



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

MAESTRÍA EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

***MICROESFERAS DE ALGINATO CARGADAS CON ACETAMINOFÉN PREPARADAS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DE SOLVENTE***

**Tesis que para obtener el Grado de Maestra en Metalurgia y Ciencias de los Materiales
presenta**

I.Q. CRISTINA YURITZI VELÁZQUEZ GONZÁLEZ

Asesora

Ph.D. ENA ATHENEA AGUILAR REYES

Morelia, Michoacán Febrero, 2023



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales

Of. Num. IIMM-ST-004-2023
Morelia, Mich., a 21 de Febrero de 2023

ING. CRISTINA YURITZI VELAZQUEZ GONZALEZ
Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Maestra en Metalurgia y Ciencias de los Materiales con la tesis titulada: "MICROESFERAS DE ALGINATO CARGADAS CON ACETAMINOFEN PREPARADAS MEDIANTE LA TECNICA DE EMULSION EVAPORACION DE SOLVENTE", le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

02001578	DRA. ENA ATHENEA AGUILAR REYES	(PRESIDENTE)
02001616	DR. CARLOS ALBERTO LEON PATIÑO	(Vocal)
76005461	DRA. MA. EUGENIA CONTRERAS GARCIA	(Vocal)
97003581	DR. JUAN ZARATE MEDINA	(Vocal)
03003795	DR. HECTOR GUILLERMO CARREON GARCIDUEÑAS	(Vocal)
19000251	DRA. TZARARA LOPEZ LUKE	(Suplente)

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

UMSNH



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales
DIRECCIÓN

Dr. Víctor Hugo López Morelos
Director

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a mi asesora la Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes por brindarme su confianza y permitirme trabajar con ella, gracias a sus conocimientos y enseñanzas se logró el desarrollo de este trabajo. Gracias al Dr. Carlos Alberto León Patiño, Dra. María Eugenia Contreras García, Dr. Juan Zarate Medina, Dr. Héctor Guillermo Carreón Garcidueñas y Dra. Tzarara López Luke por sus consejos, comentarios y colaboración en este proyecto.

Agradezco al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales por permitir que este trabajo fuese llevado a cabo en sus instalaciones. Este trabajo fue apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica (CIC)-UMSNH México. El financiamiento fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concesión No. CVU 1077933) y la Coordinación de la Investigación Científica, gracias por el apoyo para llevar a cabo la realización de este proyecto.

A mis padres Salvador y Ma. Del Carmen que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades.

A mis hermanos Cindy e Iván por su cariño y apoyo incondicional durante todo este proceso. Agradezco también a Jeovani y Melissa por ser parte de esta etapa de mi vida. Especial agradecimiento a Gerardo por su motivación, apoyo y ser partícipe en este camino.

Para mis compañeros que conforman el equipo de trabajo del laboratorio de compuestos y biomateriales, gracias por sus consejos, recomendaciones y palabras de aliento. En especial a Perla por ser mi compañera de trabajo durante estos años, infinitas gracias.

A mis amigas que aun a la distancia fueron parte de este proyecto, ¡gracias!

Finalmente agradecer a Dios, por brindarme la fuerza necesaria para la realización de mis proyectos personales.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Objetivos.....	4
1.1.1 Objetivo general	4
1.1.2 Objetivos particulares.....	4
1.2 Justificación	5
1.3 Hipótesis	6
1.4 Metas científicas	6
CAPITULO 2 REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.....	7
2.1 Biomateriales y su clasificación	7
2.2 Biomateriales poliméricos en aplicaciones médicas.....	8
2.2.1 Alginato como polímero natural, propiedades y aplicaciones biomédicas	9
2.3 Osteoartritis, detección y tratamiento	11
2.4 Sistema de administración de fármacos.....	13
2.4.1 Micropartículas como sistema de liberación.....	14
2.5 Técnicas de microencapsulación	15
2.5.1 Secado por aspersión (spray drying)	16
2.5.2 Extrusión	16
2.5.3 Coacervación.....	16
2.6 Microencapsulación por emulsión-evaporación de solvente	17
2.6.1 Agentes tensoactivos	17
2.6.2 Entrecruzante.....	18
2.6.3 Fármacos para medios de encapsulación	19

2.7 Acetaminofén como agente activo para encapsulación	20
2.8 Factores que influyen en las microesferas de alginato cargadas con fármaco.....	22
2.8.1 Concentración de alginato	22
2.8.2 Fase oleosa	22
2.8.3 Surfactante.....	23
2.8.4 Velocidad de agitación	23
2.9 Mecanismos y cinética de liberación de sustancias activas	24
2.9.1 Difusión.....	24
2.9.2 Disolución	24
2.9.3 Erosión	25
2.10 Modelos cinéticos de liberación de sustancias activas y su criterio de aceptación	25
2.10.1 Orden cero	25
2.10.2 Primer orden.....	26
2.10.3 Modelo de Higuchi.....	26
2.10.4 Modelo de Hixon-Crowell	27
2.10.5 Modelo Rigter-Peppas.....	27
2.11 Estado del arte.....	28
CAPITULO 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
3.1 Diseño de experimentos.....	34
3.2 Materiales.....	35
3.3 Técnicas experimentales	35
3.3.1 Obtención de las microesferas de alginato	35
3.3.2 Adición de fármaco a las microesferas de alginato.....	36
3.4 Caracterización física y microestructural.....	37
3.4.1 Determinación del tamaño y distribución de tamaño de partícula	37

3.4.2 Estudio morfológico.....	37
3.4.3 Difracción de rayos X (DRX)	37
3.4.4 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	37
3.4.3 Análisis térmico simultáneo (TGA/DSC)	38
3.5 Caracterización de las microesferas de alginato	38
3.5.1 Porcentaje de rendimiento.....	38
3.5.2 Porcentaje de pérdida de humedad.....	38
3.5.3 Eficiencia de encapsulación de fármaco	39
3.6 Cinética de liberación de fármaco.....	39
CAPITULO 4 ANALÍISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	40
4.1 Caracterización de las microesferas sin y con carga de fármaco.....	40
4.1.1 Determinación del tamaño y distribución de partícula.....	41
4.1.2 Estudio morfológico.....	45
4.1.3 Difracción de rayos X (DRX)	50
4.1.4 Espectrometría infrarrojo (FTIR).....	53
4.1.5 Análisis térmico simultáneo (TGA/DSC)	58
4.1.6 Porcentaje de rendimiento.....	64
4.1.7 Porcentaje de pérdida de humedad.....	66
4.1.8 Eficiencia de encapsulación de fármaco	68
4.1.9 Cinética de liberación.....	71
4.1.10 Análisis paramétrico de las microesferas	79
CAPITULO 5 CONCLUSIONES	81
RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO	82
REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Alginato como un polisacárido copolimérico formado por los ácidos gulurónico (G) y manurónico (M)._____	10
Figura 2.2	Comparación esquemática de una articulación sana y una con osteoartritis. La osteoartritis implica inflamación, pérdida de cartílago, daño óseo y dolor [9]._____	11
Figura 2.3	Comparación de la concentración de fármaco en sangre para sistemas estables y no estables respecto del tiempo y los niveles de mínima eficacia [26]._____	13
Figura 2.4	Perfiles de concentración de fármaco en sangre por sistemas de liberación pulsátiles en comparación con sistemas de liberación sostenida [26]._____	14
Figura 2.5	Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesfera ____	15
Figura 2.6	Interacción de cadenas poliméricas de alginato de sodio con iones de calcio (Ca^{2+}) situados entre los grupos G con carga negativa [34]._____	18
Figura 2.7	Molécula de fármaco analgésico acetaminofén._____	21
Figura 3.1	Diagrama de flujo por etapas de la metodología experimental._____	33
Figura 3.2	Diagrama de proceso del método emulsión-evaporación de solvente para la obtención de microesferas de alginato._____	35
Figura 4.1	Micrografía de MEs sin fármaco mostrando la presencia de cristales de CaCl_2 _____	40
Figura 4.2	Histograma de tamaño de partícula de microesferas de alginato (a) 2% m/v, y (b) 5% p/v de alginato a tiempos de reticulación de 1 hora ____	42
Figura 4.3	Histograma de tamaño de partícula de microesferas de alginato con (a) 0.1 g, (b) 0.142 g y (c) 0.2 g de acetaminofén. Sintetizadas bajo las condiciones de la formulación SA2CA2.5_1_____	43
Figura 4.4	Gráfico de frecuencia acumulada de tamaño de partícula (a) microesferas sin carga, microesferas con 0.142 y microesferas con 0.2 g de acetaminofén y (b) microesferas con 0.1 g de acetaminofén._____	44
Figura 4.5	Micrografía de alginato de sodio 100X y EDS general._____	45
Figura 4.6	Micrografía de acetaminofén 250X y EDS general._____	46

Figura 4.7	Micrografías de microesferas de alginato (2% p/v) libre de fármaco con tiempos de reticulación de (a) 15 minutos y (b) 60 min, a 5000X.____	46
Figura 4.8	Micrografía de microesferas de alginato (5% p/v) sin carga farmacéutica con tiempos de reticulación de (a) 15 min y (b) 60 min, a 250X._____	47
Figura 4.9	Micrografías por MEB de MEs cargadas con (a) 0.1 g, (b) 0.142 g y (c) 0.2g de acetaminofén a 5000X._____	48
Figura 4.10	Microesfera con carga, mostrando poros nanométricos y superficie rugosa._____	49
Figura 4.11	Micrografía MEs con fármaco:(a) esfera con matriz polimérica degradada; (b) mapeo elemental de microesfera, comprobando la existencia del fármaco._____	50
Figura 4.12	Difractograma de acetaminofén (>99%)_____	50
Figura 4.13	Difractograma de (a) alginato, (b) microesferas de alginato sin carga y (c) microesferas de alginato con acetaminofén._____	53
Figura 4.14	Espectro infrarrojo de acetaminofén._____	54
Figura 4.15	Espectro infrarrojo de alginato y microesferas de alginato._____	56
Figura 4.16	Espectro infrarrojo de microesferas de alginato cargadas con 0.1, 0.142 y 0.2 g de acetaminofén._____	57
Figura 4.17	Diagrama termoanalítico de TGA/DSC de acetaminofén._____	59
Figura 4.18	Diagrama termoanalítico TGA/DSC de alginato._____	60
Figura 4.19	Diagramas termoanalíticos TGA/DSC para microesferas sin carga (a) y microesferas con 0.1 (b), 0.142 (c) y 0.2 (d) g de acetaminofén._____	62
Figura 4.20	Diagrama termoanalítico que representa la derivada del flujo de calor (W/g°C) respecto a la temperatura de las microesferas con 0.1 g acetaminofén. _____	64
Figura 4.21	Espectro UV-VIS de las soluciones patrón de acetaminofén._____	69
Figura 4.22	Curva de calibración para la determinación de acetaminofén presente en las MEs._____	69
Figura 4.23	Sistema de liberación de (a) pastilla convencional 550mg vs (b) microesferas con acetaminofén._____	75

Figura 4.24	Perfil de liberación de acetaminofén desde las microesferas de alginato (MEs 0.1)._____	77
Figura 4.25	Perfil de liberación de acetaminofén desde las microesferas de alginato (MEs 0.141)_____	78
Figura 4.26	Perfil de liberación de acetaminofén desde las microesferas de alginato (MEs 0.2)_____	78
Figura 4.27	Factores de variación en la concentración de solución polimérica.____	79
Figura 4.28	Factores de variación en la cantidad de fármaco reticulado._____	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Clasificación de los biomateriales [11, 12]._____	7
Tabla 2.2	Clasificación de polímeros sintéticos y naturales, según su respuesta al receptor y aplicaciones [14-17]._____	9
Tabla 2.3	Fármacos usados como agentes activos para microesferas de alginato [28]. _____	20
Tabla 2.4	Valor de exponente n [41]._____	28
Tabla 3.1	Variables independientes y sus niveles._____	34
Tabla 3.2	Formulaciones de microesferas de alginato con acetaminofén._____	34
Tabla 4.1	Tamaño de microesferas sin y con carga clasificada en cuartiles.____	43
Tabla 4.2	Distancias interplanares, planos y ángulo de difracción de acetaminofén._____	51
Tabla 4.3	Grupos funcionales pertenecientes al acetaminofén detectados mediante espectrometría infrarrojo._____	55
Tabla 4.4	Grupos funcionales y tipo de vibración molecular pertenecientes al alginato de sodio._____	56
Tabla 4.5	Comparación de longitud de onda de microesferas de alginato sin y con carga farmacéutica._____	58
Tabla 4.6	Descomposición térmica de alginato, resultado del análisis termogravimétrico (TGA)._____	61
Tabla 4.7	Descomposición térmica de alginato, resultado del análisis termogravimétrico (TGA)._____	63
Tabla 4.8	Resultados de porcentaje de rendimiento de las microesferas de alginato._____	65
Tabla 4.9	Resultados de porcentaje de rendimiento de las microesferas de alginato con acetaminofén._____	66
Tabla 4.10	Resultados de pérdida de humedad de microesferas de alginato._____	67
Tabla 4.11	Resultados de pérdida de humedad de las microesferas de alginato con acetaminofén_____	67
Tabla 4.12	Resultados de eficiencia de encapsulamiento en microesferas de alginato con acetaminofén._____	70

Tabla 4.13	Concentración de acetaminofén liberado desde las microesferas._____	72
Tabla 4.14	Resultados de modelos de liberación de fármaco desde las microesferas._____	73
Tabla 4.15	Resultados de los coeficientes de correlación para las microesferas con 0.1 g acetaminofén._____	73
Tabla 4.16	Resultados de los coeficientes de correlación para las microesferas con 0.141 g acetaminofén._____	74
Tabla 4.17	Resultados de los coeficientes de correlación para las microesferas con 0.2 g acetaminofén._____	74

RESUMEN

El alginato es un polisacárido natural de elevado interés por sus condiciones favorables de biocompatibilidad y degradabilidad bajo condiciones fisiológicas normales de pH=7.4 y temperatura de 37°C. Debido a esta cualidad, se utiliza para aplicaciones biomédicas en ingeniería de tejidos, administración de fármacos y recubrimiento de heridas en forma de película. En el presente trabajo se investiga la síntesis de microesferas de matriz polimérica de alginato cargadas con acetaminofén a través de la técnica de emulsión-evaporación de solvente empleando una emulsión agua/aceite (W/O). Se estudia la capacidad de integración y liberación del acetaminofén de manera sostenida en condiciones fisiológicas. Bajo los parámetros de estudio, las microesferas sin carga obtuvieron un tamaño de partícula de $0.98 \pm 0.03 \mu\text{m}$; mientras que las microesferas sintetizadas con 0.1, 0.14 y 0.2 g de acetaminofén se registró un tamaño de partícula de 3.66 ± 0.34 , 1.22 ± 0.40 y $1.02 \pm 0.05 \mu\text{m}$, respectivamente. Empleando microscopía electrónica de barrido, se observaron microesferas con porosidad de 15 y 40 nm. La caracterización microestructural por difracción de rayos X mostró que el acetaminofén presenta estructura cristalina del tipo monoclinica, mientras que el polímero, microesferas sin y con carga carecen de una estructura definida. Por ensayos térmicos simultáneos TGA/DSC se obtuvieron las propiedades térmicas del polímero, fármaco y microesferas, observando que la reticulación de las microesferas retarda la descomposición térmica de la matriz. Una vez determinados los grupos funcionales característicos de los materiales precursores, realizando una comparación de los espectros infrarrojo de microesferas sin y con carga se comprobó la presencia de fármaco en las microesferas con 0.1, 0.142 y 0.2 g de acetaminofén. Se determinó un porcentaje de rendimiento $>70\%$ y un contenido de 40-70% del fármaco. Para los ensayos de cinética de liberación de las microesferas con acetaminofén, en sus distintas formulaciones, fueron suspendidas en buffer fosfato salino a una temperatura de 37°C y pH=7.4, obteniendo una liberación total de fármaco posterior a 15 días y con los modelos matemáticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Rigter-Peppas, se determinó que el proceso de liberación estuvo controlado por los procesos de hinchamiento y erosión de las cadenas poliméricas.

Palabras clave: *alginato, acetaminofén, microesferas, técnica de emulsión-evaporación.*

ABSTRACT

Alginate is a natural polysaccharide of great interest due to its favorable biocompatibility and degradability conditions under normal physiological conditions of pH=7.4 and a temperature of 37°C. Due to this quality, it is used for biomedical applications in tissue engineering, drug delivery, and wound coating in film form. In the present work, the synthesis of alginate polymeric matrix microspheres loaded with acetaminophen through the emulsion-solvent evaporation technique using a water/oil emulsion (W/O) is investigated. The ability to integrate and release acetaminophen in a sustained manner under physiological conditions is studied. Under the study parameters, the uncharged microspheres obtained a particle size of $0.98 \pm 0.03 \mu\text{m}$; while the microspheres synthesized with 0.1, 0.14 and 0.2 g of acetaminophen had a particle size of 3.66 ± 0.34 , 1.22 ± 0.40 and $1.02 \pm 0.05 \mu\text{m}$, respectively. Using scanning electron microscopy, microspheres with porosity of 15 and 40 nm were observed. Microstructural characterization by X-ray diffraction showed that acetaminophen has a monoclinic crystal structure, while the polymer, charged and uncharged microspheres, lack a defined structure. By simultaneous TGA/DSC thermal tests, the thermal properties of the polymer, drug and microspheres were obtained, observing that the crosslinking of the microspheres retards the thermal decomposition of the matrix. Once the characteristic functional groups of the precursor materials were determined, comparing the infrared spectra of microspheres with and without charge, the presence of drug in the microspheres was verified with 0.1, 0.142 and 0.2 g of acetaminophen. A yield percentage >70% and a content of 40-70% of the drug were determined. For the release kinetics tests of the microspheres with acetaminophen, in their different formulations, they were suspended in saline phosphate buffer at a temperature of 37°C and pH=7.4, obtaining a total drug release after 15 days and with the models mathematicians of zero order, first order, Higuchi and Rigter-Peppas, it was determined that the release process was controlled by the processes of swelling and erosion of the polymeric chains

Keywords: *alginate, acetaminophen, microspheres, emulsion-evaporation technique.*

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha estudiado el uso de micromoléculas biodegradables de polímeros biocompatibles portadoras de agente activo, como un mecanismo de liberación controlada. Se han designado aplicaciones específicas para el material empleado como matriz y los niveles de porosidad de las micromoléculas. Por ejemplo, las microesferas porosas de polímero se han investigado para el transporte y liberación de fármacos y otros compuestos biológicos, mientras que las fabricadas a base de cerámicos y vidrios bioactivos se han investigado principalmente para la regeneración de tejido óseo [1]. Estos sistemas de liberación de fármacos permiten una administración eficiente dentro del rango terapéutico deseado, evitando un exceso o un déficit, que podrían afectar su eficacia antes de administrar la siguiente dosis. Propiedades como área superficial, porosidad y volumen asociados a las microesferas hacen que se conviertan en un excelente candidato como vehículo de portadores biológicos directamente en el sitio requerido.

Existen diversos métodos de síntesis de microesferas, clasificándose en procesos fisicoquímicos, químicos, físicos y mecánicos. La selección de un método de preparación apropiado depende de la naturaleza y propiedades del polímero, así como también del agente activo a utilizar, el cual puede o no afectar las propiedades de las microesferas.

El uso de sistemas de administración de fármacos muestra un gran potencial para prolongar la vida media de los fármacos debido a que los agentes formadores de biopelículas de estos sistemas ayudan a proteger los fármacos y evitan la degradación espontánea. Por ello, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de microesferas de alginato con capacidad de encapsular acetaminofén, que consistió en una técnica de emulsión de agua en aceite y evaporación de solvente, con CaCl_2 como agente reticulante, donde se demostró la capacidad de integración y liberación sostenida de acetaminofén en condiciones fisiológicas. Una de las grandes ventajas que presenta este método de síntesis, es que, mediante la manipulación adecuada de las variables de proceso como concentración de polímero en solución acuosa, tipo de surfactante, velocidad de agitación y la relación entrecruzante-polímero se pueden obtener tamaños de partícula, rendimiento y eficiencia de carga de las microesferas adecuados según la aplicación [2]. En el primer capítulo se presentan los objetivos que se plantearon en esta investigación, así como la justificación, explicando que el uso de polímeros hidrofílicos, como el alginato, ofrecen una ventaja determinante al ser inmunotolerables y ser estar aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados

Unidos para su uso en humanos en ciertas aplicaciones biomédicas [3]. El Capítulo 2 aborda conceptos generales tales como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, tipo de biomateriales y características que deben poseer para ser utilizados como sistemas de liberación. Se mencionan también los tipos de fármacos que existen para medios de encapsulación, y los modelos matemáticos establecidos para predecir el tipo de mecanismo de liberación que rigen los sistemas microesfera-fármaco. El Capítulo 3 muestra el diseño de experimentos donde se consideraron las mejores condiciones para la síntesis de microesferas de alginato mediante el método de emulsión-evaporación de solvente. También se incluyen las técnicas de caracterización, así como los procedimientos analíticos a los que se sometieron los materiales precursores y las microesferas sin y con carga. En el Capítulo 4 se presentan los resultados y se realiza la discusión de los mismos a partir de las caracterizaciones realizadas donde se muestra la forma, estructura, morfología, composición y propiedades térmicas de los materiales precursores y el producto de la síntesis. Finalmente, el Capítulo 5 resume las principales conclusiones del proyecto.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Proponer las condiciones experimentales de síntesis de microesferas de alginato mediante la técnica emulsión-evaporación de solvente con la capacidad de encapsular y liberar acetaminofén de manera sostenida en condiciones fisiológicas.

1.1.2 Objetivos particulares

- Producir microesferas de alginato mediante el método emulsión-evaporación de solvente con la capacidad de integrar un fármaco modelo.
- Determinar el tamaño y distribución de tamaño de las microesferas sin y con carga de fármaco.
- Determinar por microscopia electrónica de barrido (MEB) y difracción de rayos X (DRX) la estructura y morfología que presentan las microesferas sin y con carga farmacéutica.
- Identificar los grupos funcionales y tipo de vibración molecular de las microesferas, sin y con carga farmacéutica, mediante espectrometría infrarroja (FT-IR).

- Realizar la caracterización térmica de las microesferas por análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Evaluar el porcentaje de rendimiento y porcentaje de pérdida de humedad de las microesferas obtenidas. Así como la eficiencia de encapsulación de fármaco de las microesferas de alginato con acetaminofén.
- Determinar la cinética de liberación del fármaco, utilizando como medio de dispersión tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS), por análisis de absorbancia mediante espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis).

1.2 Justificación

La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa del cartílago en los huesos que afecta socialmente alrededor del 10% de hombres y 18% de mujeres mayores de 60 años. Un estudio en México demuestra que la osteoartritis se encuentra dentro de las 10 causas de invalidez total, restando 2.3 años de vida saludable [4, 5]. Tradicionalmente, el tratamiento de la osteoartritis consiste en el manejo del dolor. Las recomendaciones de la *European League against Rheumatism* y *National Institute for Health and Care Excellence* recomiendan el uso "oral" de acetaminofén como tratamiento farmacológico de primera línea para el dolor leve a moderado de la osteoartritis, gracias a su bajo costo, facilidad de adquisición, eficacia y un perfil de seguridad más favorable que otras opciones de fármacos [6, 7]. Por otro lado, el tratamiento presenta una disminución de los niveles terapéuticos en periodos menores a 12 horas.

En los países desarrollados la carga socioeconómica es grande y cuesta entre el 1.0% y 2.5 % del PIB [5]. Sea a modo de ejemplo, en Estados Unidos los gastos de atención médica asociados con la OA son de aproximadamente \$185.5 mil millones de dólares anuales empleando tratamientos convencionales, por lo cual se ha recurrido a la investigación de tratamientos administrados vía intra-articular, reduciendo los costos anuales hasta un 53% [8, 9]. Uno de los sistemas de entrega más utilizados son las microesferas, debido a sus propiedades como área superficial, porosidad y volumen, lo que las convierte en excelentes candidatas como transportadores de fármacos y vehículos de administración directamente en el sitio requerido.

Dicho esto, el presente proyecto de investigación se llevará a cabo para la obtención de microesferas portadoras de fármaco con la capacidad de ser administradas por vía intra-articular y

proporcionar una liberación de fármaco sostenida, minimizando el riesgo de cristalización del medicamento y asegurando la entrega de fármaco en la zona requerida. Además, los subproductos ocasionados por la degradación de la matriz polimérica pueden ser desechados fácilmente por el cuerpo sin ocasionar daño alguno y al mismo tiempo proporcionar un alivio del dolor al receptor.

1.3 Hipótesis

Las propiedades hidrofílicas y el nivel de entrecruzamiento del alginato con cationes divalentes de calcio permitirán obtener microesferas de alginato con acetaminofén por el método de emulsión- evaporación de solvente, las cuales cumplirán con las propiedades de tamaño, biodegradabilidad, morfología, estructura y una reticulación adecuada provista por el entrecruzamiento de los átomos de calcio con los grupos funcionales del polímero, lo que posibilitará su uso como sistemas de liberación sostenida, sin comprometer la eficacia de la entrega del fármaco.

1.4 Metas científicas

- Las propiedades fisicoquímicas del surfactante y los factores que intervienen en el proceso de emulsión permitirán que las microesferas cumplan con diámetro de partícula máximo 5 μm .
- Se logrará un porcentaje de rendimiento de 60-80% sujeto a la relación polímero-agente entrecruzante.
- Las propiedades fisicoquímicas del polímero y fármaco, así como la tasa de evaporación del solvente proporcionará obtener eficiencia de encapsulamiento entre 50-70%.

CAPITULO 2 REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se detalla información acerca de las propiedades y clasificación de los biopolímeros empleados como sistemas de liberación. Se describen los diferentes métodos de obtención de microesferas, haciendo énfasis en el método de emulsión-evaporación y los factores que intervienen en el proceso de síntesis. Además, se describen los modelos matemáticos que definen el mecanismo de liberación de los agentes activos desde las microesferas. Por último, se realizó una revisión del estado del arte de microesferas de alginato portadoras de fármaco para la aplicación en diversas áreas de la biomedicina.

2.1 Biomateriales y su clasificación

Se define a un biomaterial como un material que ha sido diseñado con la capacidad de apoyar, mejorar o reemplazar la función de un tejido humano. Un biomaterial es todo aquel material que es biocompatible con el receptor, el cual puede ser de origen natural o sintético.

Williams [10] sugiere que la biocompatibilidad se refiere a la capacidad de actuar con una respuesta apropiada del huésped en una aplicación específica. En pocas palabras, ningún daño al organismo huésped define la biocompatibilidad.

Se sabe que los biomateriales son diseñados y fabricados para mejorar la calidad de vida del receptor, cumpliendo con la biocompatibilidad como característica prioritaria, sin embargo, no siempre es esto posible, de esta manera es permisible clasificar a los biomateriales respecto a su biocompatibilidad, existiendo entonces aquellos materiales carcinogénicos, citotóxicos, mutagenéticos, pirogénicos y alergénicos. La Tabla 2.1 clasifica a estos biomateriales con el tipo de biocompatibilidad y sus reacciones en el cuerpo humano.

Tabla 2.1 Clasificación general de los biomateriales [11, 12].

Tipo de material	Respuesta en el receptor
Bioinerte	Sin reacción en el entorno biológico.
Biotolerante	Formación de cápsulas delgadas de tejido conectivo, sin adherencia a la superficie del implante.

Bioerosionable	Respuesta positiva, capacidad de llevar a cabo la liberación controlada de medicamento, naturalmente degradado o absorbido en el tejido vivo para regenerar o reparar el tejido con el paso del tiempo según su aplicación.
Biodegradable	Formación de una unión interfacial entre el tejido y el material, para reparar o regenerar el tejido.

2.2 Biomateriales poliméricos en aplicaciones médicas

Los polímeros son moléculas extensas de elevado peso molecular, formados por unión covalente de unidades repetitivas denominadas “monómeros”. Químicamente, los polímeros se basan en carbono e hidrógeno.

La selección de un polímero para una aplicación dada estará determinada por las complejas propiedades de estas macromoléculas. Los polímeros pueden ser naturales o sintéticos, y en ambos casos es posible encontrar composiciones bioestables (para reemplazos permanentes, parcial o total de órganos y/o tejidos), biodegradables y bioerosionables.

Los polímeros sintéticos son más versátiles. Son polímeros manufacturados por el hombre y se emplean en diversas áreas. Dentro de los biomateriales, los polímeros usados para este ámbito son diseñados de acuerdo con la aplicación y propiedades de éstos mismos.

