carga útil en condiciones fisiológicas el día 18 de 95, 66, 50 y 23 %, respectivamente (57).

Así también la velocidad de degradación puede cambiar de acuerdo con el tipo y composición del polímero, si se le ha adicionado algún grupo, el peso molecular del polímero y la geometría del sistema de liberación. Adicionalmente la FDA aprobó su uso en humanos. Se ha empleado en la liberación de esteroides, anticancerígenos, proteínas, péptidos, antibióticos, anestésicos y vacunas (48, 58).

El PLGA es uno de los copolímeros biodegradables mejor caracterizados que se descompone en productos no tóxicos (H_2O y CO_2) que se eliminan del cuerpo. El PLGA se degrada *in vivo* a través de la hidrólisis de los enlaces éster a sus aniones monoméricos (lactato y glicolato). Mientras que el d- lactato no se metaboliza antes de la excreción, el l- lactato se convierte en CO_2 , que se excreta a través de los pulmones y se convierte en piruvato, que ingresa al ciclo de Krebs. El glicolato, por otro lado, se excreta directamente a través del sistema renal o se puede oxidar a glioxilato, que luego se convierte en glicina, serina y piruvato. Este último puede ingresar nuevamente al ciclo de Krebs y se metaboliza en CO_2 y H_2O (59).

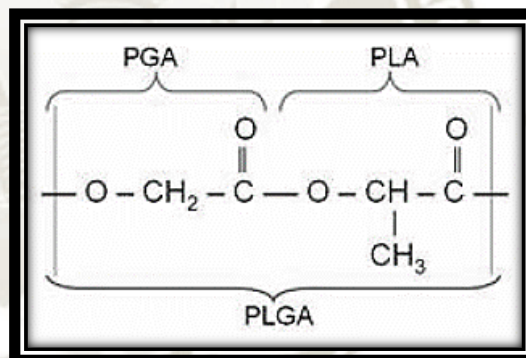


FIGURA 10: Estructura del Copolímero del ácido láctico y glicólico (60).

5.4 Policaprolactona (PCL)

Es un polímero semicristalino que se produce por polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona. Es un material biocompatible y se emplea como sutura biodegradable. Se degrada por hidrólisis a una velocidad que depende del tamaño, forma y aditivos empleados. La degradación se da por una ruptura de cadenas, de manera que se reduce el peso molecular y posteriormente las cadenas son transportadas fuera del sitio de implantación por parte de los fluidos fisiológicos o por fagocitosis. La presencia de enzimas como la lipasa pancreática, proteasas y amilasas acelera el proceso de degradación (48, 61).

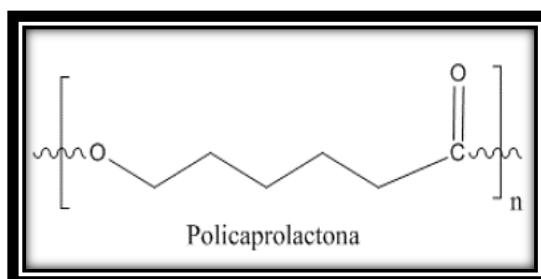


FIGURA 11: Estructura de la Policaprolactona (62).

5.5 Polietilenglicol (PEG)

El PEG es soluble en agua, es biodegradable, biocompatible y no tóxico. Estas propiedades le confieren un uso en la Industria Farmacéutica, es así que sirven para funcionalizar matrices poliméricas particularmente los polímeros de PLA y PLGA que, al unirse de manera covalente a estos, no permite que se adsorban proteínas plasmáticas, evitando así la respuesta inmune en el organismo. Adicionalmente aumenta el carácter hidrofílico del material. Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia al peso molecular del polímero (63).

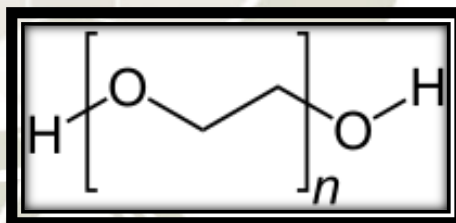


FIGURA 12: Estructura del Polietilenglicol (64).

6. Métodos de elaboración de nanopartículas poliméricas

Existen numerosos métodos para la síntesis de nanopartículas que permiten la encapsulación de moléculas hidrófobas e hidrófilas. Los métodos de síntesis más utilizados para la elaboración de nanopartículas poliméricas se detallan a continuación.

6.1. Método de emulsión y evaporación de solventes

Empleado principalmente para capturar compuestos activos hidrofóbicos. El polímero y el compuesto activo se disuelven en un solvente orgánico volátil inmiscible en agua, como el diclorometano o el etil acetato. La fase orgánica es emulsificada en agua, mediante una agitación intensa, utilizando un homogenizador, por microfluidización o por ultrasonido. En algunas ocasiones se emplea la presencia de un agente surfactante, alcohol polivinílico (PVA), para estabilizar la emulsión. El solvente orgánico se evapora (algunas veces a presiones reducidas, dependiendo de la labilidad del fármaco) causando que el polímero insoluble en agua forme nanopartículas con el fármaco incluido y éstas se recuperan posteriormente por centrifugación o se resuspenden en agua y finalmente se liofilizan para su almacenamiento. La principal desventaja de los métodos por emulsión radica en que algunos de los solventes empleados son relativamente tóxicos y que los altos esfuerzos cortantes a los que se ven sometidas las nanopartículas, por los efectos de la agitación, pueden llegar a degradar el compuesto activo, particularmente si se trata de una proteína (65, 66).

6.2. Método de precipitación

En este método el polímero y el fármaco son disueltos en un solvente que sea miscible en agua (acetona o tetrahidrofurano). Posteriormente se forma una emulsión agregando un gel acuoso que contenga un agente que provoque la precipitación del polímero y un estabilizante de coloides (PVA, polivinilpirrolidona (PVP) o hidroxietilcelulosa). Esta mezcla se agita mecánicamente y la emulsión agua en aceite se diluye en suficiente agua para permitir la migración de la acetona a la fase acuosa, induciéndose la formación de nanopartículas del polímero. Estas se purifican posteriormente por filtración. Este proceso es empleado solamente para fármacos hidrofóbicos (65).

6.3. Método por aspersión

Es una técnica sencilla, en la que las partículas son formadas por atomización de una emulsión y puestas en contacto con una corriente de aire

caliente. Esta técnica no emplea condiciones extremas, y es fácilmente escalable. Empleado con mayor frecuencia para la fabricación de micropartículas, ya que se requiere una aspersion muy fina para lograr nanopartículas (67).

6.4. Método de electrospray

El principio de funcionamiento de esta técnica es el paso de corriente a una solución polimérica, forzándola a salir en forma de nanopartículas. El equipo está compuesto por una bomba conectada a una fuente de alto voltaje. Un colector de metal colocado en el extremo opuesto que hace las funciones de polo a tierra. El flujo y el voltaje aplicado se optimizan de acuerdo a la solución que se vaya a trabajar. Las principales ventajas de este método es que las condiciones de operación son fácilmente controlables con alta capacidad de captura siendo esta técnica reproducible (68). Como desventaja el proceso emplea una fuente eléctrica con alto voltaje, se opera con flujos bajos, lo que genera rendimientos bajos y en algunos casos cuando los fármacos son muy lábiles, pueden ser desnaturalizados (69).

6.5. Método de desplazamiento de solventes o nanoprecipitación

El polímero y el compuesto activo se disuelven en un solvente orgánico miscible en agua (acetona). La fase orgánica se transfiere de manera lenta a la fase acuosa que contiene un surfactante (PVA o poloxamer 188 por ejemplo), allí se forma una emulsión aceite en agua por agitación suave, de manera que la acetona migra hacia la fase acuosa y las nanopartículas se forman por precipitación del polímero y el compuesto activo. El solvente orgánico se retira por evaporación y la fase acuosa se concentra a presión reducida, las nanopartículas son centrifugadas o dializadas para remover el exceso de surfactante y compuesto activo que no haya sido encapsulado (70).

Este método es un proceso sencillo de un solo paso con alta reproducibilidad y se aplicó inicialmente para fármacos hidrófobos. Sus ventajas son la escalabilidad y el bajo requerimiento de energía donde las propiedades de nanopartículas poliméricas dependen del contenido de polímero y peso molecular, la naturaleza de los solventes y las proporciones acompañadas de la velocidad de mezcla (71).

7. Caracterización de las nanopartículas

Dentro de las pruebas para la caracterización de nanopartículas, las más comunes son las siguientes:

7.1 Tamaño de partícula

La propiedad física más importante de una formulación de nanopartículas, es el tamaño de partícula porque evidencia si efectivamente el tamaño de esta se encuentra en escala nanométrica. Los instrumentos de la gama Zetasizer son utilizados para medir el tamaño de partículas desde menos de un nanómetro hasta varios micrones mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS).

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic Light Scattering") (Figura 5), espectroscopía de correlación de fotones PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi Elastic Light scattering) es una técnica físico-química empleada para la determinación de tamaños de partículas en suspensión, o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros (72). La luz láser al alcanzar las numerosas partículas en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa en una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, por lo que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (partículas grandes) llevan a variaciones más lentas. Por norma general, en la dispersión dinámica de luz la suspensión de la muestra permanece en reposo (73).

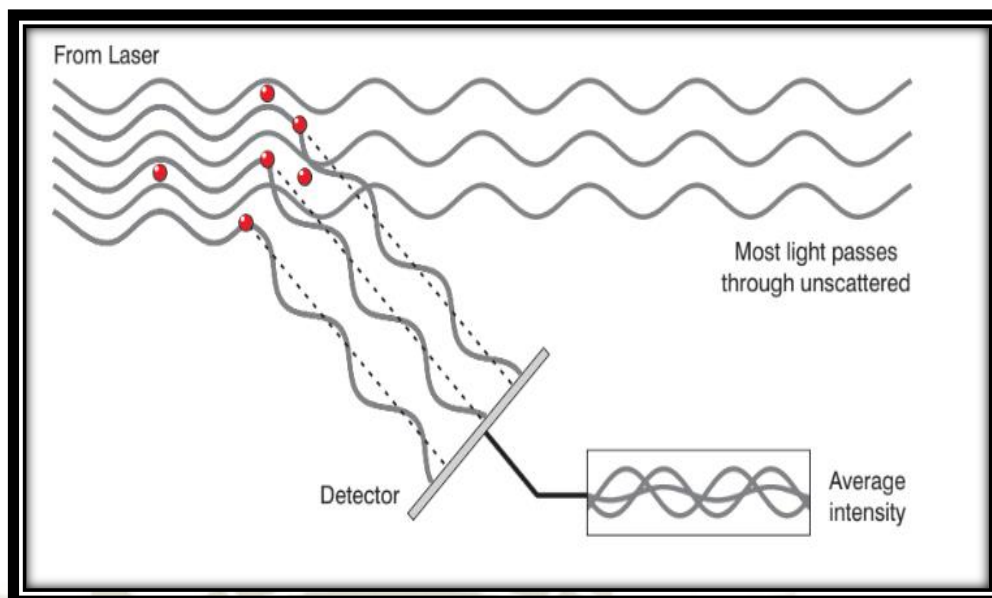


FIGURA 13: Representación esquemática de la técnica DLS (73).

7.2 Índice de polidispersidad (PDI)

El índice de polidispersión es un parámetro que mide el grado de dispersión de sistemas polidispersos, es decir que tan amplio es el rango de tamaños. Este es calculado a partir de DLS utilizando un método llamado “cumulantes” con el que se obtiene la distribución de ancho de curva. Matemáticamente, el PDI podría ser cualquier número positivo, pero generalmente solo se reporta hasta un valor de 1. Los valores alrededor de 0.1 pueden considerarse buenos para una dispersión monomodal. Los valores más altos significan que la distribución es amplia, o que la distribución del tamaño de partícula es multimodal (74).

7.3 Potencial zeta

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las nanopartículas. Los datos de potencial zeta se recopilan determinando la movilidad electroforética y luego aplicando la ecuación de Henry. La movilidad electroforética se obtiene realizando un experimento de electroforesis en la muestra y midiendo la velocidad de las partículas utilizando la velocimetría láser Doppler (LDV), en donde la luz dispersada en un ángulo de 17° se combina con el haz de referencia. Esto produce una señal de intensidad fluctuante donde la tasa de fluctuación es proporcional a la velocidad de las

partículas. Se utiliza un procesador de señales digitales para extraer las frecuencias características en la luz dispersada. El cambio de fase puede utilizarse para determinar la movilidad electroforética. Su medición aporta información detallada de la dispersión, agregación o floculación esta información se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones (74). Adicionalmente, es importante conocer esta medida ya que se relaciona con la estabilidad del sistema. En la literatura se menciona que valores mayores a ± 30 mV se relacionan con una mayor estabilidad. En la Figura 6 se esquematiza el modelo de la doble capa eléctrica, la cual sirve para entender la medida del potencial zeta. Cuando una partícula está cargada, alrededor de esta se forma una capa de contra iones la cual es compacta, denominada como capa de Stern. Luego, los iones del medio se acomodan en torno a la capa de Stern por medio de interacciones de largo alcance, la cual se denomina como capa de deslizamiento (75).

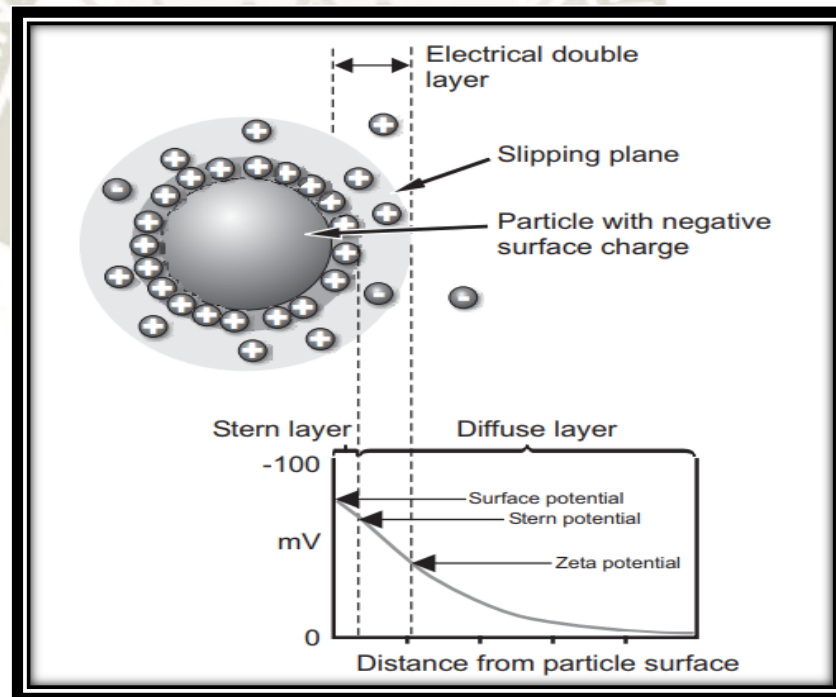


Figura 14: Modelo de la doble capa eléctrica (75).

7.4 Porcentaje de encapsulación de fármaco

La encapsulación ha sido definida como la confinación de fármacos en una matriz polimérica que crea un sistema capaz de controlar las interacciones entre

el interior y el exterior (76). La técnica ampliamente utilizada para la determinación del porcentaje de encapsulación en nanopartículas poliméricas es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) que permite conocer la cantidad de fármaco encapsulado efectivamente en la formulación. HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre los compuestos analizados y la columna cromatográfica (fase estacionaria). Dependiendo de la naturaleza, estructura química y peso molecular de los analitos, el equipo permitirá información cualitativa y cuantitativa con respecto a los componentes individuales de la muestra en estudio. Los sistemas de HPLC se pueden dividir en dos partes diferentes: Una parte es para la separación y la otra parte para la detección, que incluye uno o más detectores y un dispositivo de salida de señal. La parte de la HPLC responsable de la separación consiste en un dispositivo de inyección, una columna y el sistema de administración de fase móvil (77).

El proceso de preparación de la muestra requiere de extracción de un analito de una matriz compleja, concentración de analitos muy diluidos, eliminación de posibles interferentes o transformación del analito en una forma que pueda ser fácilmente detectable dependiendo del tipo de muestra (78). Dentro de los métodos de preparación de la muestra están: extracción sólido - sólido que consiste en una operación básica o unitaria mediante la cual se separan uno o varios constituyentes solubles contenidos en un sólido inerte mediante la utilización de un disolvente adecuado; la extracción líquido - líquido que es la partición de los componentes de una mezcla entre dos líquidos inmiscibles de diferente densidad; la filtración esta técnica consiste en verter la mezcla sólido - líquido que se quiere tratar sobre un filtro que permita el paso del líquido pero que retenga las partículas sólidas; la extracción acelerada con disolventes donde muestra sólida se coloca en un recipiente que se sella. Se llena con disolvente y se calienta a temperatura mayor que el punto de ebullición del disolvente provocando un gran aumento de la presión en la celda y la extracción en fase sólida es una técnica de extracción que se basa en la retención sobre un adsorbente sólido de los compuestos deseados disueltos en una muestra líquida. La adición de un eluyente permite eliminar los componentes de la matriz que interfieren, para después eluir y concentrar los analitos de interés. La extracción en fase sólida sustituye a la extracción líquido-líquido clásica (79).

