



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN EN
METALURGIA Y MATERIALES



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

“SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE POLÍMEROS
BIODEGRADABLES PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
MEDICAMENTO”

TESIS

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales presenta:

I.Q. EDITH PACHECO CONTRERAS

Director de Tesis:

DRA. ENA ATHENEA AGUILAR REYES

Morelia, Michoacán, México Febrero 2017.

AGRADECIMIENTOS

El camino no ha sido fácil, pero la experiencia ganada es invaluable, por lo cual quiero agradecer a aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible este trabajo. Quiero agradecer especialmente a mi asesora la Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes por su asesoría, empeño y apoyo. Gracias a la Dra. Diana Fabiola Cholico González, Dr. Egberto Bedolla Becerril y Dr. Feng Rao Wu por sus ideas y recomendaciones.

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, especialmente al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa PIFI-PROFOCIE por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

Finalmente agradezco a mi Familia, ya que toda la vida se queda corta para pagarles y darles gracias por todo lo que han hecho por mí. En especial a Alejandro Martínez Ruiz por su apoyo incondicional. Agradezco a todos aquellos que de una u otra manera influyeron en la realización de este proyecto de tesis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
Capítulo I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
Capítulo II	4
2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.....	4
2.1 Polímeros	4
2.1.1 Clasificación de los polímeros.....	5
2.2 Biomateriales	6
2.2.1 Polímeros biodegradables.....	6
2.3 Quitosano	7
2.3.1 Aplicaciones	8
2.3.2 Solubilidad.....	9
2.3.3 Biodegradabilidad.....	9
2.4 Pectina.....	9
2.4.1 Usos de la pectina en el área farmacéutica	10
2.5 Microesferas.....	10
2.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las microesferas.....	11
2.5.2 Microesferas de quitosano	12
2.5.3 Microesferas de pectina	13
2.6 Métodos de preparación de microesferas.....	15
2.6.1 Secado por aspersion	16
2.6.2 Separación de fases (coacervación).....	16
2.6.3 Método de emulsión y evaporación de solvente.....	16
2.6.3.1 Características del método de emulsión y evaporación de solvente.....	17
2.6.3.2 Fase acuosa.....	17
2.6.3.3 Fase oleosa	18
2.6.3.4 Solventes	19
2.6.3.5 Emulsificadores.....	19
2.7 Fármacos	19
2.7.1 Fármacos hidrófobos	20
2.7.2 Fármacos hidrófilos	20

2.7.3 Paracetamol	20
2.8 Mecanismos de liberación de fármacos	22
2.8.1 Cinética de liberación del fármaco	22
2.8.2 Cinética del orden cero	22
2.8.3 Cinética de primer orden	23
2.8.4 Modelo de Weibull	25
2.8.5 Modelo de Higuchi	25
2.8.6 Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	26
Capítulo III.....	28
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Materiales.....	28
3.2 Preparación de las microesferas de polímeros biodegradables	28
3.2.1 Síntesis de microesferas de pectina y quitosano	31
3.3 Caracterización	33
3.3.1 Difracción de rayos X (DRX).....	33
3.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	33
3.3.3 Determinación y distribución de tamaño de partícula	34
3.3.4 Espectrometría infrarroja (FT-IR)	34
3.3.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	35
3.3.6 Eficiencia de encapsulación.....	36
3.3.7 Liberación del fármaco de las microesferas cargadas	38
3.3.8 Pérdida de humedad	38
3.3.9 Porcentaje de rendimiento	38
3.3.10 Potencial Z.....	39
Capítulo IV.....	40
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
4.1 Determinación de las variables para la síntesis de microesferas de pectina y quitosano	40
4.2 Caracterización de materiales precursores y microesferas con y sin carga de fármaco	45
4.2.1 Difracción de rayos X (DRX).....	46
4.2.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	53
4.2.3 Determinación y distribución de tamaño de partícula	61
4.2.4 Espectrofotometría infrarroja (FT-IR).....	67
4.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	76
4.2.6 Eficiencia de encapsulación.....	79
4.2.7 Cinética de liberación	83
4.2.8 Porcentaje de pérdida de humedad	93
4.2.9 Porcentaje de rendimiento	93
4.2.10 Potencial Z.....	94
RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO	97
APÉNDICE A1	98
APÉNDICE A2	101
REFERENCIAS.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1. Estructura química de quitosano [10].	8
Figura 2.2. Estructura química de la pectina [14].	9
Figura 2.3. a) Microscopía MEB mostrando microesferas de quitosano cargadas con ADN, y b) perfil de liberación de ADN microencapsulado [20].	13
Figura 2.4. Microscopía MEB mostrando microesferas de pectina cargadas con metronidazol [21].	15
Figura 2.5. Microscopía MEB mostrando microesferas de pectina cargadas con ondansetrón [22].	15
Figura 2.6. Diagrama del método de emulsión (O/W) [27].	17
Figura 2.7. Diagrama del método de emulsión agua/aceite/agua (W/O/W) [27].	18
Figura 2.8. Diagrama del método de emulsión aceite/aceite (O/O) [27].	19