Los biomateriales poliméricos naturales son polimerizados en seres vivos, sean estos animales, plantas, microorganismos u hongos, que posteriormente son reservados hasta su uso. Este tipo de materiales y sus derivados tienen cualidades como: alta biocompatibilidad, respuesta inmune *in vivo* aceptable, buena funcionalidad y durabilidad [13].

La Tabla 2.2 muestra un resumen de la clasificación de polímeros sintéticos y naturales en los diferentes grupos, su respuesta en el receptor y aplicaciones más comunes.

Tabla 2.2 Clasificación de polímeros sintéticos y naturales, según su respuesta al receptor y aplicaciones. [14-17]

Tipo de material	Respuesta en el receptor	Polímeros sintéticos	Aplicaciones	Polímeros naturales	Aplicaciones
Bioinerte	Sin respuesta en el receptor	Propileno, PET	Articulación de dedo, dispositivo de apoyo cardiaco.	Fibroína de seda	Andamios y lentes de contacto.
		Silicón	Lentes de contacto, catéter.	Colágeno	Sustituto de vasos sanguíneos pequeños.
Bioerosionable	Respuesta positiva, capacidad de llevar a cabo la liberación controlada de medicamento	Poliuretano	Vehículos de suministro de fármacos.	Alginato, quitosano	Vehículos de suministro de fármacos
Biodegradable	Respuesta positiva, buena degradación química con el paso del tiempo según su aplicación.	PLA, PGA	Suturas quirúrgicas autoabsorbibles y andamios artificiales para regeneración de tejido óseo.	Almidón, celulosa, colágeno	Recubrimiento de heridas en forma de películas.

2.2.1 Alginato como polímero natural, propiedades y aplicaciones biomédicas

El alginato es un polisacárido aniónico e hidrofílico natural formado por la unión de los ácidos manurónico (M) y gulurónico (G) mediante los carbonos 1-4 (Figura 2.1) generalmente obtenido

de las paredes celulares de algas pardas (marrones). Existen diferentes arreglos moleculares entre los grupos D-manurónico y L-gulurónico, dichos arreglos son dependientes del pH en el que se encuentre el polisacárido, para pH neutros el polisacárido gelifica utilizándose de esta manera para hidratación y liberación de agentes activos. El alginato es un polímero natural de bajo costo, baja toxicidad y elevada biocompatibilidad y degradabilidad [2, 18].

El peso molecular del alginato afecta la tasa de degradación y las propiedades mecánicas de los biomateriales a base de alginato. Un peso molecular significativamente mayor reduce el número de sitios de reacción disponibles para la degradación hidrolítica, lo que contribuye aún más a la tasa de descomposición lenta. Además, la degradación inherente también afecta las propiedades mecánicas debido a cambios estructurales tanto a nivel molecular como macroscópico [19].

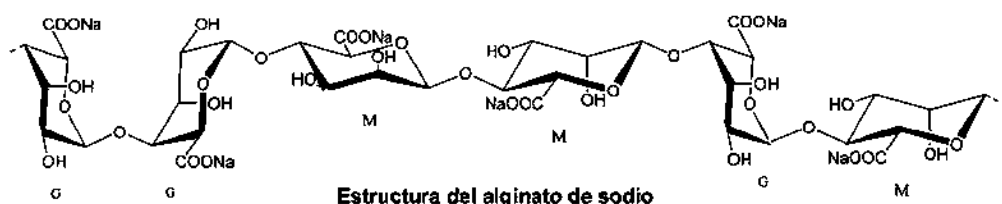


Figura 2.1 Alginato como un polisacárido copolimérico formado por los ácidos gulurónico (G) y manurónico (M).

Dentro de la industria farmacéutica ha sido utilizado en los últimos años para la encapsulación y liberación de fármacos debido a sus óptimas propiedades, tales como: (1) un ambiente acuoso parcialmente inerte dentro de la matriz; (2) procesos de encapsulación realizados a temperatura ambiente sin el uso de solventes orgánicos tóxicos; (3) un alto grado de porosidad el cual permite una elevada difusión para las macromoléculas; (4) disolución y biodegradación del sistema bajo condiciones fisiológicas normales (pH=7.4) [20].

Las microesferas poliméricas fabricadas con una matriz de alginato, han sido utilizadas como gelificantes para tratamientos del reflujo esofágico, encapsulación de fármacos, células y posteriormente su liberación de agentes activos para tratar zonas inflamadas como el intestino y el colon, la fabricación de andamios en el área de ingeniería de tejidos, en el campo dermatológico para la cicatrización de heridas y en odontología como material para impresiones dentales o la

fabricación de moldes para producción de una copia a nivel completo del complejo óseo, fijación y elaboración de prótesis [1, 2].

2.3 Osteoartritis, detección y tratamiento

Los huesos del cuerpo humano se clasifican por su forma y microestructura. Los huesos están conformados por minerales como los fosfatos de calcio (hidroxiapatita cristalina), que en conjunto constituyen más de la mitad de la masa ósea, así como también contienen agua y fibras proteínicas.

Las enfermedades osteoartíticas se caracterizan por el daño progresivo generado en una o varias articulaciones como rodilla, cadera, hombro y manos, produciendo así una pérdida de función y dolor. La Figura 2.2 muestra gráficamente el desgaste de la zona articular donde la alteración de la homeóstasis tisular típicamente conduce a la destrucción progresiva del cartílago articular con descomposición de proteoglicanos, muerte de condrocitos y esclerosis del hueso subcondral, y finalmente se acompaña de inflamación sinovial y formación de osteocitos.



Figura 2.2 Comparación esquemática de una articulación sana y una con osteoartritis. La osteoartritis implica inflamación, pérdida de cartílago, daño óseo y dolor [9].

Actualmente, el diagnóstico de la osteoartritis se establece convencionalmente mediante imágenes de rayos X, resonancia magnética y/o mediante análisis de líquido articular. Además, la tomografía

de coherencia óptica (OCT) tiene el potencial de ser un indicador de pronóstico mínimamente invasivo para la osteoartritis en el futuro [4].

Las opciones de tratamiento dependen en gran medida de la gravedad de la osteoartritis y del dolor que sienten los pacientes. La primera opción es tratar el dolor sintomático con analgésicos y antiinflamatorios ya sea que la administración sea por vía oral (comprimidos), parenteral o tópica (crema o ungüentos). En la actualidad se ha recurrido al uso de tratamientos intra-articulares (IA), esto se refiere al uso de sistemas de liberación controlada administrados por vías IA. Dicho tratamiento presenta grandes ventajas sobre las administraciones convencionales, destacando una mayor biodisponibilidad local, costos y exposición sistémica reducidos [21]. Una desventaja evidente de las inyecciones IA es la molestia y el dolor que pueden causar y el posible riesgo de infección. Por lo tanto, el número de inyecciones IA por año debe reducirse al mínimo [22].

Abd-Allah y col. [23] sintetizaron microesferas de quitosano/tripolifosfato cargadas con lornoxicam, mediante la técnica de gelación ionotrópica, las cuales fueron administradas vía IA, las microesferas optimizadas fueron testadas en un modelo de osteoartritis inducida por monoyodoacetato en ratas, logrando tiempos de retención de 8 días.

Arunkumar y col. [24] empleando la técnica de emulsión-evaporación en una emulsión aceite/agua (O/W), produjeron microesferas de policaprolactona (PCL) con etoricoxib (COX 2 inhibitor) como un sistema de administración de fármacos intra-articulares para el tratamiento de la osteoartritis. El análisis *in vivo* de las microesferas cargadas fue realizado en 4 ratas (Sprague Dawley rats), mostrando que las microesferas podrían prolongar la retención del fármaco en la región sinovial hasta aproximadamente 4 semanas.

Horisawa y col. [25] elaboraron microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), cargadas con fosfato de sodio de betametasona (BSP) como sistema de liberación IA. Los estudios de liberación *in vitro* demostraron que la liberación fue constante durante 3 semanas, mientras que en los ensayos *in vivo*, probados en conejo artrítico (artritis inducida por antígeno), la inflamación disminuyó significativamente en un lapso de 21 días.

2.4 Sistema de administración de fármacos

Los sistemas convencionales de administración de fármacos usualmente son por vía oral, rectal y parenteral. Una desventaja de los sistemas convencionales de administración es el déficit en la concentración de agentes terapéuticos por lo que se requiere una frecuente administración de dosis. Debido a esto se presentan elevados niveles de fármacos en sangre por arriba del límite tóxico posterior a la administración, al paso del tiempo estos niveles disminuyen por debajo del nivel terapéutico y es hasta entonces cuando se requiere la siguiente dosis. Esto no significa que la eficiencia del fármaco se vea afectada por el medio de administración, el medicamento es efectivo siempre que su concentración en la sangre sea superior a la concentración efectiva mínima, independientemente de los perfiles farmacocinéticos (esto supone que la concentración máxima del fármaco es inferior al nivel tóxico del fármaco), tal como se muestra en la Figura 2.3.

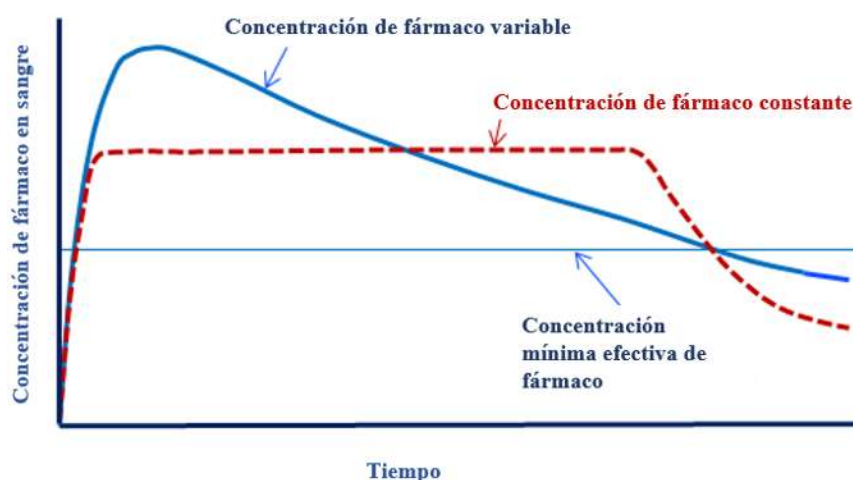


Figura 2.3 Comparación de la concentración de fármaco en sangre para sistemas estables y no estables respecto del tiempo y los niveles de mínima eficacia [26].

Uno de los retos más desafiantes en la administración de fármacos es el uso de aquellos medicamentos que requieren una administración en el momento adecuado, un ejemplo es el uso de insulina, la cual debe ser administrada cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, por lo que una administración constante y sostenida de dicho fármaco produciría una hipoglucemia en el receptor. A este tipo de liberación se le conoce como liberación pulsátil [26].

Los sistemas de liberación pulsátil requieren un sensor (switch) con la capacidad de entregar la cantidad de fármaco exacta en el momento adecuado. La Figura 2.4 representa gráficamente los perfiles de concentración de fármaco en sangre respecto al tiempo para los sistemas de liberación pulsátil y sostenida.

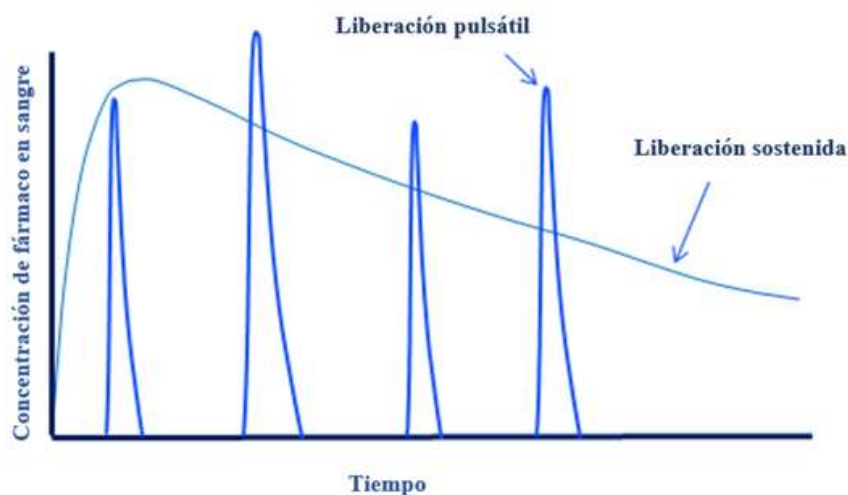


Figura 2.4 Perfiles de concentración de fármaco en sangre por sistemas de liberación pulsátiles en comparación con sistemas de liberación sostenida [26].

2.4.1 Micropartículas como sistema de liberación

Las micropartículas tienen un diámetro dentro del rango de los micrómetros (μm) y pueden dividirse en microcápsulas o microesferas.

La microencapsulación surge en el año 1931. Las microcápsulas son partículas de forma esférica que están constituidas por un recubrimiento sólido y en su interior contienen un agente activo, ya sea que éste se encuentre en estado sólido o líquido, con el propósito de conseguir una liberación sostenida o prolongada de fármacos [27].

Las microesferas (MEs) son partículas esféricas sin una distinción entre la cubierta y el núcleo. Poseen una estructura monolítica donde el fármaco está incorporado dentro de la matriz polimérica. Las partículas esféricas consisten en un tamaño que oscila entre 1 y 1000 μm . Son utilizadas para proteger los medicamentos de los efectos ambientales (humedad, calor, oxidación) [28].

La Figura 2.5 representa un esquema de una nanocápsula y una nanoesfera, esquemáticamente la representación es la misma para microesferas y microcápsulas, diferenciándose entre sí por el tamaño.

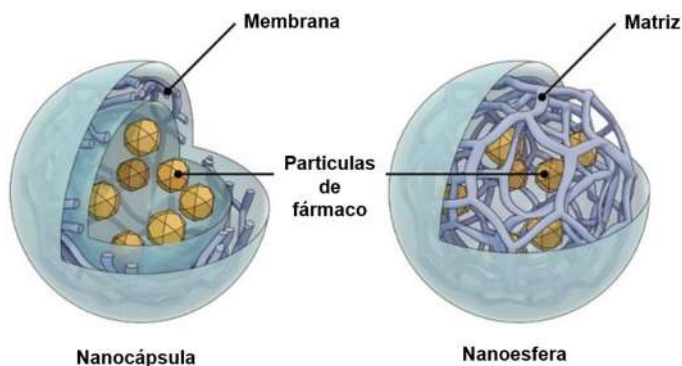


Figura 2.5 Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesfera [29].

Una de las aplicaciones más predominantes para el uso de microesferas es el buen funcionamiento que tienen como vehículo de administración de fármacos. Especialmente los materiales biocompatibles y biodegradables. Gracias a su esferoidización, una de las grandes ventajas que tiene los sistemas de encapsulación, es la protección que brinda hacia agentes frágiles como ácidos nucleicos y proteínas, agentes terapéuticos, factores de crecimiento, etc., que de otro modo serían fácilmente destruidos por el cuerpo y asegurando a la vez una administración eficaz. Debido a su tamaño pequeño, los sistemas microesféricos pueden ser inyectados con una jeringa convencional, sin necesidad de intervención quirúrgica.

2.5 Técnicas de microencapsulación

Las técnicas de encapsulación se pueden clasificar en base a los métodos empleados los cuales pueden ser, físicos, químicos, mecánicos y fisicoquímicos. Dichos métodos contienen diferentes técnicas, uno de los factores de selección para dichas técnicas es el costo de elaboración, tiempos de producción, tamaño de partícula, sustancia a encapsular y el tipo de polímero.

2.5.1 Secado por aspersión (*spray drying*)

El principio activo se dispersa en una solución del material de recubrimiento. Posteriormente, la solución dispersa se pulveriza en una cámara (en cuyo interior transita aire caliente), evaporando el disolvente y obteniendo así las microesferas. Se caracteriza por ser un proceso rápido, continuo y de un solo paso para producción de microesferas en grandes cantidades. Sin embargo, resulta ser un proceso de alto costo, limitándose a ciertos rangos de viscosidad, una inestabilidad térmica y bajos rendimientos [28].

2.5.2 Extrusión

La técnica de extrusión es una técnica simple y ampliamente utilizada en la fabricación de microesferas cargados de fármacos mediante gelificación iónica del polímero, que implica una reacción simple de difusión y reticulación. Por lo tanto, el método de extrusión también se conoce como método de gelificación iónica. La técnica consiste en formar una dispersión del fármaco en la solución polimérica, la cual posteriormente es goteada (extruida) a través de una herramienta de goteo simple (p. ej., una jeringa o una pipeta) o una herramienta compleja, p. agujas de acero inoxidable en un baño de gelificación que contiene el agente reticulante. Aquí, los iones del polímero son reemplazados por los iones del agente reticulante los cuales endurecen la membrana para formar partículas y obtener las microesferas.

2.5.3 Coacervación

Esta técnica se conoce también como separación de fases. A partir de la formación de una emulsión agua en aceite (W/O), la solución del agente activo se agrega gota a gota a la emulsión formada, posteriormente la solución de agente activo y polímero se separa en dos fases para que el polímero recubra el agente activo. Al reducir la solubilidad de la matriz en la suspensión, las partículas de gel producidas se forman por aglomeración. El polímero se deposita en la superficie del agente activo para formar microesferas cargadas [30].

2.6 Microencapsulación por emulsión-evaporación de solvente

El procesamiento por emulsión-evaporación del solvente es el método ampliamente usado en la preparación de MEs a partir de polímeros biodegradables. En primer lugar, es necesaria la formación de una emulsión la cual puede ser simple o compleja. La elección de la fase interna y externa depende de las propiedades hidrofílicas-hidrofóbicas del principio activo. La precipitación del material polimérico se logra al evaporar el solvente. Posteriormente, las MEs formadas son lavadas y recolectadas por filtración o centrifugación, y secadas por liofilización u otro proceso de secado.

2.6.1 Agentes tensoactivos

Los surfactantes son sustancias químicas que poseen doble afinidad, una cabeza polar (hidrofílica) y una cola no polar (hidrofóbica). Esta estructura les permite migrar y adsorberse en la interfase. Los agentes tensoactivos pueden clasificarse como tensoactivos catiónico o aniónico, dependiendo de la carga (positiva o negativa) que posee la zona hidrofílica. En cambio, si éste no presenta una carga iónica en la cabeza hidrofílica se le conoce como tensoactivo no iónico [31].

Puesto que las cadenas poliméricas son poco solubles en agua, la función principal de los agentes tensoactivos es minimizar la interfaz de contacto agua-hidrocarburo en la solución acuosa de una emulsión. La selección de un tensoactivo dependerá del tipo de emulsión a formar, de manera empírica se pueden considerar las escalas establecidas por Griffin [32] del balance hidrofílico-lipofílico (HLB - *Hydrophilic-Lipophilic Balance*) de los agentes tensoactivos; esto es, cuanto mayor sea el valor HLB del tensoactivo, más hidrofílico es y viceversa, cuanto menor es el valor HLB del tensoactivo, más lipofílico es. Para el caso de una emulsión agua en aceite (W/O), los valores de HLB del tensoactivo deben estar entre 1 y 4, mientras que para emulsiones aceite en agua (O/W), los valores de HLB del tensoactivo suelen encontrarse entre 10 y 13 [33].

Los emulsionantes no iónicos como Span 80 (HLB de 4.3) y Span 85 (HLB de 1.8) se indican como tensoactivos para la fabricación de microesferas de alginato. Comúnmente, la fase oleosa para la fabricación de MEs de alginato es parafina líquida, por lo que el Span 80 es el tensoactivo más común ya que se disuelve de manera efectiva en la parafina líquida o aceite mineral, puesto que posee un valor HLB bajo que indica que es lipofílico y adecuado para emulsiones de agua en aceite (W/O) [28].

2.6.2 Entrecruzante

En la formación de microesferas de alginato se ha estudiado el uso de cationes divalentes, tal es el caso del uso de iones calcio (Ca^{2+}), con el propósito de reducir la disolución de la matriz del polímero proporcionando un endurecimiento en las partículas de alginato. Morris y col. [34] establecieron un modelo conocido como “caja de huevo” (Figura 2.6); en presencia de calcio, el alginato tiende a formar una estructura donde los iones libres de calcio (Ca^{2+}) tienden a situarse entre los grupos de carga negativa del ácido gulurónico (G), formando una estructura polimérica de doble hélice.

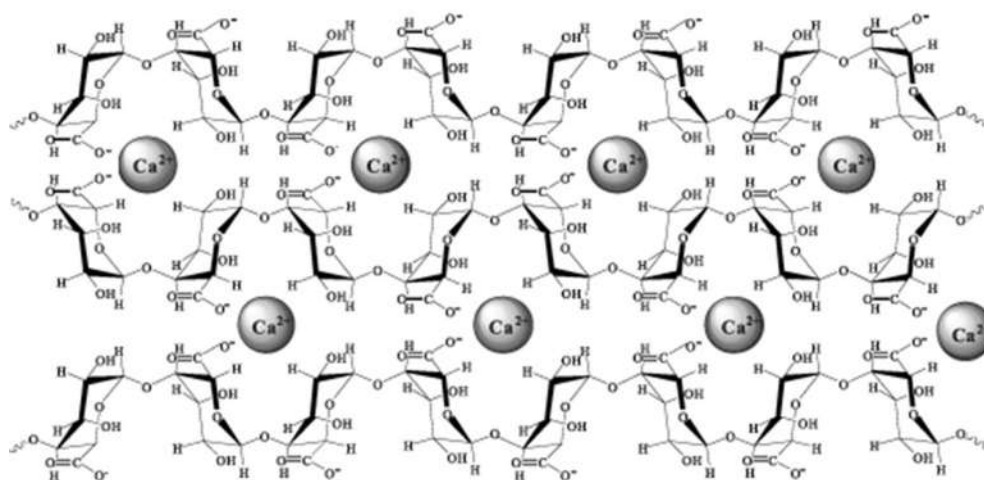


Figura 2.6 Interacción de cadenas poliméricas de alginato de sodio con iones de calcio (Ca^{2+}) situados entre los grupos G con carga negativa [34].

Al estudiar el efecto de la concentración de CaCl_2 sobre las características de las MEs cargadas con fármaco obtenidas mediante el método emulsión-gelificación, Baimark y col. [36] descubrieron que las bajas concentraciones de Ca^{2+} (0.5% - 1.25% p/v) producen un efecto de aglomeración de las MEs fabricadas, puesto que la concentración de reticulante no es suficiente para endurecer las microesferas. Rastogi y col. [37] enfatizaron que la condición óptima para una adecuada encapsulación es una concentración de 7.5% p/v de CaCl_2 . Un aumento en la concentración de CaCl_2 favorece la eficiencia de encapsulación, ya que se puede lograr hasta un 98% de eficiencia de encapsulamiento (E.E.) debido a la presencia de una red mayormente reticulada.

2.6.3 Fármacos para medios de encapsulación

Se conoce como fármaco a cualquier compuesto biológicamente activo capaz de modificar el metabolismo de las células sobre las que actúa. En el campo de la medicina, medicina veterinaria y otras ciencias, los fármacos se utilizan con el fin de curar, prevenir enfermedades, reducir sus efectos en el organismo o simplemente aliviar el dolor físico. Existen diversos métodos de clasificación de fármacos ya sea por su efecto terapéutico, según su método de aplicación o bien por sus propiedades físicas (hidrofóbicos o hidrofílicos). Los fármacos hidrofílicos normalmente se excretan directamente por los riñones, mientras que los fármacos hidrofóbicos experimentan una biotransformación antes de la excreción, con la finalidad de desintoxicar las sustancias exógenas como para aumentar su hidrofiliidad, asegurando su eliminación a través de los riñones [38].

Para lograr la encapsulación de fármacos hidrofóbicos se ha empleado el uso de ciclodextrinas ya que son capaces de modificar favorablemente las propiedades biofarmacéuticas no deseadas del fármaco, como la baja estabilidad química y la solubilidad acuosa limitada mediante la formación de complejos de inclusión [39]. Cheng y col. [40] realizaron la síntesis de microesferas de PLGA cargadas con complejos de β -ciclodextrina (β -CD) y epigallocatequina-3-galato (EG) para las propiedades antiinflamatorias en células microgliales activadas, demostrando que el uso de β -CD puede aumentar la eficiencia de carga de EG en microesferas de PLGA y proporcionar un efecto neuro protector en las células microgliales activadas.

El efecto terapéutico de las moléculas hidrofílicas está limitado por la eliminación rápida de la circulación sistémica o del sitio local de administración. La farmacocinética y la biodistribución inadecuadas pueden mejorarse encapsulándolas en sistemas de administración de fármacos. Sin embargo, la alta solubilidad en agua, la naturaleza altamente hidrofílica y el bajo peso molecular dificultan la encapsulación de moléculas hidrofílicas en muchos sistemas de administración de fármacos. En comparación con otros sistemas de liberación, los sistemas microencapsulados otorgan un mayor potencial como portadores de fármacos debido a la estabilidad y la baja permeabilidad, a causa del grosor de la membrana, el entrecruzamiento y la difusividad lateral de la pared polimérica. Las propiedades de los sistemas microencapsulados, incluido el tamaño, la permeabilidad y la propiedad de carga, son mucho más versátiles gracias a la disponibilidad abundante de polímeros naturales y sintéticos [41].

La Tabla 2.3 enlista algunos fármacos encapsulados en sus diferentes técnicas empleadas, conteniendo el alginato como matriz polimérica.

Tabla 2.3 Fármacos usados como agentes activos para microesferas de alginato [28].

Sustancia activa	Técnica empleada
Ibuprofeno	Extrusión
Dextrano azul	Extrusión; emulsión-evaporación
Curcumina	Extrusión
Astaxantina	Extrusión
Icariin	Emulsión-evaporación
Cafeína	Secado por aspersión
Insulina	Secado por aspersión
Diclofenaco sódico	Emulsión-evaporación
Aceclofenaco	Extrusión
Risperidona	Extrusión

2.7 Acetaminofén como agente activo para encapsulación

Se han estudiado diferentes fármacos como agentes activos para encapsulación y su posterior liberación controlada en el medio receptor. Dada la aplicación y problemática a tratar, el fármaco de interés para este proyecto es acetaminofén (paracetamol).

El acetaminofén es un fármaco ampliamente usado en la vida cotidiana debido a su función analgésica para tratar dolor leve y/o moderado. Es considerado como un medicamento AINE (medicamentos antiinflamatorios no esteroideos) al no poseer efectos secundarios sobre órganos como estómago, esófago, intestino grueso y delgado. El acetaminofén produce analgesia por un mecanismo de inhibición de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. Ha demostrado una eficacia comparable frente a otros fármacos con la dosis estándar equivalente y produciendo menores efectos secundarios [42].

La administración oral y rectal pueden producir analgesia en un lapso de 40 minutos, con un efecto máximo de 1 hora, sin embargo, las variaciones de biodisponibilidad pueden hacer que el inicio

terapéutico y la duración de la acción sean impredecibles. La administración de acetaminofén por vía intravenosa ha demostrado que el inicio de analgesia ocurre posterior a los 5 minutos de administración y una duración de analgesia entre 4-6 horas [43].

El acetaminofén ($\text{CH}_3\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{OH}$, Figura 2.7) tiene un peso molecular de 151.16 g/mol, presentado en forma de polvo blanco inodoro posee un punto de fusión y ebullición de 170°C y $>500^\circ\text{C}$, respectivamente. Presenta solubilidad en agua a 20°C y densidad de 1.3 g/cm^3 [44].

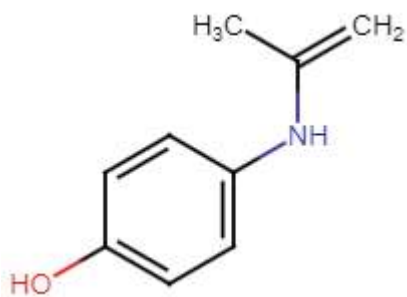


Figura 2.7 Molécula de fármaco analgésico acetaminofén.

Por otro lado, el tratamiento presenta una disminución de los niveles terapéuticos en periodos menores a 12 horas, por lo que se ha utilizado el uso de sistemas de liberación sostenida administrados intraarticularmente para prolongar su liberación, tratar, disminuir el dolor y retrasar la administración de dosis posteriores. Uno de los sistemas de entrega más utilizados son las microesferas, debido a sus propiedades como área superficial, porosidad y volumen, lo que las convierte en excelentes candidatas como transportadores de fármacos y vehículos de administración directamente en el sitio requerido. La síntesis de microesferas cargadas con acetaminofén utilizando una matriz polimérica de quitosano, ha sido realizada por Mulia y col. [45] mediante la técnica de gelaación ionotrópica obteniendo una liberación de orden cero en un lapso de 8 horas donde la mayor liberación de fármaco fue de 39% , y por Villicaña y col. [46] mediante el método de emulsión-evaporación de solvente mostrando una liberación del fármaco durante 420 horas.