7.5 Cinética de liberación del fármaco

La liberación se define como el paso del fármaco desde la forma farmacéutica que lo contiene hasta el lugar donde se va a absorber. Es decir, el objetivo de los sistemas de liberación es suministrar una cantidad terapéutica del fármaco al sitio apropiado del organismo con la que alcance rápidamente la concentración de fármaco y luego sea mantenida. Existen sistemas de liberación controlada (sostenida, retardada, en el receptor blanco terapéutico o sitio específico) y sistemas de liberación modificada (diferida, acelerada o prolongada) (80). Se han desarrollado nuevos sistemas de administración de fármacos, como los liposomas nanopartículas, micropartículas, que se usan como sistemas de liberación de drogas a los que se realizan estudios de cinética de liberación (81). Los estudios cinéticos son llevados a cabo con el objetivo de conocer el perfil de liberación del fármaco en un entorno controlado frente a un medio receptor. El estudio puede durar desde días a semanas o meses dependiendo de la formulación desarrollada. Es deseable que la liberación sea constante en el tiempo para entregar una dosis uniforme y controlada. En la realidad, gran parte de los sistemas de nanopartículas poseen cinéticas de doble comportamiento (bifásicas) que en un principio se acompañan de un efecto “burst” o liberación rápida del fármaco que se encuentra en la parte más externa de la partícula, para luego dar paso a una cinética más lenta y controlada que puede mantenerse días, semanas o meses, y que es gobernada principalmente por mecanismos de difusión y erosión. Se debe considerar parámetros como el pH fisiológico, temperatura corporal y condiciones sink (el volumen final debe ser por lo menos 5-10 veces la solubilidad máxima del fármaco en el volumen total) (82).

Una ventaja de utilizar nanopartículas poliméricas como vehículo del fármaco, es que puede presentar una liberación controlada del fármaco en el organismo, extendiendo su permanencia y efecto farmacológico por más tiempo. Este concepto recibe el nombre de sistemas de liberación controlada de fármacos. Por lo tanto, a continuación, se definen los diferentes tipos de sistemas de liberación controlada:

Estas formas de liberación modificada atendiendo a su objetivo, es decir, si pretenden controlar la velocidad de liberación se pueden clasificar en formas farmacéuticas de liberación retardada, prolongada, sostenida y pulsátil (83).

- Formas de liberación retardada: Son aquellas en las que la liberación del principio activo se retrasa, ya que se libera en un momento distinto al de la administración, pero sin prolongar el efecto terapéutico (84).
- Formas de liberación prolongada: Son aquellas en las que el principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir efecto terapéutico y posteriormente lo hace de forma más lenta, manteniendo la concentración eficaz, con lo que se consigue alargar el efecto terapéutico (84).
- Formas de liberación sostenida en las que el principio activo se libera a una velocidad constante, para evitar las fluctuaciones de los niveles plasmáticos de principio activo (84).
- Formas de liberación pulsátil en las que la liberación se produce en distintas fases. De este modo, se puede hacer coincidir la liberación de algunos principios activos con momentos del día donde interese tener una concentración plasmática eficaz del fármaco (85).

7.6 Potencial de hidrógeno (pH)

Es la medida del coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de la formulación de nanopartículas poliméricas. Para medir el potencial de hidrógeno (pH) es necesario contar con un transductor adecuado que pueda ser capaz de ofrecer una señal eléctrica como un nivel de voltaje a partir de la señal física que se desea medir, como lo es el pH, y uno de estos transductores es el electrodo de vidrio. Los electrodos de vidrio (Figura 15) son “instrumentos de lectura directa”, que brindan el valor de pH de la disolución donde se introduce el electrodo de vidrio en una escala con unidades de pH, la cual se gradúa con valores de pH de referencia, suministrados por disoluciones tampón estándar (86, 87).

Es preciso mencionar que Wu y colaboradores (88) reportaron que la velocidad de degradación del PLGA incrementa en medios ácidos (pH=5) utilizando al PLGA (LA/GA 50/50) y se vuelve más lenta a pH alcalinos

(pH=9.24) o neutros (88). Por otro lado, Makino reportó que para el Poli (L-láctido) presenta una mayor degradación a pH con tendencias alcalinas (89).

Así podemos concluir que ambos medios (alcalino y ácido) aceleran la degradación del polímero. Destacando que para el caso del PLA se acelera en medios básicos mientras que para el PLGA en medios ácidos.

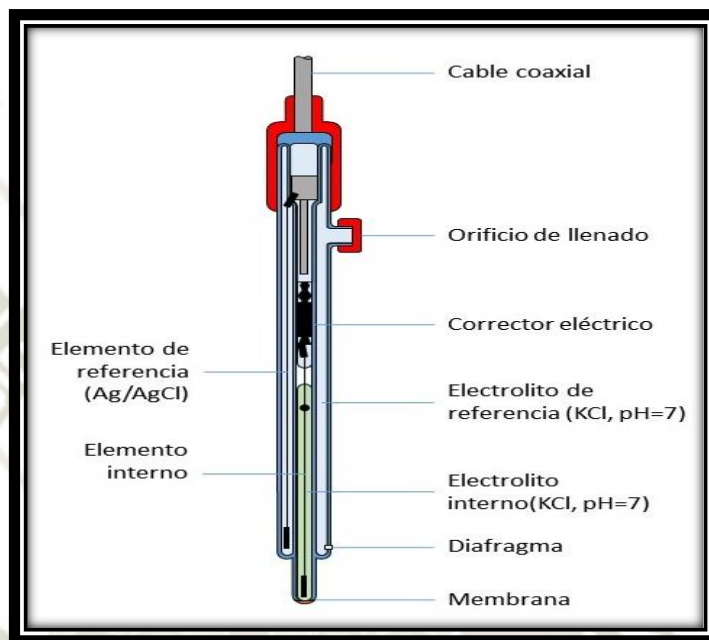


FIGURA 15: Electrodo de membrana de vidrio (86).

Desde el punto de vista de la nanomedicina la tendencia es obtener sistemas inteligentes, cargados con el fármaco, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar el fármaco en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada. La formulación de nanopartículas se presenta en consistencia líquida lo que limita su administración en tratamientos de patologías. Motivo por el cual en los últimos años los hidrogeles son ampliamente estudiados para solucionar estas deficiencias y brindar a las nanopartículas una forma farmacéutica eficiente. Los hidrogeles presentan buena interacción con los tejidos vivos, ya que por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua (90). Por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a pegarse a su superficie (91). Y, además, su característica de hinchamiento en medio líquido les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas.

8. Hidrogeles Poliméricos

Un hidrogel es una red tridimensional conformada por cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua. Estos polímeros se caracterizan por ser hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua y además se hinchan en presencia de ella, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio físico químico (92). Adicionalmente, pueden tener gran resistencia mecánica según el método con el que se obtengan. Su conformación tridimensional ocurre en soluciones acuosas concentradas cuando el polímero inicial es capaz de gelificar con la consecuente formación de redes espaciales no covalentes. El carácter hidrófilo se debe a la presencia de grupos funcionales hidrófilos como son: hidroxilo (OH), carboxilo (COOH) y amida (CONH) (93).

Los hidrogeles presentan largas cadenas lineales de polímeros que se entrecruzan química o físicamente para formar una red tridimensional. En el caso de los geles químicos, empleando monómeros bifuncionales en pequeña cantidad, se consigue el entrecruzamiento de las cadenas (Figura 8), mientras que en los geles físicos este entrecruzamiento es debido a interacciones secundarias no covalentes (94).

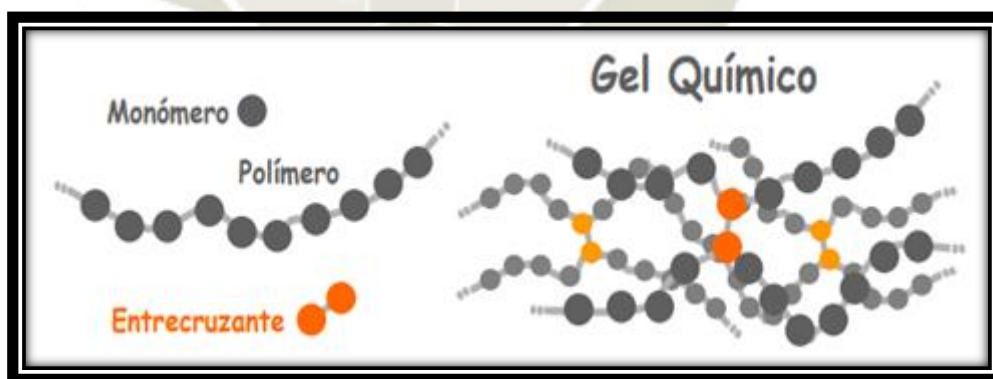


FIGURA 16 : Estructura de un gel polimérico (94).

Por su capacidad de hincharse y su habilidad para atrapar y ceder fármacos desde la red que forman, los hidrogeles han sido ampliamente utilizados en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. En este sentido presentan tres ventajas fundamentales: biocompatibilidad, permeabilidad y posibilidad de controlar la cinética de hinchamiento (95). Su elevado contenido en agua da lugar

a una buena compatibilidad, su naturaleza suave y gomosa reduce la irritación mecánica y su elevada hidrofilia minimiza la tensión interfacial. Su permeabilidad a fármacos o a otros solutos puede ser ajustada fácilmente modificando el monómero, el grado de entrecruzamiento o las condiciones de síntesis (96). En conclusión, el conocimiento de su cinética de hinchamiento nos permite entender la liberación de las sustancias terapéuticas de una manera controlada.

En la formulación de geles se reconocen polímeros como el quitosán que se revisó anteriormente en este estudio, y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) un éter de la celulosa que posee grupos metilo e hidroxipropilo en su estructura, así mismo la Real Farmacopea Española define a la hidroxipropilmetilcelulosa, como una celulosa parcialmente *O*-metilada y *O*-(2-hidroxipropilada), con carácter higroscópico. Las soluciones de estos polímeros de carbohidratos han revelado la reversibilidad del gel con la temperatura además de sus propiedades de hinchabilidad y gelificación térmica, HPMC son ampliamente usados en la formulación de geles. La HPMC se emplea como aglutinante de granulados (granulación húmeda y seca (2 -5 % m/m) y como agente de recubrimiento (2-20 % m/m). Asimismo, se usa como agente estabilizador (viscosante) de suspensiones y emulsiones. También se utiliza para evitar la coalescencia y la formación de sedimentos, ya que actúa como protector de coloides. Otras aplicaciones incluyen su empleo en la fabricación de la cubierta de la cápsula (97).

9. Caracterización de geles

9.1. Medición de la viscosidad de geles

Viscosidad es la propiedad que tienen los fluidos de ofrecer resistencia al movimiento relativo de sus moléculas y es un parámetro de los fluidos que tiene importancia en sus diversas aplicaciones industriales. La viscosidad de las sustancias puras varía de forma importante con la temperatura y en menor grado con la presión. La facilidad con que un líquido se escurre es una pauta de su viscosidad. La viscosidad es constante y depende de la temperatura y presión. Los líquidos que cumplen con esta relación proporcional se denominan líquidos

Newtonianos mientras que los líquidos que no son fluidos se denominan no-Newtonianos (98).

En el Sistema Internacional se mide en Pascales segundo, pero la unidad más utilizada es el centipoise (cP), equivalente a 1 mPa s. El viscosímetro de Ostwald que se observa en la Figura 17 es un aparato relativamente simple para medir viscosidad, “h”, de fluidos Newtonianos. En un experimento típico se registra el tiempo de flujo “t”, de un volumen dado V (entre las marcas a y b) a través de un tubo capilar de longitud L bajo la influencia de la gravedad (98).

$$Ft = \mu \cdot \frac{s \cdot v}{y}$$

Ft: fuerza tangencial

μ: viscosidad dinámica

s: superficie

v: velocidad de una placa respecto a otra

y: espesor de la lámina líquida

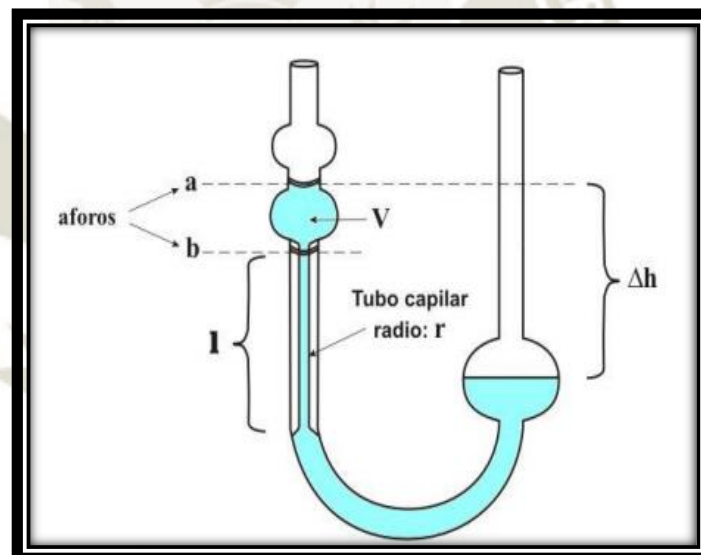


FIGURA 17: Viscosímetro de Ostwald (98).

Para esclarecer cómo está clasificado un gel polimérico de quitosán y HPMC podemos comparar sus valores de viscosidad con los obtenidos de un Polímero similar como lo es la Carboximetilcelulosa al 2 %.

Tabla 2. Rangos de viscosidad para una solución acuosa de Carboximetilcelulosa al 2 % a temperatura ambiente.

CARBOXIMETILCELULOSA Sal Sódica	VISCOSIDAD (sol. 2 % a 20 °C)(cP)
BAJA	25-50
MEDIA	400-800
ALTA	1500-3500

9.2. Potencial de hidrogeno (pH)

Es la medida del coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de la formulación del gel. Se obtienen lecturas de pH utilizando como instrumento de lectura el electro combinado de vidrio (Figura 15).

Los diferentes rangos de pH del medio pueden afectar a la capacidad adhesiva del polímero (desplazando su equilibrio iónico), su grado de hidratación y la densidad de carga electrostática de la superficie de la mucosa. La presencia de medios ácidos o alcalinos fuertes supondrá un desafío a la hora de diseñar la formulación (99).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Frascos de laboratorio Boeco Germany (1000 mL, 500 mL y 250 mL)
- Balón de concentración, para equipo rotavapor, Pyrex (250 mL)
- Tubos de ensayo
- Probetas (250 mL y 25 mL)
- Vasos de precipitados (500 mL, 400 mL, 250 mL, 50 mL)
- Viales de vidrio
- Bagueta

1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Columna para HPLC (LiChrospher® 100 RP-18)
- Micropipetas (100 μ L y 1000 μ L)
- Parafilm M 4 pulgadas
- Barra magnética
- Cassettes para diálisis, Slide-A-Lyzer® G2, 10K MWCO. Volumen 3 mL (Orange).
- Tips
- Tubos de microcentrífuga.
- Jeringas de 20 mL, 10 mL, 5 mL y 1 mL
- Membranas de Nylon 0.22 μ m
- Filtro de jeringa Nylon 13 mm 0.45 μ m
- Guantes de nitrilo
- Celda desechable de poliestireno
- Celda capilar plegada desechable de poliestireno

1.3. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Rotavapor, marca Buchi Rotavapor R-114.
- Analizador de Partículas, marca Zetasizer Nano S90 by Malvern
- Cromatografo Liquido de Alta Resolución, marca Hitachi Lachrom Elite®
HPLC

- Potenciómetro, marca inoLab® pH/ION 7320
- Balanza analítica, marca Sartorius Entris 224I 1S
- Agitador magnético, marca Nanbie MYP11-2
- Baño María con ultrasonido, marca Branson; modelo CPX952318R
- Sistemas de agua ultra pura, marca Simplicity® System, modelo Simplicity UV.
- Vortex West Tune XH-D
- Baño Seco MK 200-1 J&G SC
- Incubadora Equipo Novatech E160
- Refrigeradora Samsung RT35K5730SL/ZS
- Hornilla eléctrica KRHÜNER MGI 220-240 V 50 Hz 1500 W
- Microcentrífuga de alta velocidad refrigerada SCIENCE MED

1.4. REACTIVOS

- Enrofloxacin HPLC (Sigma Aldrich, Lote 117M4856V).
- Ciprofloxacino HPLC (Sigma Aldrich, Lote 127M4065V).
- PLGA RG 502H (Sigma Aldrich, Lote BCBV7981).
- Poli vinil alcohol (Sigma Aldrich, Lote SLBT7470).
- Hidroxipropilmetilcelulosa (Sigma Aldrich, Lote MKCB1715V)
- Ácido Láctico (Sigma Aldrich, Lote MKCD2387).
- Quitosán (Sigma Aldrich, Lote STBH2613).
- Ácido orto-fosfórico 85 % Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur
- Trietilamina Sigma Aldrich
- Metanol grado HPLC LiChrosolv® Reag. Ph Eur.
- Fosfato di básico de sodio J.T. Baker
- Cloruro de potasio Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur
- Fosfato monobásico de potasio Emsure® ACS, ISO, Reag.
- Cloruro de sodio Emsure® ACS, ISO, Reag.
- Etanol 96 %.
- Agua ultra pura

2. MÉTODOS

2.1. Formulación de nanopartículas cargadas con enrofloxacin

La composición de una formulación de nanopartículas poliméricas influye significativamente en sus propiedades físico-químicas y aunque ésta puede ser muy variada, estudios recientes sugieren el uso del PLGA como base de dichas nanopartículas. Esto debido a que el PLGA es biodegradable, biocompatible y no tóxico. Así, por ejemplo, se ha propuesto nanopartículas a base de PLGA como sistema de entrega de doxorubicina y dexametasona (100), o asociado a un estabilizador de superficie como el PVA, puede constituir un sistema de entrega de gentamicina de aplicación local (101).