Capítulo 3

Figura 3.1. Síntesis para la preparación de microesferas de pectina.	31
Figura 3.2. Síntesis para la preparación de microesferas de quitosano.	32
Figura 3.3. Difractómetro D8 ADVANCE Bruker.	33
Figura 3.4. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JEOL JSM-7600F).	34
Figura 3.5. Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Tensor 27 Bruker.	35
Figura 3.6. Analizador térmico simultáneo (DSC/TG) STA Q600 TA Instruments.	36
Figura 3.7. Espectrómetro UV-Vis lambda 25 marca Perkin-Elmer.	37
Figura 3.8. Sistema Zeta-meter 3.0+.	39

Capítulo 4

Figura 4.1. Gel de pectina después del lavado con hexano.	42
Figura 4.2. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL2 a 50X.	42
Figura 4.3. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL3 a 200x.	43
Figura 4.4. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL8 a 250x.	43
Figura 4.5. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL9 a 100x.	44
Figura 4.6. Micrografía de microesferas de quitosano formulación QL1 a 10000x.	45
Figura 4.7. DRX de pectina pura de alta metilación $\geq 74\%$.	46
Figura 4.8. DRX de pectina pura en su forma cristalina [41].	47
Figura 4.9. Patrón de DRX de pectina, y membranas de pectina/PVP [42].	47
Figura 4.10. DRX de quitosano puro de alta desacetilación $\geq 75\%$.	48
Figura 4.11. DRX de derivados de esqueletos de cangrejos: (A) quitina, (B) quitosano, (c) polisulfato de quitosano [43].	48
Figura 4.12. DRX de paracetamol puro $\geq 99\%$.	49
Figura 4.13. Patrón de difracción de rayos X para paracetamol monoclinico [44].	50
Figura 4.14. Espectro de difracción de rayos X para las microesferas de pectina con y sin paracetamol.	52
Figura 4.15. Espectro de difracción de rayos X para las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.	53
Figura 4.16. Micrografía de (a) pectina pura 100X y (b) de quitosano puro 100X.	54
Figura 4.17. Micrografía de paracetamol puro 500X.	54
Figura 4.18. Micrografías de microesferas de pectina sin carga de paracetamol (a) 100x, (b)250x, (c)500x y (d)1000x, formulación PL12 .	55

Figura 4.19. Micrografías de las microesferas de pectina sin paracetamol mostrando la porosidad interior, (a) 2000x y (b) 500x, formulación PL12.	56
Figura 4.20. Micrografías de microesferas de pectina con carga de paracetamol (a) 250x, (b)500x, (c)500x y (d)1200x, formulación P4.	57
Figura 4.21. Micrografía de microesferas de pectina sintetizadas por secado por aspersión [46].	57
Figura 4.22. Micrografías de las microesferas de quitosano sin paracetamol, (a) 10000x	58
Figura 4.23. Micrografía de una microesfera de quitosano sin paracetamol mostrando la porosidad interna, 2000x formulación QL2.	59
Figura 4.24. Micrografías de las microesferas de quitosano con paracetamol, (a) 5000x, (b) 10000x, (c) 10000x y (d) 10000x, formulación Q4.	60
Figura 4.25. Micrografía de microesferas de quitosano [47].	60
Figura 4.26. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de pectina sin carga de paracetamol.	61
Figura 4.27. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de pectina sin carga de paracetamol.	62
Figura 4.28. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de pectina con carga de paracetamol.	63
Figura 4.29. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de pectina con carga de paracetamol.	63
Figura 4.30. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de quitosano sin carga de paracetamol.	64
Figura 4.31. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de quitosano sin carga de paracetamol.	65
Figura 4.33. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de quitosano con carga de paracetamol.	66
Figura 4.32. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de quitosano con carga de paracetamol.	66
Figura 4.34. Espectro de infrarrojo de la pectina pura.	67
Figura 4.35. Espectro de infrarrojo de quitosano puro.	69
Figura 4.36. Espectro de infrarrojo del paracetamol puro.	70
Figura 4.37. Espectros de infrarrojo para la pectina pura, microesferas de pectina con y sin carga de paracetamol y paracetamol puro.	72
Figura 4.38. Espectros de infrarrojo para el quitosano puro, microesferas de quitosano con y sin carga de paracetamol y paracetamol puro.	74
Figura 4.39. DSC del paracetamol puro.	76
Figura 4.40. DSC de pectina y microesferas de pectina con carga de paracetamol.	77
Figura 4.41. DSC de quitosano y microesferas de quitosano con carga de paracetamol.	78
Figura 4.42. Espectros UV-Vis de las muestras patrón de paracetamol.	79
Figura 4.43. Curva de calibración para la cuantificación de paracetamol en microesferas poliméricas.	80
Figura 4.44. Cinética de liberación de las microesferas de pectina cargadas con paracetamol (modelo de Higuchi).	88
Figura 4.45. Cinética de liberación de las microesferas de quitosano cargadas con paracetamol (modelo de Higuchi).	91