2.8 Factores que influyen en las microesferas de alginato cargadas con fármaco

Los parámetros con mayor importancia en la administración de MEs cargadas son el tamaño y la distribución del tamaño de las microesferas. Un tamaño de partícula elevado y una mala distribución podrían causar una deficiencia en la administración, así como también problemas cruciales en el receptor.

Estos parámetros están en función de la técnica empleada para la obtención de MEs. El método de encapsulación por emulsión-evaporación de solvente implica una gran cantidad de variables y condiciones de operación para tener una producción eficaz que se describen a continuación.

2.8.1 Concentración de alginato

La concentración del polímero influye en las características de morfología, tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación. El aumento en la concentración de alginato es directamente proporcional al aumento en viscosidad de la solución, que a su vez influye en el aumento de la tensión interfacial entre la solución acuosa y la fase oleosa, provocando un aumento en el tamaño de partícula, así como también un incremento en la eficiencia de encapsulación de fármaco [28].

Lin y col. [47] investigaron el efecto de la concentración de alginato sobre el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación del fármaco mediante el método de extrusión. Reportando que el aumento de la concentración de alginato del 1% al 3% p/v condujo al aumento de tamaño de partícula de microesferas desde 728,7 mm hasta 1053,4 mm, respectivamente. Los resultados también mostraron que una alta concentración de alginato es eficaz para mejorar la eficiencia de encapsulación del fármaco, que fue del 100 % al 3 % p/v de concentración de alginato. Estos hallazgos demuestran que el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación del fármaco se ven afectados significativamente por la concentración de alginato.

2.8.2 Fase oleosa

La influencia de la fase oleosa sobre el tamaño de partícula no se ha estudiado ampliamente, sin embargo, algunos autores indican que la viscosidad de la fase oleosa afecta el tamaño y homogeneidad de las microesferas. El tamaño y la distribución del tamaño de las microesferas de alginato se pueden adaptar a la relación entre la viscosidad de la fase oleosa y la viscosidad de la fase acuosa. Por ejemplo, Wang y col. [48] reportaron que las microesferas obtenidas aumentaron

su tamaño y distribución de tamaño de partícula, utilizando aceite de oliva en la formación de la fase oleosa en comparación con el aceite de parafina líquida debido a que la viscosidad del aceite de oliva era mayor en comparación con el aceite de parafina líquida. Por lo tanto, el estudio demostró que el tamaño y la distribución de tamaño de las microesferas depende de la viscosidad de la fase oleosa.

2.8.3 Surfactante

La función del surfactante es reducir la tensión interfacial entre las moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas que conducen a la formación de emulsiones estables. La relación entre el surfactante y el tamaño de partícula establece que aumentando los niveles de concentración del surfactante se reduce el tamaño de las gotas de la solución acuosa, por lo tanto, se obtienen menores tamaños de partícula y mejor distribución de tamaño.

2.8.4 Velocidad de agitación

Usualmente la velocidad de agitación se maneja para controlar el tamaño y distribución de las partículas. En general a elevadas velocidades de agitación se obtienen microesferas más finas, debido a que la energía transferida para provocar una dispersión entre la fase oleosa y acuosa es mayor.

Shukla y col. [49] en la producción de microesferas de alginato con furoato de diloxanida identificaron que, debido al aumento en la velocidad de agitación en la formación de la emulsión, el tamaño de partícula disminuye puesto que a una velocidad de agitación de 750 rpm el tamaño de partícula reportado es de 455 μm mientras que a una velocidad de agitación de 1500 rpm el tamaño de partícula observado es de 348 μm . Por otra parte los resultados de porcentaje de rendimiento también se ven afectados por la velocidad de agitación ya que de igual manera al aumentar la velocidad de agitación disminuye el porcentaje de rendimiento, sin embargo para el caso de la eficiencia de agitación la velocidad optima reportada es de 100-1250 rpm obteniendo eficiencias de encapsulación del 70%.

2.9 Mecanismos y cinética de liberación de sustancias activas

2.9.1 Difusión

Los agentes activos se pueden liberar en el organismo a través de la difusión, donde el agente se encuentra depositado en una matriz polimérica, el mecanismo de difusión ocurre a través de un gradiente de concentración, los mecanismos de difusión se rigen mediante las leyes de difusión de Fick (Ec. 2.1), donde D es la constante de difusión, y J la velocidad de difusión entre la matriz polimérica y el fluido. Considerando que la difusión ocurre en una sola dirección, la expresión matemática resulta sencilla, sin embargo, cuando ocurre un hinchamiento de la matriz y el fenómeno de difusión se realiza en 3 dimensiones el sistema resulta más complejo.

$$J = -D \frac{\partial n}{\partial x} \quad (2.1)$$

Resulta como buena aproximación considerar la primera ley de Fick en casos donde la interacción entre la matriz polimérica y el fluido circulante es mínima, asumiendo que la constante de difusión es independiente de la concentración de la matriz polimérica (∂n).

Si la constante de difusión depende de la concentración del polímero y su interacción con el fluido que penetra, el proceso de difusión dependerá de las propiedades fisicoquímicas del polímero, tales como el peso molecular, el gradiente de sustitución y la viscosidad. En este caso, el mecanismo de difusión puede regirse por la segunda ley de Fick [50].

2.9.2 Disolución

En sistemas donde la liberación está controlada por la penetración del disolvente en la matriz polimérica se puede estudiar el fenómeno de hinchamiento y ósmosis.

Hinchamiento. El proceso de hinchamiento está relacionado con la difusión del fármaco desde y a través de una matriz polimérica, hacia el interior de esta misma. Dicho proceso provoca una transición vítrea en la matriz polimérica al ser penetrada por el medio en donde se lleve a cabo la liberación (fluidos biológicos, agua, etc.).

Ósmosis. Los sistemas osmóticos están compuestos por un núcleo de agente activo rodeado por la matriz polimérica selectiva al agua. Mediante una diferencia de presión osmótica (presión que hay que ejercer para detener el flujo de agua a través de la membrana semipermeable), es impulsada la

solución del fármaco entre el lado interno y externo, a través de pequeños poros en la capa semipermeable del polímero de la microesfera [51].

2.9.3 Erosión

En estos sistemas el compuesto activo se mantiene disperso en la matriz polimérica, el control químico ocurre a través de la degradación de la matriz, la cual se va erosionando con el paso del tiempo, permitiendo así la liberación del fármaco [50].

2.10 Modelos cinéticos de liberación de sustancias activas y su criterio de aceptación

Una de las ventajas del uso de modelos matemáticos es la posibilidad de predecir el comportamiento del agente activo, tomando en cuenta la solubilidad y las propiedades como geometría y tamaño de la matriz polimérica.

Existen una serie de pasos que son de utilidad para poder determinar los modelos cinéticos pertinentes para predecir las condiciones de difusión del agente activo [52].

1. Establecer por lo menos 3 formulaciones diferentes respecto del agente activo utilizando la misma matriz polimérica.
2. Elegir los mejores modelos matemáticos que determinan el perfil de liberación.
3. Expresar de manera lineal los modelos matemáticos seleccionados.
4. Determinar la mejor correlación entre la pendiente y la ordenada al origen, mediante el uso de la regresión lineal.
5. El modelo ideal sería relativamente simple con un intervalo de confianza cerca del nivel nominal ($R \approx 1$). El modelo matemático que presenta el mayor intervalo de confianza es el ideal para poder predecir el mecanismo de difusión del agente activo.

2.10.1 Orden cero

Este modelo considera una liberación dada por la difusión, siendo independiente de la concentración, bajo condiciones ideales la liberación de fármaco se conservaría constante a través del tiempo, logrando obtener un gráfico lineal dado por la ecuación 2.2:

$$Q = k_0 t \quad (2.2)$$

Donde Q es la cantidad de fármaco liberado en un tiempo t y k es la constante de liberación de orden cero [53].

2.10.2 Primer orden

La cinética de primer orden describe un comportamiento lineal debido a que éste considera una velocidad de liberación que es directamente proporcional a la concentración de fármaco liberado, esto es, a mayor concentración de fármaco, la velocidad de reacción aumenta [53, 54]. La ecuación 2.3 muestra el modelo matemático para estos casos de estudio

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{k_1 t}{2.303} \quad (2.3)$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco liberado en un tiempo t , Q_0 es la cantidad de fármaco inicial en solución y k_1 es la constante de liberación de primer orden.

2.10.3 Modelo de Higuchi

Higuchi estableció en 1961 una expresión matemática (Ec. 2.4) para predecir la velocidad de liberación del agente activo contenido en la matriz polimérica, dicha ecuación fue modificada y adaptada para ser utilizada en diferentes geometrías y características de la matriz. [52]

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k^2 \sqrt{t} \quad (2.4)$$

Donde:

M_t es la cantidad absoluta del agente activo encapsulado a un tiempo t .

M_∞ es la cantidad total de agente activo liberado al tiempo infinito, la cual deberá corresponder a la cantidad de fármaco encapsulado inicialmente ($t = 0$).

k es una constante que toma en cuenta las variables del diseño del sistema.

t es el tiempo transcurrido desde $t = 0$ hasta $t = \infty$.

Se puede considerar la relación M_t/M_∞ en términos de porcentaje de liberación de fármaco, Q .

2.10.4 Modelo de Hixon-Crowell

En 1931, Hixon-Crowell mostraron un modelo matemático (Ec. 2.5) conocido como el modelo de la raíz cúbica. Describe la velocidad de liberación del fármaco sin considerar la difusión de la matriz polimérica. De acuerdo con este modelo, se considera que el área regular de la partícula es proporcional a la raíz cúbica de su volumen [55].

$$W_o^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \quad (2.5)$$

Donde:

W_o es la concentración inicial del agente activo.

W_t es la concentración del agente activo en el tiempo t .

K_s es la constante que involucra la relación superficie/volumen.

2.10.5 Modelo Ritger-Peppas

Ritger y Peppas propusieron en 1987 un modelo similar al de Kosmeyer y Peppas, que describe la difusión del fármaco en términos de hinchamiento de la matriz polimérica (Ec. 2.7) [56].

$$Q_t = kt^n \quad (2.7)$$

Donde:

Q_t es el porcentaje de liberación de fármaco acumulativo.

k es la constante cinética que considera las características geométricas y estructurales de la matriz.

t es el tiempo de liberación del agente activo

n Es el exponente de liberación, el cual define el mecanismo por el cual se rige el fenómeno.

La Tabla 2.4 resume los valores que puede tomar el exponente n para los distintos mecanismos de difusión, los cuales pueden ser considerados para el modelo cinético Ritger-Peppas.

Tabla 2.4 Valor del exponente n [56].

Valor exponencial	Mecanismo de difusión
$n \leq 0.45$	El mecanismo de liberación está determinado por una difusión Ficksiana.
$0.45 \leq n \leq 0.89$	La cinética de difusión es del tipo no ficksiana.
$n = 0.89$	El mecanismo de liberación es no Ficksiana, de orden cero.

2.11 Estado del arte

Se ha estudiado el uso de microesferas poliméricas a base de una matriz de alginato para la liberación controlada de fármacos. La síntesis de microesferas se puede llevar a cabo por diferentes métodos, la selección de cada método depende del tamaño de partícula, propiedades fisicoquímicas de los materiales precursores y la aplicación establecida.

Baimark y Srisuwan [36] sintetizaron microesferas de alginato mediante el método de emulsión agua en aceite (W/O)-difusión de solvente y evaluaron la influencia de la concentración de Ca^{2+} en las características y comportamiento de liberación de fármacos de las microesferas de alginato. La concentración de solución acuosa para los casos de microesferas sin tensoactivo (con y sin dextrano azul) fue de 0.5% (p/v). Para la formación de la emulsión se añadió gota a gota la solución de alginato en 400 ml de acetato de etilo (fase oleosa) con una velocidad de agitación de 600 rpm. Para la producción de las microesferas con carga se mantuvo una relación constante de 10:1 de alginato/dextrano azul. El entrecruzamiento de las microesferas se realizó en concentraciones de 2.5, 5 y 10% (p/v) de CaCl_2 . El tamaño de microesfera obtenido para los casos de MEs con y sin surfactante fue de $\sim 100 \mu\text{m}$ para ambos casos. En cuestiones de eficiencia de encapsulación se obtuvo que a menor concentración de CaCl_2 la eficiencia disminuyó, resultando que para las microesferas reticuladas con 2.5% (p/v) de CaCl_2 el valor de la E.E. fue de 77% mientras que para las reticuladas a 10% las eficiencias resultaban mayores al 80%. Agregado a esto, los ensayos de liberación mostraron que menores concentraciones de CaCl_2 se obtuvieron tasas de liberación más súbitas respecto a las que poseían mayor grado de entrecruzamiento.

Caizaluiza y col. [55] desarrollaron un sistema de liberación controlada de partículas mucoadhesivas de alginato cargadas con claritromicina y metronidazol, mediante la técnica de emulsión-gelificación, con la finalidad de combatir infecciones en el cuerpo humano. Mediante la preparación de una emulsión agua en aceite (W/O), donde la concentración de la solución de alginato fue de 3.10% (p/v) con 0.2 g de claritromicina y metronidazol para cada caso, una solución orgánica de 6.07% (v/v) (span 80/aceite mineral), la emulsión se preparó con una agitación constante de 800 rpm con tiempo de 25 min. La concentración y las condiciones de reticulación fueron de 20 ml de solución reticulante (10% p/v CaCl_2) añadidos en intervalos de 2.5 ml/min con tiempos de maduración de 30 min. Bajo estas condiciones se obtuvo un tamaño de partícula variable entre 162.81 μm – 1043.39 μm , en el caso de las partículas cargadas con claritromicina la eficiencia máxima de encapsulación que se obtuvo fue de 71.3% y 9.8% de carga, para el metronidazol la eficiencia máxima obtenida fue de 86.1% y una carga de 9.8%. En ambos casos se mantuvo la liberación de fármaco hasta 720 min.

Garcés y col. [57] elaboraron microesferas de diclofenaco sólido, para una liberación prolongada del agente activo y aliviar los malestares causados por ciertas enfermedades como artritis, osteoartritis, torceduras, etc., mediante el mecanismo de gelación ionotrópica, utilizando una matriz de alginato. Las concentraciones para las soluciones fueron de 7% (p/v) para la solución de alginato (solución A) y solución reticulante CaCl_2 (solución B). La solución A fue añadida a la solución B por un sistema de goteo a una velocidad de 56 gotas/ min, manteniendo una agitación a 300 rpm y una temperatura de 60°C, una vez terminada la solución A, se dejaron madurar las microesferas durante 18 min con agitación a 700 rpm. Se obtuvieron MEs con un tamaño de partícula menor a 2 mm, y un porcentaje de encapsulación mayor al 30%.

Hariyadi y col. [58] obtuvieron microesferas de alginato con glutatión para el antienviejecimiento tópico a través de la técnica gelificación ionotrópica. Las concentraciones usadas para la solución de alginato fueron de 1.5 y 2.5% (p/v), en una solución aparte se disolvieron 2 g de glutatión en tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS) y una mezcla de tensoactivos (Tween 80 y Span 80). Ambas soluciones fueron añadidas a la solución del agente reticulante (1 M CaCl_2) y se sometió a una agitación de 1000 rpm durante 2 h. Las microesferas de alginato/glutatión fueron liofilizadas a -80°C durante 29 h. Bajo estas condiciones las microesferas tuvieron una eficiencia de encapsulación de 34.74-56.63%, diámetro de partícula de 1.89-2.42 μm y una carga farmacéutica de 5.72-6.23%.

Huang y col. [59] evaluaron la estabilidad de luteína contenida en microesferas de alginato. Utilizando el método de emulsión-gelificación para la microencapsulación de luteína en matriz de alginato. Empleando un agitador magnético se dispersó luteína, estearato de magnesio y parafina líquida en solución de alginato de sodio a 65°C. La mezcla se emulsionó utilizando un *Ultra-Turrax* a 2600 rpm durante 3 min. Posteriormente, la emulsión obtenida se agregó gota a gota en 100 ml de solución de cloruro de calcio agitando constantemente a 300 rpm durante 30 min a 25°C. Las microesferas se retiraron del medio de encapsulación por filtración y se enjuagaron dos veces con éter de petróleo. Finalmente, el proceso de secado se llevó a 25°C durante 24 h. Las microesferas que contenían luteína se almacenaron posteriormente en un desecador al vacío y se secaron hasta peso constante. Los factores experimentales, analizados en esta investigación fueron concentraciones de solución de cloruro de calcio (0.03, 0.04 y 0.05 g/ml), solución de alginato de sodio (60, 70 y 80 g/ml) y parafina líquida (2, 4 y 6% v/v). La capacidad de carga de las microesferas obtenidas fue de 63% y un tamaño de partícula de 150 µm. Analizando este tamaño de partícula es posible decir que las altas concentraciones empleadas para su síntesis influyeron en obtener partículas de tamaños mayor a 100 µm. De los ensayos de liberación se concluyó que la luteína fue liberada por el mecanismo de difusión y erosión de la matriz de alginato bajo condiciones alcalinas.

Millán-Olvera y col. [20] establecieron la síntesis de perlas de alginato cargadas con insecticidas para el control de plagas en la industria agrícola, usando como agentes activos imidacloprid y bifentrina. Para la preparación de las perlas, la concentración de la solución de alginato fue de 2% (p/v) para ambos casos, mientras que la concentración de la suspensión de bifentrina e imidacloprid se manejó al 20% (p/v), respectivamente. En seguida, la solución de alginato se mezcló con la suspensión manteniéndose en agitación constante a 500 rpm por una hora, hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente la solución se añadió gota a gota a la solución reticulante (CaCl₂/NaCl, 1 y 0.9% p/v), empleando un encapsulador (Buchi, B-390) con boquilla de 300 µm, 600 mBar, 1000Hz y 300 V. Las perlas alginato/bifentrina y alginato/imidacloprid obtuvieron un diámetro promedio de 1.26 mm y 1.13 mm, y un tamaño de poro de 6.24 y 7.85, respectivamente.

Uyen y col. [60] sintetizaron y caracterizaron microesferas de alginato con curcumina empleando el método de emulsión-gelificación. Primeramente, se preparó una solución de curcumina en etanol (3.6 mg/1 ml), posteriormente la solución de curcumina se dispersó en una solución de alginato a distintas concentraciones (2, 3, 4, 5, 6% p/v) durante una hora hasta obtener una solución

homogénea curcumina-alginato. Como solución orgánica se empleó parafina líquida y Span 80 (2% v/v). La emulsión se llevó a cabo bajo una agitación mecánica de 300 rpm, una vez obtenida la emulsión, se añadió gota a gota una solución de cloruro de calcio al 10% (p/v) manteniendo la agitación constante de 300 rpm por 90 minutos. Las microesferas se filtraron y lavaron con éter de petróleo. Los resultados mostraron que el tamaño de partícula aumentaba conforme aumentaba la concentración de la solución de alginato, siendo que el tamaño de partícula para las microesferas obtenidas al 2% (p/v) mostraron un tamaño de 90.4 μm , mientras que las obtenidas a 5% (p/v) mostraron un tamaño de 200 μm . De igual manera, reportaron que la eficiencia de encapsulación aumenta a medida que aumenta la concentración de alginato de sodio, esto debido a que el aumento de la viscosidad elimina la difusión de la curcumina fuera de la red de alginato de alta densidad durante el proceso de gelificación.

Huang y col. [61] prepararon microesferas mediante reticulación en emulsión de alginato de sodio (SA) y fibroína de seda (SF) con el objetivo de mejorar la capacidad hemostática al aumentar la adhesión celular. La solución de fibroína y la solución de alginato se prepararon por separado, ambas a una concentración de 2% (p/v), la solución orgánica estuvo compuesta por parafina líquida (96 ml), Span 80 (3 ml) y Tween 80 (1 ml). Una vez obtenidas las soluciones, la solución de fibroína/alginato se añadió a la fase orgánica a una velocidad de agitación de 400 rpm durante 45 minutos a 45°C. Posteriormente, a la emulsión obtenida se añadió gota a gota la solución de cloruro de calcio al 5% (v/v) y glutaraldehído al 25% (v/v) manteniendo la agitación constante a 400 rpm por un tiempo de 3 horas. La recuperación de las microesferas se llevó a cabo por precipitación, dicho precipitado fue lavado y centrifugado con éter de petróleo e isopropanol a 4000 rpm. Los resultados mostraron microesferas de superficie rugosa la cual aumenta con una relación de alginato:fibroína de 2:1, además se demostró que las microesferas no poseen propiedades citotóxicas, promoviendo la adhesión celular.

Sivan y col. [62] encapsularon células madre mesenquimales, utilizando emulsificación de un solo paso por gelificación interna. Se mezcló un medio de crecimiento completo que contenía células concentradas con solución de alginato (9.9 ml, 2 % p/v) en tampón HEPES y CaCO_3 (550 μL , 24 mM en tampón HEPES). Luego, la mezcla de alginato se agregó a aceite mineral (10 ml) para crear una emulsión y se agitó usando una de tres velocidades (800, 900 o 1000 rpm) durante 12 min. La gelificación interna se logró mediante un paso de acidificación de ácido acético (0.4 % v/v). Se observó que, elevando la velocidad de agitación para la formación de la emulsión, el tamaño de

partícula disminuía, ya que a una velocidad de 800 rpm se tienen partículas de $222 \pm 63.6 \mu\text{m}$ mientras que a 1000 rpm el diámetro de partícula fue de $127 \pm 30.7 \mu\text{m}$. Un comportamiento similar ocurre con respecto al rendimiento y eficiencia de encapsulación puesto que, los porcentajes obtenidos para microesferas sintetizadas a 1000 rpm (R=60% y E.E.=63%) fueron menores que los obtenidas a 800 rpm (R=88% y E.E.=70%).

Man y col. [63] prepararon microesferas de alginato de calcio mediante el método de microfluidos como portadores de un inhibidor de la histona desacetilasa para tratar lesiones renales agudas mediante inyección intravenosa. Las microesferas se fabricaron mediante una plantilla de emulsión microfluídica W/O y su tamaño se ajustó por la concentración de alginato, el caudal de la fase continua y la fase de dispersión. Estos investigadores ajustaron la concentración de alginato a 1, 0.1, 0.04 y 0.02 % en peso y el caudal de $5 \mu\text{L/h}$ en la fase dispersa y $15 \mu\text{L/h}$ en la fase continua. Para la reticulación de las microesferas se realizaron ensayos a tres concentraciones de CaCl_2 (2, 5 y 10% en peso). De los resultados se observó que aumentando la concentración de la solución de alginato se obtuvo un aumento en el tamaño de partícula ya que, para la concentración de 1% (p/v) el tamaño de partícula fue de $7.3 \mu\text{m}$ mientras que para las microesferas sintetizadas con una concentración de 0.02% el tamaño de partícula fue de $3.3 \mu\text{m}$ y que un mayor grado de entrecruzamiento del alginato de sodio con los iones de calcio conduciría a un tiempo de liberación del fármaco más largo.

Considerando los factores que afectan el tamaño, rendimiento y eficiencia de encapsulación de la síntesis de microesferas de alginato por diversos métodos, las condiciones seleccionadas para este caso de estudio serán la concentración de alginato, concentración de agente reticulante, y tiempo de reticulación. El tensoactivo a utilizar será Span 80 ya que su valor de HLB (4.3) brinda estabilidad a la emulsión, para valorar los rendimientos y eficiencias de encapsulación, se tomarán valores de 2.5 y 5% (p/v) de CaCl_2 . La velocidad de agitación para la formación de la emulsión permanecerá fija, por lo que la variación en tamaños estará en función de la concentración de la solución acuosa. Los solventes empleados para la eliminación de residuos de solución orgánica serán éter de petróleo y alcohol etílico, ya que se muestra como los solventes más empleados para el lavado de microesferas.

CAPITULO 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este proyecto se dividió en cuatro etapas. Se obtuvieron MEs de polímero sin carga farmacéutica y se caracterizaron para seleccionar las más apropiadas. Posteriormente, se añadió el agente activo a las MEs seleccionadas. Una vez obtenidas las MEs con fármaco, se caracterizaron y a continuación se llevó a cabo la evaluación de la cinética de liberación. Esta experimentación se llevó a cabo siguiendo la metodología descriptiva en la Figura 3. 1.

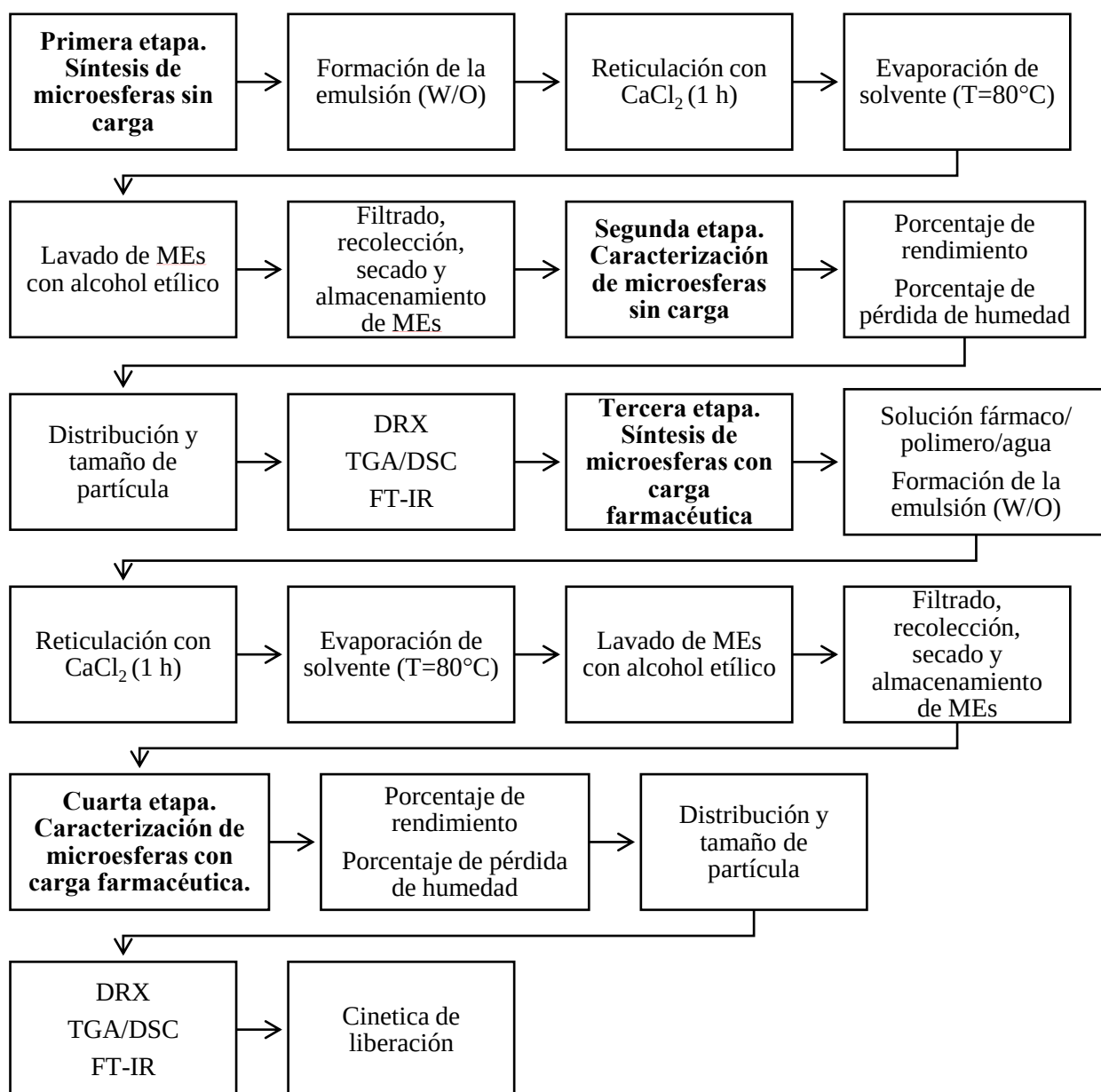


Figura 3. 1 Diagrama de flujo por etapas. Metodología experimental.