Considerando los estudios previos, la presente investigación estudió el PLGA como base de las nanopartículas, a diferentes ratios polímero-fármaco, 3:1, 5:1 y 8:1. Asimismo, para determinar la concentración a la cual el enrofloxacin sea efectivo a partir de una forma de liberación prolongada que cumpla con la terapia antibiótica de 5 a 7 días se propuso concentraciones calculadas en base a dosis terapéuticas del enrofloxacin en animales (5 mg/kg cada 24 horas) (102). Así, las distintas formulaciones de nanopartículas con distintas concentraciones de un mismo componente, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Formulaciones de nanopartículas poliméricas cargadas de Enrofloxacin (n = 3)

NPs	Enrofloxacin	PLGA	PVA	RATIO (PLGA:ENR)
Formulación 1	25.0 mg	210.0 mg	110.0 mg	8:1
Formulación 2	25.0 mg	210.0 mg	300.0 mg	8:1
Formulación 3	25.0 mg	210.0 mg	600.0 mg	8:1
Formulación 4	40.0 mg	210.0 mg	100.0 mg	5:1
Formulación 5	40.0 mg	210.0 mg	300.0 mg	5:1
Formulación 6	40.0 mg	210.0 mg	600.0 mg	5:1
Formulación 7	70.0 mg	210.0 mg	110.0 mg	3:1
Formulación 8	70.0 mg	210.0 mg	300.0 mg	3:1
Formulación 9	70.0 mg	210.0 mg	600.0 mg	3:1

Para todas las formulaciones que se muestran en la tabla 3 las nanopartículas fueron obtenidas siguiendo el método de nanoprecipitación (103) como a continuación se detalla. Se pesó las cantidades de enrofloxacin y PLGA para ser disueltas en 8 mL de acetona, se homogenizó por agitación magnética a 500 rpm durante 10 minutos a 25 °C; se cubrió el beaker con parafilm para evitar la pérdida del solvente. A esta fase se agregó una solución acuosa formada por un agente estabilizante, alcohol polivinilo (PVA) que inicialmente se disolvió en 24 mL de agua ultrapura para obtener la concentración de PVA. Posteriormente, la mezcla se homogenizó durante 5 minutos utilizando un agitador magnético a 700 rpm. Se vertió la mezcla final en un balón de 200 mL, a partir del cual se evaporó el solvente orgánico utilizando un equipo rotaevaporador a una temperatura de 40 °C, una presión de 120 mbar y a una velocidad de agitación 50 rpm/minuto, durante 12 minutos. Se dividió el volumen en tubos Eppendorf; y se centrifugó a 15.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, y este volumen de nanopartículas se lavó con agua ultra pura dos veces. El volumen blanquecino obtenido se almacenó en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

2.2. Formulación del gel mucoadhesivo

En el presente trabajo se optó por utilizar la formulación de un gel mucoadhesivo, como la forma farmacéutica que permitirá administrar por vía tópica y de manera exitosa las nanopartículas poliméricas al organismo. Los componentes propuestos para la formulación del gel mucoadhesivo presentan propiedades que favorecen la interacción del principio activo con el lugar de administración. Así el ácido láctico, mantiene la formulación en un pH fisiológico, similar al del sitio de acción (104). El gel mucoadhesivo prolonga también el proceso de liberación del fármaco debido a la propiedad mucoadhesiva que le brinda el quitosán a la formulación, si la forma farmacéutica tiene una buena capacidad de adhesión al lugar de administración, entonces esto le permitirá a las nanopartículas tener una liberación del principio activo más eficiente y sostenida en el tiempo (105). Por último, la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) actúa en la formulación como emulsificante, viscosante y estabilizante. Actualmente el gel de quitosán y HPMC es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica (105).

El gel debe ser lo suficientemente fluido como para administrar correctamente la formulación, evitando así pérdida de producto, respetando la dosis indicada, y que permanezca en la superficie de aplicación a un pH fisiológico. Entonces para poder encontrar la viscosidad correcta del gel se realizó diversas formulaciones con concentraciones al 1 %; 2 % y 3 % como lo sugieren estudios anteriores (106, 107).

Tabla 4. Formulaciones de gel de nanopartículas poliméricas cargadas de Enrofloxacin (n = 3).

Para 40 g de formulación

Componente	Formulación 1 %	Formulación 2 %	Formulación 3 %
Ácido láctico	200 µL	400 µL	600 µL
Hidroxipropilmetilcelulosa	400.0 mg	800.0 mg	1200.0 mg
Quitosán	400.0 mg	800.0 mg	1200.0 mg

Se trabajó tres concentraciones de HPMC y quitosán con respecto al volumen de nanopartículas final obtenidas (Tabla 4). Se agregó el ácido láctico a las nanopartículas en suspensión con agitación magnética a 600 rpm y a 25 °C; el pH alcanzó la acidez. Después se adicionó el quitosán y se incrementó la agitación a 1000 rpm. Por último, dependiendo de la viscosidad de la preparación se adicionó lentamente el HPMC en pequeñas cantidades y se mezcló con la ayuda de agitación magnética.

2.3. Caracterización de las nanopartículas cargadas de enrofloxacin

La caracterización de las nanopartículas está dirigida a la determinación de valores y parámetros fisicoquímicos que tienen relevancia en la formulación final. A continuación, se describen los distintos ensayos que se realizaron:

2.3.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)

El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas cargadas con enrofloxacin en suspensión y en gel, se determinó mediante dispersión dinámica de la luz, utilizando un analizador de partículas Zetasizer NanoZS90® a 25 °C a un ángulo de 90°. Las muestras de nanopartículas en suspensión se diluyeron en agua ultrapura en proporción de 1/100 y las muestras de nanopartículas en gel se diluyeron igualmente en agua ultrapura en proporción 1/1000, debido a la mayor viscosidad. Ambas concentraciones se ajustan al rango de concentración que se puede analizar en el equipo (1×10^{-3} % p/v a 1 % p/v) (108). La formulación diluida de nanopartículas fue colocada en una celda desechable de poliestireno, posteriormente fue introducida al equipo para su análisis. Se realizó 12 lecturas de 10 segundos por cada muestra y cada una por triplicado.

2.3.2. Potencial zeta

El potencial zeta se midió utilizando un analizador de partículas Zetasizer NanoZS90®. Las muestras de nanopartículas en suspensión se diluyeron en una proporción de 1/100 con agua ultrapura y las muestras de nanopartículas en gel se diluyeron en una proporción 1/1000 con agua ultrapura. Las mediciones se realizaron en una celda capilar plegada desechable de poliestireno a 25 °C. Las muestras introducidas en el equipo se equilibraron 2 minutos antes del análisis. Se realizaron 13 lecturas por cada muestra y cada una por triplicado.

2.3.3. pH de las nanopartículas

El pH de las nanopartículas cargadas con el fármaco, tanto en suspensión como en el gel, se midió utilizando un potenciómetro digital marca inoLab® pH/ION 7320 a 25 °C. Se colocó las muestras de en un beaker, se introdujo el electrodo y se dio un tiempo para que el equipo se estabilice y de un valor de pH.

2.4. Caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin en gel mucoadhesivo.

2.4.1. Tamaño partícula e índice de polidispersidad (PDI)

El tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) del gel mucoadhesivo fue determinado mediante dispersión dinámica de la luz, utilizando un analizador de partículas Zetasizer nanoZS90[®], la muestra se diluyó con agua ultra pura en relación de 1/1000 (108). Ésta dilución se hizo porque la formulación tiene una mayor viscosidad y tomando las consideraciones del equipo donde la concentración máxima que se pueden analizar en el equipo es (1x10⁻³ % p/v a 1 % p/v) (108).

Las mediciones se realizaron a 25°C, con un ángulo de 90°. Se realizó 12 lecturas de 10 segundos por cada muestra y cada una por triplicado.

2.4.2. Potencial zeta

El potencial zeta del gel mucoadhesivo se midió utilizando un analizador de partículas Zetasizer nanoZS90[®]. Las muestras del gel se diluyeron en una proporción de 1/1000 con agua ultrapura antes del análisis. Las mediciones se realizaron en una celda capilar plegada desechable de poliestireno a 25 °C. Las muestras introducidas en el equipo se equilibraron 2 minutos antes del análisis. Se realizaron 13 lecturas de 10 segundos por cada muestra.

2.4.3. pH del gel mucoadhesivo

El pH del gel mucoadhesivo que contiene nanopartículas cargadas con enrofloxacin fue determinado utilizando el equipo medidor de pH digital marca inoLab[®] pH/ION 7320 a 25 °C. El gel se colocó en un beaker, después se introdujo el electrodo del equipo en el beaker, se esperó un momento a que el equipo se estabilice y muestre el resultado.

2.4.4. Viscosidad de nanopartículas en gel mucoadhesivo

Este ensayo se realizó en el laboratorio de investigación y servicios (LABINSERV) de la Universidad Nacional San Agustín. Para la realización de este ensayo es necesario que el instrumento esté limpio y seco. La viscosidad del gel mucoadhesivo se determinó por medio del Viscosímetro de Ostwald. Las condiciones en las que se realiza el ensayo son de 25 °C. Primero se evaluó la viscosidad del agua, se dejó caer agua por la parte inferior de la ampolla de llenado y se cronometra el tiempo que tarda en pasar entre los niveles A y B, marcados en el instrumento (Figura 17; Pág. 32). Se repitió esta operación tres veces y se calcula el valor medio de los tiempos. A continuación, se procede de la misma manera con el gel mucoadhesivo cuya viscosidad se desea conocer, se realizó las tres lecturas y se obtuvo el valor medio de los tiempos para el gel. Una vez obtenidos los tiempos se calcula la viscosidad del gel utilizando la ecuación de la viscosidad dinámica (109) (Pág. 32).

2.5. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de enrofloxacin

La formulación de nanopartículas tiene una concentración teórica de 40 mg de enrofloxacin en un volumen de 20 mL (Tabla 2). Para obtener con certeza la concentración se procede a cuantificar y establecer los miligramos de enrofloxacin en la formulación. En este sentido, se utilizó el método estandarizado de la USP 40 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (110). Este proceso comprende:

Preparación de la fase móvil: Se elaboró un sistema tampón de ácido fosfórico 20 mM ajustado a pH 3.0 con trietilamina y acetonitrilo (87:13 v/v). La solución se filtró con una membrana de Nylon 0.45 µm.

Preparación de la curva de calibración: Para la preparación de la curva de calibración se partió de una solución stock 1 (10 mg de Enrofloxacin y 10 mL de fase móvil con sonicación por 15 minutos a 50 °C) y solución stock 2 (10 mg de Ciprofloxacino y 10 mL fase móvil con sonicación por 15 minutos a 50 °C). A partir de la solución stock de enrofloxacin, se preparó estándares a distintas concentraciones para construir la curva de calibración (0.5, 1, 5, 10, 25 y 50

µg/mL). A cada estándar se agregó una concentración constante de ciprofloxacino (10 µg/mL) como estándar interno, para corregir la pérdida de analito durante la preparación de la muestra. Cada uno de los estándares se filtró con una membrana de Nylon de 0.22 µm y se colocó en viales de HPLC.

Preparación de la muestra: Se tomó un volumen de 10 µL de nanopartículas en suspensión y se colocó en un tubo Eppendorf, a este último se le agregó 890 µL de acetona y 100 µL de ciprofloxacino previamente disuelto en fase móvil en una concentración de 100 µg/mL llegando a obtener una concentración final de ciprofloxacino de 10 µg/mL. Se calentó a 40 °C para conseguir la evaporación completa de los solventes orgánicos. Finalizado este paso, las muestras fueron reconstituidas con 1 mL de fase móvil, se colocó en un vórtex por 30 segundos, se sometió a ultrasonido y se filtró a través de membranas de 0.22 µm.

Sistema cromatográfico: El sistema de HPLC (ELITE LaChrom, VMR HITACHI) cuenta con una bomba (L-2130), un detector de diodos (L-2450), un inyector automático (L-2200) y un horno de columna (L-2350). Los análisis de enrofloxacin se procesaron siguiendo la monografía USP 40 (110). La fase estacionaria fue una columna RP-18 de fase inversa (LiChrospher® 100 RP-18). La fase móvil se hizo circular a través de la columna a un flujo de 1.5 mL/minuto, y se analizaron 20 µL de muestras durante 7 minutos a 40 °C y a 274 nm.

La eficiencia de encapsulación (EE (%)) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = (CC \cdot VOL / D \cdot W) \times 100$$

Ecuación 1: Eficiencia de encapsulación(111).

CC = Concentración de enrofloxacin hallada experimentalmente

VOL = Volumen final de las nanopartículas

D = Dilución de la muestra

W = Peso de Enrofloxacin

2.6. Cinética de liberación *in vitro*

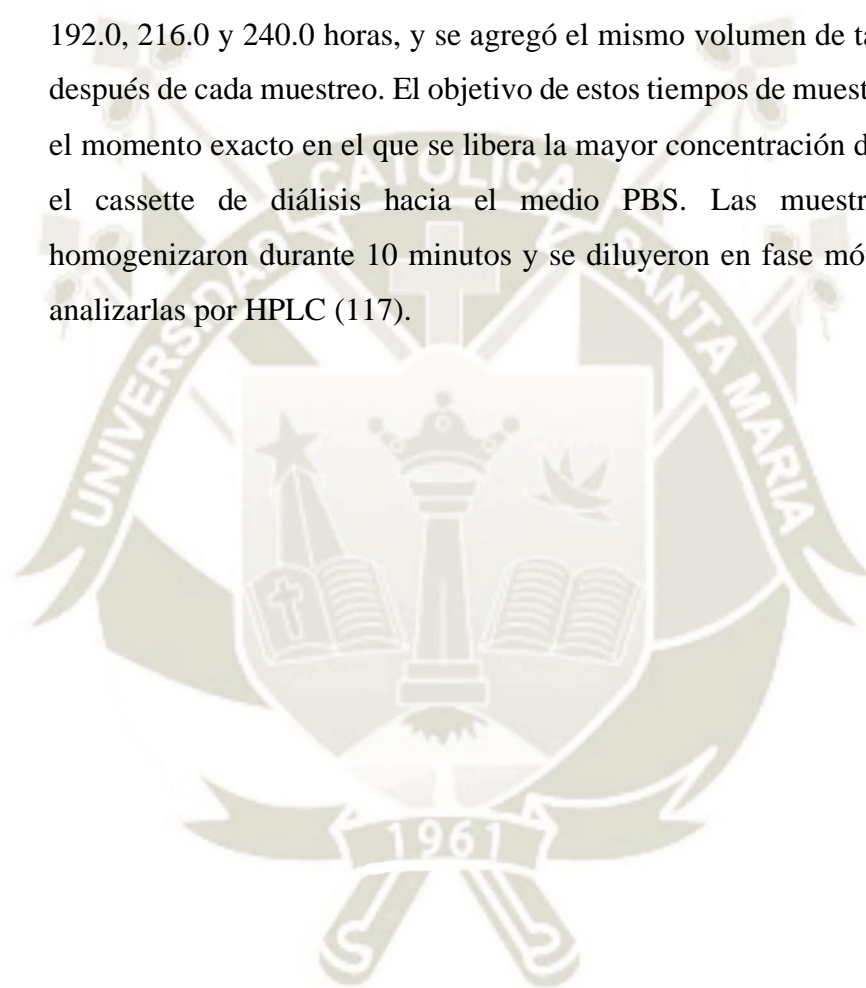
La liberación del principio activo en el sitio de acción es fundamental ya que conlleva a tener tiempos de latencia menos prolongados y una especificidad mayor para la obtención del efecto terapéutico del fármaco. Por lo tanto, es indispensable conocer los tiempos en los que se va liberando el fármaco con el fin de demostrar que puede ser utilizado como un sistema de liberación prolongado. Los ensayos de liberación *in vitro* requieren de condiciones que asemejen a las del organismo. El paso del fármaco desde la matriz polimérica hacia su sitio de acción (liberación) se dará por transporte difusivo, debido al gradiente de concentración que existe entre el interior y el exterior de la nanopartícula que permite al compuesto migrar de manera rápida, ya que al ser un compuesto de bajo peso molecular y tamaño pequeño viaja a través de los poros del interior de la partícula. Dichos poros, pueden llegar a medir entre 9.6 y 24.7 nanómetros (112). Lo anterior, se ve ratificado al ajustar diferentes modelos cinéticos y encontrar que en estudios anteriores se determinó que la liberación del compuesto activo es por difusión (113, 114), el tamaño de las nanopartículas favorece el paso del principio activo a través de la membrana bacteriana (115); y en el caso de los ensayos *in vitro*, la liberación se dará desde el interior de un cassette de diálisis hacia un medio externo de tampón PBS.

El volumen del medio se calculó siguiendo lo establecido por las condiciones Sink. Estas condiciones establecen que, al tener una concentración en un medio mucho menor a la concentración del fármaco a saturación, despreciamos la concentración que hay en el medio. Por lo tanto, es necesario determinar la concentración de enrofloxacin a la cual se consigue una solución saturada en un volumen de PBS (116).

Primero se disolvió una pequeña cantidad conocida de enrofloxacin en un determinado volumen de PBS, a este volumen se le fue añadiendo cada vez mayores cantidades de enrofloxacin hasta conseguir una solución saturada. Con el resultado de este ensayo podemos calcular el volumen de PBS necesario para el ensayo de liberación *in vitro* (116).

El volumen de PBS que se utilizó en los ensayos de cinética de liberación es de 5 a 10 veces mayor al requerido para preparar una solución saturada. Se

colocó un volumen de formulación (enrofloxacin libre, nanopartículas en suspensión y nanopartículas en gel mucoadhesivo) dentro de un cassette de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) como específica las instrucciones del fabricante. Luego, el cassette de diálisis se colocó en un beaker con PBS a pH de 7.4 en agitación continua de 200 rpm y a 37°C. Se tomó 1000 μ L de muestra en los siguientes intervalos de tiempo 0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 10.0, 12, 24.0, 34.0, 36.0, 48.0, 58.0, 60.0, 72.0, 96.0, 120.0, 140.0, 168.0, 192.0, 216.0 y 240.0 horas, y se agregó el mismo volumen de tampón de diálisis después de cada muestreo. El objetivo de estos tiempos de muestreo es determinar el momento exacto en el que se libera la mayor concentración del fármaco desde el cassette de diálisis hacia el medio PBS. Las muestras obtenidas se homogenizaron durante 10 minutos y se diluyeron en fase móvil (1:2 v/v) para analizarlas por HPLC (117).



CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN



1. Elección de los componentes en la formulación

La versatilidad de las nanopartículas poliméricas para incorporar en su estructura a diversos fármacos, convierte a la nanotecnología en un campo prometedor para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos. Son especialmente atractivos para patologías de difícil tratamiento como puede ser el cáncer, ya que con la aplicación de estos nanosistemas inteligentes se consigue aumentar la eficacia terapéutica, y reducir los efectos secundarios de la medicación. El futuro de estos nanotransportadores pasa por una mayor investigación en la ciencia de materiales, para conseguir diseños más eficaces, y en las bases fisiopatológicas de las enfermedades, para abordar más eficazmente la zona afectada (118).

Existen dos formas de enrofloxacin, la sal y la forma de base. La sal es soluble en agua y se usa en forma inyectable, como Baytril (119), mientras que la forma de la base es muy poco soluble en agua. La forma de base de la enrofloxacin, fue seleccionada por su lipofilicidad y buena afinidad con la formulación y las membranas bacterianas en casos de infecciones. También tiene la característica de lograr concentraciones tisulares e intracelulares muy superiores logrando combatir concentraciones antimicrobianas en varios tejidos, de 8 a 10 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria (CIM) obteniendo una tasa de sobrevivencia bacteriana casi nula lo que la convierte en un tratamiento efectivo y aleja la posibilidad de generar resistencia (120).

El PLGA es un polímero biocompatible, que es ampliamente soluble en solventes orgánicos como por ejemplo el acetato de etilo, cloroformo, tetrahidrofurano y acetona he insoluble en soluciones acuosas (121). Es un material empleado en sistemas de liberación de medicamentos ya que se degrada en menos tiempo que el PLA, y dichos tiempos varían dependiendo si se le ha adicionado algún grupo funcional, la geometría del sistema de liberación, el peso molecular del polímero y la proporción entre el ácido láctico y glicólico (122).

Adicionalmente la FDA aprobó su uso en humanos. Se ha empleado en diferentes estudios en la liberación de esteroides, anticancerígenos, proteínas, péptidos, antibióticos, anestésicos y vacunas. Se degrada fisiológicamente por medio de sus enlaces éster en sus respectivos monómeros (123, 124).

En el presente trabajo, se evaluó el impacto que tienen los diferentes componentes en la formulación de nanopartículas poliméricas realizando ensayos a distintas concentraciones de cada componente (tabla 3), con los resultados obtenidos se determina su inclusión o exclusión de la formulación final. Los resultados que se muestran en la siguiente tabla corresponden a los ensayos para determinar la concentración de los componentes de la formulación de nanopartículas poliméricas (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de los ensayos de las diferentes formulaciones de los componentes de la formulación de nanopartículas poliméricas. (n=3)

NPs	RATIO (PLGA: ENR)	PVA (mg)	TAMAÑO (nm)	PDI	POTENCIA L Z (mV)	%EE *
Formulación 1	8:1	110.0	271.2±1.9	0.313±0.006	-26.1±1.2	90%±0.58
Formulación 2	8:1	300.0	242.0±1.4	0.156±0.002	-29.0±3.2	90%±0.58
Formulación 3	8:1	600.0	532.6±1.8	1.485±0.014	-51.3±2.1	-
Formulación 4	5:1	110.0	268.7±1.0	0.298±0.008	-27.1±2.2	60%±0.58
Formulación 5	5:1	300.0	239.0±1.5	0.137±0.015	-30.7±0.8	61%±1.15
Formulación 6	5:1	600.0	602.3±0.7	1.359±0.009	-55.5±7.0	-
Formulación 7	3:1	110.0	264.3±1.3	0.341±0.022	-26.0±4.1	35%±0.58
Formulación 8	3:1	300.0	248.4±1.1	0.135±0.034	-30.8±2.3	34%±0.58
Formulación 9	3:1	600.0	612.5±1.7	1.434±0.010	-42.3±3.5	-

(-) No se determinó el porcentaje de eficiencia de encapsulación porque la muestra precipita y no cumple con las características de muestra para el método. Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar.

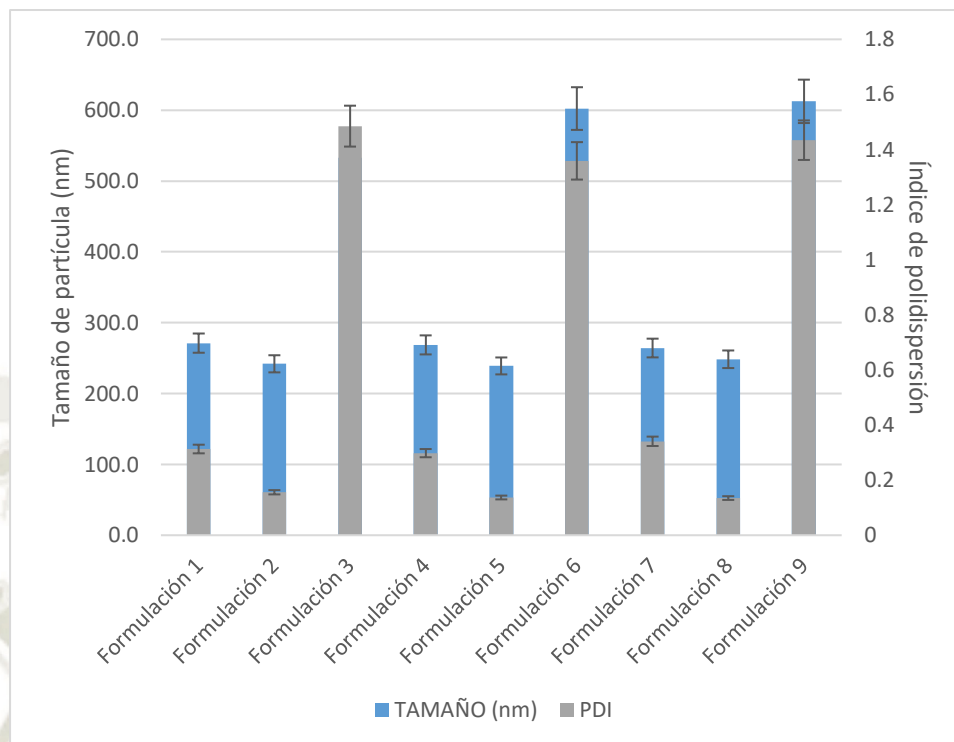


FIGURA 18. Tamaño de partícula e índice de polidispersión de las distintas formulaciones.

Los valores descritos en la tabla 5 muestran los resultados de los análisis realizados a las distintas formulaciones con concentraciones diferentes de cada uno de los componentes establecidos en la metodología descrita en la página 37. Según los datos obtenidos en el presente proyecto las formulaciones 1, 2, 4, 5, 7, 8 que no contienen exceso de PVA (110 mg y 300 mg) muestran tamaños de partícula similares y dentro del rango de 230 y 250 nm. (Figura 18). El intervalo de tamaño de partícula óptimo es de 200 a 400 nm, como se demuestra en un estudio para elaborar nanopartículas cargadas con enrofloxacin, con el método de solvente-antisolvente, donde se aplicó sonocristalización para controlar el tamaño de partícula (125). El estudio obtuvo un tamaño de partícula próximo a 270 nm. En el caso de las pruebas 3, 6 y 9 el tamaño de partícula se ve incrementado en un 128% en comparación a las demás pruebas, esto se debe a que en dichas formulaciones se utilizó un exceso de PVA (600 mg) (Figura 18), este polímero tiene una relación inversamente proporcional entre su concentración y el tamaño de partícula del nanosistema. Sin embargo, una concentración tan alta de PVA como la utilizada en las pruebas 3,6 y 9 provocó la aglutinación y precipitación del sistema. En un estudio destinado a elaborar nanopartículas de

Quercetina por el método de nanoprecipitación, se obtuvo un tamaño de partícula de 235 nm (126). Este tamaño de partícula puede deberse a que el PVA posee un monómero más polar que otros polímeros, razón por la cual tiene la capacidad de disolverse más fácil en medio acuoso. Claramente, cuando la fase orgánica, que contiene PLGA y fármaco, entra en contacto con la fase acuosa, el polímero se favorece más, en términos de interacciones. Por ende, el desplazamiento del solvente es más efectivo.

El índice de polidispersión (PDI), es una medida de la amplitud de la distribución del tamaño promedio de las partículas. Por lo tanto, cuanto menor sea este valor, las partículas tendrán una mayor tendencia a encontrarse en un rango más pequeño de distribución de tamaño, las formulaciones 1, 2, 4, 5, 7 y 8 cumplen con este requisito y se les puede clasificar como suspensiones homogéneas, mientras que las pruebas 3, 6 y 9 están fuera de este concepto (Figura 18).

Las formulaciones cuyo potencial Z fluctúa entre - 30.0 y + 30.0 mV se pueden clasificar como nanopartículas en suspensión estables (127). Esto le confiere a la formulación una máxima repulsión entre las partículas adyacentes y conformar así, una suspensión satisfactoria que no se endurece y se mantiene aun cuando está almacenada. Un sistema de alta dispersión sedimentará muy lentamente. Por lo tanto, las formulaciones 3, 6 y 9 son menos estables en comparación a las otras formulaciones, esto se debe a que la concentración de PVA es mayor en estos casos (Figura 18).

El porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE%) para las nanopartículas cargadas de enrofloxacin fue evaluado por HPLC. Los datos obtenidos de las formulaciones ensayadas se dividen en tres grupos: el primer grupo está conformado por la prueba 1, 2 y 3. En las tres formulaciones la concentración de enrofloxacin es 25 mg, el porcentaje de encapsulación en la formulación 1 y 2 es de 90 %, no se ve alterado por la variación en la concentración de PVA mientras que en la formulación 3, no se realizó los ensayos de porcentaje de encapsulación, esto debido a que la muestra precipitó y no cumple con las consideraciones para ser analizada por HPLC, esto ocurre también en las pruebas 6 y 9. En un segundo grupo encontramos a las formulaciones 4, 5 y 6 cuya concentración de Enrofloxacin es de 40 mg obteniendo un porcentaje de encapsulación de 60 %

en las formulaciones 4 y 5. El tercer grupo está conformado por las formulaciones 7, 8 y 9, este grupo fue formulado con una concentración de 70 mg de enrofloxacin y los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de encapsulación es de 35 % y 34 % para las formulaciones 7 y 8 respectivamente.

Así concluimos que el porcentaje de encapsulación se ve alterado negativamente a medida que se somete a la formulación a una mayor concentración de PVA. El PVA tiene una participación muy importante en la forma y el tamaño de la nanopartícula(128).

Criterio de selección de la formulación final: Se establece entonces como criterios de evaluación los valores de tamaño de partícula, PDI y potencial z, que resultaron de los ensayos realizados a las nueve formulaciones representadas en la tabla 5 (Pag. 48). Estos, son determinantes al momento de seleccionar las formulaciones con mejores características. De los resultados obtenidos la concentración de fármaco encapsulado en la “formulación 4” y la “formulación 5” se obtuvo un porcentaje de encapsulación superior al 60 % en las cuales se empleó 40 mg del fármaco. Las formulaciones 1 y 2 encapsularon un porcentaje mayor al 90 %, respecto a una concentración de 25 mg de fármaco; el inconveniente de estas formulaciones es que la concentración de fármaco no lograría un efecto farmacológico, salvo un incremento del volumen de formulación, el cual sería muy grande e implicaría problema de administración. Mientras que las formulaciones 7 y 8 obtuvieron un porcentaje de encapsulación muy bajo (34 %) para los fines del presente estudio. Se conoce que a mayor concentración de PLGA se obtiene también un mayor tamaño de partícula (48). Como se puede apreciar en la figura 18, hay una diferencia significativa en el tamaño al cambiar la concentración de PVA y el ratio (PLGA: ENR). También se observa que la formulación 5 y la formulación 2 con respecto al tamaño de partícula no son significativamente diferentes, sin embargo para la elección de la formulación se toma en consideración la cantidad de enrofloxacin (25mg) en la formulación cuyo inconveniente es que lograría un efecto farmacológico con un volumen de formulación mayor.

Basándonos en la cantidad que asegure un tratamiento antibiótico (5 mg/kg cada 24 horas) (102), en el tamaño de partícula 200 a 400 nm, y el porcentaje de eficiencia de encapsulación superior a 60 %) además de un tratamiento estadístico de los datos de ANOVA y DUNNET (Figura 21 y 22) para evidenciar diferencia significativa, se decidió optimizar la formulación 5 (Tabla 6).

Tabla 6. Formulación final de las nanopartículas poliméricas. (n=3)

NP's	Enrofloxacin	PLGA	PVA	RATIO (PLGA:ENR)
	40.0 mg	210.0 mg	300.0 mg	5:1
Formulación 5	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	EE%
	239.0±4.2	0.137±0.005	-30.9±1.2	61±1.15

Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar.

La Figura 19 muestra los resultados de normalidad de los residuales de los datos que son las lecturas por triplicado del tamaño de partícula de las 9 formulaciones trabajadas (ver Anexo N° 6), que es necesario para posteriormente realizar el test de ANOVA.

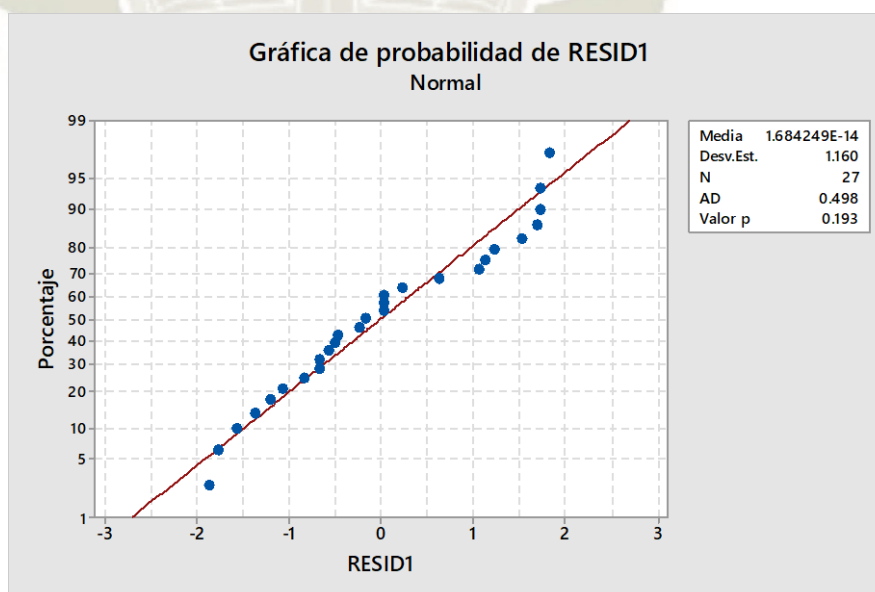


Figura 19. Prueba de Anderson-Darling (normalidad de datos). **H₀**: Los residuales provienen de una población con distribución normal **H_a**: Los residuales No provienen de una población con distribución normal. **Decisión**: Debido a que el p-valor (0.193) > alfa (0.05), no se rechaza H₀. **Conclusión**: Los residuales provienen de una población con distribución normal.

La Figura 20 muestra los resultados de homogeneidad de varianzas en donde demostramos que las varianzas de las 9 formulaciones son homogéneas entre sí. Lo cual es necesario para ejecutar la prueba de ANOVA a los resultados de tamaño de partícula de las 9 formulaciones trabajadas (ver anexo N°6).

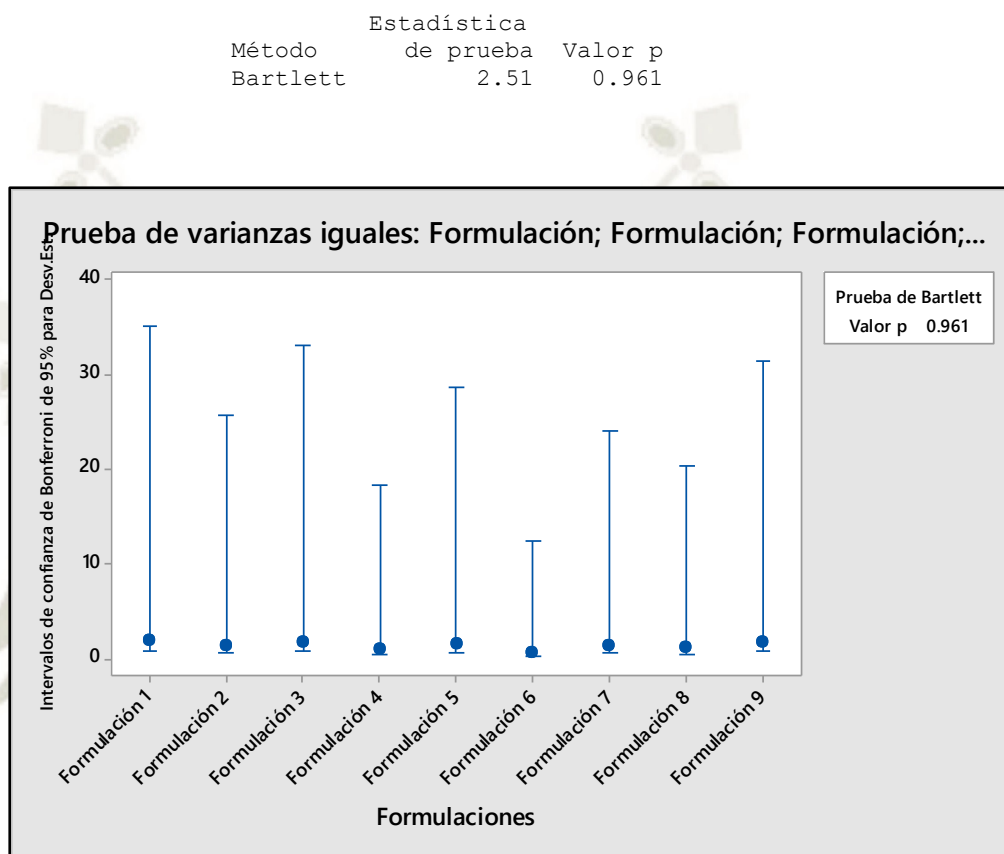


FIGURA 20. Prueba de varianzas iguales (Bartlett). *Ho: Todas las varianzas son iguales Ha: Al menos una de las varianzas es diferente. Decisión: Debido a que el p-valor (0.961) > alfa (0.05), No rechaza la Ho Conclusión: se concluye que las varianzas entre las distintas formulaciones son homogéneas con 95% de confianza.*