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 2.1. Propiedades de quitosano en relación con uso en aplicaciones biomédicas [11].	8
---	---

Capítulo 3

Tabla 3.1. Características de los materiales precursores.	28
Tabla 3.2. Experimentos realizados con pectina para la preparación de microesferas.	29
Tabla 3.3. Experimentos realizados con quitosano para la preparación de microesferas.	30
Tabla 3.4. Experimentos realizados con pectina y paracetamol para la síntesis de microesferas.	30
Tabla 3.5. Experimentos realizados con quitosano y paracetamol para la síntesis de microesferas.	30
Tabla 3.6. Variables para la realización de los estudios DSC.	36

Capítulo 4

Tabla 4.1. Resultados de los experimentos realizados con pectina.	40
Tabla 4.2. Resultados de los experimentos realizados con quitosano.	45
Tabla 4.3. Comparación de parámetros de paracetamol puro $\geq 99\%$ y paracetamol de referencia [44].	50
Tabla 4.4. Comparación de los ángulos 2θ encontrado en el espectro de las microesferas de pectina con paracetamol y el espectro de paracetamol puro.	52
Tabla 4.5. Principales grupos funcionales detectados en el espectro de infrarrojo de la pectina pura.	68
Tabla 4.6. Principales grupos funcionales detectados en el espectro de infrarrojo del quitosano puro.	69
Tabla 4.7. Principales grupos funcionales detectados en el espectro de infrarrojo del paracetamol puro.	71
Tabla 4.8. Comparación del número de onda (cm^{-1}) de las bandas encontradas en el paracetamol y las microesferas de pectina con paracetamol.	73
Tabla 4.9. Comparación del número de onda (cm^{-1}) de las bandas encontradas en la pectina pura y las microesferas de pectina con y sin paracetamol.	73
Tabla 4.10. Comparación de la longitud de onda (cm^{-1}) de las bandas encontradas en el paracetamol puro y las microesferas de quitosano con paracetamol.	75
Tabla 4.11. Comparación de la longitud de onda (cm^{-1}) de las bandas encontradas en el quitosano puro y las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.	75
Tabla 4.12. Eficiencia de encapsulación de paracetamol de las microesferas de pectina.	81
Tabla 4.13. Eficiencia de encapsulación de paracetamol de las microesferas de quitosano.	82
Tabla 4.14. Datos obtenidos de la liberación de paracetamol de las microesferas de pectina.	85
Tabla 4.15. Datos obtenidos de la liberación de paracetamol de las microesferas de quitosano.	86
Tabla 4.16. Resultados de los modelos matemáticos aplicados en las pendientes de la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas poliméricas.	87
Tabla 4.17. Resultados de la pérdida de humedad de las microesferas de pectina con y sin paracetamol.	93
Tabla 4.18. Resultados de la pérdida de humedad de las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.	93
Tabla 4.19. Resultados del porcentaje de rendimiento de las microesferas de pectina con y sin paracetamol.	94
Tabla 4.20. Resultados del porcentaje de rendimiento de las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.	94
Tabla 4.21. Resultados de potencial Z para el paracetamol y microesferas poliméricas.	95