3.1 Diseño de experimentos

Para la síntesis de microesferas de alginato libres de fármaco, las pruebas se realizaron siguiendo un diseño factorial 2^k donde $k = 3$. En este diseño las variables independientes encontradas son: la concentración de alginato (X_1), concentración de CaCl_2 (X_2) y tiempo de reticulación (X_4). El rendimiento (Y_1) y el tamaño de partícula (Y_2) se establecieron como variables dependientes. Las variables independientes y los niveles que utilizados se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Variables independientes y sus niveles.

Variable independiente	nivel bajo	nivel alto
Concentración de alginato (% p/v)	2	5
Concentración de CaCl_2 (% p/v)	2.5	5
Tiempo de reticulación (min)	15	60

Una vez considerados los niveles y las variables del diseño, la Tabla 3.2 muestra las formulaciones desarrolladas con sus respectivas variables de procesamiento.

Tabla 3.2 Formulaciones de microesferas de alginato sin acetaminofén.

Formulaciones	Concentración de alginato (% p/v)	Concentración de CaCl_2 (% p/v)	Tiempo de reticulación (min)
SA2CA2.5	2	2.5	15
SA5CA2.5	5	2.5	15
SA2CA5	2	5	15
SA5CA5	5	5	15
SA2CA2.5_1	2	2.5	60
SA5CA2.5_1	5	2.5	60
SA2CA5_1	2	5	60
SA5CA5_1	5	5	60

3.2 Materiales

Para la síntesis de microesferas se utilizaron los siguientes materiales: alginato de sodio (ácido gulurónico $\geq 38\%$, Cedron S.A de C.V.), acetaminofén (BioXtra $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich), cloruro de calcio (anhidro $\geq 96,0\%$, Baker ASC), agua destilada, aceite mineral comercial y Span 80 (pureza $\geq 60\%$, Sigma Aldrich).

3.3 Técnicas experimentales

3.3.1 Obtención de las microesferas de alginato

Empleando la técnica emulsión/evaporación de solvente (Figura 3.2), con una emulsión agua en aceite (W/O), se realizó la síntesis de microesferas poliméricas con matriz de alginato.

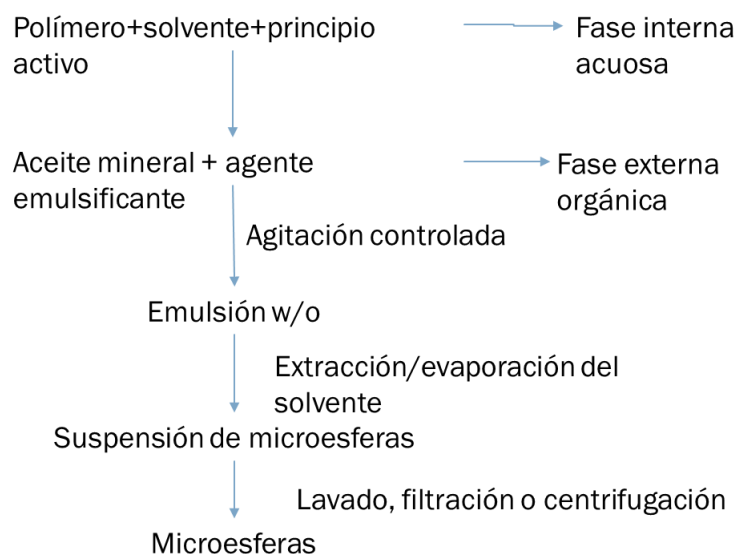


Figura 3.2 Diagrama de proceso del método emulsión/evaporación de solvente para la obtención de microesferas de alginato.

Con el uso de una parrilla de agitación magnética *IKA C-Mag HS 7 Control Magnetic Stirrers* se elaboró la solución acuosa (alginato/agua destilada) a una temperatura de 60°C y tiempos de agitación de 40 min. Para la solución orgánica se empleó una concentración constante de 2% (v/v) de Span 80 en aceite mineral, a temperatura ambiente y agitación constante hasta obtener una solución homogénea. La solución acuosa se incorporó a la solución orgánica, sometiéndose a una

agitación constante con velocidad de 3000 rpm y tiempo de 15 minutos, empleando un emulsificador *IKA Ultra-Turrax® T18 digital*. Nuevamente en una parrilla de agitación magnética *IKA C-Mag HS 7 Control Magnetic Stirrers*, a la emulsión obtenida, se añadió gota a gota la solución reticulante (CaCl_2 /agua destilada), a tiempos de reticulación variables (15 y 60 min). Una vez terminada la reticulación, se aumentó la temperatura de la parrilla a 90°C permaneciendo constante hasta evaporar completamente el solvente.

Las microesferas fabricadas fueron lavadas y centrifugadas empleando alcohol etílico caliente ($T=80^\circ\text{C}$) a 7 intervalos de 5 minutos cada uno, posteriormente empleando un sistema de filtrado a vacío, se recolectaron las microesferas las cuales fueron sometidas a un secado utilizando un horno *Carbolite HTF 1700 furnace* a 70° C con tiempos de permanencia de 1 hora.

Para la optimización del método se evaluaron las variables mencionadas en el apartado 3.1 Diseño de experimentos, siendo la concentración de alginato, concentración de agente reticulante y tiempo de reticulación las variables que determinaron las condiciones de operación para la obtención de microesferas de alginato sin carga farmacéutica de mayor rendimiento.

3.3.2 Adición de fármaco a las microesferas de alginato

Una vez que fueron seleccionadas las mejores condiciones de síntesis de microesferas sin carga, bajo el mismo proceso de síntesis se procedió a realizar la obtención de las microesferas con el agente activo. En primera instancia se seleccionaron 0.1 g y 0.5 g de acetaminofén, sin embargo, mediante un análisis de microscopia electrónica de barrido se observó la presencia de cristales debidas al fármaco en microesferas que contenían 0.5 g de acetaminofén, por lo que fueron consideradas cantidades de fármaco menores a 0.5 g, las cuales fueron 0.1, 0.142 y 0.2 g de acetaminofén manteniendo una relación 5:1, 3.5:1 y 2.5:1 (polímero:fármaco) y evitando así la presencia de cristales.

La metodología para la adición del fármaco modelo, siguió el mismo procedimiento como se ha descrito anteriormente para la obtención de microesferas sin carga. Para fines de este proyecto se empleó acetaminofén, al ser un compuesto hidrofílico, éste fue disuelto en agua donde posteriormente se añadió el biopolímero. Las condiciones de trabajo quedaron establecidas por el lote de mayor rendimiento obtenido en la producción de microesferas sin carga, en este caso la

cantidad de fármaco empleado se estableció determinando el factor de mayor eficiencia de encapsulación.

3.4 Caracterización física y microestructural

3.4.1 Determinación del tamaño y distribución de tamaño de partícula

Para la determinación del tamaño y distribución de tamaño de partícula de las microesferas sin y con carga de fármaco se utilizó un analizador de tamaño de partícula *Coulter LS 100 Q Small Volume Module Plus*. Para realizar los ensayos, las microesferas fueron suspendidas en agua para crear la dispersión de las partículas.

3.4.2 Estudio morfológico

El análisis de morfología se llevó a cabo empleando un microscopio electrónico de barrido (MEB) de emisión de campo *Jeol FE-SEM JSM-7600 F* a un voltaje de aceleración de 15 kV. La muestra previamente fue colocada sobre cinta de carbono (eliminando excesos de muestra) y aplicando un metalizado de cobre durante 20 minutos.

3.4.3 Difracción de rayos X (DRX)

Se analizaron muestras de fármaco, polímero y microesferas sin y con fármaco, para determinar su naturaleza cristalina e identificar las fases presentes. Para este estudio se utilizó un difractómetro de rayos X *Bruker D8 Advance* con radiación $\text{CuK}\alpha$ en un rango de 2θ de 10 a 70° con un paso de 0.02° y un tiempo de 0.6 s por paso.

3.4.4 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis por espectrometría infrarroja se llevó a cabo para corroborar la presencia de grupos funcionales del polímero y fármaco en las microesferas sin y con carga. Empleando un espectrofotómetro *Bruker Tensor 27* en un intervalo de frecuencia de 4000-400 cm^{-1} .

3.4.3 Análisis térmico simultáneo (TGA/DSC)

Mediante el estudio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se determinaron las temperaturas de transición vítrea y fusión del polímero, y la temperatura de fusión del fármaco. El análisis termogravimétrico (TGA), mostró los porcentajes de pérdida de peso y temperaturas de descomposición para el fármaco, polímero, y microesferas sin y con carga. Los diagramas termoanalíticos se obtuvieron mediante un módulo de análisis térmico simultáneo *TA Instruments SDT Q600*, empleando un crisol de alúmina y atmósfera de Ar desde temperatura ambiente hasta 800°C, a una velocidad de calentamiento de 20°C/min.

3.5 Caracterización de las microesferas de alginato

3.5.1 Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento está determinado por la relación de la masa final de microesferas obtenidas en cada ensayo entre la masa inicial del polímero empleado, multiplicado por cien.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.1)$$

Donde M_f es la masa final de microesferas obtenidas y M_i es la masa inicial de polímero.

3.5.2 Porcentaje de pérdida de humedad

Las microesferas obtenidas fueron secadas utilizando una mufla *Thermolyne Thermo Scientific* a 70°C con un tiempo de permanencia de una hora. Las microesferas fueron pesadas antes y después del proceso de secado. El porcentaje de pérdida de humedad está dado por la relación de la masa inicial de las esferas antes del secado entre la masa final constante después del proceso de secado.

$$\% \text{ Pérdida de humedad} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.2)$$

Donde M_i es la masa inicial de la muestra y M_f la masa final.

3.5.3 Eficiencia de encapsulación de fármaco

Se preparó una solución de 2 mg de microesferas con fármaco en 10 ml de tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente se realizó una dispersión de la solución usando una incubadora *Shaking Incubator NB-T205* con agitación a 100 rpm y temperatura de 37°C. Una vez terminada la dispersión, las muestras preparadas fueron sometidas a un proceso de centrifugación *Thermo Scientific Sorval ST 16 Centrifuge*. El sobrenadante de cada muestra fue examinado en un espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Instrument L6020060* donde cada ensayo fue realizado por triplicado.

El porcentaje de encapsulación está determinado por la relación de la masa total encapsulada entre la masa del fármaco inicialmente agregada.

$$\% E.E. = \frac{M_{total}}{M_{teórica}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.6 Cinética de liberación de fármaco

Para el estudio de cinética de liberación de acetaminofén de las microesferas de alginato, se suspendieron 140 mg de cada formulación de MEs en 100 mL de tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS), a condiciones de $T = 37^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 7.4$. Las soluciones fueron sometidas a una agitación constante de 100 rpm y $T = 37^{\circ}\text{C}$ mediante el uso de una incubadora con agitación *Shaking Incubator NB-T205*. Tomando alícuotas de cada muestra a tiempos de 15 y 30 min, 1, 1.5, 3, 9, 24 y 48 h, así como también a tiempos de 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 16 y 20 días. Previo a la toma de alícuotas las soluciones fueron centrifugadas *Thermo Scientific Sorval ST 16 Centrifuge* durante 3 min a 5000 rpm, esto con el fin de evitar sólidos suspendidos en la alícuota. Posteriormente, se determinó la concentración de acetaminofén liberado, determinando su absorbancia mediante el uso de un espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Instrument L6020060* y longitud de onda de 293.20 nm (onda característica del acetaminofén).

Los modelos cinéticos empleados para describir el comportamiento de la cinética de liberación son los descritos en el apartado 2.10 Modelos cinéticos de liberación de sustancias activas y su criterio de aceptación.

CAPITULO 4 ANALÍISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se detallan resultados como tamaño y distribución de tamaño de partícula de las microesferas sin y con carga, se describe también los resultados de las caracterizaciones morfológicas, estructurales, propiedades térmicas y grupos funcionales de los materiales precursores y producto de síntesis mediante las técnicas de microscopia electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX), espectrometría infrarroja (FT-IR) y análisis térmico simultáneo (TGA/DSC). Se describe también los resultados en base al método de síntesis como porcentaje de rendimiento, porcentaje de pérdida de humedad, porcentaje de eficiencia de encapsulación y finalmente se analiza la cinética de liberación del fármaco.

4.1 Caracterización de las microesferas sin y con carga de fármaco

Se realizó la síntesis de las microesferas sin carga empleando las formulaciones establecidas en la Tabla 3.2. Posterior a la síntesis se llevó a cabo un análisis de microscopía electrónica de barrido, en el cual se comprobó la existencia de microesferas y al mismo tiempo se observó la presencia de cristales debidos al agente reticulante (CaCl_2) (**Figura 4. 1**), este fenómeno se detectó en las formulaciones donde la concentración de solución reticulante era del 5%. La presencia de cristales de CaCl_2 resultó indeseable provocando una alteración en los resultados de rendimiento, por lo que las formulaciones con esta concentración fueron descartadas. Reduciendo así el número de formulaciones de microesferas sin carga a un total de 4 (**SA2CA2.5**, **SA5CA2.5**, **SA2CA2.5_1** y **SA5CA2.5_1**).

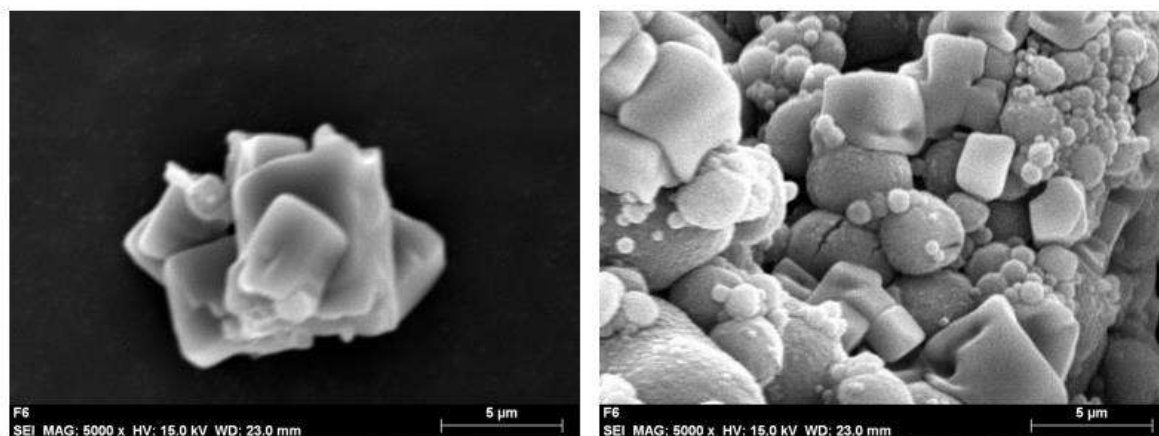


Figura 4. 1 Micrografía de MEs sin fármaco mostrando la presencia de cristales de CaCl_2 .

Después de que se obtuvieron las microesferas sin y con carga se procedió a realizar los ensayos de caracterización física y química (distribución y tamaño de partícula, morfología, calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X), así como la caracterización del producto de procesamiento (porcentaje de rendimiento, porcentaje de pérdida de humedad y eficiencia de encapsulación), y finalmente la cinética de liberación, cuyos resultados se presentan a continuación.

4.1.1 Determinación del tamaño y distribución de partícula

Una vez establecidas las mejores condiciones de síntesis (formulaciones SA2CA2.5_1 y SA5CA2.5_1) se determinó el tamaño de partícula. La figura ilustra un histograma de la distribución de tamaño de partícula de las MEs sin carga para las microesferas al 2% y 5% de concentración de alginato. En el caso de las microesferas al 2% (Figura 4.2a), el análisis estadístico resultó en una curva bimodal por lo que es debido tomar las curvas e interpretarlas por separado, donde la primera sección presenta un tamaño de partícula promedio igual a $0.57\ \mu\text{m}$ y una desviación estándar de 0.14, por otro lado la segunda sección de esta misma gráfica presenta un tamaño promedio de partícula de $1.82\ \mu\text{m}$ y una desviación estándar de 0.27; por su parte las microesferas al 5% de concentración (Figura 4.2b) el promedio de tamaño de partícula registrado fue de $6.373\ \mu\text{m}$ con una desviación estándar de 1.875. Esto comprueba lo descrito por Uyen [28] de que una de las variables de procesamiento que influye en el tamaño de partícula es la concentración de polímero, por lo tanto, a mayor concentración de solución polimérica se obtendrá mayor tamaño de partícula.

Dada la aplicación, Edwards [21] menciona que la forma más simple de prolongar los tiempos de residencia del fármaco en las articulaciones es sintetizando microesferas con tamaños mayores a 250 nm (óptimamente entre 1 y $4\ \mu\text{m}$), entonces el tamaño óptimo resultaría en las microesferas sintetizadas a una concentración de 2% p/v de alginato (SA2CA2.5_1).

.

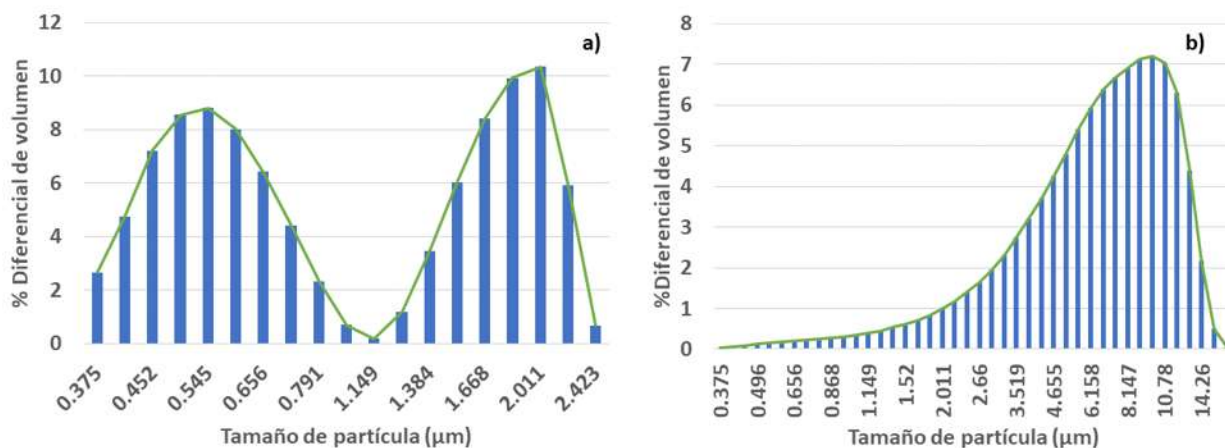


Figura 4.2 Histograma de tamaño de partícula de microesferas de alginato (a) 2% m/v, y (b) 5% p/v de alginato a tiempos de reticulación de 1 hora.

Considerando que la solución más factible para la síntesis de microesferas fue el lote de 2% p/v de solución de alginato, la Figura 4.3a presenta un histograma del análisis de tamaño de partícula para las microesferas de alginato con 0.1 g de acetaminofén, la mayoría de las microesferas tienen tamaños entre 5 y 7 μm donde la mayor cantidad de microesferas se concentra en un tamaño de partícula de 6.1 μm . Respecto a las microesferas con 0.142 g (Figura 4.3b) es evidente que éstas poseen tamaños de microesferas similares a las que son libres de fármaco, en este caso la mayor concentración de microesferas medidas se encuentra en un tamaño de partícula de 1.22 μm . Finalmente, para las microesferas cargadas con 0.2 g (Figura 4.2c) se tiene una mayor frecuencia de tamaños de partícula entre diámetros de 0.54 y 2 μm . Es notorio que en los casos de las microesferas sin carga (Fig. 4.2a) y las microesferas con 0.142 g y 0.2 g de acetaminofén (Fig. 4.3b y 4.3c), el comportamiento estadístico es similar ya que en estos casos las curvas son bimodales y de tipo gaussianas, indicando que durante el procesamiento es muy probable obtener microesferas con tamaños de $\sim 0.5 \mu\text{m}$ y $\sim 2.5 \mu\text{m}$.

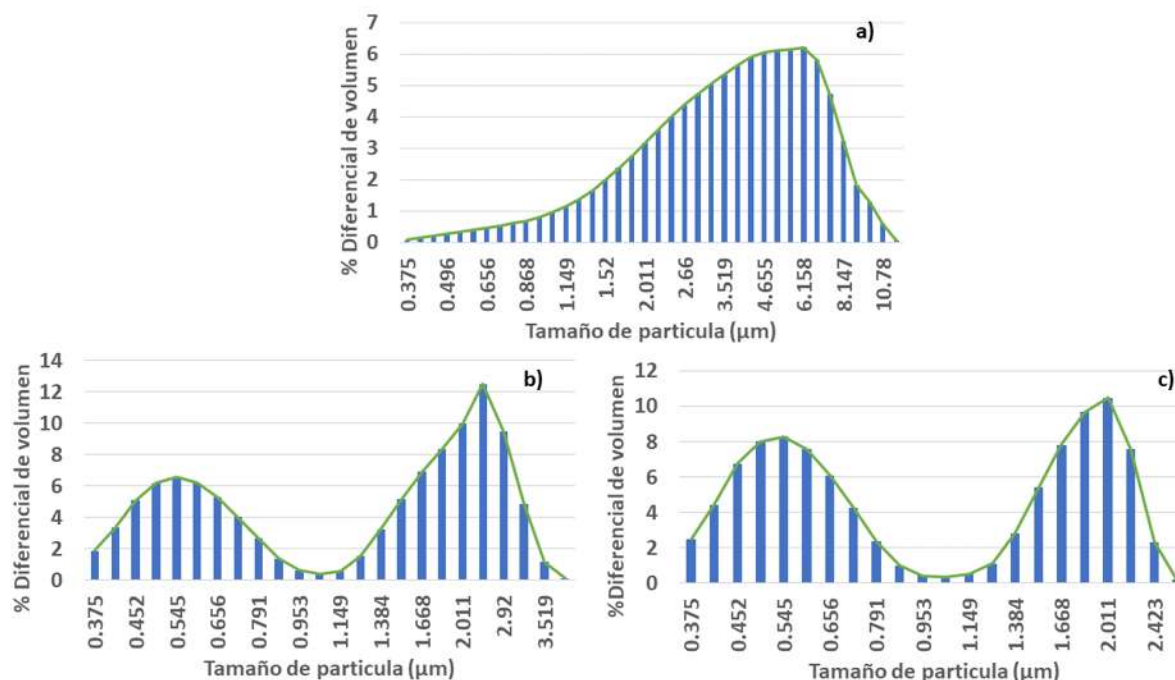


Figura 4.3 Histograma de tamaño de partícula de microesferas de alginato con (a) 0.1 g, (b) 0.142 g y (c) 0.2 g de acetaminofén. Sintetizadas bajo las condiciones de la formulación SA2CA2.5_1.

La Tabla 4. 1 incluye el tamaño de partícula representativo para cada cuartil (Q25, Q50 y Q75) en cada caso de estudio, así como también su respectivo promedio.

Tabla 4. 1 Tamaño de microesferas sin y con carga clasificada en cuartiles.

Cuartiles	Tamaño de partícula (μm)			
	Sin carga	0.1 g	0.142 g	0.2 g
Q25	<0.545	<2.423	<0.598	<0.598
Q50	<0.791	<3.863	<1.384	<1.047
Q75	<1.832	<5.610	<2.011	<1.832
Promedio	0.9866 ±0.03	3.66±0.349	1.2236±0.40	1.027±0.05

La Figura 4.4 muestra un gráfico de frecuencia acumulada para las microesferas sin y con carga, observando que, para los casos de microesferas sin carga, y con 0.142 y 0.2 g de fármaco el 25% de las microesferas tienen tamaños menores a 0.6 μm . Respecto al 50% de la cantidad de microesferas se muestra que éstas mismas (sin carga y con 0.142 y 0.2 g de fármaco) tienen tamaños de entre 0.8-1.4 μm . Sin embargo, las microesferas con 0.1 g de fármaco muestran un mayor tamaño de partícula entre 3 y 5 μm donde se registra la mayor cantidad de microesferas.

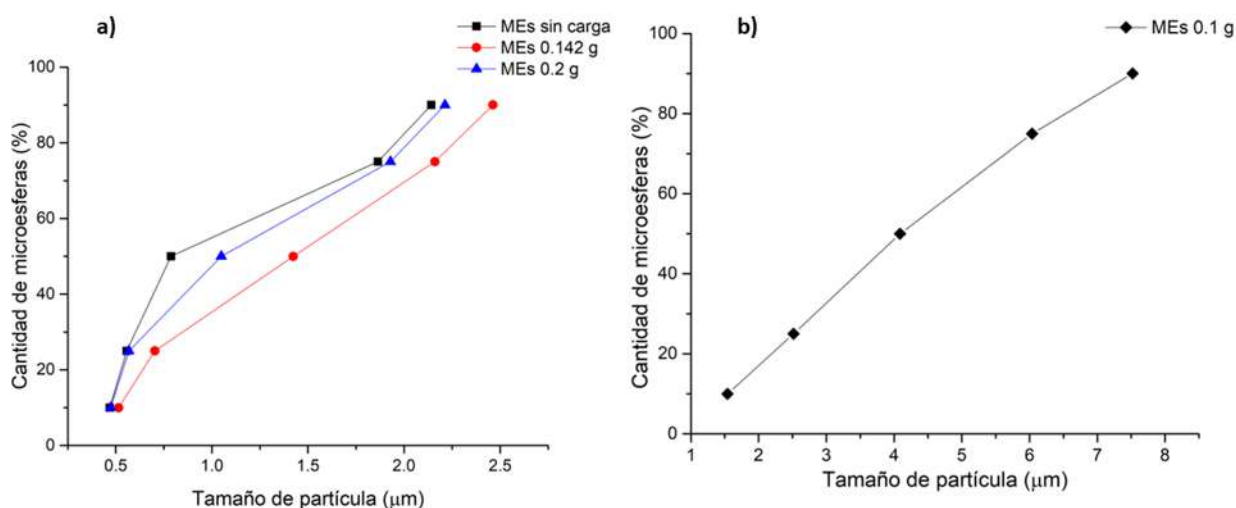


Figura 4.4 Gráfico de frecuencia acumulada de tamaño de partícula (a) microesferas sin carga, microesferas con 0.142 y microesferas con 0.2 g de acetaminofén y (b) microesferas con 0.1 g de acetaminofén.

Con base en la revisión bibliográfica realizada, el tamaño de partícula se ve afectado por la variación de cantidad de fármaco, es decir, a menores cantidades de fármaco se tiene una menor variación en el tamaño de partícula, esto es posible de analizar respecto a los gráficos de la figura 4.3 ya que para las microesferas sintetizadas a 0.142 y 0.2 g de acetaminofén obtenemos curvas bimodales teniendo así dos tamaños de partícula promedio respecto a cada sección mostrada, mientras que las microesferas al 0.1 g de acetaminofén la curva obtenida es del tipo “gaussiana” y presenta solo un promedio de tamaño de partícula.

4.1.2 Estudio morfológico

Previamente al proceso de síntesis de microesferas, se realizaron estudios morfológicos y elementales de los precursores, tales como el polímero y fármaco.

La Figura 4.5 muestra la micrografía obtenida de alginato de sodio, observando que se encuentra constituido por partículas tipo hojuelas con tendencia a ser alargadas sobre el eje x con tamaños que oscilan entre los 190 y 240 μm y espesor variable. El análisis elemental general muestra que la composición de dicho polímero está basada en C, O, Na y Cl con porcentajes de 19.43, 64.32, 16.03 y 0.20 % en peso, respectivamente. Se muestran residuos de cloro los cuales se deben al proceso de obtención del polímero, dado que en la fase de precipitación de éste se utiliza una solución de CaCl_2 [64].