La Figura 21 muestra los resultados de la prueba de ANOVA en donde se comparó las medias de las lecturas por triplicado del tamaño de partícula de las 9 formulaciones de prueba trabajadas (ver anexo N°6), en donde se concluye que las medias entre las distintas formulaciones son diferentes significativamente con 95% de confianza.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	8	655343	81917.8	42161.29	0.000
Error	18	35	1.9		
Total	26	655378			

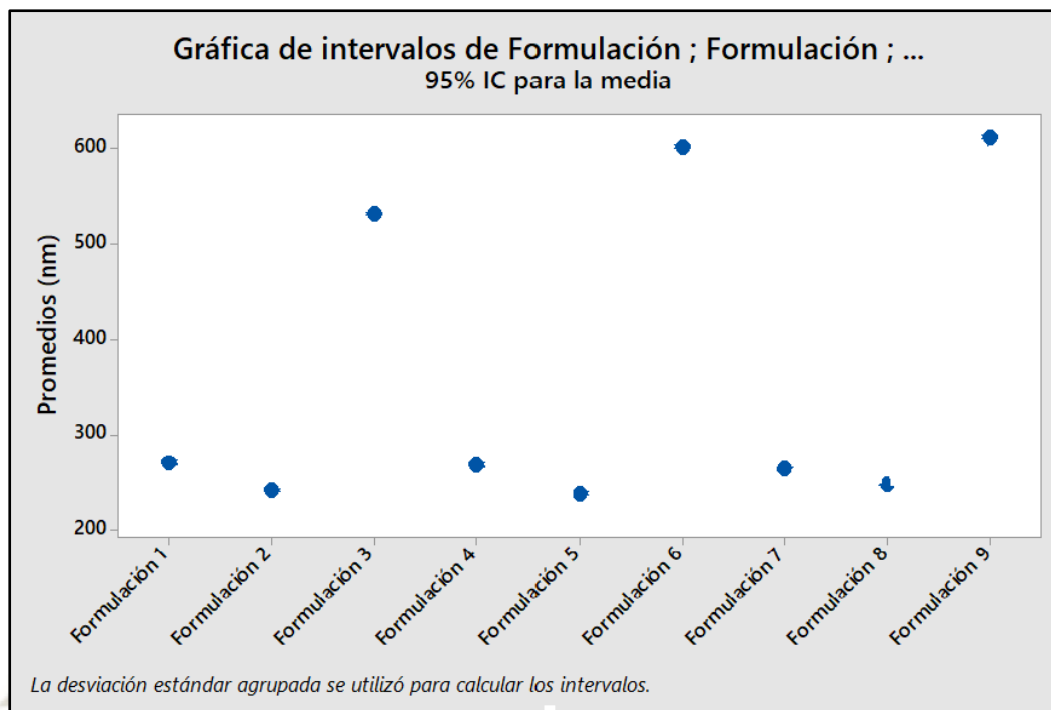


FIGURA 21. Análisis de varianzas (F-FISHER). **Ho:** Todas las medias son iguales **Ha:** Al menos una de las medias es diferente **Decisión:** Debido a que el *p*-valor (0.000) < alfa (0.05), rechaza la Ho **Conclusión:** se concluye que las medias entre las distintas formulaciones son diferentes significativamente con 95% de confianza.

En la Figura 22 se aprecia que en todas las formulaciones se encuentra una diferencia significativa al ser comparada con la formulación 5 (PLGA:ENR, 5:1) que se presenta en la tabla 5 (Pág. 48). Lo que connota una diferencia del tamaño en la formulación 5 (línea punteada) con respecto a las demás formulaciones trabajadas.

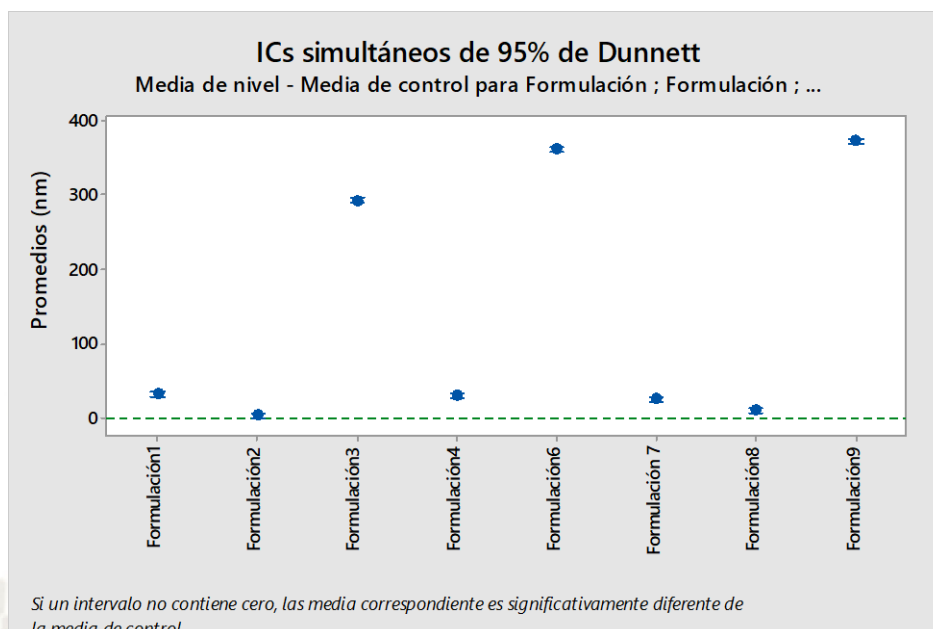


FIGURA 22. Comparación múltiple de medias (DUNNETT). Control: formulación 5 **Conclusión:** se concluye que la media de la formulación 2 no es significativamente diferente con respecto a la media control (formulación 5) mientras que todas las otras medias entre las distintas formulaciones son diferentes significativamente con 95% de confianza.

* Si un intervalo no contiene cero, las media correspondiente es significativamente diferente con respecto a la media de control(formulación 5)

Elaboración de gel mucoadhesivo con nanopartículas poliméricas: Las nanopartículas se suspendieron en el gel mucoadhesivo formulado a base de dos polímeros: quitosán y HPMC. El quitosán es un producto natural derivado de la quitina desacetilada, el segundo polisacárido natural más abundante. Este polímero es conocido por su biocompatibilidad, sus propiedades mucoadhesivas y su efecto antibacteriano. Otras propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas en el quitosán, tanto *in vitro* como en modelos animales. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: baja toxicidad, capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales por la apertura transitoria de las uniones estrechas celulares. Para poder polimerizar el quitosán, debe estar en medios ácidos, con un pH más bajo que su pKa de 6.3; por lo tanto, en el presente estudio se usó ácido láctico para protonar las extremidades de quitosán. HPMC es un derivado de la celulosa, un polisacárido natural que se encuentra en las paredes celulares de las plantas y presenta un gran atractivo

debido a su biodisponibilidad, biodegradabilidad y buenas propiedades mecánicas. De gran uso en la industria farmacéutica y alimentaria, este polímero fue elegido por su biocompatibilidad y propiedades mucoadhesivas (97) y su degradación genera sustancias asimilables por el ser humano.

El ácido láctico, es un producto natural de la microbiota vaginal que se produce principalmente en las células musculares y en los glóbulos rojos, el ácido láctico es un ácido débil biocompatible ($pK_a = 3.86$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$) capaz de protonar los polímeros de quitosán a la vez que proporciona un pH ligeramente ácido (entre $5.5 - 6.5$), compatible con el tracto uterino (96). El Químico farmacéutico, como especialista del medicamento, puede contribuir en el perfeccionamiento del diseño de las nanopartículas estímulo-respuesta y en la investigación de la base biológica de las enfermedades.

1.1. Caracterización de las nanopartículas cargadas de enrofloxacin en Gel Mucoadhesivo

1.1.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta

Para mejorar la eficiencia de las nanopartículas poliméricas cargadas con enrofloxacin en la etapa de administración, se utilizó un gel de quitosán con propiedades mucoadhesivas. El gel mucoadhesivo es la forma farmacéutica en la que se administraran las nanopartículas en suspensión. Se considera que la propiedad física más importante en este punto, es la viscosidad. La adición de nanopartículas en suspensión al gel mucoadhesivo no altera las características de tamaño de partícula, PDI y potencial zeta de las nanopartículas cargadas con enrofloxacin, tal y como se muestra en la Tabla 8.

1.1.2. Viscosidad de las nanopartículas en gel mucoadhesivo.

Se analizaron dos concentraciones de polímeros, quitosán 2 % / HPMC 100 cP 2 % y quitosán 1 % / HPMC 100 cP 1 % (Tabla 7). El gel debe ser lo suficientemente fluido para administrar correctamente la formulación, evitando así la pérdida de producto y respetando la dosis indicada.

Tabla 7: Perfil de viscosidad de dos formulaciones gel sin partículas cargadas de enrofloxacin

Formulación de gel	Viscosidad (cP)
Gel 1 %	144.17
Gel 2 %	210.36

Las mediciones de viscosidad se realizaron por el método de OSTWALD.

Por lo tanto, los puntos de vista de tres expertos veterinarios fueron necesarios para seleccionar la concentración en la que la formulación de gel mucoadhesivo muestre una viscosidad correcta para ser administrada.

Es necesario determinar en qué porcentaje el polímero viscosante del gel mucoadhesivo da lugar a una forma farmacéutica capaz de administrar y liberar las nanopartículas poliméricas de enrofloxacin. Para la evaluación de las formulaciones del gel al 1 % y 2 %, se solicitó el apoyo de un jurado conformado por tres experimentados profesionales Médicos Veterinarios Zootecnistas, catedráticos de la Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas de la Universidad Católica de Santa María. El ensayo consistió en evaluar la fluidez de cada una de las formulaciones de gel al ser cargados en una jeringa de 20 mL e inyectados en un tubo capilar de un diámetro de 5.0 mm y una longitud de 50 cm. El tubo capilar se utiliza para la aplicación de formas farmacéuticas semisólidas en tratamientos de endometritis subclínica en animales como los bovinos. La formulación del gel al 1 % fue cargada en la jeringa e inmediatamente inyectada hacia el capilar, se pudo evidenciar que el gel fluye con un poco de esfuerzo por el tubo capilar, pero no hubo interrupciones en la inyección del gel. La formulación del segundo gel al 2 % se cargó en la jeringa de la misma forma que la anterior y de inmediato se procedió a su inyección del gel hacia el tubo capilar, se pudo observar una resistencia del formulado a deslizarse por el tubo, además se tuvo que detener la inyección del gel en dos ocasiones debido a que se requería una mayor fuerza en la presión ejercida en la jeringa. Terminada la evaluación, el jurado concluyó que la formulación del gel mucoadhesivo al 1 % muestra características de fluidez y viscosidad superiores al gel 2 %. El gel al 1 % no presenta dificultades al pasar por el sistema de administración, garantizando la

correcta aplicación del gel mucoadhesivo en el tejido que se desea tratar por lo que es elegido para el presente proyecto.

Tabla 8: Tamaño de partícula y potencial zeta de la formulación final de nanopartículas cargadas con enrofloxacin y en gel mucoadhesivo. (n=3)

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NPs	243.8 ± 4.9	0.134 ± 0.009	-29.0 ± 1.7
NPs – GEL 1 %	241.3 ± 6.9	0.129 ± 0.004	-30.0 ± 1.1

NPs: Nanopartículas poliméricas cargadas con Enrofloxacin, NPs - GEL 1 %: nanopartículas poliméricas cargadas con Enrofloxacin en gel mucoadhesivo. Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar.

El tamaño de las nanopartículas en gel mucoadhesivo (NPs – GEL 1 %) corresponde al rango de tamaño partícula que se obtuvo en anteriores ensayos en concentraciones iguales a las utilizadas en esta formulación. Se puede concluir que el tamaño de las nanopartículas poliméricas o PDI no se vio afectado cuando se incorporó dentro del gel.

El potencial zeta de la solución de nanopartículas poliméricas en gel mucoadhesivo no muestra que existan alteraciones en las propiedades de repulsión entre las partículas adyacentes y conforman así, una suspensión satisfactoria de nanopartículas poliméricas inmersas en gel mucoadhesivo.

1.1.3. pH de las nanopartículas en gel mucoadhesivo.

El pH de la formulación de nanopartículas en suspensión tiene un valor medio de 5.55±0.24 (n = 3), se considera ligeramente ácido, y se debe analizar para posteriores aplicaciones. Sin embargo, la adición de las nanopartículas poliméricas al gel mucoadhesivo le confiere a la forma farmacéutica un pH más cercano a la neutralidad y con mayor similitud al pH fisiológico, pH 6.00. Esto se debe a la presencia del ácido láctico, un componente que se emplea en la preparación del gel mucoadhesivo. Un valor de pH cercano a la neutralidad resulta desfavorable para las colonias bacterianas patógenas formadoras de biofilm, puesto que en su mayoría estas bacterias se desarrollan en un medio ácido (129).

2. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de enrofloxacin en gel mucoadhesivo

Las nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin tienen una eficiencia de encapsulación de $61 \% \pm 1.15$ ($n = 3$) mientras que las nanopartículas poliméricas en gel mucoadhesivo es de $60 \% \pm 1.52$ ($n=3$) (Tabla 9).

Tabla 9: Eficiencia de encapsulación de formulación final de nanopartículas poliméricas cargadas con enrofloxacin y en gel mucoadhesivo. ($n=3$)

Formulación	Eficiencia de Encapsulación (%)
NPs	$61 \% \pm 1.15$
NPs – GEL 1 %	$60 \% \pm 1.52$

NPs: Nanopartículas poliméricas cargadas con enrofloxacin, NPs - GEL 1 %: nanopartículas poliméricas cargadas con enrofloxacin en gel mucoadhesivo. Los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar.

Los resultados de las nanopartículas en suspensión y de las nanopartículas en gel mucoadhesivo no muestran diferencia significativa en su porcentaje de encapsulación. Por lo que se puede concluir que los componentes del gel mucoadhesivo no aumentan ni disminuyen la capacidad de identificación y cuantificación del fármaco. Sin embargo, el gel mucoadhesivo podría brindar propiedades que mejoran la eficiencia del fármaco al momento de su administración y liberación.

3. Estudio de cinética de liberación *in vitro* de la formulación de nanopartículas

El estudio de cinética de liberación *in vitro* de enrofloxacin a partir de las nanopartículas en suspensión y en gel mucoadhesivo duró 10 días y se realizó en una solución de PBS a pH fisiológico y a una temperatura de 37°C . Se utilizó una solución de enrofloxacin disuelto en PBS como control. Se evaluó la concentración de enrofloxacin liberada a partir de las nanopartículas en el medio de diálisis a diferentes tiempos, 0.00, 0.08, 0.16, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 24.00, 30.00, 48.00 horas y una vez al día hasta 10 días después del inicio de la diálisis, y se añadió el mismo volumen de tampón de diálisis después de cada muestreo (ver anexo 9).

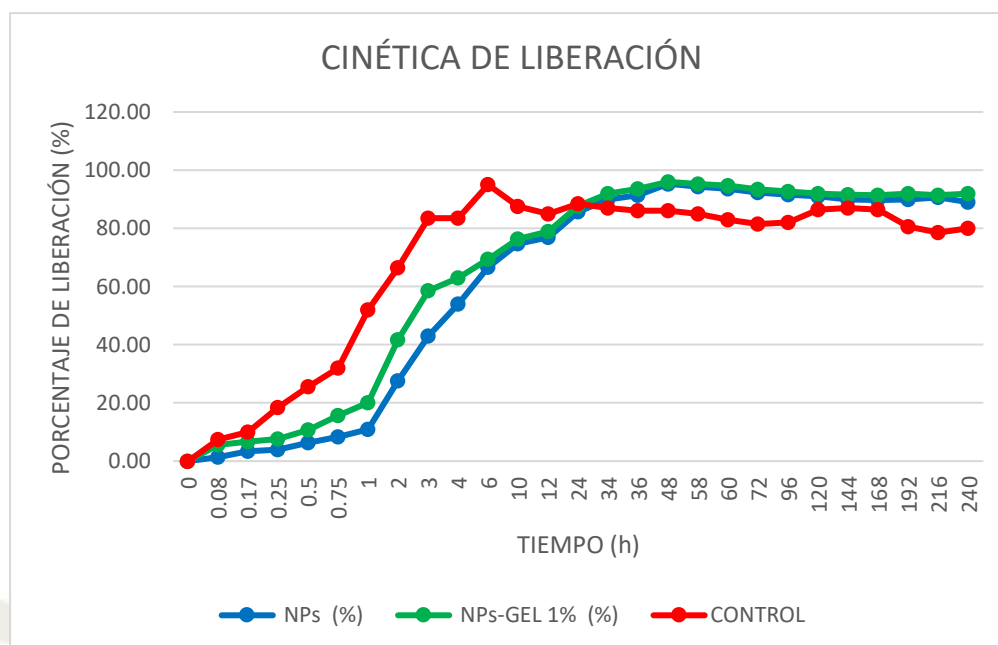


FIGURA 23: Perfiles de liberación in vitro. Control (CONTROL), nanopartículas cargadas con enrofloxacin (NPs) y nanopartículas cargadas con enrofloxacin en gel mucoadhesivo 1 % (NPs-GEL 1 %). La liberación de fármaco (%) se estabiliza a las 240 horas, los datos después de este tiempo no se muestran (n = 3). (ver anexo N°8)

El enrofloxacin libre (curva roja, Figura 23) difunde rápidamente a través de la membrana de diálisis, liberándose así 95 % de la concentración inicial de fármaco en el casete de diálisis, en las 6.0 primeras horas. Las nanopartículas en suspensión (curva azul, Figura 23), mostraron una rápida liberación de enrofloxacin y alcanzaron un valor máximo del 95 % en 48 horas después de iniciado el ensayo. Sin embargo, las nanopartículas en gel mucoadhesivo, para la cual se esperaba un perfil diferente por la red de polímeros que tendría que incrementar el tiempo de liberación, todo el fármaco se liberó en 48 horas después de la inducción (curva verde, Figura 23). Asimismo, ambas formulaciones no se comportan como formas de liberación controlada para los fines de este estudio, ya que el 95 % de la carga difundió a través de la membrana de diálisis entre 24 y 48 horas y no a lo largo de 7 días. El perfil de liberación del gel se puede explicar por la desprotonación de las extremidades de quitosán a un pH fisiológico que descompone los polímeros de manera reversible: por lo tanto, la enrofloxacin puede difundir mejor en el tampón de diálisis. También, es posible que la agitación constante fuera insuficiente y el gel contenido en el casete promueva la

formación de una crema, lo que lleva a la desestabilización de las nanopartículas y la liberación de enrofloxacin. Dado que el fármaco tiene una baja solubilidad en PBS (186 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la molécula podría precipitar en cristales.