RESUMEN

En este trabajo se estudió la síntesis de microesferas de polímeros biodegradables para liberación controlada de fármacos; los polímeros utilizados fueron pectina y quitosano, ambos polímeros de origen natural. La síntesis de microesferas se llevó a cabo por el método de emulsión y evaporación de solvente, el cual a grandes rasgos consiste en la formación de una emulsión, formada por una fase acuosa y una fase orgánica; esta emulsión se coloca en agitación para evaporar el solvente y finalmente obtener las microesferas. Se realizó experimentación para encontrar las variables adecuadas de síntesis para la formación de microesferas, encontradas estas variables se incorporó el paracetamol a la síntesis. Las microesferas de ambos polímeros, con y sin carga de fármaco, fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), espectrometría infrarroja (FT-IR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). La eficiencia de encapsulación de fármaco, tamaño y distribución de partícula, factor de forma, % de rendimiento, % de pérdida de humedad y potencial Z fueron evaluados. Además, se realizaron pruebas para determinar la cinética de liberación del fármaco encapsulado en las microesferas en buffer fosfato salino (*PBS* por sus siglas en inglés). Los estudios de DRX demostraron el comportamiento amorfo de ambos polímeros antes y después de la síntesis. Las micrografías de MEB mostraron partículas esféricas y con superficie no porosa; en el caso de las microesferas de pectina con carga de paracetamol se observó que el fármaco recubría las microesferas por lo cual su superficie era rugosa e irregular; las microesferas de quitosano cargadas con fármaco presentaron superficies lisas y regulares. Los estudios de IR y DSC establecieron que no existe una interacción entre pectina-fármaco, pero sí entre quitosano-fármaco. La eficiencia de encapsulación fue baja para ambos polímeros; los tamaños de partícula promedio fueron de 24.98 μm SD 13.67 y de 0.62 μm SD 0.24 para las microesferas de pectina y quitosano, respectivamente. El rendimiento fue de 64 % para las microesferas de pectina y 80% para las microesferas de quitosano, ambas cargadas con paracetamol. La pérdida de humedad fue baja para ambos polímeros. El potencial Z fue de +115.3 DS 13.94 para las microesferas de pectina con carga y de +183.3 DS 19.86 para las microesferas de quitosano con carga. Una cinética de liberación de fármaco de orden cero resultó para ambas microesferas poliméricas (pectina y quitosano).

Palabras clave: microesferas, pectina, quitosano, paracetamol, polímero.

ABSTRACT

In this paper the synthesis of biodegradable polymers microspheres for controlled release of drugs was studied; the polymers used were pectin and chitosan, both naturally occurring polymers. Synthesis of microspheres was performed by the method of emulsion and solvent evaporation, which roughly is the formation of an emulsion, comprising an aqueous phase and an organic phase; this emulsion is placed under stirring to evaporate the solvent and finally obtain the microspheres. Experimentation was performed to find the appropriate synthesis variables for the formation of microspheres, once these variables were found the paracetamol was incorporated into the synthesis. Microspheres of both polymers, with and without drug loading, were characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FT-IR) and differential scanning calorimetry (DSC). The drug encapsulation efficiency, particle size and particle size distribution, shape factor, % yield, % of moisture loss and zeta potential were evaluated. In addition, tests were performed to determine the kinetics of drug release from drug delivery microspheres in phosphate buffered saline (PBS). XRD studies demonstrated the amorphous nature of both polymers before and after synthesis. SEM micrographs showed spherical and nonporous surface particles; in the case of pectin microspheres loaded with paracetamol, it was observed that the drug was coating the microspheres so their surface was rough and irregular; drug loaded chitosan microspheres showed smooth and regular surfaces. The IR and DSC studies showed that there was no interaction between pectin-drug, but there was between chitosan-drug. The encapsulation efficiency was low for both polymers; the average particle sizes were 24.98 μm SD 13.67 and 0.62 μm SD 0.24 for pectin and chitosan microspheres, respectively. The yield was 64% for pectin microspheres and 80% for chitosan microspheres, both loaded with paracetamol. Moisture loss was low for both polymers. The Z potential was +115.3 DS 13.94 for drug-loaded pectin microspheres and +183.3 DS 19.86 for drug-loaded chitosan microspheres. Zero-order release kinetics resulted for both polymer microspheres (pectin and chitosan).

Keywords: microspheres, pectin, chitosan, paracetamol.

1. INTRODUCCIÓN

El término biomaterial engloba todos los materiales introducidos en el organismo con propósitos terapéuticos específicos. Este tipo de materiales deben ser biocompatibles, no deben causar ninguna respuesta adversa o negativa en el organismo; cuando interactúen con los tejidos y fluidos corporales deben biodegradarse física y químicamente en componentes no tóxicos asimilables por el organismo.