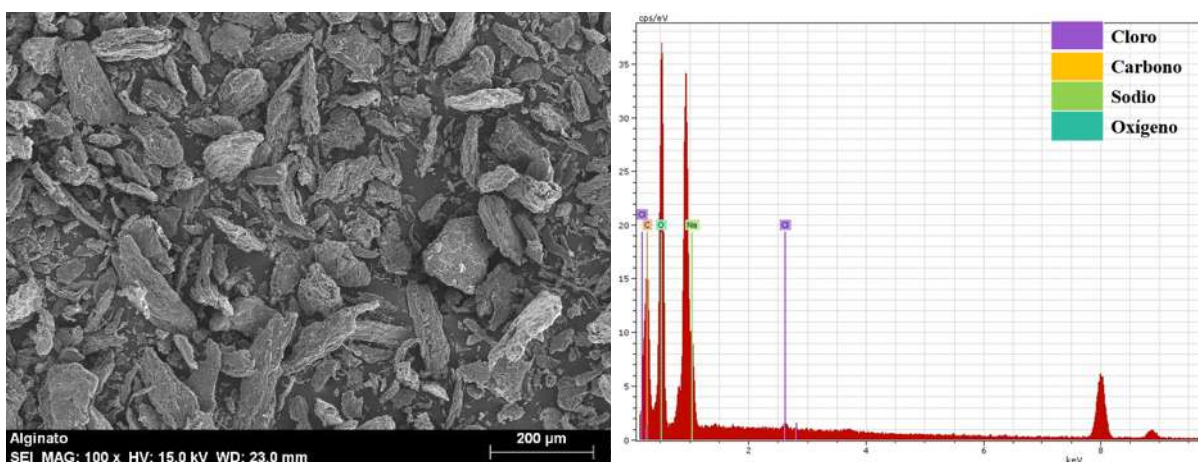


Figura 4.5 Micrografía de alginato de sodio 100X y EDS general.

Para el caso del acetaminofén, la Figura 4.6 muestra que el fármaco está compuesto por cristales, con variación de tamaños que oscilan desde los 30 μm hasta 230 μm de sección longitudinal, estos cristales poseen espesor variable entre 13 y 23 μm . Algunos cristales tienen una relación entre sección transversal y sección longitudinal cercana a uno, lo que podría considerarse como cristales con tendencia esférica, sin embargo, estos cristales no poseen un patrón de forma definido. El análisis EDS indica que el fármaco está compuesto por C, N y O con 27.21, 20.43 y 52.35% en peso, respectivamente.

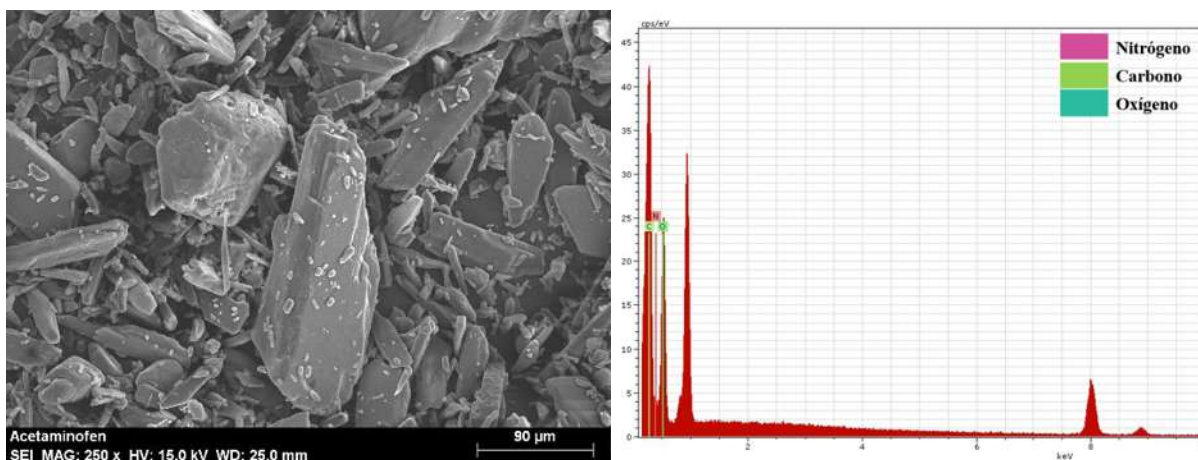


Figura 4.6 Micrografía de acetaminofén 250X y EDS general.

Una vez sintetizadas las microesferas de polímero libre de fármaco, con sus respectivas variables de procesamiento, fueron analizadas para seleccionar las de mejor tamaño y morfología. La Figura 4.7 muestra microesferas con una concentración de 2% (p/v) y tiempos de reticulación de 15 min (SA2CA2.5, Fig. 4.6a) y 60 min (SA2CA2.5_1, Fig. 4.6b), observando que las MEs obtenidas a tiempos de reticulación de 15 minutos muestran mayor rugosidad careciendo de homogeneidad, mientras que las microesferas reticuladas a 60 min presentan superficie porosa y mejor esfericidad.

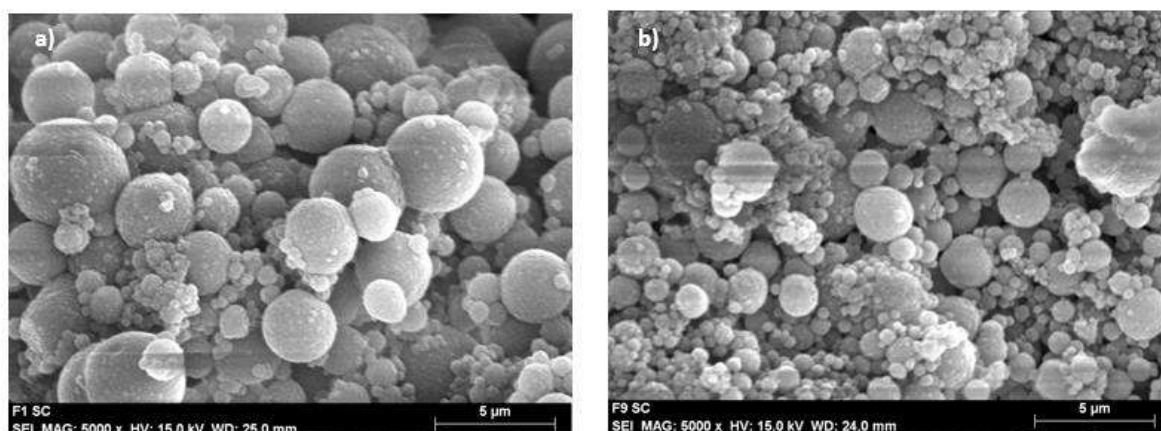


Figura 4.7 Micrografías de microesferas de alginato (2% p/v) libre de fármaco con tiempos de reticulación de (a) 15 minutos y (b) 60 min, a 5000X.

Para el caso de las microesferas sintetizadas a una concentración de 5% (p/v) de alginato y tiempos de reticulación variables (15 y 60 min), la Figura 4.8 demuestra que dichas esferas presentan mayor tamaño, superficie parcialmente rugosa y debido al aumento en la viscosidad del polímero, dada por el incremento en la concentración, se tiene mayor número de agregados entre esferas, careciendo de uniformidad. Resultados similares se reportan en la literatura para microesferas de alginato con superficie rugosa y formación de pequeños poros. Se menciona, además, que la superficie irregular o los agregados en las microesferas es debida a la reticulación con los iones de calcio [59, 61].

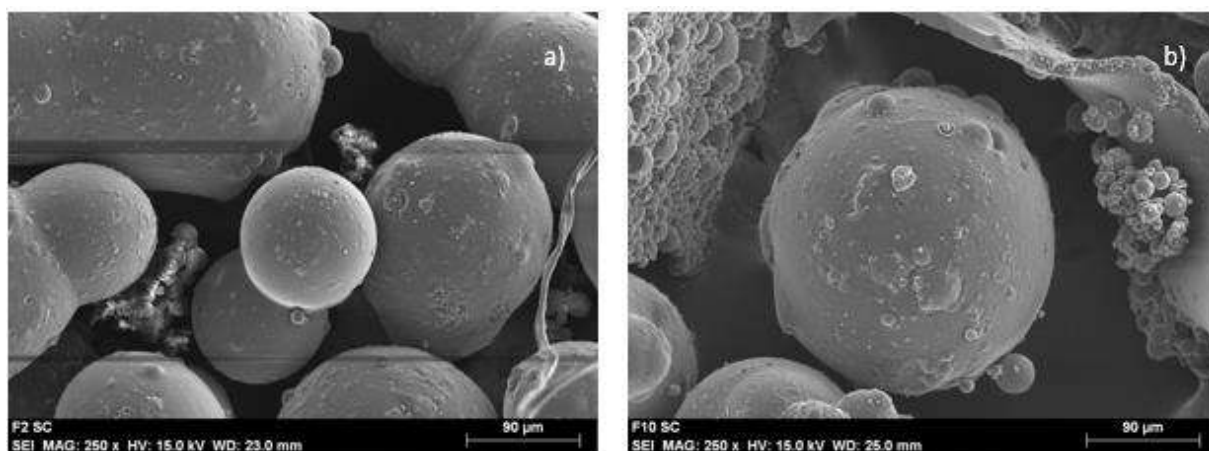


Figura 4.8 Micrografía de microesferas de alginato (5% p/v) sin carga farmacéutica con tiempos de reticulación de (a) 15 min y (b) 60 min, a 250X.

De las microesferas obtenidas y analizadas, se observa que las que presentan mayores tiempos de reticulación, producen mayor cantidad de esferas y una relación de diámetros (longitudinal/transversal) de 1.04, por lo cual, para este proyecto se seleccionaron las MEs sintetizadas bajo las condiciones de la formulación SA2CA2.5_1, puesto que presentan un tamaño óptimo de entre 0.5 y 1.8 μm , mayor cantidad de esferas y menor número de agregados entre estas mismas.

Dadas las condiciones de síntesis de las microesferas con acetaminofén, se observó que, al igual que las MEs sin carga, las que presentaban mejores características en cuestión de tamaño y

morfología era la formulación SA2CA2.5_1. La Figura 4.9 muestra las micrografías por MEB de las microesferas cargadas con 0.1, 0.14 y 0.2 g de acetaminofén, observando que poseen superficie rugosa y porosa. Para el caso de las microesferas con 0.142 g de acetaminofén (Figura 4.9b) se muestra mayor aglomeración entre partículas, la razón de esto puede ser la poca dispersión que se generó en la formación de la emulsión.

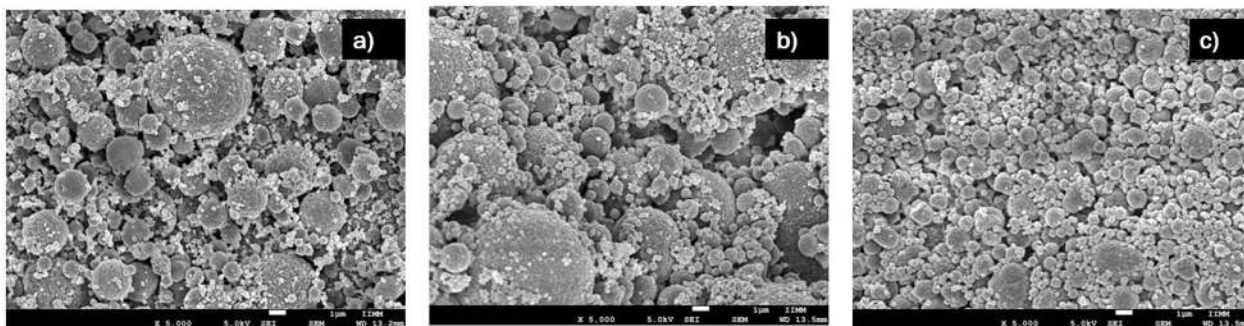


Figura 4.9 Micrografías por MEB de MEs cargadas con (a) 0.1 g, (b) 0.142 g y (c) 0.2g de acetaminofén a 5000X.

Distintos autores como Millán-Olvera y col. [20] y Hariyadi y col. [58] concluyeron que las microesferas de polímero disminuyen su relación de diámetro al estar cargadas con agentes activos, además de poseer mayor cantidad de poros, ocasionado por la interacción entre el polímero y el fármaco. Como se puede observar en la Figura 4.10, las microesferas con carga son rugosas y parcialmente porosas, dichos poros tienen tamaños entre 15 y 40 nm. Para la determinación del tamaño de poro se realizó una magnificación de 40000X en la microesfera cargada, donde las flechas en rojo indican los poros medidos.

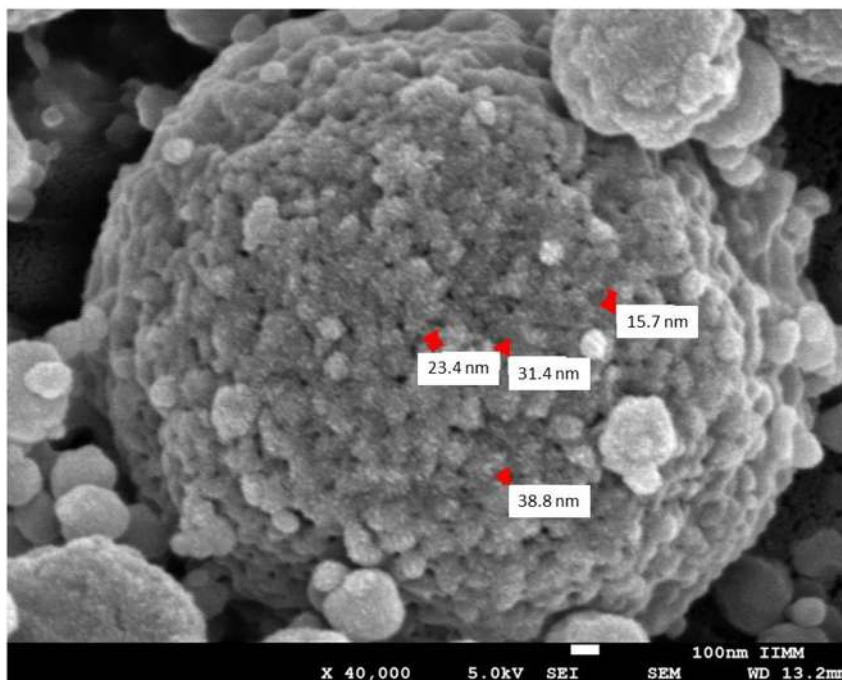


Figura 4.10 Microesfera con carga, mostrando poros nanométricos y superficie rugosa.

Debido a que las microesferas con carga no presentan cambios en su estructura al estar en contacto con el fármaco, una manera de poder identificar la presencia de éste en las microesferas es provocando una degradación de la matriz polimérica, tal como se muestra en la Figura 4.11a, y realizando un mapeo elemental (Figura 4.11b) se determinó que el elemento presente en la superficie expuesta es nitrógeno, elemento característico del acetaminofén.

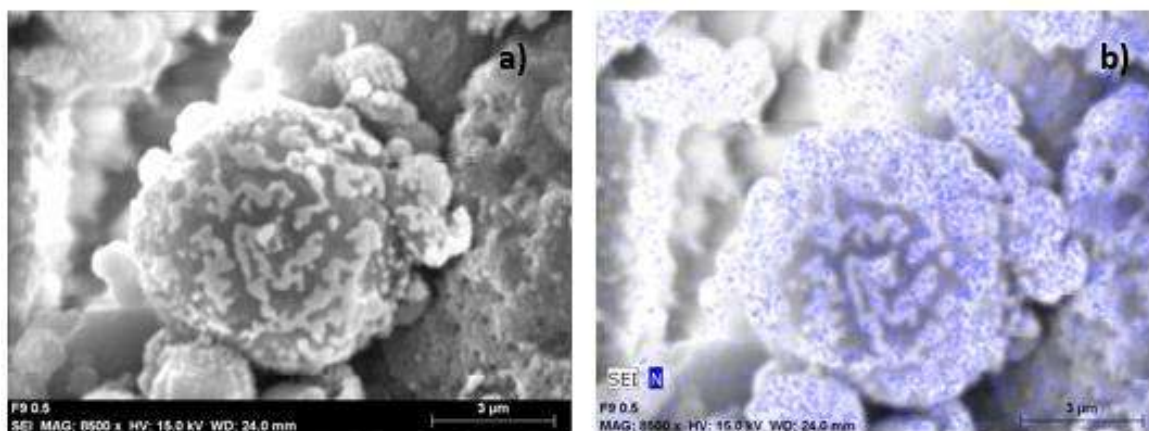


Figura 4.11 Micrografía MEs con fármaco:(a) esfera con matriz polimérica degradada; (b) mapeo elemental de microesfera, comprobando la existencia del fármaco.

4.1.3 Difracción de rayos X (DRX)

Continuando con el análisis de los materiales precursores, la Figura 4.12 muestra el difractograma del fármaco empleado, el cual presenta una estructura tipo monoclinica. El difractograma fue indexado tomando como referencia la tarjeta de patrón COD 2300230, correspondiente del software del equipo D8 AVANCE.

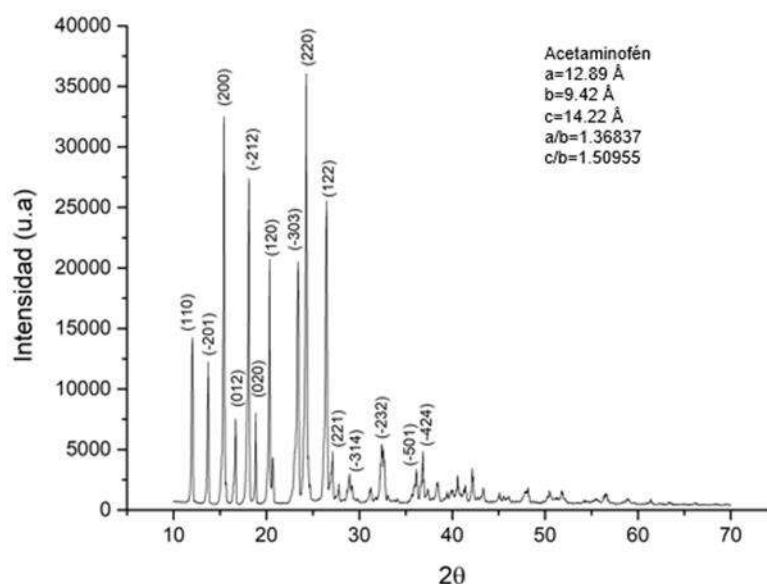


Figura 4.12 Difractograma de acetaminofén (>99%).

La Tabla 4. 2 registra los planos (hkl), distancia interplanares ($d, \text{\AA}$) y ángulo de difracción (2θ) de la muestra de acetaminofén analizada. La muestra de acetaminofén posee una estructura del tipo monoclinica, caracterizada por tener parámetros de red distintos entre sí ($a \neq b \neq c$) y dos de sus ángulos axiales son iguales entre ellos y distinto del tercer ángulo ($\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta > 90^\circ$), donde sus parámetros de red poseen longitudes de $a = 12.89 \text{ \AA}$, $b = 9.42 \text{ \AA}$ y $c = 14.22 \text{ \AA}$

Tabla 4. 2 Distancias interplanares, planos y ángulo de difracción de acetaminofén.

Acetaminofén analizado (pureza > 99%)		
hkl	d(Å)	2θ
110	7.36	12.015
-201	6.42	13.782
200	5.78	15.317
012	5.30	16.714
-212	4.90	18.089
020	4.70	18.866
120	4.38	20.258
-303	3.81	23.329
220	3.68	24.165
122	3.37	26.426
221	3.29	27.081
-314	3.08	28.967
-232	2.75	32.533
-501	2.48	36.191
-424	2.44	36.806

Respecto a los análisis de alginato, microesferas sin carga y microesferas con 0.142 g de acetaminofén, la Figura 4.13 muestra que, en los tres casos, la muestra es semicristalina.

Analizando individualmente los espectros, para el biopolímero se logran identificar dos picos o reflexiones ubicados aproximadamente a 13.40° y 21.49° atribuidos a los bloques de ácido gulurónico y ácido manurónico, respectivamente. El pico característico del ácido gulurónico presenta mayor intensidad que el pico del ácido manurónico, en base a esto es posible decir que el biopolímero empleado en este proyecto presenta mayor concentración de ácido gulurónico respecto del manurónico. En el caso de las microesferas sin carga, se observa solo un pico de difracción ubicado a 13.23° con menor intensidad a la obtenida en el polímero, mientras que el pico ubicado a 21.49° en el biopolímero no se presenta en las microesferas sin carga. Por último, el difractograma obtenido para las microesferas con carga muestra nuevamente los picos de difracción de los bloques de ácido gulurónico y manurónico a 14.16° y 21.25° , respectivamente. Realizando una comparación entre los difractogramas de microesferas sin carga y con carga, es posible decir que la adición de fármaco favorece el entrecruzamiento entre el alginato de sodio y los iones de calcio (Ca^{2+}). Rezende Días y col. [65] en su estudio de microesferas de alginato con biovidrio, reportaron que para microesferas de polímero sin biovidrio se tienen picos de difracción a 15° y 22° correspondientes a los bloques de ácido gulurónico y ácido manurónico, respectivamente. Además, es posible atribuir la reducción en la intensidad de las reflexiones a 13° y 20° debido a la reticulación dada entre el polímero y los iones de calcio. De lo anterior, se concluye que los resultados obtenidos en este análisis son consistentes con lo publicado en la literatura.

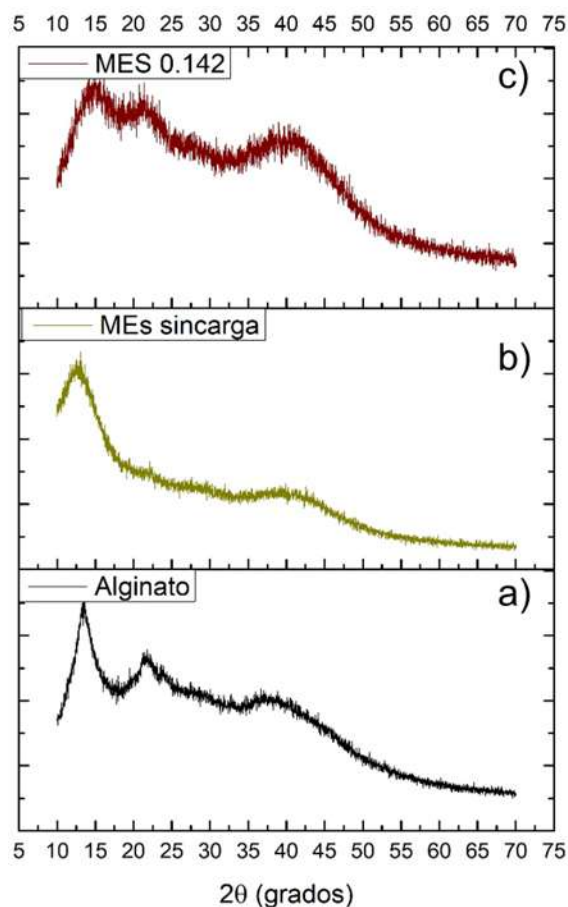


Figura 4.13 Difractograma de (a) alginato, (b) microesferas de alginato sin carga y (c) microesferas de alginato con acetaminofén.

4.1.4 Espectrometría infrarrojo (FTIR)

Previo al análisis de los espectros obtenidos, se establecieron los grupos funcionales principales de cada muestra (alginato, acetaminofén, microesferas sin y con carga). Para el caso del acetaminofén, La literatura establece que los grupos funcionales de mayor interés son hidroxilo (O-H), amino (N-H), C-H (aromático), C-H (metil), (C=O), C=C (aromático) y C-C [46,66,67]. La Figura 4.14 muestra el espectro infrarrojo de dicho fármaco, mostrando que a una longitud de onda de 3322 cm^{-1} corresponde al grupo amino (-NH), posteriormente a 3107 cm^{-1} se encuentra el enlace C-H correspondiente al grupo aromático del fármaco, a una longitud de onda de 1652 cm^{-1} se ubica el grupo C=O (amida I), respecto a los dobles enlaces del anillo, a 1609 cm^{-1} se registra el estiramiento de los enlaces C=C. Continuando con el análisis en un rango de $1560\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ nuevamente se

reconocen modos vibracionales de flexión del grupo amino (-NH), a 1171 y 1323 cm^{-1} se encuentran los grupos O-H. Finalmente en un rango de 900-650 cm^{-1} se registran modos de vibración del grupo funcional -CH con flexiones fuera del plano [68]. La Tabla 4.3 registra los grupos funcionales, longitud de onda y vibración molecular del espectro infrarrojo del acetaminofén.

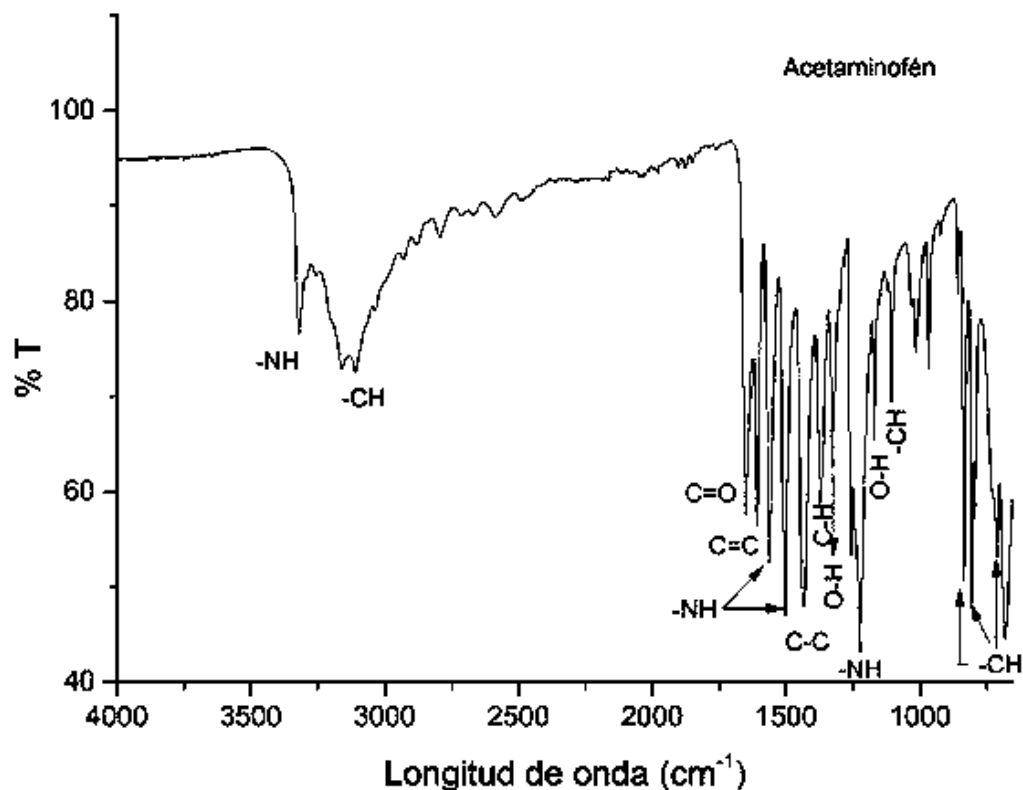


Figura 4.14 Espectro infrarrojo de acetaminofén.

Tabla 4.3 Grupos funcionales pertenecientes al acetaminofén detectados mediante espectrometría infrarrojo.

Grupo funcional	Vibración molecular	Longitud de onda (cm ⁻¹)
-NH	Estiramiento	3322
	Flexión	1560
	Flexión	1500
	Flexión	1223
-CH	Estiramiento	3107
	Flexión en plano	1110
	Flexión fuera de plano	838
	Flexión fuera de plano	807
	Flexión fuera de plano	713
	Flexión fuera de plano	679
C=O	Estiramiento	1652
C=C	Estiramiento	1609
C-C		1433
O-H	Flexión fuera de plano	1171 (Fenol)
	Flexión en plano	1323
C-H	Estiramiento simétrico	1366

La Figura 4.15, representa el espectro infrarrojo del alginato y microesferas de alginato sin carga. La literatura establece que los principales grupos funcionales del biopolímero son hidroxilo (O-H), carboxilato (-COO-), C-H y C-O-C [59-61]. El grupo funcional hidroxilo (O-H) se encuentra a una longitud de onda de 3247 cm⁻¹, posteriormente a 2920 cm⁻¹ se registran modos vibracionales de estiramiento debidos al enlace C-H, respecto al grupo funcional carboxilato (-COO-) en un rango de 1600 y 1410 cm⁻¹ se registran estiramientos asimétricos y simétricos, respectivamente. Finalmente, las bandas de absorción ubicadas entre los 1083-1022 cm⁻¹ pertenecen a los modos vibracionales del grupo C-O [68]. La Tabla 4.4 muestra los valores de longitud de onda, vibración molecular y grupo funcional del biopolímero empleado.