El presente estudio concluye que al utilizar nanopartículas poliméricas como sistema de liberación modificada para enrofloxacin, se logra alcanzar la concentración máxima del fármaco liberado al medio, en un intervalo de tiempo mucho mayor en comparación al intervalo de tiempo que muestra el mismo principio activo sin un sistema que modifique su liberación.

El tiempo que toma alcanzar la concentración máxima de fármaco liberado, en un sistema de liberación modificado para enrofloxacin, no se ve alterado con la adición de este mismo sistema al gel mucoadhesivo de quitosán, la finalidad de incluir las nanopartículas cargadas con enrofloxacin en gel mucoadhesivo es la de brindar una forma farmacéutica al sistema de nanopartículas en suspensión y mejorar las propiedades físicas del formulado final al momento de su administración en el sitio de acción.

Uno de los objetivos del empleo de nanopartículas poliméricas como dispositivos de entrega de medicamentos es optimizar su eficacia terapéutica. Se ha demostrado que los sistemas nano estructurados son una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas; por ejemplo, las nanopartículas de rifampicina en alginato mejoraron la eficacia del medicamento contra *Mycobacterium tuberculosis*, las nanoesferas de anfotericina en policaprolactona contra *Cándida albicans* disminuyeron la toxicidad *in vivo* de la anfotericina, y las nanopartículas de ciprofloxacino en poliacrilato 'glicosilado' contra *S. aureus* mejoraron la biodisponibilidad de la ciprofloxacino (127).

4. Conclusiones

- **Primera:** Se formuló nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin, éstas fueron elaboradas por el método de nanoprecipitación.
- **Segunda:** Se elaboraron diferentes formulaciones de nanopartículas poliméricas, de éstas se tomó la formulación 5 la cual presenta una composición de enrofloxacin, PLGA (ratio 1:5) y PVA teniendo un tamaño de 239.0 ± 4.2 nm, PDI de 0.137 ± 0.005 , potencial zeta -30.9 ± 1.2 mV y una eficiencia de encapsulación del 61 ± 1.15 %. Además, se logró optimizar la formulación para fines aplicación de dosis, bajo la forma farmacéutica de gel mucoadhesivo (quitosán 1 %, HPMC y ácido láctico)
- **Tercera:** Se realizó el estudio de cinética de liberación de disolución *in vitro* de la formulación final de nanopartículas poliméricas cargadas de enrofloxacin en gel mucoadhesivo, obteniendo una liberación del 95 % del fármaco a las 48 horas en medio de PBS, a pH fisiológico y a una temperatura de 37 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Titos JC. Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones de liberación retardada de enrofloxacin en la cabra. Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Departamento de Farmacología. 2010:321.
2. Salvador H, Gutierrez L. Complejo recristalizado de clorhidrato de Enrofloxacin dihidratado, y método para obtener el mismo. Universidad Nacional de México. 2015.
3. Intorre L, Mengozzi G, Bertini S, Bagliacca M, Luchetti E, Soldani G. The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the Muscovy duck. *Vet Res Commun*. 1997;21(2):127-36.
4. Aref S, Al Khodary T, Zeed TA, El Sadiék A, El Menshawy N, Al Ashery R. The Prognostic Relevance of BAALC and ERG Expression Levels in Cytogenetically Normal Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015;31(1):21-8.
5. Brown SA. Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol Ther*. 1996;19(1):1-14.
6. Unmack J. The fluoroquinolone antibacterial agents. *Aust Nurses J*. 1990;19(6):28-9.
7. Dudley MN. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *Am J Med*. 1991;91(6A):45S-50S.
8. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(5):504-8.
9. Bhanot SK, Singh M, Chatterjee NR. The chemical and biological aspects of fluoroquinolones: reality and dreams. *Curr Pharm Des*. 2001;7(5):311-35.
10. Reece RJ, Maxwell A. DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1991;26(3-4):335-75.

11. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:369-413.
12. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:635-92.
13. Williams NL, Howells AJ, Maxwell A. Locking the ATP-operated clamp of DNA gyrase: probing the mechanism of strand passage. *J Mol Biol.* 2001;306(5):969-84.
14. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem.* 1998;273(42):27668-77.
15. Aldred KJ, McPherson SA, Wang P, Kerns RJ, Graves DE, Turnbough CL, Jr., et al. Drug interactions with *Bacillus anthracis* topoisomerase IV: biochemical basis for quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2012;51(1):370-81.
16. Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, Homes P, Huang J, Kranz M, et al. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(9):1152-3.
17. Aldred KJ, McPherson SA, Turnbough CL, Jr., Kerns RJ, Osheroff N. Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(8):4628-39.
18. Aldred KJ, Schwanz HA, Li G, McPherson SA, Turnbough CL, Jr., Kerns RJ, et al. Overcoming target-mediated quinolone resistance in topoisomerase IV by introducing metal-ion-independent drug-enzyme interactions. *ACS Chem Biol.* 2013;8(12):2660-8.
19. Minnick MF, Wilson ZR, Smitherman LS, Samuels DS. *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):383-6.
20. Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(1):126-7.

21. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10):629-40.
22. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006;12(1):83-8.
23. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-89.
24. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 2:S120-6.
25. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(4):1037-9.
26. Andriole VT. Efficacy of ciprofloxacin in animal models of infection. *Am J Med.* 1987;82(4A):67-70.
27. Kaartinen L, Panu S, Pyorala S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Vet J.* 1997;29(5):378-81.
28. Pyorala S, Manner L, Kesti E, Sandholm M. Local tissue damage in cows after intramuscular injections of eight antimicrobial agents. *Acta Vet Scand.* 1994;35(1):107-10.
29. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:765-74.
30. Pinto TV, Sousa CM, Sousa CAD, Aboelhassan MM, Peixoto AF, Pereira C, et al. A novel generation of hybrid photochromic vinylidene-naphthofuran silica nanoparticles through fine-tuning of surface chemistry. *Dalton Trans.* 2017;46(28):9076-87.
31. Llabot J, Palma S, Allemandi D. Nanopartículas poliméricas sólidas. *Revista Nuestra Farmacia.* 2008;53:40-7.

32. Irache JM. Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2008;31:7-10.
33. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*. 2004;2(1):3.
34. Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(2):517-35.
35. Mai WX, Meng H. Mesoporous silica nanoparticles: A multifunctional nano therapeutic system. *Integr Biol (Camb)*. 2013;5(1):19-28.
36. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(5):761-9.
37. Marta RA. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas: Universidad Complutense de Madrid; 2013.
38. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*. 2005;109(1-3):169-88.
39. Hans ML, Maxwell C, Ehrlichman RS, Metzger K, Liang Y, Siegel SJ, et al. Evaluation of in vitro release and in vivo efficacy of mPEG-PLA-haloperidol conjugate micelle-like structures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(2):422-30.
40. Gartzandia O, Egusquiaguirre SP, Bianco J, Pedraz JL, Igartua M, Hernandez RM, et al. Nanoparticle transport across in vitro olfactory cell monolayers. *Int J Pharm*. 2016;499(1-2):81-9.
41. Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Gois JR, et al. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA J*. 2010;1(1):164-209.

42. Xie Z, Su Y, Kim GB, Selvi E, Ma C, Aragon-Sanabria V, et al. Immune Cell-Mediated Biodegradable Theranostic Nanoparticles for Melanoma Targeting and Drug Delivery. *Small*. 2017;13(10).
43. Aitziber LV. Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2018.
44. Shayne Cox Gad PD, D.A.B.T. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. A John Wiley & Sons, INC, Publication. 2008.
45. Estevinho BM, Rocha FA, Santos LM, Alves MA. Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. *J Microencapsul*. 2013;30(6):571-9.
46. Ortega C, Fernandez X. Quitosano: una alternativa sustentable para el empaque de alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. 2020;21.
47. Boraso A, Ciancia M, Cerezo A, Piriz ML, Casas G, M.C.Eyras. Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides. 2015. p. 3-60.
48. Salas RJL. Producción de nanopartículas de PLGA para el transporte de medicamentos específico a tejido óseo: Universidad Nacional de Colombia; 2016.
49. Yu XF, Han ZC. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol*. 2006;21(5):519-31.
50. Reyes F, Rodriguez G, Rosa M. Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Biomecánica*. 2012;20:7-19.
51. Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm*. 2000;199(1):95-110.
52. Martin O, Avérous L. Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer* 42. 2001;14.

53. Sargar T. Tamaño del mercado Global de Ácido Poliglicólico, participación, crecimiento, alcance futuro, tendencias 2020-2026. Tecnoalimenportal. 2021.
54. Dechy-Cabaret O, Martin-Vaca B, Bourissou D. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chem Rev.* 2004;104(12):6147-76.
55. Men Y, Gander B, Merkle HP, Corradin G. Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic malarial peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine.* 1996;14(15):1442-50.
56. Parikh J, Raval A. Revisión sobre el comportamiento de degradación hidrolítica de los polímeros biodegradables del sistema controlado de administración de fármacos. *Tendencias Biomater.* 2011.
57. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2007;119(1):77-85.
58. Sun J, Zhang L, Wang J, Feng Q, Liu D, Yin Q, et al. Tunable rigidity of (polymeric core)-(lipid shell) nanoparticles for regulated cellular uptake. *Adv Mater.* 2015;27(8):1402-7.
59. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012;161(2):505-22.
60. Garrocho A, Cerda B, Flores H. Microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) para liberación controlada de biomoléculas: Conceptos, aplicaciones y perspectivas en Estomatología. *Revista ADM / 2012;LXX NO. 1. :6-11.*
61. Seppala JV, Helminen AO, Korhonen H. Degradable polyesters through chain linking for packaging and biomedical applications. *Macromol Biosci.* 2004;4(3):208-17.
62. M. O. Synthesis of polycaprolactone: a review *Chemical syntheses of biodegradable polymers.* 2012.

63. Alred PA, Tjerneld F, Kozlowski A, Harris JM. Synthesis of dye conjugates of ethylene oxide-propylene oxide copolymers and application in temperature-induced phase partitioning. *Bioseparation*. 1992;2(6):363-73.
64. Chen J, Spear S, Huddleston J. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*. 2005.
65. Avgoustakis K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv*. 2004;1(4):321-33.
66. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-90.
67. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*. 2008;125(3):193-209.
68. Nath SD, Son S, Sadiasa A, Min YK, Lee BT. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. *Int J Pharm*. 2013;443(1-2):87-94.
69. Sridhar R, Ramakrishna S. Electrosprayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications. *Biomatter*. 2013;3(3).
70. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*. 1999;57(2):171-85.
71. Badri W, Miladi K, Nazari QA, Greige-Gerges H, Fessi H, Elaissari A. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. *Int J Pharm*. 2016;515(1-2):757-73.
72. Lizondo M, Pons M, Gallardo M, Estelrich J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(12):1845-9.

73. Cuadros-Moreno A, Pimentel RC, Martín-Martínez ES, Fernandez JY. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional. 2014.
74. Hann MM, Leach AR, Harper G. Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci*. 2001;41(3):856-64.
75. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-51.
76. Borgogna M, Bellich B, Cesaro A. Marine polysaccharides in microencapsulation and application to aquaculture: "from sea to sea". *Mar Drugs*. 2011;9(12):2572-604.
77. Kokot Z, Urbaniak B. Validation of HPLC method for determination of six fluoroquinolones: cinoxacin, ciprofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, norfloxacin and ofloxacin. *Acta Pol Pharm*. 2004;61 Suppl:64-6.
78. De Smet J, Boussey K, Colpaert K, De Sutter P, De Paepe P, Decruyenaere J, et al. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: A bio-analytical HPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(10):961-7.
79. Sturini M, Speltini A, Pretali L, Fasani E, Profumo A. Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters. *J Sep Sci*. 2009;32(17):3020-8.
80. Genaro AR. Remington Farmacia. Editorial Medica Panamericana. 2000;20a Edicion
81. Diana Ramos Picos, Martha Gómez Carril, Dianelis Fernández Mena, Fuente. LNDI. Microesferas Biodegradables de Liberación Controlada para Administración Parenteral. *Revista Cubana de Farmacia*. 2000;vol 34:pp 70-7.

82. J. L. Escobar, D. Zaldivar, L. Agüero, S. Fernández, Katime. I. Liberación de Cefazolina sodica a partir de Hidrogeles de Copolímeros de Poli(Acrilamina-co-Acido Metacrilico). Revista Iberoamericana de Polímeros Escobar et al 2002;Volumen 3.
83. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS. Real Farmacopea Española. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2015; 5a ed. Madrid.
84. Isabel Martín Montaner, López. JE. Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros ¿Nos aportan algo en la práctica clínica? Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra. 2005;VOLUMEN 13, Nº 1(1138-1043).
85. Shweta Arora, Ali J, Ahuja A, Qureshi J. Pulsatile Drug Delivery Systems: An Approach for Controlled Drug Delivery. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006;68:295.
86. Creus SA. Instrumentación Industrial. Alfaomega Grupo Editor, SA. 2010;Octava Edición.
87. Douglas AS, Holler FJ, Crouch SR. Principios de Análisis Instrumental. Cengage Learning. 2008;Sexta Edición.
88. Wu XS, Wang N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(1):21-34.
89. Makino K, Ohshima H, Kondo T. Transfer of protons from bulk solution to the surface of poly(L-lactide) microcapsules. J Microencapsul. 1986;3(3):195-202.
90. Jeyanthi R, Rao KP. In vivo biocompatibility of collagen-poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. Biomaterials. 1990;11(4):238-43.
91. Ibañez PPUCdMFdCQDdQM. Sistemas poliméricos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable 2006.

92. Amashta IAK, Trabanca OK, Trabanca DK. Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares síntesis, propiedades y aplicaciones. Vasco SEdlUdP, editor: Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco; 2004.
93. Lozinsky VI, Zubov AL, Titova EF. Swelling behavior of poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996;18(8):561-9.
94. Peña ED. Desarrollo y caracterización de hidrogeles poliméricos con aplicación en la liberación controlada de fármacos. Farmacéutica DdFyT, editor: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones; 2002.
95. Gehrke SH, Lee PI. Specialized drug delivery systems: Manufacture and production technology. . P Tyle Marcel Dekker, New York. 1991;98(2):374.
96. Yeh P-Y, Smith PL. Physiological considerations in dosage form design. *Macromolecular Symposia*. 2001;172(1):139-48.
97. Allen L, Ansel HC. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems: Wolters Kluwer Health; 2013.
98. Mardones L, Juanto S. Laboratorio: Medida de viscosidad. Cátedra:Química AplicadaFRLP-UTN. 2014.
99. Boddupalli BM, Mohammed ZN, Nath RA, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010;1(4):381-7.
100. James Aguirre L. Obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico)/ácido poli(gama-glutámico) conjugadas con ácido fólico para el transporte y liberación de doxorubicina. Universidad Autónoma del Estado de México. 2016.
101. Urrejola MC, Soto LV, Zumarán CC, Peñaloza JP, Álvarez B, Fuentevilla I, et al. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa

por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*. 2018;36:1463-71.

102. Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous administration in sheep. *Rev Sci Tech*. 2009;28(3):1129-42.

103. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2006;2(1):8-21.

104. Parra Juez JL, Pons Gimier L. *Ciencia cosmética : bases fisiológicas y criterios prácticos*. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceúticos; 1995.

105. Varshosaz J, Taymouri S, Minaiyan M, Rastegarnasab F, Baradaran A. Development and in vitro/in vivo evaluation of HPMC/chitosan gel containing simvastatin loaded self-assembled nanomicelles as a potent wound healing agent. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018;44(2):276-88.

106. Kienzle-Sterzer C, Rodriguez-Sanchez D, Rha C. Dilute solution behavior of a cationic polyelectrolyte. *Journal of Applied Polymer Science*. 1982;27(11):4467-70.

107. Szymańska E, Winnicka K. Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine drugs*. 2015;13(4):1819-46.

108. Malvern Instruments Ltd. 2003. Zetasizer Nano Series User Manual Zetasizer Nano Series 2004;MAN0317 (Issue 1.1).

109. Bioquímica DdFy. *MEDIDA DE VISCOSIDADES Y DENSIDADES*. Universidad Pablo de Olavide.

110. Twinbrook Parkway R, MD. USP 40, FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. The United States Pharmacopeial Convention. 2017;CUADRAGÉSIMA REVISIÓN.

111. ZAZZALI PJA. PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA MICROENCAPSULACIÓN DE BIOMOLÉCULAS. UNIVERSIDAD DE CHILE,

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS. 2011.

112. Rescignano N, Amelia M, Credi A, Kenny JM, Armentano I. Morphological and thermal behavior of porous biopolymeric nanoparticles. *European Polymer Journal*. 2012;48(7):1152-9.

113. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;48(2-3):139-57.

114. Wang D, Miller SC, Shlyakhtenko LS, Portillo AM, Liu XM, Papangkorn K, et al. Osteotropic Peptide that differentiates functional domains of the skeleton. *Bioconjug Chem*. 2007;18(5):1375-8.

115. Merino J, Noriega MJ. FISIOLÓGÍA GENERAL, TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANA. Universidad de Cantabria.4.

116. Terrae UF. Disoluciones Químicas. Universidad Finis Terrae.

117. Sáez V, Hernáez E, López L. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS. APLICACIONES BIOMÉDICAS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*; Sáez et al. 2003;Volumen 4(2).

118. Gómez NL. Nanoparticulas Estimulo-Respuesta para la Liberacion de Farmacos. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 2017.

119. Velarde IM. Primer Antibacteriano Latinoamericano para uso veterinario. *Innovacion Organizaciones Privadas*. 2013.

120. Serra Valdés MÁ. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2017;16:402-19.

121. E. FVS. ELABORACIÓN DE NANOPARTICULAS DE POLI (D, L-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) (PLGA) ESTABILIZADAS CON LA MEZCLA POLI (ALCOHOL

VINÍLICO)-DODECIL SULFATO DE SODIO (PVA-SDS): DEGRADACIÓN DE PLGA Y LIBERACIÓN DE FÁRMACO DURANTE ALMACENAMIENTO.: CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA; 2011.

122. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2003;5:1-16; discussion

123. Park K, Skidmore S, Hadar J, Garner J, Park H, Otte A, et al. Injectable, long-acting PLGA formulations: Analyzing PLGA and understanding microparticle formation. *Journal of Controlled Release.* 2019;304:125-34.

124. Nimesh S. 1 - Nanotechnology: an introduction. In: Nimesh S, editor. *Gene Therapy*: Woodhead Publishing; 2013. p. 1-12.

125. Santamaría J, Morales N. Desarrollo de nanopartículas de enrofloxacina de liberación modificada. Universidad Central del Ecuador Quito. 2018.

126. Rivera C. Estudio del Proceso de Nanoencapsulación de Quercetina por medio de Nano-Precipitación. Universidad ICESI Santiago De Cali. 2017.

127. Herrera MT, Artunduaga JJ, Ortiz CC, Torres RG. Síntesis de nanopartículas de ácido poli-láctico cargadas con antibióticos y su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Biomédica.* 2017;37(1):11-21.

128. Cabrera J, López A, Santiago J. Efecto del 2-propanol en la síntesis de nanopartículas de plata mediante radiación gamma. *Revista de la Sociedad Química del Perú.* 2008;74:323-31.

129. Lasa I, Pozo JLD, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 2005;28:163-75.

Anexo N° 01**Preparación de nanopartículas de PLGA – PVA cargadas con Enrofloxacin**

- Pesar 210 mg de PLGA (Resomer RG 502 H) y 40 mg de Enrofloxacin (ENR) en un vaso de precipitados de 50 mL.
- Disolver 210 mg de PLGA y 40 mg de ENR en 8 mL de acetona agitándolo a temperatura ambiente; cubrir el vaso con parafilm para evitar la pérdida de solvente.
- Preparar una solución de PVA: 300 mg en 24 mL de agua ultrapura.
- Preparar una solución acuosa que contenga:
 - 25 % (PVA / PLGA (w / w)) (a saber, 4.2 mL de solución de PVA)
 - Csp 24 mL de agua ultrapura (19.80 mL)
- Verter repentinamente la solución acuosa en la mezcla PLGA / ENR / acetona bajo agitación por 5 minutos.
- Verter la mezcla en un balón de 200 mL (lavar con acetona dos veces y luego con agua dos veces; lavar con acetona justo antes de verter la preparación en su interior)
- Coloque el balón en el rotavapor (12 min, Rotación 5, 40 °C con el sistema de enfriamiento configurado a -4 °C + bomba de vacío)
- Medir el volumen de nanopartículas.
- Divide el volumen entre tubos Eppendorf.
- Centrifugar a 100 g 5 min 4 °C para ver si los cristales ENR se han asentado.
- Centrifugar a 20000 g 10min 4 °C.
- Sacar el sobrenadante y agruparlo a 4 °C para dosis posteriores de ENR.
- Vuelva a tomar el sedimento de NPs mediante pipeteo / vórtice y sonicación sucesiva (5min máximo) en un volumen igual de agua
- Repita los pasos de lavado 2 veces (agrupando el sobrenadante para dosis posteriores de ENR)
- Medir el volumen final.
- Medir el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas.

Anexo N° 02**Cuantificación del porcentaje de encapsulación por HPLC****Preparación de fase móvil**

1. Fase móvil:

Para 100 mL de solución de Ácido fosfórico:

- Añadir 90 mL de agua ultra pura en un beaker.
- Añadir 0.171 mL de Ácido fosfórico al 85%
- Ajustar el pH a 3.00 con trietilamina
- Enrazar a 100 mL (en probeta) con agua ultra pura.
- Filtrar con 0.45 um membrana de nylon.

FASE MÓVIL: 13 volúmenes de acetonitrilo con 87 volúmenes de ácido fosfórico

2. Solución de referencia:

a. Referencia 1 ENROFLOXACINO (Solución Stock 1)

- Disolver una cantidad en mg de ENR en un volumen igual de Fase móvil (10 mg ENR + 10 mL de Fase móvil).
- Sonicar la mezcla por 15 min a 50 ° C dos veces.

b. Referencia 2 CIPROFLOXACINO (Solución Stock 2)

- Disolver una cantidad en mg de ENR en un volumen igual de Fase móvil (10 mg ENR + 10 mL de Fase móvil).
- Sonicar la mezcla por 15 min a 50 ° C dos veces.
- Hacer la solución de CIP 100ug/mL: 0.2 mL Stock 2 + 1.8 mL Fase móvil.

3. Calibración estándar:

Primero hacer las siguientes diluciones de Ref. 1 ENR (Solución Stock 1):

- 100 ug/mL: 0.2 mL stock 1 +1.8 mL Fase móvil.
- 50 ug/mL: 0.1 mL stock 1+ 1.9 mL Fase móvil.
- 10 ug/mL: 0.2 mL de 100 ug/mL +1.8 mL Fase móvil.
- 5 ug/mL: 0.2 mL de 50 ug/mL +1.8 mL Fase móvil.

Para la curva de calibración: ENR+CIP

- ENR 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + CIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$:
 - 0.1 mL Stock + 0.2 mL CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1.7 mL Fase móvil
- ENR 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + CIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$:
 - 0.050 mL Stock + 0.2 mL CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1.750 mL Fase móvil
- ENR 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + CIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$:
 - 0.2 mL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.2 mL CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1.6 mL Fase móvil
- ENR 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + CIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$:
 - 0.2 mL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.2 mL CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1.6 mL Fase móvil
- ENR 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + CIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$:
 - 0.2 mL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.2 mL CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1.6 mL Fase móvil
- ENR 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + CIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$:
 - 0.2 mL 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.2 mL CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1.6 mL Fase móvil

Características del sistema

- Columna: RP-18
- Flujo: 1.5 mL/min
- Temperatura: 40°C
- Detección en longitud de onda: 278 nm
- Volumen de inyección: 25 μL
- Ratio acetonitrilo/buffer: 13:87

Dosaje directo de muestras PLGA ENR, en HPLC:

1. Tomar 10 μL de la muestra en tubo y agregar 890 μL de Acetona y 100 μL de CIP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
2. Secarlo con aire o nitrógeno, hasta lograr la completa evaporación de Acetona.
3. Reconstituirlo con 1 mL de Fase móvil, luego vortex 30 segundos.
4. Sonicar durante 5 minutos.
5. Observar si hay completa reconstitución, sino 30 segundos adicionales de vortex.
6. Filtrarlo con filtro 0.22, utilizar jeringa de 1 mL y colocar el volumen de 1 mL en los viales previamente identificados.

Anexo N°03**Protocolo de preparación de nanopartículas poliméricas en gel de quitosán al 1% y HPMC 100 cp al 1%.**

Componente	Para 40 g	Para 20 g
Quitosán	0.4 g (1%)	0.2 g (1%)
Ácido Láctico	0.2 mL (200 uL)	0.1 mL (100 uL)
HPMC 100	0.4 g (1%)	0.2 g (1%)

- Añadir 200 uL de ácido láctico a las nanopartículas poliméricas obtenidas y agitar durante 5 minutos (precaución: el pH se vuelve ácido)
- Agregue poco a poco 0.4 g de quitosán (1%) y mézclelo (la velocidad se puede modular durante el paso de agitación)
- Dependiendo de la viscosidad de la preparación. Agregue lentamente 0.4 g de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) 100 mPa / s (1 %) y mezcle.
- Medir el pH y la viscosidad.

Anexo N° 04

Protocolo de preparación de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4

Sal	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
Fosfato de sodio di básico dihidratado	10	1.44
Fosfato de potasio di básico anhidro	1.8	0.24
Cloruro de sodio	137	8
Cloruro de potasio	2.7	0.2

- En un vaso de precipitado de 1 litro, pondremos ± 800 mL de agua ultrapura.
- Vertemos las 4 sales en el vaso, introducimos una pastilla magnética y dejamos el vaso en un agitador magnético hasta que las sales estén completamente disueltas.
Nota: Añádanse de uno en uno y espere hasta que es bien disuelto antes de añadir el siguiente ingrediente.
- Comprobamos el pH; suele estar a 6.7, así que lo ajustamos con NaOH 2M (hidróxido sódico, sosa) hasta 7.4
- Verter la disolución en una probeta y enrasar hasta 1 litro

Anexo N° 05

Lecturas promedio de tamaño de partícula e índice de polidispersión de las 9 formulaciones trabajadas.

FORMULACIÓN	TAMAÑO DE PARTÍCULA PROMEDIO (nm)	PDI PROMEDIO
Formulación 1	271.2	0.313
Formulación 2	242.0	0.156
Formulación 3	532.6	1.485
Formulación 4	268.7	0.298
Formulación 5	239.0	0.137
Formulación 6	602.3	1.359
Formulación 7	264.3	0.341
Formulación 8	248.4	0.135
Formulación 9	612.5	1.434

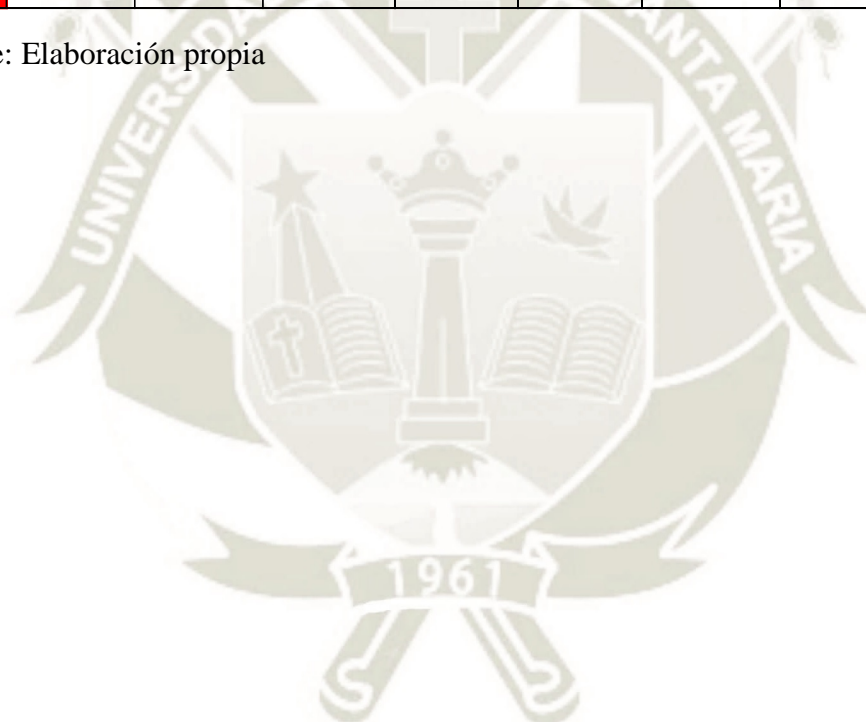
Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 06

Lecturas por triplicado del tamaño de partícula tomadas del ZETASIZER

	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4	Formulación 5	Formulación 6	Formulación 7	Formulación 8	Formulación 9
Lectura 1 (nm)	273.0	240.9	534.3	267.9	237.8	601.6	262.9	247.7	610.9
Lectura 2 (nm)	269.3	241.5	530.8	269.8	240.7	602.9	265.4	247.8	612.3
Lectura 3 (nm)	271.2	243.5	532.6	268.5	238.5	602.3	264.5	249.6	614.2
Promedio	271.2	242.0	532.6	268.7	239.0	602.3	264.3	248.4	612.5
Desviación estándar	1.9	1.4	1.8	1.0	1.5	0.7	1.3	1.1	1.7

Fuente: Elaboración propia



Anexo N° 07

**Lecturas por triplicado del porcentaje de encapsulación calculada a partir de datos
de HPLC.**

	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4	Formulación 5	Formulación 6	Formulación 7	Formulación 8	Formulación 9
Lectura 1 (%)	90	90	-	60	60	-	35	34	-
Lectura 2 (%)	89	90	-	60	60	-	35	34	-
Lectura 3 (%)	89	91	-	59	62	-	34	35	-
Promedio	89	90	-	60	61	-	35	34	-
Desviación estándar	0.58	0.58	-	0.58	1.15	-	0.58	0.58	-

Fuente: Elaboración propia



Anexo N° 08

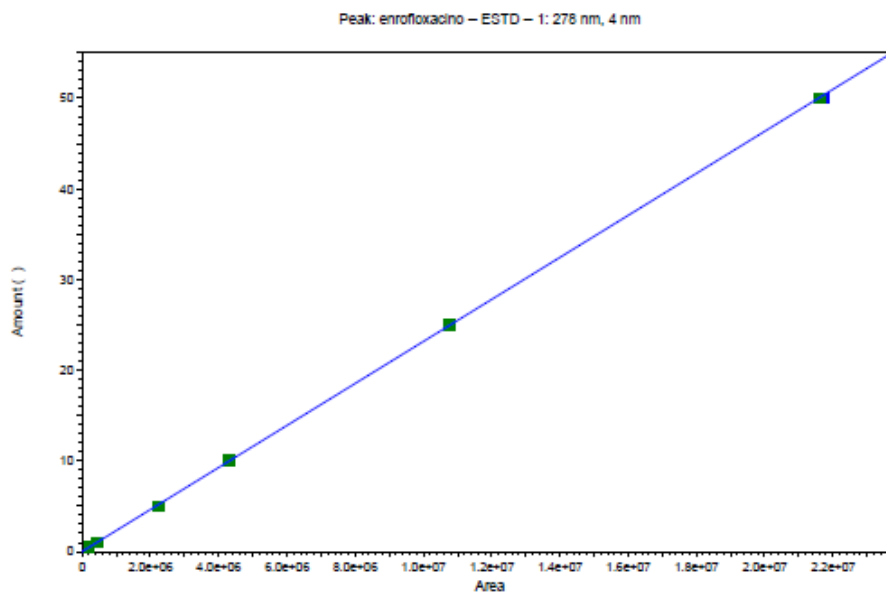
Resultados de cinética de liberación de la formulación control, la formulación de nanopartículas y nanopartículas en gel.

TIEMPO(h)	PORCENTAJE DE LIBERACIÓN SIN GEL PROM (%)	PORCENTAJE DE LIBERACIÓN CON GEL PROM (%)	PROMEDIO CONTROL
0	0.00	0.00	0.00
0.08	1.3	5.7	7.5
0.17	3.3	6.7	10.0
0.25	4.0	7.7	18.5
0.50	6.3	10.7	25.5
0.75	8.3	15.7	32.0
1	11.0	20.0	52.0
2	27.7	41.7	66.5
3	43.0	58.7	83.5
4	54.0	63.0	83.5
6	66.7	69.3	95.0
10	74.7	76.3	87.5
12	77.0	79.0	85.0
24	85.7	87.7	88.5
34	90.0	92.0	87.0
36	91.3	93.7	86.0
48	95.3	96.0	86.0
58	94.3	95.3	85.0
60	93.7	94.7	83.0
72	92.3	93.3	81.5
96	91.7	92.7	82.0
120	91.0	92.0	86.5
144	90.0	91.7	87.0
168	89.7	91.3	86.5
192	90.0	92.0	80.5
216	90.7	91.3	78.5
240	89.0	92.0	80.0

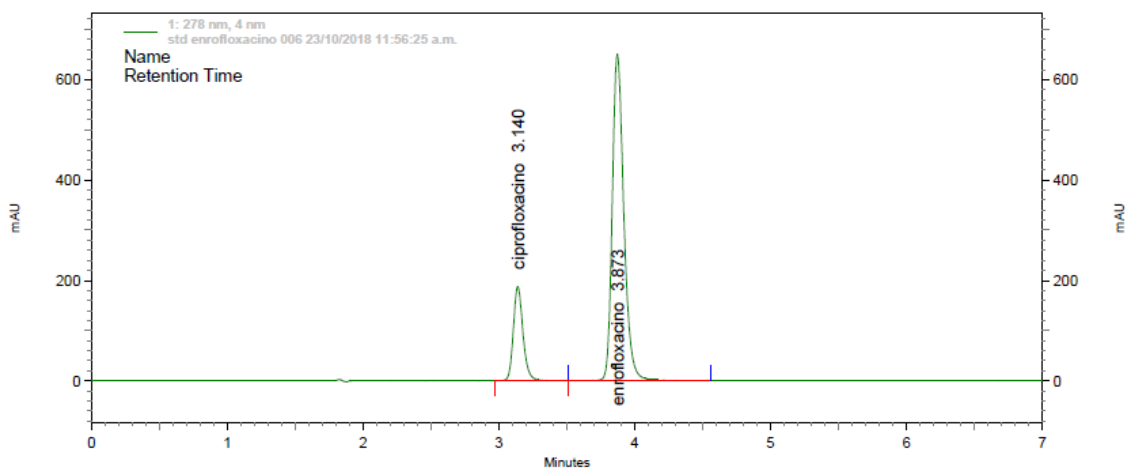
Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 09

Curva de calibración y pico de ciprofloxacino y enrofloxacina



enrofloxacino (1: 278 nm, 4 nm)
 Average RF: 2.33556e-006 RF StDev: 7.86337e-008 RF %RSD: 3.36681
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Replace
 Fit Type: Linear
 $y = 2.31781e-006x - 0.00751737$
 Goodness of fit (r^2): 0.999982



Anexo N° 09

Resultados de cinética de liberación de la formulación control, la formulación de nanopartículas sin gel y nanopartículas en gel.