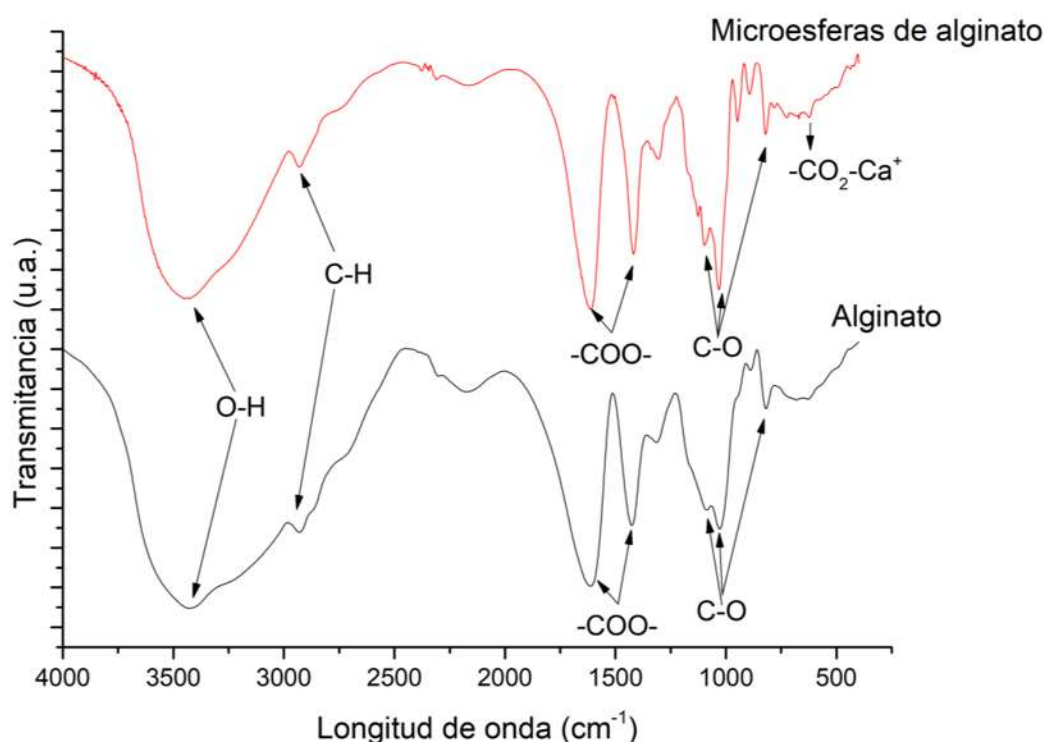


Figura 4.15 Espectro infrarrojo de alginato y microesferas de alginato.

Tabla 4.4 Grupos funcionales y tipo de vibración molecular pertenecientes al alginato de sodio.

Grupo funcional	Vibración molecular	Longitud de onda (cm ⁻¹)
O-H	Estiramiento	3247
C-H	Estiramiento	2920
-COO-	Estiramiento asimétrico	1596
	Estiramiento simétrico	1415
C-O	Estiramiento asimétrico	1060
	flexión	1024

Una vez determinados los grupos funcionales de los materiales precursores y las microesferas sin carga, se realizó una comparación de las microesferas con carga y microesferas sin carga, con la finalidad de comprobar la existencia de una interacción polímero-fármaco. La Figura 4.16 muestra los espectros infrarrojos de las microesferas con acetaminofén, observando que existe la presencia

de los grupos funcionales hidroxilo (O-H), carboxilo (-COO- y C-O) y C-H, así como a 625 cm^{-1} , se encuentra la banda de absorción de una sal de ácido carboxílico (-CO₂-Ca⁺), indicando el entrecruzamiento entre el polímero y los iones de calcio. Por otro lado, a una longitud de onda de 1515 cm^{-1} se observó una banda de absorción perteneciente a la vibración de tensión del grupo N-H, verificando así la presencia del fármaco en las microesferas.

La Tabla 4.5 muestra una comparación de la longitud de onda registrada para las microesferas de alginato sin y con carga de acetaminofén.

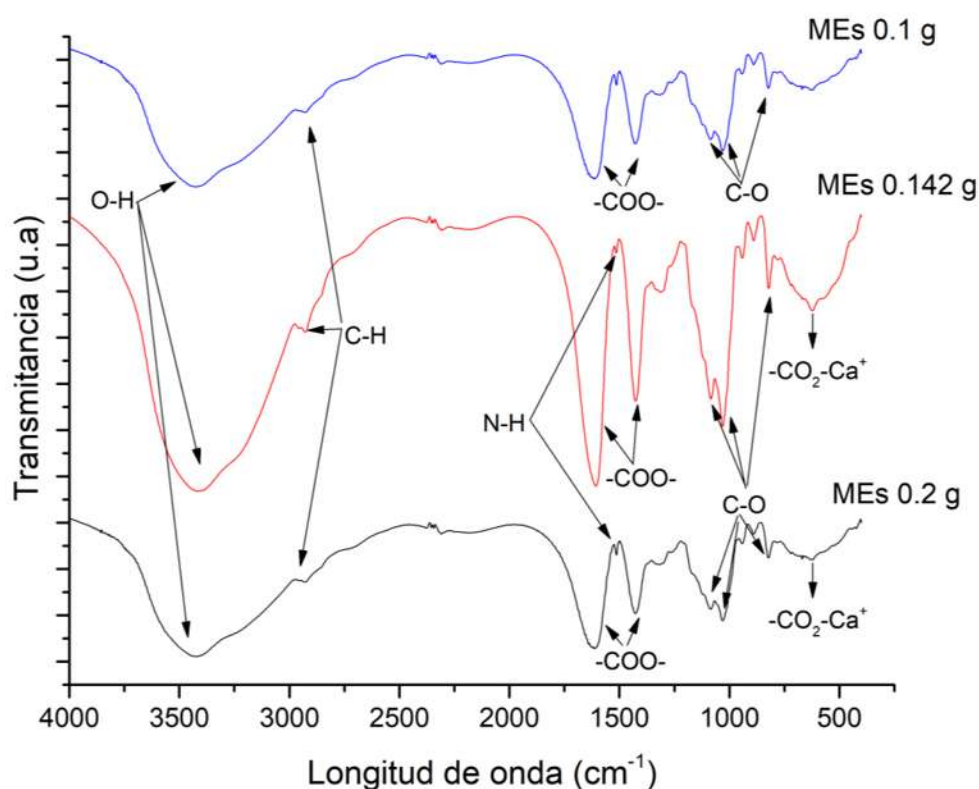


Figura 4.16 Espectro infrarrojo de microesferas de alginato cargadas con 0.1, 0.142 y 0.2 g de acetaminofén.

Tabla 4.5 Comparación de longitud de onda de microesferas de alginato sin y con carga farmacéutica.

Grupo funcional	Vibración molecular	Microesferas de alginato	Microesferas de alginato con carga
		Longitud de onda (cm ⁻¹)	Longitud de onda (cm ⁻¹)
O-H	Estiramiento	3257	3263-3260
C-H	Estiramiento	2920	2926-2920
-COO-	Estiramiento asimétrico	1597	1598-1594
	Estiramiento simétrico	1418	1421-1418
C-O	Estiramiento	1062	1083-1081
	Estiramiento	1020	1019-1017
N-H	Tensión	---	1515
-COOCa ⁺	Rocking en plano y fuera de plano	625	622

4.1.5 Análisis térmico simultáneo (TGA/DSC)

Se realizaron análisis por termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) del acetaminofén, alginato y microesferas de alginato con acetaminofén. La Figura 4.17 muestra el diagrama termoanalítico del fármaco, donde se observa un primer pico endotérmico a 173.77°C asociado a la temperatura de fusión de material y un segundo pico a 311.06°C debido a la descomposición del fármaco, coincidiendo con lo reportado por Jendrzewska y col. [69] donde atribuyen el segundo pico a la descomposición del fármaco a una temperatura de 364°C, la diferencia de temperaturas entre el reportado por estos investigadores y los obtenidos en el presente trabajo puede deberse a las condiciones de operación bajo las cuales se realizaron los análisis. Jendrzewska reportan una velocidad de calentamiento de 5°C/min, mientras que el obtenido en el presente trabajo se realizó a 20°C/min, ambos bajo una atmósfera de argón. Been y col. [70] reportaron que el pico endotérmico a 170°C es debido a la fusión de la estructura cristalina del fármaco. El análisis termogravimétrico muestra una pérdida de masa total en una sola etapa de aproximadamente 90% registrada entre (300-350)°C. Schnitzler y col. [71] trabajando bajo una

atmósfera de nitrógeno con velocidad de calentamiento de 20°C/min, registran la pérdida del fármaco hasta 326°C. Tomando nuevamente lo reportado por Jendrzejewska y col., reportan una pérdida de peso del 72% iniciando la descomposición del fármaco a 321°C y terminando en 378°C.

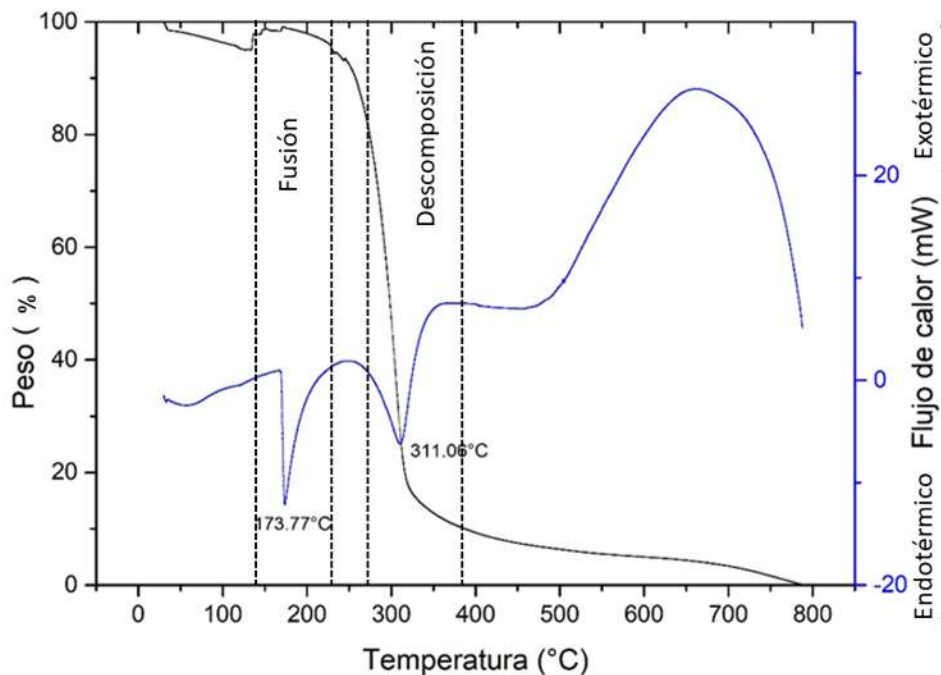


Figura 4.17 Diagrama termoanalítico de TGA/DSC de acetaminofén.

En la Figura 4.18 se muestra la curva TGA/DSC del alginato. En el análisis DSC del polímero se observa un perfil endotérmico a 93.10°C, con entalpía de 161.7 J/g, el cual corresponde a la deshidratación del polímero, mientras que el pico exotérmico registrado a 256.14°C y entalpía de 336.1 J/g se debe a la descomposición del anillo glucosídico perteneciente a la molécula del alginato. Maciel y Parize [72] registraron una deshumidificación del material alrededor de los 100°C y la degradación del bloque de ácido gulurónico en torno a los 250°C. Soares y col. [73] bajo una atmósfera de nitrógeno (N₂) y rampa de calentamiento de 20°C/min, analizaron el comportamiento térmico de ácido algínico y alginato de sodio, reportando que para el alginato de sodio se observa una deshidratación del material a 102.9°C y la descomposición del mismo a 260.3°C. Paşcalău y col. [74] trabajando con una atmósfera de nitrógeno (N₂) reportaron que la desorción del agua ocurre entre los 30 y 100°C, así como la temperatura de descomposición de

enlaces glucosídicos ocurre entre los 225 y 250°C. Respecto al análisis termogravimétrico (TGA) del biopolímero (Figura 4.18), se muestran tres zonas de pérdida de peso, la primera de aproximadamente 16% se debe a la pérdida de humedad en la muestra, la segunda de 44.14% ($T = 250.57^\circ\text{C}$) se atribuye al rompimiento del anillo gulurónico perteneciente a la cadena polimérica, dado que el polímero contiene grupos hidroxilo y carboxilo, al momento de romper los enlaces del anillo glucosídico se reduce a una molécula con extremos hidroxilo y carboxílico. Finalmente, entre los 450-800°C se tiene la formación de carbonatos de sodio y la degradación térmica del mismo, esto es debido a la fragmentación y conversión del polisacárido en carbón.

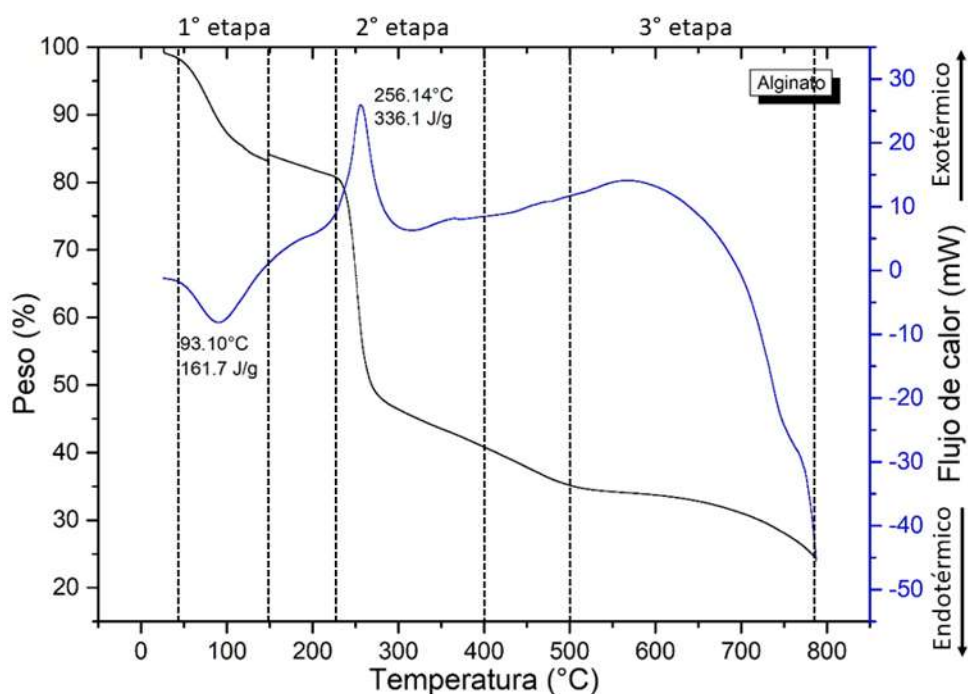


Figura 4.18 Diagrama termoanalítico TGA/DSC de alginato.

La Tabla 4.6 muestra un resumen del porcentaje de pérdida de peso, rangos de temperatura y fenómenos térmicos del análisis TGA del polímero. Maciel y Parize [72] reportan en la primera zona de descomposición una pérdida de 10% alrededor de los 110°C, en la segunda zona obtuvieron un 20% de pérdida de peso debida al agua ligada con los grupos OH del polímero y finalmente a 400°C ocurre la degradación térmica del anillo glucosídico. López Ortega [75] en el análisis de

descomposición de alginato de sodio reporta que la descomposición del anillo gulurónico ocurre a una temperatura máxima de 288.65°C con una pérdida de masa de 49.8% bajo una atmósfera de N₂ con un flujo de calor de 20°C/min.

Tabla 4.6 Descomposición térmica de alginato, resultado del análisis termogravimétrico (TGA).

Etapas	Evento térmico	ΔT (°C)	Pérdida de masa (%)
1	Pérdida de humedad	25-200	16.14
2	Rompimiento del anillo gulurónico	200-450	44.14
3	Formación de NaCO ₃ y degradación térmica	450-800	13.54

La Figura 4. 19 muestra los diagramas termoanalíticos obtenidos de las técnicas TGA/DSC para las microesferas sin y con carga. En el caso de las microesferas libre de fármaco se observa primeramente el perfil endotérmico de la pérdida de agua a 113.89°C con una entalpía de 398.2 J/g, a medida en que va en aumento la temperatura, se presentan dos picos exotérmicos a 236.16° y 298.85°C, estos perfiles son referentes a la descomposición de los bloques manurónico y gulurónico, respectivamente. Esta diferencia de temperaturas en la descomposición entre el polímero en polvo y las microesferas de alginato, es debida a que a medida que aumenta la reticulación de las MEs, la muestra se vuelve térmicamente más estable, por lo que la degradación y descomposición del material se ve retardada.

Respecto al análisis DSC de las microesferas de alginato con acetaminofén, se observa nuevamente la presencia de los perfiles endotérmicos referentes a la deshumidificación del material en rangos de 100°C-109°C, teniendo en cuenta los perfiles endotérmicos del polímero, para las MEs con fármaco se tiene un aumento en las temperaturas de deshidratación de 10°C aproximadamente, este fenómeno se presenta también para el perfil de degradación del ácido gulurónico de las MEs con fármaco, donde la temperatura de degradación se encuentra entre 280°C-290°C siendo ésta 30°C mayor que la del biopolímero.

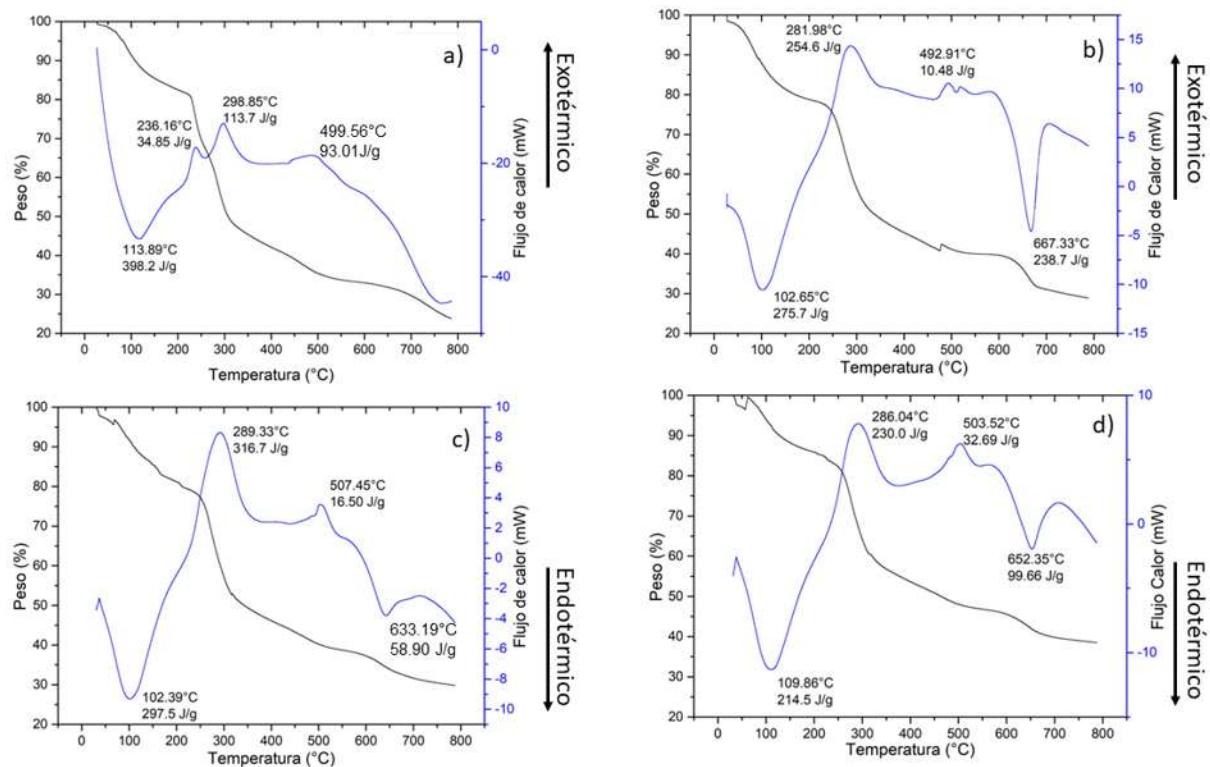


Figura 4. 19 Diagramas termoanalíticos TGA/DSC para microesferas sin carga (a) y microesferas con 0.1 (b), 0.142 (c) y 0.2 (d) g de acetaminofén.

Dentro del análisis termogravimétrico, la Tabla 4.7 muestra los datos obtenidos para las microesferas sin y con carga, reportando la temperatura máxima de la pérdida y el porcentaje de pérdida de peso. En el caso de las microesferas libres de fármaco, se observan 4 etapas de descomposición, la primera como se ha mencionado es debida a la pérdida de humedad, a una temperatura de 113.89 se pierde 17% de la masa inicial, en la segunda etapa se tiene la descomposición del ácido manurónico a una temperatura de 234.63°C y 14% de pérdida, para la tercera etapa a una temperatura de 285°C se tiene el rompimiento del anillo gulurónico perdiendo un 25% en peso, en los casos del rompimiento de anillos del bloque G y M que posee la molécula, estos son degradados a grupos hidroxilo y carboxílico, lo que provoca la pérdida de peso. Finalmente, en la cuarta etapa, al igual que en las microesferas con acetaminofén se tiene la formación de carbonatos y la descomposición de éstos con disminuciones del 18% en peso, como se menciona anteriormente esta etapa es llevada a cabo por la fragmentación y conversión del polisacárido en carbón.

Para el caso de las microesferas con carga se observan 3 zonas de pérdida, la primera debida a la deshidratación del material con pérdidas entre 15 y 20%, la segunda zona tiene la mayor pérdida de peso siendo de aproximadamente 40% referida a la descomposición del anillo glucurónico, y finalmente en la última etapa se tiene la formación de carbonato de sodio y su descomposición térmica con pérdidas entre 8 y 10% en peso. Con la finalidad de comprobar la descomposición de ambos bloques G y M de la molécula en las microesferas con fármaco, se recurrió al análisis de la derivada del flujo de calor respecto a la temperatura, Figura 4. 20 observado que se registra la descomposición del grupo manurónico a una temperatura de 212.21°C, resultado similar a lo reportado por Srisuwan y Srihanam [76] en sus estudios de análisis térmico de micropartículas de alginato, reportan que a una temperatura de 229 y 343°C se tiene la descomposición de los bloques M y G del ácido manurónico y ácido gulurónico de la cadena polimérica, reduciendo a moléculas hidroxilicas para finalmente a temperaturas mayores de 470°C fragmentar y descomponer en carbonatos.

Tabla 4.7 Datos termogravimétricos de microesferas de alginato sin y con carga farmacéutica

Muestra	MEs sin carga		MEs 0.1		MEs 0.142		MEs 0.2	
Evento térmico	DTG (°C)	%PP*	DTG (°C)	%PP*	DTG (°C)	%PP*	DTG (°C)	%PP*
Pérdida de humedad	113.89	17.36	102.65	19.29	102.9	21.23	109.86	14.87
Descomposición del polímero	234.63	14.57	271.62	38.59	271.48	40.20	275.21	37.79
	285.60	25.25						
Formación Na₂CO₃	474.21	18.82	477.37	10.91	487.11	8.77	489.18	8.31
Descomposición Na₂CO₃	650.89		666.49		633.02		648.52	

*PP= Pérdida de peso

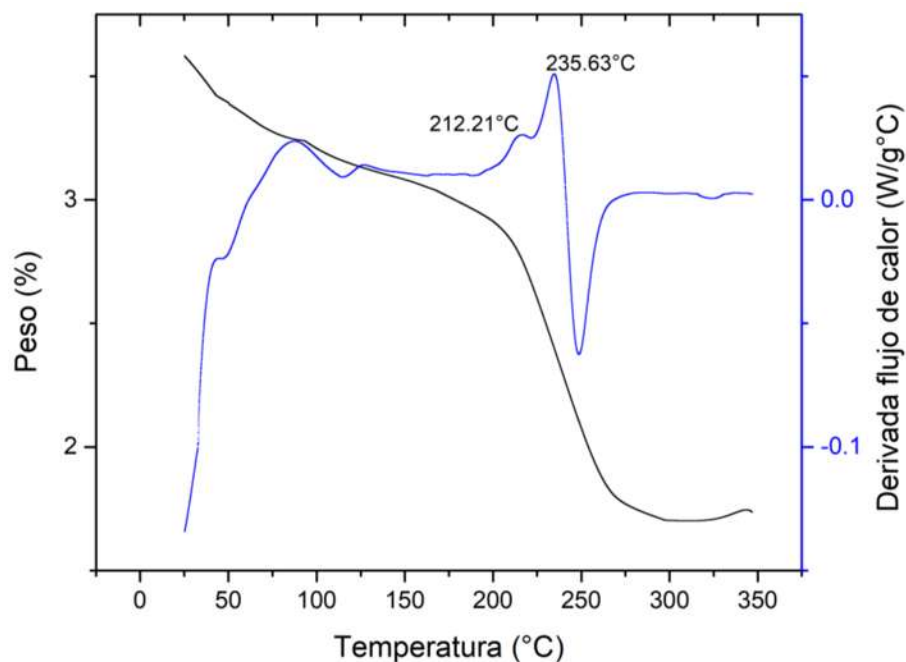


Figura 4. 20 Diagrama termoanalítico que representa la derivada del flujo de calor (W/g°C) respecto a la temperatura de las microesferas con 0.1 g acetaminofén

4.1.6 Porcentaje de rendimiento

Se determinó el porcentaje de rendimiento para las microesferas sin y con carga, mostrando que, para las microesferas sin carga, el promedio dado en porcentaje de rendimiento es de 69.16-78.12% (Tabla 4. 8), y para las microesferas con acetaminofén los rendimientos son entre 77.50-83.80% (Tabla 4.9). Sivan y col. [62] reportaron rendimientos de 60 y 88% para las microesferas obtenidas a 1000 y 800 rpm, respectivamente. Concluyendo que la velocidad de agitación no solo influye en el tamaño de partícula, sino que también interviene en los rendimientos de producción. Zava y col. [60] para sus microesferas de alginato con ácido Δ -aminolevulínico registraron rendimientos del 60.5%. Benavides y col. [77] empleando una emulsión aceite/agua (O/W), obtuvieron rendimientos de 60.2-62.3% para microesferas con aceite esencial de tomillo, atribuyendo las bajas eficiencias a las pérdidas que existen en el momento de la extrusión de la solución polimérica entre el émbolo de la jeringa y las paredes de ésta. Dhamecha y col. [78] realizaron un estudio comparativo de los métodos más comunes de síntesis de MEs de alginato obteniendo rendimientos entre 66.6 y 96.6%. Comparando los rendimientos con lo reportado por los distintos autores mencionados es posible decir que la técnica empleada en este proyecto resulta factible teniendo rendimientos mayores o iguales a 70%.

Algunos de los factores que influyen en los porcentajes de rendimiento son las pérdidas de muestra entre lavados, la solución acuosa restante entre las paredes de los recipientes empleados para la obtención de la emulsión, y la relación polímero-reticulante. Esta última es de gran importancia, puesto que una baja concentración de solución reticulante tendría menor interacción entre las gotas formadas en la emulsión, resultado en una menor cantidad de microesferas formadas. Esto es posible de comprobar en los resultados mostrados en la Tabla 4.8, puesto que las muestras elaboradas con una relación 2:1 de solución de polímero-solución reticulante (SA2CA2.5 y SA2CA2.5_1), tienen menor porcentaje de rendimiento a comparación de las que se prepararon con una relación 1:0.8 solución de polímero-solución reticulante (SA5CA2.5 y SA5CA2.5_1), para los mismos tiempos de reticulación de 15 min (SA2CA2.5 y SA5CA2.5) y 60 min (SA2CA2.5_1 y SA5CA2.5_1).

Tabla 4. 8 Resultados de porcentaje de rendimiento de las microesferas de alginato.

Formulación	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% Rendimiento	%Rendimiento promedio
SA2CA2.5	0.500	0.340	68.10%	75.09±7.7 %
	0.500	0.370	73.82%	
	0.500	0.417	83.37%	
SA5CA2.5	1.250	0.863	69.08%	78.12±9.5%
	1.250	0.966	77.28%	
	1.250	1.100	88.00%	
SA2CA2.5_1	0.500	0.383	76.60%	69.16±8.4%
	0.500	0.300	60.00%	
	0.500	0.354	70.87%	
SA5CA2.5_1	1.250	0.870	69.60 %	75.11±5.5%
	1.250	0.937	75.00%	
	1.250	1.009	80.75%	

Tabla 4.9 Resultados de porcentaje de rendimiento de las microesferas de alginato con acetaminofén.

Formulación	Masa inicial (g)	Masa final (g)	%Rendimiento	%Rendimiento promedio
MEs 0.1	0.500	0.372	74.30%	78.90±3.3 %
	0.500	0.412	82.30%	
	0.500	0.401	80.20%	
MEs 0.142	0.500	0.377	75.50%	77.50±1.4%
	0.500	0.393	78.50%	
	0.500	0.392	78.49%	
MEs 0.2	0.500	0.410	81.90%	83.80±3.5%
	0.500	0.444	88.80%	
	0.500	0.404	80.80%	

4.1.7 Porcentaje de pérdida de humedad

Las Tabla 4.10 y Tabla 4.11 muestran los resultados en porcentaje de pérdida de humedad de las microesferas de alginato sin y con carga de acetaminofén, respectivamente. En el caso de las microesferas sin carga es apreciable que las formulaciones sintetizadas con una solución de alginato al 5% p/v poseen bajos porcentajes de pérdida de humedad, es importante recordar que una mayor cantidad de solución polimérica produce microesferas más densas por lo tanto la difusión de solvente a través de las cadenas poliméricas se ve afectado, evitando así una eliminación efectiva. Por otra parte, las microesferas fabricadas al 2% p/v registran porcentajes de pérdida de humedad más efectivos en comparación con las formulaciones al 5%.

En adición a este análisis, para el caso de los lotes de microesferas con fármaco, las microesferas con 0.1 y 0.2 g de acetaminofén presentan valores de pérdida de humedad similares a las formulaciones SA2CA2.5 y SA2CA2.5_1. Además, se observa que el porcentaje de pérdida de humedad para las microesferas con 0.142 g de acetaminofén está por arriba del 40% lo que puede indicar que absorbieron mayor cantidad de solvente entre lavados, en comparación con las muestras anteriores.

Tabla 4.10 Resultados de pérdida de humedad de microesferas de alginato.

Formulación	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% Pérdida de humedad	% Pérdida de humedad promedio
SA2CA2.5	0.444	0.340	23.40 %	20.60±4.7
	0.436	0.370	15.13%	
	0.487	0.417	23.23%	
SA5CA2.5	0.970	0.863	10.90 %	14.53±3.5
	1.134	0.966	14.83%	
	1.357	1.100	17.86%	
SA2CA2.5_1	0.466	0.383	17.90 %	20.44±4.7
	0.405	0.300	25.92%	
	0.428	0.354	17.50%	
SA5CA2.5_1	1.007	0.870	13.70 %	13.22±2.9
	1.042	0.937	10.07%	
	1.200	1.009	15.91%	

Tabla 4.11 Resultados de pérdida de humedad de las microesferas de alginato con acetaminofén.

Formulación	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% Pérdida de humedad	% Pérdida de humedad promedio
MEs 0.1	0.503	0.371	26.20	24.45 ±3.27
	0.513	0.411	19.85	
	0.551	0.401	27.28	
MEs 0.142	0.510	0.377	25.84	41.60±13.14
	0.665	0.392	40.97	
	0.935	0.393	58.03	
MEs 0.2	0.517	0.410	20.90	21.70 ±1.85
	0.586	0.444	24.25	

	0.504	0.404	19.90	
--	-------	-------	-------	--

4.1.8 Eficiencia de encapsulación de fármaco

Se determinó la eficiencia de encapsulación de las tres formulaciones dadas para las microesferas con carga. Para la curva de calibración se analizaron muestras de concentración conocida de acetaminofén (5, 10, 20, 30, 40 ppm). La Figura 4.21 muestra un pico característico para cada concentración, coincidiendo en la longitud de onda de 243.20 nm. Conociendo la absorbancia para cada una de las soluciones a las concentraciones establecidas, se realizó la curva de calibración (Figura 4.22). Los datos fueron sometidos a un ajuste lineal, obteniendo un valor de correlación de 0.995 y la ecuación de la línea recta obtenida está representada por la ec. 4.1.

$$\text{Concentración acetaminofén (ppm)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0068}{0.0053} \quad (4.1)$$

En soluciones que presentan un comportamiento normal (tipo gaussiano) en su curva de absorbancia, se considera solo la intensidad ya que la curva al comienzo y final de la absorción del haz de luz ésta regresa al punto de intensidad cero. En casos donde la curva no tenga este comportamiento, se toma en cuenta el área bajo la curva dentro de los límites inicial y final de la onda de absorbancia.

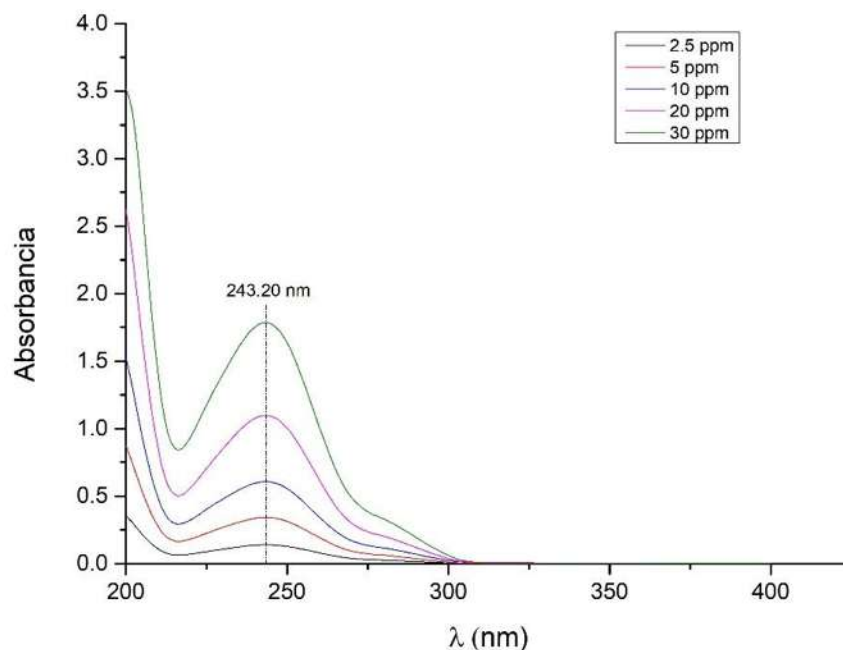


Figura 4.21 Espectro UV-VIS de las soluciones patrón de acetaminofén.

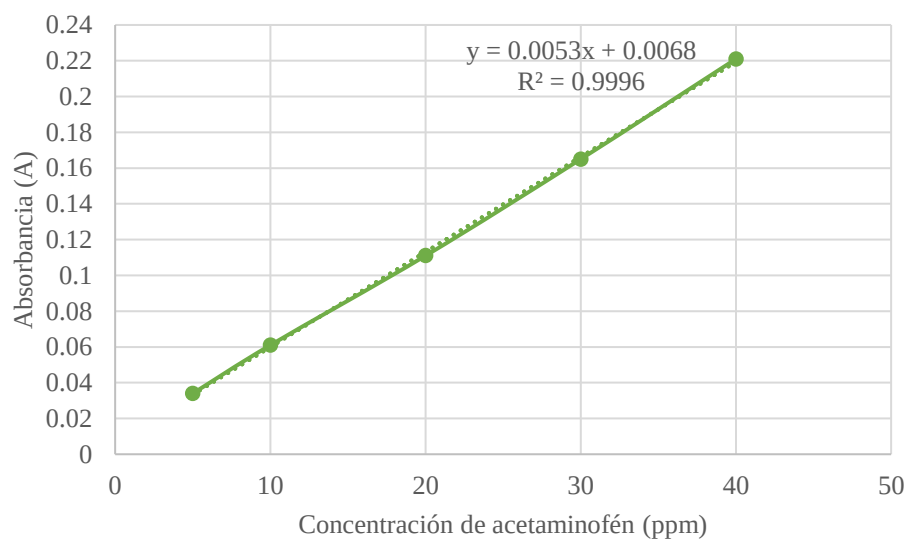


Figura 4.22 Curva de calibración para la determinación de acetaminofén presente en las MEs.

La Tabla 4.12 muestra los resultados de las eficiencias de encapsulación de fármaco en cada ensayo, para las microesferas con 0.1 g de acetaminofén el porcentaje determinado fue de 75%, para microesferas con 0.142 g se obtuvo una eficiencia de encapsulación de 36% y finalmente para

las microesferas cargadas con 0.2 g de fármaco se tuvieron eficiencias de 46%. Es notorio que en las microesferas con menor cantidad de fármaco se obtuvieron eficiencias mayores al 50%, caso contrario de las microesferas con 0.142 y 0.2 g.

Tabla 4.12 Resultados de eficiencia de encapsulamiento en microesferas de alginato con acetaminofén.

Formulación	Masa de microesferas cargadas con acetaminofén (g)	Acetaminofén teórico encapsulado (g)	Acetaminofén real encapsulado en las microesferas (g)	Eficiencia de carga (%)	Eficiencia de carga promedio (%)
MEs 0.1	0.371	0.100	0.086	86%	75.33±7.9
	0.411	0.100	0.073	73%	
	0.401	0.100	0.067	67%	
MEs 0.142	0.377	0.142	0.053	37.5%	36.16±1.74
	0.392	0.142	0.053	37.3%	
	0.392	0.142	0.048	33.70	
MEs 0.2	0.409	0.200	0.092	45.5%	46.83±2.2
	0.444	0.200	0.090	45%	
	0.404	0.200	0.100	50%	

Jyothi y col. [79] realizaron una revisión en la que mencionan los principales factores que influyen en la eficiencia de encapsulación: (1) alta solubilidad del polímero en solventes orgánicos, (2) baja solubilidad del disolvente orgánico en agua, (3) baja concentración de polímero y (4) tasa lenta de evaporación de solventes. Por su parte Sivan y col. [62] reportaron que se obtiene mayor eficiencia de encapsulación cuando la velocidad de agitación de la emulsión disminuye, recordando que para las microesferas sintetizadas a 1000 rpm obtuvieron una E.E.=63%, mientras que las obtenidas a 800 rpm E.E.=70%.

Huang y col. [59] consiguieron una eficiencia de atrapamiento del 63% para las microesferas alginato-luteína, así mismo, observaron que bajas concentraciones de alginato conducen a bajas eficiencias de atrapamiento. Por otra parte, se demostró que una mayor concentración de cloruro de calcio condujo a una menor eficiencia de atrapamiento. La razón es que los iones de calcio pueden unirse a los grupos carboxílicos limitados del alginato, lo que lleva a la formación de un gel termoestable fuerte. Una vez que los sitios de unión estuvieran completamente ocupados, el exceso de iones de calcio limita la interacción de la luteína con el alginato. Uyen y col. [60] lograron eficiencias de encapsulación, para las microesferas alginato-curcumina, de 37.67 a 53.36% siendo éstas dependientes de la concentración de solución de alginato. Puesto que al aumentar la concentración de alginato de 2% a 5% p/v aumentó la eficiencia de encapsulación. El aumento de la viscosidad elimina la difusión de la curcumina fuera de la red de alginato de alta densidad durante el proceso de gelificación, promoviendo la gelificación del cloruro de calcio y el alginato de sodio.

Dicho esto, es probable que los valores de eficiencia de encapsulación obtenidos estén influenciados por una baja concentración de polímero, una lenta tasa de evaporación del disolvente, ya que se necesitan 3 horas para asegurar su eliminación total y las altas velocidades de agitación en la emulsión. Por lo tanto, una forma de optimizar la eficiencia de la encapsulación sería usar proporciones de polímero más altas y aumentar la temperatura de evaporación entre 90 y 100 °C para tener tasas de evaporación más eficientes.

4.1.9 Cinética de liberación

Siguiendo la metodología redactada en el apartado 3.5 Cinética de liberación de fármaco, las microesferas fueron suspendidas en tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS), tomando alícuotas a diferentes tiempos y determinando la cantidad de fármaco liberado mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis), la cinética de liberación se determinó por los modelos cinéticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Rigter Peppas (apartado 2.10 Modelos cinéticos de liberación). La Tabla 4.13 muestra un resumen de los datos obtenidos de fármaco liberado en función del tiempo, por su parte la Tabla 4.14, contiene los modelos cinéticos descritos anteriormente con los respectivos valores determinados para cada sección de liberación.

La determinación de los mecanismos de liberación se realizó por secciones, cada formulación analizada tiene un total de cuatro secciones donde, para cada sección se aplicó un modelo matemático para determinar el de mejor ajuste. Las Tablas 4.15-4.17 resumen los valores del coeficiente de correlación obtenido para cada sección en las diferentes formulaciones.

Tabla 4.13 Concentración de acetaminofén liberado desde las microesferas.

Tiempo (h)	Masa de acetaminofén liberado (mg)		
	F9 0.1	F9 0.141	F9 0.2
0	0	0	0
0.25	3.44	1.20	1.66
0.5	4.80	2.17	3.93
1	6.96	3.22	7.02
1.5	10.62	4.56	10.21
3	13.48	7.51	13.70
9	16.53	10.40	16.81
24	21.35	13.10	20.27
48	23.89	14.48	23.07
72	26.18	17.25	27.94
144	30.06	20.68	30.87
168	33.35	22.65	34.32
192	37.51	24.23	36.85
216	39.46	25.33	38.73
240	42.16	28.04	41.79
312	43.74	29.94	43.76
384	45.27	31.32	45.58
480	46.73	32.56	47.13

Tabla 4.14 Resultados de modelos de liberación de fármaco desde las microesferas

Modelo cinético de liberación	Microesferas con 0.1 g acetaminofén	Microesferas con 0.142 g acetaminofén	Microesferas con 0.2 g acetaminofén
Orden cero	$Q = k_0 t$ $r^2 = 0.998$ $Q = 13.817t$	$Q = k_0 t$ $r^2 = 0.998$ $Q = 8.891t$	$Q = k_0 t$ $r^2 = 0.998$ $Q = 6.512t$
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t}$ $r^2 = 0.998$ $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.234\sqrt{t}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t}$ $r^2 = 0.998$ $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.1801\sqrt{t}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H^2 \sqrt{t}$ $r^2 = 0.992$ $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.2348\sqrt{t}$
Primer Orden	$\ln M_t = \ln M_0 + k_1 t$ $r^2 = 0.992$ $\ln M_t = 3.89 \times 10^{-3} + 2.85t$	$\ln M_t = \ln M_0 + k_1 t$ $r^2 = 0.992$ $\ln M_t = 0.06 + 11.16 t$	$\ln M_t = \ln M_0 + k_1 t$ $r^2 = 0.998$ $\ln M_t = 5.62 \times 10^{-3} + 3.33t$
Rigter-Peppas	$Q = k_{RP} t^n$ $r^2 = 0.999$ $Q = 31.322t^{0.1892}$	$Q = k_{RP} t^n$ $r^2 = 0.999$ $Q = 18.200t^{0.2784}$	$Q_t = k_{RP} t^n$ $r^2 = 0.998$ $Q = 16.0247t^{0.1750}$

Para las Tablas 4.15-4.17 se resalta con gris, los mejores ajustes para cada sección, en el caso donde dos o más modelos se ajustan a la sección se calculó el criterio de aceptación de Akaike para determinar el de mayor correlación. El criterio de aceptación de Akaike es un criterio de calidad relativa de un modelo, obtenido a partir de la suma de los residuos y un factor que penaliza la inclusión de parámetros.

Tabla 4.15 Resultados de los coeficientes de correlación, R^2 , para las microesferas con 0.1 g acetaminofén.

Sección	Modelos cinéticos			
	Orden cero	Modelo Higuchi	Primer orden	Rigter-Peppas

1	0.998	0.982	0.904	0.981
2	0.948	0.998	0.920	0.991
3	0.991	0.993	0.998	0.992
4	0.966	0.992	0.994	0.997

Tabla 4.16 Resultados de los coeficientes de correlación, R^2 , para las microesferas con 0.141g acetaminofén

Sección	Modelos cinéticos			
	Orden cero	Modelo Higuchi	Primer orden	Rigter-Peppas
1	0.998	0.984	0.976	0.991
2	0.954	0.998	0.913	0.990
3	0.992	0.995	0.995	0.994
4	0.986	0.993	0.982	0.996

Tabla 4.17 Resultados de los coeficientes de correlación, R^2 , para las microesferas con 0.2g acetaminofén

Sección	Modelos cinéticos			
	Orden cero	Modelo Higuchi	Primer orden	Rigter-Peppas
1	0.998	0.960	0.922	0.992
2	0.979	0.992	0.936	0.992
3	0.956	0.938	0.998	0.992
4	0.948	0.961	0.938	0.998

Se realizó la comparación de la liberación de acetaminofén contenido en las microesferas contra una tableta de acetaminofén, las muestras fueron analizadas a las mismas condiciones (pH=7.4 y

$T = 37^{\circ}\text{C}$). En la Figura 4.23 se puede observar que la tableta convencional libera el 100% de su contenido a un tiempo de 15 minutos mientras que las microesferas solo han liberado ~7% de su contenido. Esto comprueba que, al tener la ingesta del medicamento vía oral, se obtiene un alivio del malestar al momento, pero la desventaja es que su tiempo de vida es de 4-6 horas provocando una ingesta consecutiva. Por otra parte, las microesferas de polímero con fármaco contenido retardan la liberación de fármaco gracias al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Por lo tanto, el grado de liberación del fármaco aumenta a medida que aumenta la concentración del agente reticulante, ya que la interacción de las moléculas del polímero con los iones de calcio reduce el grado de hinchamiento, provocando así una menor disolución de la matriz [36].

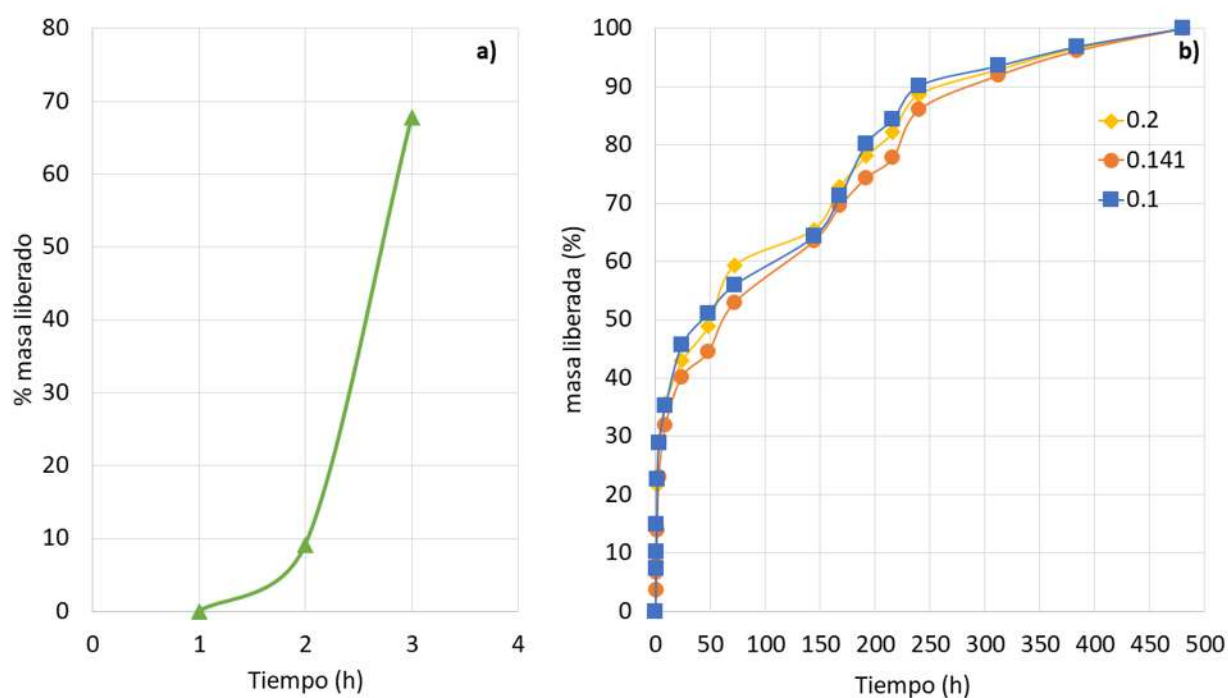


Figura 4.23 Sistema de liberación de (a) pastilla convencional 550mg vs (b) microesferas con acetaminofén.

En la Figura 4.21 se observa que la liberación total del fármaco para cada formulación analizada se dio a las 480 h (20 días). Como se mencionó anteriormente el análisis de mecanismos de liberación se realizó por secciones. En la primera sección se encontró que, para los tres casos de estudio, se tiene una liberación ráfaga de aproximadamente el 20% de fármaco contenido generada

por el fármaco acumulado cerca de la superficie de las microesferas, en las siguientes 45 horas el mecanismo de liberación se dio por la relajación de cadenas poliméricas y difusión de fármaco a través de ellas, liberando el 50% de fármaco inicialmente añadido, el modelo cinético que describe esto es el modelo de Higuchi. En la tercera sección (72 a 172 h) se ha liberado el 80% de acetaminofén, el mecanismo de liberación sigue una cinética de primer orden en la que la solución de PBS penetra en las microesferas, provocando la difusión del fármaco y la relajación de la cadena. Finalmente, las 264 horas restantes se rige por el modelo de Rigter y Peppas, donde el exponente de difusión (para los tres casos) tiene un valor de $n < 0.45$, lo que indica que la difusión del fármaco por hinchamiento es del tipo fickiana, es decir la difusión se da desde zonas de alta concentración hacia zonas de menor concentración de fármaco.

Las Figuras 4.22-4.24 ilustran los sistemas de liberación para cada formulación y las secciones consideradas. Uyen y col. [60] reportan que el proceso de liberación de curcumina cargada en las microesferas se dio por medio de hinchamiento de la matriz polimérica, liberando el 98% de curcumina en 28 días. Describiendo también que ocurre un intercambio iónico de sodio (Na^+) encontrados en el medio PBS, los cuales entran en la red de alginato y reemplazan a los iones Ca^{2+} unidos en los grupos COO^- , lo que da como resultado el hinchamiento de la matriz de alginato provocando la difusión de la curcumina. Del análisis de los modelos matemáticos el que presenta mayor convergencia fue el modelo de orden cero.

Caizaluisa y col. [55] reportaron que los modelos cinéticos que describen mejor el comportamiento de liberación de claritromicina fueron el modelo de primer orden y Rigter-Peppas. El ensayo de liberación se llevó a cabo hasta 720 min. Para el caso de las microesferas con metronidazol los mecanismos que se ajutaron a la liberación fueron el modelo de primer orden, Hixson-Crowell, Higuchi y Rigter-Peppas. En ambos casos de estudio (metronidazol y claritromicina) el exponente n del modelo Rigter-Peppas fue menor a 0.45, por lo tanto, el mecanismo de difusión fue del tipo fickiano.

La solubilidad de las microesferas puede verse afectada por el pH del medio donde se realice los ensayos de liberación. Se ha reportado que, en medios ácidos, las microesferas son completamente insolubles, mientras que a pH neutros las microesferas se vuelven solubles, por lo tanto, los mecanismos de liberación se dan por difusión [59].

Dados los resultados reportados por otros investigadores, en resumen, los mecanismos involucrados en la liberación de acetaminofén fueron hinchamiento de las cadenas de alginato y difusión fickiana a través de los poros de las microesferas.

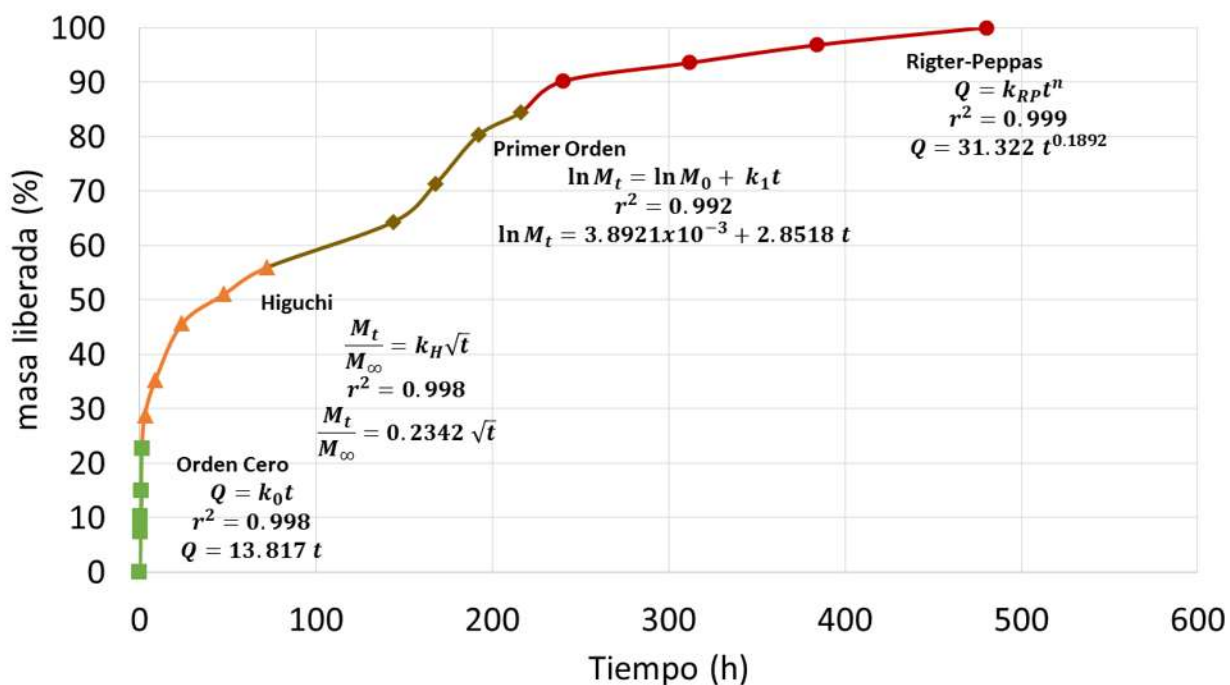


Figura 4.24 Perfil de liberación de acetaminofén desde las microesferas de alginato (MEs 0.1).

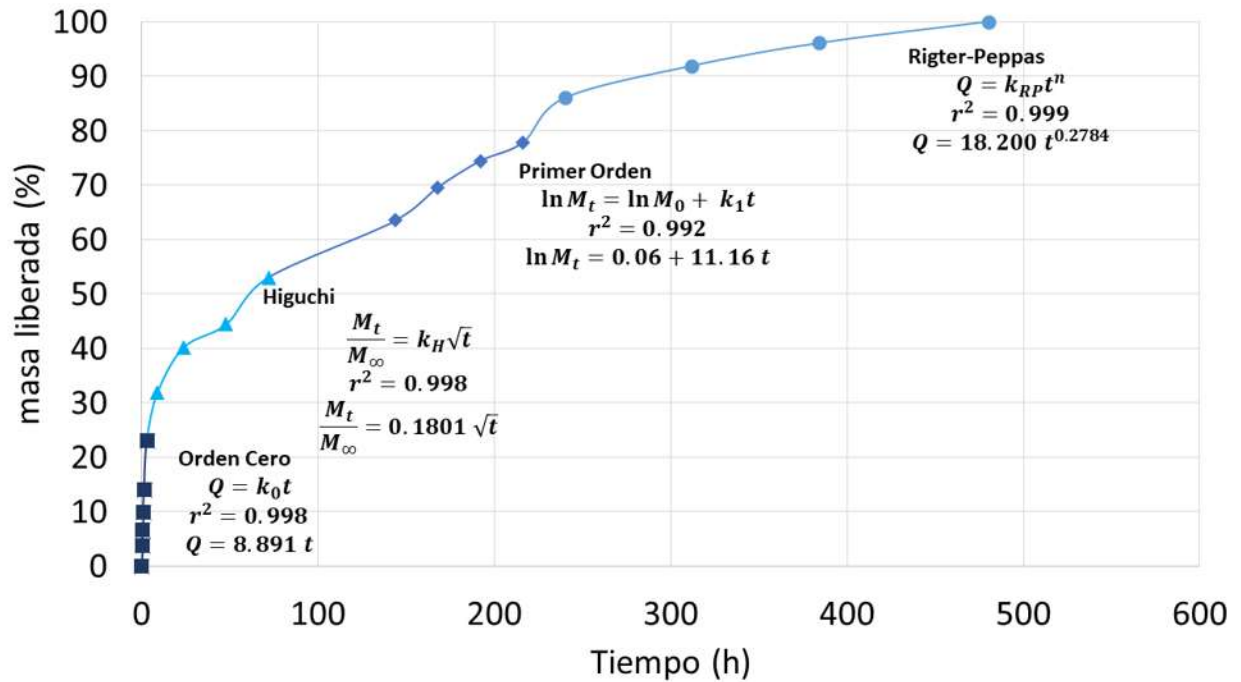


Figura 4.25 Perfil de liberación de acetaminofén desde las microesferas de alginato (MEs 0.141).