MUESTRA 01 SIN GEL													
2.32E-06	0.00751737												
	0.08 h (5min)	0.017h (10min)	0.25 h (15 min)	0.50 h (30 min)	0.75 h (45min)	1h	2h	3h	4h	6h	10h	12h	24h
Area 1	23561	43188	64588	109337	138868	180361	395244	759569	709077	993844	1062790	1034835	1069460
Area 2	25463	43027	65572	106582	150652	181829	402008	770212	827953	967545	955987	1039201	1116824
Promedio	24512	43107.5	65080	107959.5	144760	181095	398626	764890.5	768515	980694.5	1009389	1037018	1093142
concentración ug/mL	0.04929679	0.092397625	0.1433257	0.24271224	0.328008806	0.41222643	0.916422	1.76535348	1.7737544	2.26554615	2.332053	2.39609332	2.52617809
Enrofloxacino(ug)	24.6483944	46.19881229	71.6628524	121.356119	164.0044028	206.113216	458.21098	723.794927	815.92702	996.840306	1119.386	1164.50135	1263.08904
porcentaje	2%	3%	5%	8%	11%	14%	32%	50%	57%	69%	78%	81%	88%
	34h	36h	48h	58h	60h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Area 1	1121608	1137704	1205696	1171507	1088462	1077961	1081272	1027798	1033279	1033435	1039046	1072070	1450075
Area 2	1119357	1180206	1200784	1180274	1100875	1076735	1080459	1045039	1002752	1067620	1055758	1091508	1228260
Promedio	1120482.5	1158955	1203240	1175890.5	1094668.5	1077348	1080865.5	1036418.5	1018015.5	1050527.5	1047402	1081789	1339167.5
concentración ug/mL	2.58954817	2.678720119	2.78136433	2.71797339	2.529716226	2.4895706	2.4977235	2.39470379	2.3520491	2.42740577	2.420161	2.49986399	3.09641845
Enrofloxacino(ug)	1320.66957	1339.360059	1390.68217	1375.29454	1366.046762	1344.36812	1323.7935	1293.14005	1288.9229	1310.79912	1306.887	1349.92656	1362.42412
porcentaje	92%	93%	97%	96%	95%	93%	92%	90%	90%	91%	91%	94%	95%

MUESTRA 02 SIN GEL

MUESTRA 02 SIN GEL													
2.32E-06	0.00751737												
	0.08 h (5min)	0.017h (10min)	0.25 h (15 min)	0.50 h (30 min)	0.75 h (45min)	1h	2h	3h	4h	6h	10h	12h	24h
Area 1	26542	54106	60156	93521	154726	191492	463036	723380	1021924	1323710	1545336	1529612	1657990
Area 2	25367	57086	59235	105858	152180	182047	483029	735370	980209	1325535	1525454	1631792	1645877
Promedio	25954.5	55596	59695.5	99689.5	153453	186769.5	473032.5	729375	1001066.5	1324622.5	1535395	1580702	1651933.5
concentración ug/mL	0.05264023	0.12134359	0.13084546	0.22354395	0.34815753	0.42537884	1.08888209	1.6830353	2.31276457	3.06270591	3.55123651	3.65624953	3.82135062
Enrofloxacino(ug)	26.3201148	60.6717974	65.4227284	111.771975	174.078764	212.689422	544.441044	841.517649	1156.38229	1531.35295	1775.61826	1828.12477	1979.45962
porcentaje	1%	3%	3%	5%	7%	9%	23%	36%	49%	65%	76%	78%	85%
	34h	36h	48h	58h	60h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Area 1	1536031	1658762	1929984	1508648	1489914	1446792	1467582	1849035	1743526	1506256	1491343	1594089	1703487
Area 2	1532361	1695141	1950448	1517976	1467660	1413868	1466910	1852016	1728836	1492152	1509394	1579633	1682338
Promedio	1534196	1676951.5	1940216	1513312	1478787	1430330	1467246	1850525.5	1736181	1499204	1500368.5	1586861	1692912.5
concentración ug/mL	3.54845746	3.87933759	4.48953468	3.50005232	3.42002993	3.30771581	3.39328008	4.28164914	4.01662031	3.46735265	3.47005174	3.67052492	3.91633215
Enrofloxacino(ug)	2051.00841	2110.35965	2199.87199	2170.03244	2154.61885	2140.09213	2103.83365	2140.82457	2104.70904	2080.41159	2082.03105	2077.51711	1958.16608
porcentaje	88%	90%	94%	93%	92%	91%	90%	91%	90%	89%	89%	89%	84%

MUESTRA 03 SIN GEL													
2.32E-06	0.00751737												
	0.08 h (5min)	0.017h (10min)	0.25 h (15 min)	0.50 h (30 min)	0.75 h (45min)	1h	2h	3h	4h	6h	10h	12h	24h
Area 1	34332	72386	79804	124858	137606	206042	568580	880706	1126590	1361595	1397313	1451397	1538989
Area 2	27658	76114	76387	123217	162869	203183	561932	868810	1124712	1316538	1440151	1451397	1544487
Promedio	30995	74250	78095.5	124037.5	150237.5	204612.5	565256	874758	1125651	1339066.5	1418732	1451397	1541738
concentración ug/mL	0.06432315	0.16458002	0.17349316	0.27997799	0.34070461	0.46673553	1.30263864	2.02000547	2.60152777	3.09618435	3.28083385	3.35654511	3.56593838
Enrofloxacino(ug)	32.1615755	82.2900113	86.7465804	139.988994	170.352305	233.367764	651.31932	1010.00273	1300.76389	1548.09218	1640.41692	1678.27256	1961.26611
porcentaje	1%	4%	4%	6%	7%	10%	28%	43%	56%	66%	70%	72%	84%
	34h	36h	48h	58h	60h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Area 1	1710006	1845035	1850137	1491199	1494934	1424712	1535209	1507484	1412639	1415791	1466566	1570746	1741541
Area 2	1652116	1846303	1989337	1470566	1503611	1418820	1464120	1403067	1420792	1361654	1371419	1554799	1730480
Promedio	1681061	1845669	1919737	1480882.5	1499272.5	1421766	1499664.5	1455275.5	1416715.5	1388722.5	1418992.5	1562772.5	1736010.5
concentración ug/mL	3.88886263	4.27039269	4.44206825	3.4248869	3.46751142	3.28786608	3.46842	3.36553474	3.27615998	3.21127753	3.28143764	3.61469236	4.01622513
Enrofloxacino(ug)	2107.76354	2135.19635	2221.03412	2191.92761	2198.40224	2176.56735	2185.1046	2153.94223	2096.74239	2080.90784	2100.12009	2074.83341	2064.33972
porcentaje	90%	91%	95%	94%	94%	93%	93%	92%	90%	89%	90%	89%	88%

MUESTRA 01 CON GEL

MUESTRA 01 CON GEL													
2.31781E-06	0.00751737												
	0.08 h (5min)	0.017h (10min)	0.25 h (15 min)	0.50 h (30 min)	0.75 h (45min)	1h	2h	3h	4h	6h	10h	12h	24h
Area 1	165634	227055	250823	342480	461823	760143	1517233	2133533	2416319	2796133	2827880	2851790	3138640
Area 2	179116	229055	250114	342480	455600	762224	1507095	2056741	2327475	2803383	2799355	3186289	3117323
Promedio	172375	228055	250468.5	342480	458711.5	761183.5	1512164	2095137	2371897	2799758	2813617.5	3019039.5	3127981.5
concentración ug/mL	0.39201513	0.52107079	0.57302102	0.7862862	1.05568873	1.75676136	3.49739147	4.84861212	5.49008922	6.48178972	6.51391341	6.99004257	7.24254943
Enrofloxacino(ug)	196.007564	260.535395	286.510512	393.143099	527.844366	878.380679	1748.69574	2424.30606	2745.04461	2981.62327	3256.9567	3355.22044	3693.70021
porcentaje	5%	6%	7%	9%	13%	21%	42%	58%	65%	71%	78%	80%	88%
	34h	36h	48h	58h	60h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Area 1	3124692	3403479	3499272	3285932	3329786	3353630	2962654	2846023	2807561	2863355	2871873	2850250	2853470
Area 2	3175674	3361441	3460197	3246242	3288243	3348300	2905747	2850387	2802644	2858416	2924284	2898389	3403280
Promedio	3150183	3382460	3479734.5	3266087	3309014.5	3350965	2934200.5	2848205	2805102.5	2860885.5	2898078.5	2874319.5	3128375
concentración ug/mL	7.29400829	7.83238224	8.05784605	7.56265174	7.66214953	7.75938282	6.79340189	6.59408066	6.49417726	6.62347165	6.70967796	6.65460911	7.24346149
Enrofloxacino(ug)	3924.17646	3994.51494	4028.92303	4008.20542	3953.66916	3926.24771	3804.30506	3758.62598	3727.65774	3709.14412	3757.41966	3726.5811	3766.59997
porcentaje	93%	95%	96%	95%	94%	93%	91%	89%	89%	88%	89%	89%	90%

MUESTRA 02 CON GEL

MUESTRA 02 CON GEL													
2.32E-06	0.00751737												
	0.08 h (5min)	0.017h (10min)	0.25 h (15 min)	0.50 h (30 min)	0.75 h (45min)	1h	2h	3h	4h	6h	10h	12h	24h
Area 1	145831	236980	293563	204052	583117	648879	1442477	2043883	2665623	2746370	2758139	2825216	2847857
Area 2	144947	228714	285766	467239	582218	627568	1455743	2032201	2671192	2791880	2807966	2807561	2862041
Promedio	145389	232847	289664.5	335645.5	582667.5	638223.5	1449110	2038042	2668407.5	2769125	2783052.5	2816388.5	2854949
concentración ug/mL	0.32946671	0.53217774	0.6638699	0.77044513	1.34299519	1.47176344	3.35124428	4.71627676	6.17734422	6.41078825	6.44306955	6.52033606	6.60971197
Enrofloxacino(ug)	164.733354	266.088868	331.934952	385.222563	671.497594	735.88172	1675.62214	2358.13838	2470.93769	2718.17422	2963.81199	3064.55795	3503.14734
porcentaje	4%	7%	8%	10%	17%	18%	42%	59%	62%	68%	74%	77%	88%
	34h	36h	48h	58h	60h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Area 1	3175748	3279495	3347373	3325172	2824686	2775446	2949218	2739922	2964992	2934102	3147337	3089309	3056634
Area 2	3176096	3243288	3300066	3283591	2781490	2777020	2938927	3102498	2958712	2926098	3093048	2972009	3041460
Promedio	3175922	3261391.5	3323719.5	3304381.5	2803088	2776233	2944072.5	2921210	2961852	2930100	3120192.5	3030659	3049047
concentración ug/mL	7.3536664	7.55176846	7.69623292	7.65141111	6.48950803	6.42726324	6.81628331	6.76329238	6.85749281	6.78389771	7.22449601	7.01697437	7.05959426
Enrofloxacino(ug)	3676.8332	3775.88423	3848.11646	3810.40274	3815.83072	3727.81268	3748.95582	3719.81081	3703.04612	3663.30476	3756.73792	3718.99641	3812.1809
porcentaje	92%	94%	96%	95%	95%	93%	94%	93%	93%	92%	94%	93%	95%

MUESTRA 03 CON GEL													
2.32E-06	0.00751737												
	0.08 h (5min)	0.017h (10min)	0.25 h (15 min)	0.50 h (30 min)	0.75 h (45min)	1h	2h	3h	4h	6h	10h	12h	24h
Area 1	171154	252445	289515	455948	589884	722182	1453020	2013366	2016379	1909106	2495941	2637962	2987486
Area 2	176929	252038	288065	464466	616680	707797	1401727	2042316	2283306	2977894	2523923	2869784	2913086
Promedio	174041.5	252241.5	288790	460207	603282	714989.5	1427373.5	2027841	2149842.5	2443500	2509932	2753873	2950286
concentración ug/mL	0.39587776	0.5771305	0.66184298	1.05915502	1.39077568	1.64969244	3.3008632	4.69263278	4.97540907	5.65605137	5.81002812	6.37543701	6.83068502
Enrofloxacino(ug)	197.93888	288.565251	330.92149	529.577508	695.387841	824.846221	1650.4316	2346.31639	2487.70454	2771.46517	3079.3149	3187.7185	3483.64936
porcentaje	5%	7%	8%	13%	17%	21%	41%	59%	62%	69%	77%	80%	87%
	34h	36h	48h	58h	60h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Area 1	3040995	2711786	3338756	3428140	3274067	2958950	2837085	3067224	2811205	2762141	2846841	3214801	2848874
Area 2	3064843	3636783	3282857	3211532	3229999	2972773	2852269	2894223	2838171	3158015	2831652	3034853	3408855
Promedio	3052919	3174284.5	3310806.5	3319836	3252033	2965861.5	2844677	2980723.5	2824688	2960078	2839246.5	3124827	3128864.5
concentración ug/mL	7.06856882	7.34987099	7.66630304	7.68723171	7.53007724	6.86678607	6.58590343	6.90123337	6.53957272	6.85338102	6.57331656	7.2352379	7.24459606
Enrofloxacino(ug)	3647.38151	3674.93549	3833.15152	3843.61585	3795.15893	3749.2652	3714.44953	3768.07342	3701.39816	3769.35956	3720.49717	3689.97133	3622.29803
porcentaje	91%	92%	96%	96%	95%	94%	93%	94%	93%	94%	93%	92%	91%

Prueba control 1

	0	5min	10min	15 min	30 min	45min	1h	2h	3h	4h	6h
Area 1	0	116984	161395	302881	418993	504988	844681	1097564	1391233	1427107	1496840
Area 2	0	115751	165690	306802	418123	502208	854272	1117508	1402670	1429251	1494486
Promedio	0	116367.5	163542.5	304841.5	418558	503598	849476.5	1107536	1396951.5	1428179	1495663
concentración ug/mL	0.00E+00	2.76E-01	3.88E-01	7.27E-01	9.99E-01	1.20E+00	2.03E+00	2.65E+00	3.34E+00	3.42E+00	3.58E+00
Enrofloxacino(ug)	0	137.79465	194.2443	363.3226	499.3958	601.15467	1015.033	1323.82688	1670.1415	1707.50829	1.86E+03
porcentaje	0%	7%	10%	18%	25%	30%	51%	66%	84%	85%	93%

	10h	12h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h
Area 1	1432596	1401732	1470603	1403136	1337818	1190856	1433294	1442324	1388889	1392803	1297347
Area 2	1437696	1383470	1436096	1440469	1334187	1160927	1407495	1433216	1391869	1379040	1224424
Promedio	1435146	1392601	1453350	1421803	1336002.5	1175891.5	1420395	1437770	1390379	1385921.5	1260886
concentración ug/mL	3.43E+00	3.33E+00	3.48E+00	3.40E+00	3.19E+00	2.81E+00	3.40E+00	3.44E+00	3.32E+00	3.31E+00	3.01E+00
Enrofloxacino(ug)	1.72E+03	1.66E+03	1.74E+03	1.70E+03	1.60E+03	1.49E+03	1.70E+03	1.72E+03	1.66E+03	1.66E+03	1.51E+03
porcentaje	86%	83%	87%	85%	80%	74%	85%	86%	83%	83%	75%

	240h
Area 1	1316402
Area 2	1262347
Promedio	1289374.5
concentración ug/mL	3.08E+00
Enrofloxacino(ug)	1.60E+03
porcentaje	80%

Prueba control 2

	0	5min	10min	15 min	30 min	45min	1h	2h	3h	4h	6h
Area 1	0	135094	176325	320582	445428	579849	895033	1131298	1398722	1393082	1629995
Area 2	0	139929	176255	316241	443033	582396	894163	1124998	1388968	1384902	1629915
Promedio	0	137511.5	176290	318411.5	444230.5	581122.5	894598	1128148	1393845	1388992	1629955
concentración ug/mL	0.00E+00	3.26E-01	4.19E-01	7.59E-01	1.06E+00	1.39E+00	2.14E+00	2.70E+00	3.33E+00	3.32E+00	3.90E+00
Enrofloxacino(ug)	0	163.09556	209.4979	379.5605	530.11552	693.92048	1069.025	1348.4912	1666.4242	1660.61713	1.95E+03
porcentaje	0%	8%	10%	19%	26%	34%	53%	67%	83%	82%	97%

	10h	12h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h
Area 1	1438554	1430027	1469151	1395457	1332447	1167764	1426636	1447354	1437775	1250182	1292144
Area 2	1442549	1404421	1448072	1434658	1345515	1185539	1424139	1413661	1467325	1277447	1354941
Promedio	1440551.5	1417224	1458612	1415058	1338981	1176651.5	1425388	1430507.5	1452550	1263814.5	1323543
concentración ug/mL	3.44E+00	3.39E+00	3.49E+00	3.38E+00	3.20E+00	2.81E+00	3.41E+00	3.42E+00	3.47E+00	3.02E+00	3.16E+00
Enrofloxacino(ug)	1.79E+03	1.76E+03	1.81E+03	1.76E+03	1.66E+03	1.46E+03	1.77E+03	1.78E+03	1.81E+03	1.57E+03	1.65E+03
porcentaje	89%	87%	90%	87%	83%	73%	88%	88%	90%	78%	82%

	240h
Area 1	1306343
Area 2	1300060
Promedio	1303201.5
concentración ug/mL	3.12E+00
Enrofloxacino(ug)	1.62E+03
porcentaje	80%