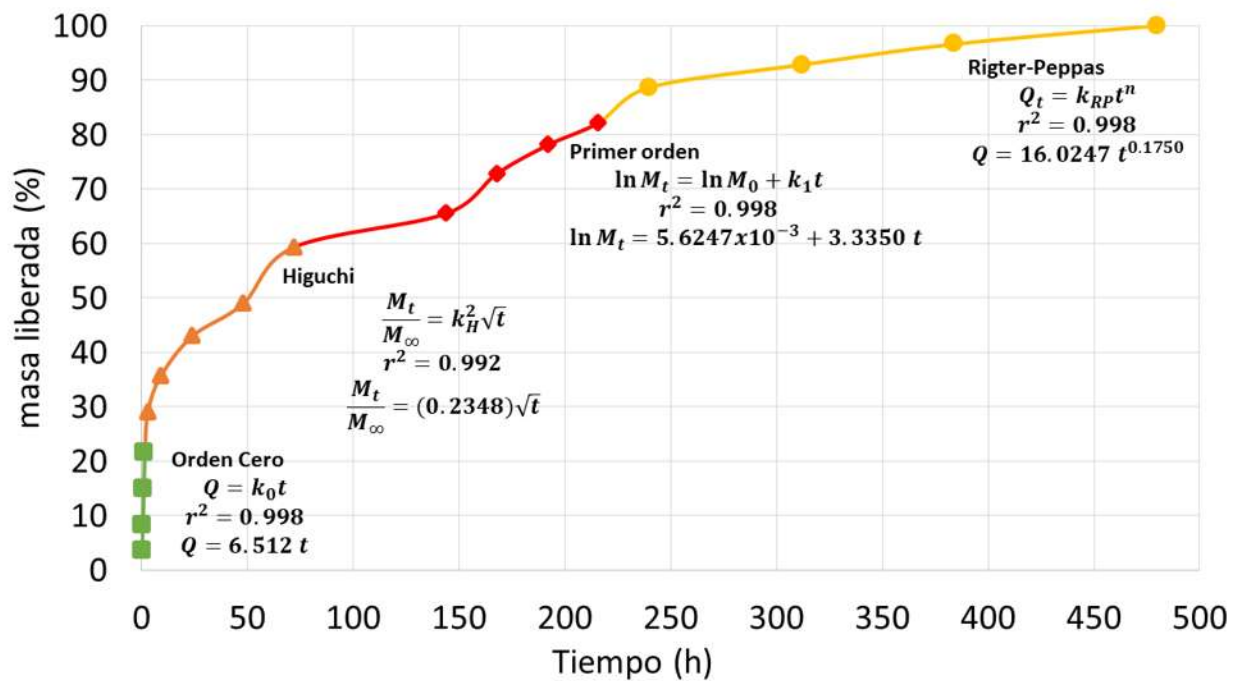


Figura 4.26 Perfil de liberación de acetaminofén desde las microesferas de alginato (MEs 0.2).

4.1.10 Análisis paramétrico de las microesferas

Como se ha discutido anteriormente, la concentración es uno de los factores principales que afecta directamente a los rendimientos de producción de microesferas y a su vez al tamaño de partícula. Como se puede observar en la Figura 4. 27, una menor concentración de solución polimérica proporciona menores rendimientos de producción y tamaños de partícula menores, mientras que el aumento en la concentración de solución polimérica da como resultados tamaños de partícula mayores y rendimientos superiores al 70%.

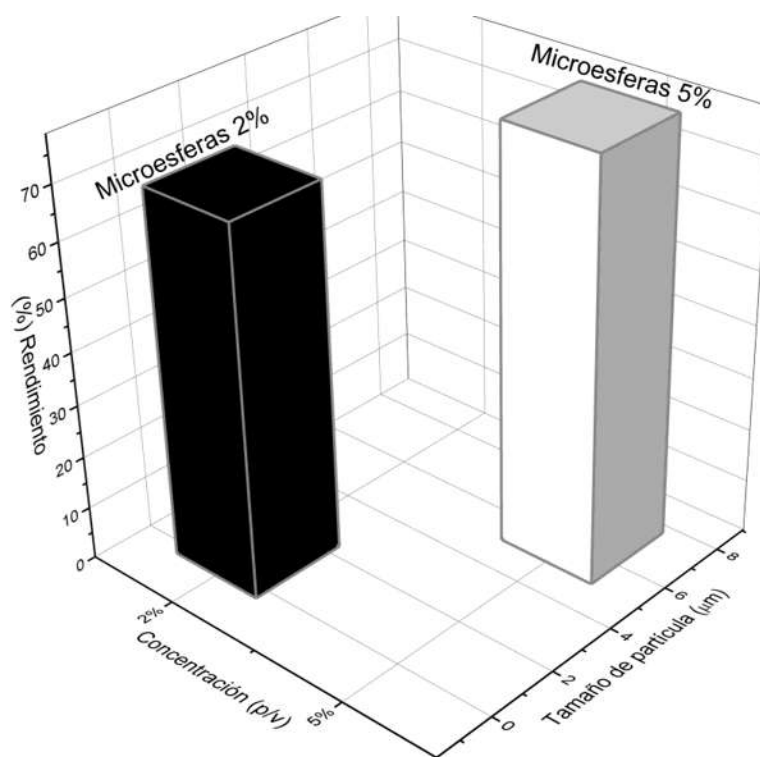


Figura 4. 27 Factores de variación en la concentración de solución polimérica.

Para el caso de las microesferas con acetaminofén, analizaremos como influye la cantidad de fármaco en la eficiencia de encapsulación y tamaño de partícula. La Figura 4. 28 muestra las variaciones del tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación respecto a la cantidad de fármaco contenida en las microesferas, observando que a menores cantidades de fármaco las eficiencias de encapsulación son superiores al 75% mientras al aumentar la cantidad de fármaco las eficiencias disminuyen debido a que no se tiene una buena dispersión del fármaco en la solución acuosa inicial. Por otra parte es de observarse que el tamaño de partícula también se ve afectado por la

concentración de fármaco contenido, ya que una menor cantidad de fármaco resulta en microesferas de mayor tamaño, sin embargo, es importante resaltar que a una relación 3.5:1 de polímero: fármaco, las microesferas obtienen menor tamaño y menor eficiencia de encapsulación, recordando también que a esta relación de polímero: fármaco se generó una mejor estabilidad de las microesferas en los ensayos de liberación ya que al paso de 24 horas, estas solo habían liberado el 40% de su contenido, mientras que las microesferas con 0.1 y 0.2 g de acetaminofén habían liberado cerca del 50% del contenido inicial.

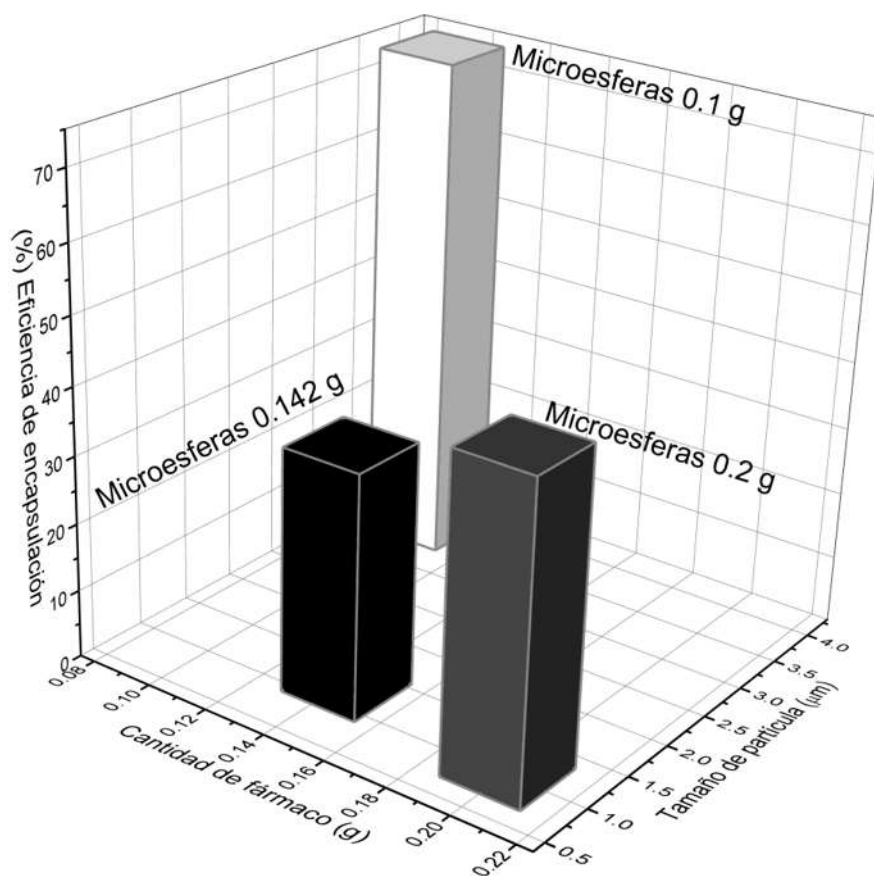


Figura 4. 28 Factores de variación en la cantidad de fármaco reticulado.

CAPITULO 5 CONCLUSIONES

1. Es posible la obtención de microesferas de biopolímero mediante el método emulsión/evaporación de solvente, resultando en rendimientos mayores al 70%, esferas con distribución de tamaño y morfología uniforme. El uso de este método resulta conveniente para la encapsulación de distintos agentes tales como proteínas, factores de crecimiento, fármacos, aceites esenciales, probióticos, entre otros.
2. Los tamaños obtenidos resultaron óptimos dada la aplicación considerada a futuro. En caso de ser requerido un aumento o disminución de tamaño de las microesferas, factores como la velocidad de agitación, viscosidad de la solución polimérica y concentración de agente reticulante son determinantes del tamaño de partícula de las microesferas. Un aumento en la viscosidad en la solución polimérica es directamente proporcional al tamaño de las microesferas, es decir el tamaño de éstas aumenta al aumentar la viscosidad. Velocidades de agitación mayores a 10,000 rpm resulta en microesferas de tamaños menores a 1 μm .
3. Se comprobó la presencia del fármaco y la reticulación de las microesferas mediante análisis por FT-IR, ya que se muestra la sal carboxílica formada por los iones Ca^{2+} y el grupo funcional amino característico del acetaminofén.
4. La reticulación de las microesferas demostró dar mayor estabilidad térmica, ya que la descomposición térmica ocurre a temperaturas mayores en comparación con el polímero en polvo.
5. Las eficiencias de encapsulación resultaron con elevado contenido de acetaminofén, sin embargo, la mejora de ésta es posible utilizando una solución de polímero menor al 2% (m/v), una tasa de evaporación de solvente más alta y una mejor dispersión polímero/fármaco.
6. El uso de microesferas de alginato como sistemas de administración de fármacos es favorable ya que se obtiene una liberación sostenida de hasta 20 días. Además, las microesferas mostraron una liberación sostenida debido al proceso de difusión e hinchamiento de las cadenas poliméricas, mostrando un efecto burst en las primeras 1.5 horas.

RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO

Se recomienda una mejora en la relación polímero-fármaco ya que proporcionará resultados de eficiencia más altos, trabajar con tasas de evaporación más altas y mejorar la dispersión del fármaco en la solución acuosa. Analizar la posibilidad de formar microesferas mediante una doble emulsión, con la finalidad de emplear dos polímeros diferentes para mejorar la liberación de agentes activos, retardando la degradación de la matriz polimérica. Se ha reportado que polímeros como la pectina posee propiedades similares al alginato, lo cual lo vuelve un candidato factible para la producción de microesferas alginato/pectina.

Mejorar el proceso de lavado de microesferas empleando solventes distintos al éter de petróleo y alcohol etílico o bien proponer un agente distinto de aceite mineral para la solución orgánica. Realizar los ensayos de cinética de liberación comparando la pérdida de masa de polímero de microesferas debidas al hinchamiento y difusión de agentes activos.

Como trabajo futuro se continuará con el estudio de citotoxicidad de las microesferas mediante la reducción de MTT empleando fibroblastos humanos (MG-63 cell line). Una vez comprobando la viabilidad celular de las microesferas se pretende formar microesferas de alginato con material regenerador óseo como vidrio bioactivo y la carga de acetaminofén para ser incorporados en andamios para la regeneración de tejido blando (cartílago) desgastado por causa de artritis. Los andamios serán fabricados por metalurgia de polvos y se evaluarán sus propiedades mecánicas para seleccionar el de mejor calidad. Realizar los estudios *in vitro* de andamios con las células y ensayos *in vivo* empleando *Mus musculus mice*.

REFERENCIAS

1. Hossain Zakir K M, Patel U y Ahmed I. *Development of microspheres for biomedical applications: a review*. **Prog Biomater**. 1-19, 2015.
2. Hurtado A, Selgas Rafael y Ángel S A. *El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales*. **NEREIS. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación**. 12, 137-149, 2020.
3. Ramos Picos D, Gómez Carril M y Fernández Mena D. *Métodos de obtención de microesferas biodegradables*. **Revista Cubana de Farmacia**. 35(2), 126-135, 2001.
4. Espinosa Morales R, Alcántar Ramírez J, Arce Salinas C A, Chávez Espina L M, Esquivel Valerio J A, Gutiérrez Gómez J J, de la Lanza L, Martínez Hernández J L y Méndez Medina C. *Reunión multidisciplinaria de expertos para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. Actualización basada en evidencias*. **Medicina Interna de México**. 34(3), 443-476, 2018.
5. Glyn-Jones S, Palmer A J R, Agricola R, Price A J, V T L, Weinas H y Carr A J. *Osteoarthritis*. **The Lancet**. 386(9991), 376-387, 2015
6. Jordan K M, Arden N K, Doherty M, et al. *EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)*. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 62, 1145-1155, 2003.
7. National Clinical Guideline Centre (UK). *Osteoarthritis: Care and Management* [en línea]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg177>. [Consultado 06 Junio 2022].
8. Mancipe Castro L, García A J y Guldberg R E. *Biomaterial strategy for improved intra-articular drug delivery*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 109(4), 426-436, 2020.

9. Maudens P, Jordan O y Alléman E. *Recent advances in intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy*. **Drug Discovery Today**. 23(10), 1761-1775, 2018.
10. Williams D F. *Definitions is biomaterials*. **Journal of polymer Science: polymer Letters**. 26(9), 414, 1988.
11. Sudip P. *Introduction to Ideal Characteristics and Advanced Biomedical Applications of Biomaterials*. En; **Biomedical Engineering and its Applications in Healthcare**. Singapore, Ed. Springer, 171-275, 2019.
12. Rios T, López M E y Franco A. *Biomateriales compuestos de matriz polimérica con refuerzo de cerámico bioactivo usados en sistemas de fijación ósea*. **Revision del estado del arte. Revista colombiana de materiales**. 5, 270-276, 2013.
13. Osorio Delgado M A, Henao Tamayo L J, Velásquez Cock J A, Canas Gutierrez A I, Restrepo Múnera L M, Ganan Rojo P F, Zuluaga Gallego R O y Ortiz Trujillo I C. *Biomedical applicatios of polymeric biomaterials*. **DYNA**. 84(201), 241-252, 2016.
14. Aramwit P. *Introduction to biomaterials for wound healing*. **Wound Healing Biomaterials**. 2, 3-38, 2016.
15. Chen Q y Thouas G. *Bioresorbable polymers*. En; **Biomaterials A Basic Introduction**. New York, Ed. CRC Pres Taylor & Francis Group, 339-378, 2015.
16. Chen Q y George T. *Bionerte Polymers*. En; **Biomaterials A Basic Introduction**. New York, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, 195-332, 2015.
17. Pires A L R, Bierhalz K, A C y Morales Á M. *Biomaterials: Types, Application and Market*. **Química Nova**. 38(7), 957-971, 2015.

18. Bonilla P V. *Formación y caracterización de nanosistemas de liberación de Farmacos que contienen alginato*. enero 2013. [En línea]. Available: DOI: 10.13140/RG.2.1.2857.6801. [Consultado 25 noviembre 2020].
19. Sun J y Tan H. *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative*. **Materials**. 6(4), 1285-1309, 2013.
20. Millán-Olvera B M, García-Gaitán B, Ruiz-Aguilar I, Ríos-Donato N y García-Rivas J L. *Obtención y caracterización de perlas de alginato-imidacloprid y alginato-bifentrina*. **Journal of Chemical Engineering and Applied Chemistry**. 109-117, 2019.
21. Edwards S H. *Intra-articular drug delivery: The challenge to extend drug residence time within the joint*. **The Veterinary Journal**. 190(1), 15-21, 2011.
22. Gerwin N, Hops C y Lucke A. *Intraarticular drug delivery in osteoarthritis*. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 58(2), 226-242, 2006.
23. Abd-Allah H, Kamel A O y Sammour O A. *Injectable long-acting chitosan/tripolyphosphate microspheres for the intra-articular delivery of lornoxicam: Optimization and in vivo evaluation*. **Carbohydrate polymers**. 149, 263-273, 2016.
24. Arunkumar P, Indulekha S, Vijayalakshmi S y S R. *Synthesis, characterizations, in vitro and in vivo evaluation of Etoricoxib-loaded Poly (Caprolactone) microparticles—a potential Intra-articular drug delivery system for the treatment of Osteoarthritis*. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**. 27(4), 303-316, 2016.
25. Horisawa E, Hirota T, Kawazoe S y Jun Y. *Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit*. **Pharmaceutical research**. 19(4), 403-410, 2002.

26. Park K. *The controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back*. **Journal of Controlled Release**. 190(28), 3-8, 2014.
27. Zarate Hernandez E, Hernandez Esquivel R A y Perez Urizar J T. *Microcápsulas y microesferas: una revisión a la caracterización integral y aplicación para liberación de medicamentos biotecnológicos*. **CienciaUAT**. 14 abril 2021. [En línea]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582021000100021&lng=es&nrm=iso>. [Consultado 10 junio 2021].
28. Uyen N T T, Ain Z, Hamid A, Thanh Tram N X y Binti Ahmad N. *Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 153, 1035-1046, 2020.
29. Suffredini G, East J E, Levy L M. *New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging*. **American Journal of Neuroradiology**. 35(7), 126-1253, 2013.
30. Yang Y, Chen Q, Lin J, Cai Z, Liao G, Wang K, Bai L, Zhao P y Yu Z. *Recent Advance in Polymer Based Microspheric Systems for Controlled Protein and Peptid Delivery*. **Bentham Science Publishers**. 26, 2285-2296, 2019.
31. Aranberri I, Binks B P, Clint J H, Fletcher P D I. *Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos*. **Revista Iberoamericana de polímeros**. 7(3), 211-231, 2006.
32. Griffin W C. *Classification of surface-active agents by HBL*. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**. 1, 311-326, 1949.
33. Yamashita Y, Sakamoto K. *Hydrophilic–lipophilic balance (HLB): Classical indexation and novel indexation of surfactant*. **Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science** **2V Set**. 570-574, 2016.

34. Morris E, Rees D, Thom D y Boyd J. *Chiroptical and Stoichiometric Evidence of a Specific Primary Dimerisation Process in Alginate Gelation*. **Carbohydrate Research**. 66, 145-154, 1978.
35. Kawaguti H Y y Sato H H. *Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana*. **Quimica Nova**. 31(1), 134-143, 2008.
36. Yodthong Baimark Y S. *Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca^{2+} Post-cross-linking*. **Advanced Powder Technology**. 25(5), 1541-1546, 2014.
37. Rastogi R, Sultana Y, Aqil M, Ali A, Kumar S, Chuttani K, Mishra A K. *Alginate microsphere of isoniazid for oral sustained drug delivery*. **International Journal of pharmaceutics**. 334, 71-77, 2007.
38. Garza A Z, Park S B, Kocz R. *Drug Elimination*. **StatPearls** [11 Julio 22].
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547662/>
39. Larañeta E, Stewart S, Ervine M, Al-Kasasbeh R, Donnelly R F. *Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications*. **Journal of Functional Biomaterials**. 9(1), 13-33, 2018.
40. Cheng C Y, Pho Q H, Wu X Y, Chin T Y, Chen C H, Fang P H, Lin Y C, Hsieh M F. *PLGA Microspheres Loaded with β -Cyclodextrin Complexes of Epigallocatechin-3-Gallate for the Anti-Inflammatory Properties in Activated Microglial Cells*. **Polymers**. 10(5), 519-538, 2018.
41. Li Q, Li, X, Zhao C. *Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. 8, 437, 2020.
42. Hernández Cortez E. *Acetaminofén: el medicamento más usado en pediatría*. **Anestesia en México**. 28(3), 1-4, 2016.

43. Sharma C V, Vivek M. *Paracetamol: mechanisms and updates*. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**. 14(4), 153-158, 2014.
44. Sigma-Aldrich. Ficha de datos de seguridad: Acetaminophen. [En línea]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/sds/sial/a7085> [consultado 20 de abril 2021].
45. Mulia K, Krisanti E A. *Effect of sodium tripolyphosphate concentration and simulated gastrointestinal fluids on release profile of paracetamol from chitosan microsphere*. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. 316, 012028, 2018.
46. Villacaña Molina E, Pacheco Contreras E, Aguilar Reyes E A, León Patiño C A. *Pectin and chitosan microsphere evaporation via water/oil emulsion and solvent evaporation method for drug delivery*. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. 69(7), 467-475, 2019.
47. Lin S-F, Chen Y-C, Chen R-N, Chen L-C, Ho H-O, Tsung Y-H, Sheu M-T, Liu D-Z. *Improving the Stability of Astaxanthin by Microencapsulation in Calcium Alginate Beads*. **PLoS ONE**. 11(4), 0153685, 2016.
48. Wang L Y, Ma G H, Su Z G. *Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug*. **Journal of Controlled Release**. 106(1-2), 62-75, 2005.
49. Shukla S, Jain D, Verma K, Verma S. *Formulation and in vitro characterization of alginate microspheres loaded with diloxanide furoate for colon-specific drug delivery*. **Asian Journal of Pharmaceutics**. 4(4), 199-204, 2010.
50. Bizerra A y Viviane S. *Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações*. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**. 3(2), 1-12, 2016.
51. Singh M, Dua J S, Menra M y Soni M. *Microencapsulation and its various aspects: a review*. **International Journal of Advanced Research**. 4(6), 2094-2108, 2016.

52. Andretta y H A. *Fármacos de acción prolongada: Mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos.* **Acta farmacéutica bonaerense.** 22(4), 355-364, 2003.
53. Costa P y Sousa Lobo J M. *Modeling and comparision of dissolution profiles.* **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 13(2), 123-133, 2001.
54. Gouda R, Baishya H y Qing Z. *Application of Mathematical Models in Drug Realease Kinetics of Cardidopa and Levodopa ER Tablets.* **Journal of Developing Drugs.** 6(2), 1-8, 2017.
55. Loachamin C y Rafel A. *Desarrollo de un sistema de liberación controlada basado en microparticulas mucoadhesivas de alginato con claritromicona y metronidazol.* **Q.F. Tesis. Facultad de Ciencias Quimicas.** Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador, 2018.
56. Rigter P L, Peppas N A. *A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickcian and Non-Fickian Release from Non-swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs.* **Journal of Controlled Release.** 5, 23-36, 1987.
57. Garcés Padilla J A y Santamaría Aguirre J R. *Elaboracion de microesferas de diclofenaco sódico por gelación ionotrópica para la obtención de formas farmacéuticas sólidas de liberación prolongada.* **Q.F. tesis.** Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador, 2018.
58. Hariyadi D M, Rosita N y Rahayu A. *Diseño, optimización y caracterización de microesferas de glutatión cargado de alginato para el antienvjecimiento.* **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research.** 7(4), 223-233, 2019.
59. Huang J, Bai F, Wu Y, Ye Q, Liang D, Shi C, Zhang X. *Development and evaluation of lutein-loaded alginate microspheres whit improved stability and antioxidant.* **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 99, 5195-5201, 2019.

60. Uyen N T T, Hamid Z A A, Thi L A, Ahmad N B. *Synthesis and characterization of curcumin loaded alginate microspheres for drug delivery*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 58, 101796, 2020.
61. Huang X, Fu Q, Deng Y, Wang F, Xia B, Chen Z, Chen G. *Surface roughness of silk fibroin/alginate microspheres for rapid hemostasis in vitro and in vivo*. **Carbohydrate Polymers**. 253, 117256, 2021.
62. Sivan S S, Bonstein I, Marmor Y N, Pelled G, Gazit Z y Amit M. *Encapsulation of Human-Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Small Alginate Beads Using One-Step Emulsification by Internal Gelation: In Vitro, and In Vivo Evaluation in Degenerate Intervertebral Disc Model*. **Pharmaceutics**. 6(14) 1179, 2022.
63. Man J, Wang X, Li J, Cui X, Hua Z, Li J, Mao Z y Zhang S. *Intravenous Calcium Alginate Microspheres as Drug Delivery Vehicles in Acute Kidney Injury Treatment*. **Micromachines** 13(4) 538, 2022.
64. Molina Rubio M J. *Estudio de la estabilidad térmica del ácido alginico y derivados en diversas atmosferas*. **Ph.D. Tesis**. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales Universidad Politecnica de Madrid. Madrid, España, 1992.
65. Rezende Dias M, Crisley Leão R y de Souza Costa H. *Obtenção e Caracterização de Microesferas de Alginato/Vidro Bioativo*. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**. 12, 122-137, 2020.
66. Castro Suarez J R, Pájaro Payares A A, Espinosa Fuentes E y Meza Fuentes E. *Detección vibracional de acetaminofén en tabletas comerciales usando espectroscopia ATR-FTIR y Quimiometría*. **Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology**. 2017.

67. Zapata F, López Fernández A, Ortega Ojeda F, Quintanilla G, García Ruiz C y Montalvo G. *Introducing ATR-FTIR Spectroscopy through Analysis of Acetaminophen Drugs: Practical Lessons for Interdisciplinary and Progressive Learning for Undergraduate Students*. **Journal of Chemical Education**. 98, 2675-2686, 2021.
68. George S. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, **Jonh Wiley & Sons Ltd**, 2001.
69. Jendrzewska I, Goryczka T, Pietrasik W, Klimintko J, Jampilek J. *X-ray and Thermal Analysis of Selected Drugs Containing Acetaminophen*. **Molecules**. 25(24), 5909, 2020.
70. Been S, Choi J, Lee Y H, Kim P Y, Kim W K, Cho H H, Lee J E, Bucciarelli A, Lee D H, Song J E y Khang G. *Improvement of Medication Adherence and Controlled Drug Release by Optimized Acetaminophen Formulation*. **Macromolecular Research**. 29(5), 342-350, 2021.
71. Schnitzler E, Lencone K y Kobelnik M. *Characterization of pharmaceuticals by thermal analysis*. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**. 8(1) 91-100, 2002.
72. Maciel A N y Parize A L. *Influência do íon Ca^{2+} no desenvolvimento de micropartículas de alginato de sódio preparadas por gelatização iônica*. **Trabajo de conclusión de curso**. Licenciatura en Ciencias Naturales, Universidad de Brasília. Brasil, 2013.
73. Soares J D P, Santos J E, Chierece G O y Cavalheiro E T G. *Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt*. **Eclética Química**. 29(2), 57-64, 2004.
74. Paşcalău V, Popescu V, Popescu G L, Dudesu M C, Borodi G, Dinescu A, Perhaita I y Paul M. *The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films*. **Journal of Alloys and Compounds**. 536, S418-S423, 2012

75. López Ortega J E. *Estudio de la producción de alginato de sodio derivado de macroalgas pardas y su conversión hidrotérmica catalizada a ácido láctico utilizando digestión por microondas*. **Tesis de Licenciatura**, Latacunga: Departamento de Ciencias de la energía y Mecánica. Universidad de las Fuerzas Armadas, 2018.
76. Srisuwa Y Srihanam P. *Preparation and Characterization of Keratin/Alginate Blend Microparticles*. **Advances in Materials Science and Engineering**. 2018, 1-8, 2018.
77. Benavides S, Cortés P, Parada J y Franco W. *Development of alginate microspheres containing thyme essential oil*. **Food Chemistry**. 204, 77-83, 2016.
78. Dhamecha D, Movsas R, Sano U y Menon J U. *Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future*. **International Journal of Pharmaceutics**. 569, 118627, 2019.
79. Jyothi N V N, Prasanna P M, Sakarkar S N, Prabha K S, Ramaiah P S y S G Y. *Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency*. **Journal of Microencapsulation**. 27(3), 187-197, 2010.