Numerosos investigadores se encuentran tratando de desarrollar un modelo ideal para el empleo de sistemas de transporte de fármacos con alta especificidad y actividad en la zona blanco, sin efectos tóxicos. Las microesferas (MEs) de polímeros biodegradables son una excelente opción para la liberación de fármacos ya que permiten controlar la liberación dentro de un rango terapéutico deseado, disminuyendo así el tiempo y la cantidad de medicamento empleado para el tratamiento de enfermedades y por ende se disminuyen los efectos tóxicos del medicamento en el organismo. Estos sistemas consisten en una matriz polimérica que contiene un fármaco y que pueden ser administrados por vía parenteral, nasal, oral, sublingual, subcutánea, intravenosa y por implante.

En la literatura existen varios métodos para la preparación de microesferas de polímeros biodegradables como la evaporación de solvente, separación de fases, polimerización interfacial, polimerización en emulsión y secado por aspersion. En el presente trabajo se desarrollaron sistemas poliméricos en forma de microesferas como vehículos para el transporte de fármacos a zonas blanco. El método utilizado fue el de emulsión y evaporación de solvente, en el cual se parte de una solución de polímero en un solvente orgánico, donde se emulsiona el fármaco, esta emulsión se agita hasta la extracción del solvente lo cual propiciará la formación de las microesferas; por último las microesferas formadas se recolectan, y se someten a un lavado y secado. Las principales características de este método y por las cuales fue seleccionado es debido a su sencillez y a que no requiere de equipo especializado, además ofrece reproducibilidad, alta eficiencia de encapsulación, alto rendimiento, tamaño de partícula uniforme, mejor morfología que otros métodos y bajo costo.

Un fármaco es una sustancia natural, sintética o biotecnológica con alguna actividad farmacológica y que se identifica por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas. Para la carga de las microesferas se utilizó paracetamol que es un analgésico antipirético; se utiliza para el alivio de

dolores leves a moderados y para el control de la fiebre. La liberación del fármaco desde las microesferas se puede dar a través de varias rutas como por ejemplo: difusión, hinchamiento y erosión. El tipo de liberación dependerá de las características físico-químicas del polímero. Por lo tanto la cinética de liberación será diferente para cada polímero empleado en este trabajo.

1.1 Justificación

El avance científico y tecnológico aunado a la necesidad de desarrollar sistemas de administración de fármacos eficaces y localizados ha llevado al uso de nuevos materiales que permitan el mejoramiento de sistemas terapéuticos tradicionales dirigidos a desarrollar terapias inteligentes que logren la biodisponibilidad del fármaco, así como la penetración o sobrepaso de barreras fisiológicas. El sistema terapéutico debe incluir elementos que definan la velocidad y el tiempo de liberación, tratando de asimilar fluidos fisiológicos internos. De esta forma se puede programar el perfil cinético de liberación del fármaco según las necesidades terapéuticas disminuyendo los efectos secundarios de la administración de medicamentos no dirigidos como la sobredosis o la escasas, el daño a órganos sanos, y también se reduce el incumplimiento por parte del paciente [1].

Se han generado importantes avances en la liberación controlada de agentes bioactivos, empleando sistemas o matrices poliméricas biodegradables [2]. Los polímeros ofrecen propiedades que permiten su empleo en el campo biomédico y farmacéutico. El quitosano y la pectina son polímeros con características idóneas para su utilización en la síntesis de microesferas, ya que son de origen natural y presentan biocompatibilidad, biodegradabilidad, nula toxicidad y su costo es bajo comparado con otros polímeros.

Por lo anterior, la síntesis de microesferas de quitosano y pectina representa una excelente opción para la administración de fármacos. Muchas de las propiedades de las microesferas dependen de un método de preparación adecuado, así como de las propiedades del polímero y el principio activo que se utilice [3]. El método de emulsión y evaporación de solvente proporciona mejores características morfológicas que otros métodos, tamaño de partícula uniforme, alta eficiencia de encapsulación, alto rendimiento, reproducibilidad y bajo costo.

Debido a la seguridad, eficacia y venta libre del paracetamol lo ha transformado en uno de los medicamentos más comunes en las sobredosis. Por lo cual, lo hace un buen candidato para la encapsulación en las microesferas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Sintetizar microesferas de polímeros biodegradables mediante el control de las variables de procesamiento del método de emulsión y evaporación de solvente, que permitan la liberación controlada de fármacos en condiciones fisiológicas.

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar microesferas de diferentes polímeros biodegradables: pectina y quitosano por medio del método de emulsión y evaporación de solvente.
- Caracterizar las microesferas sintetizadas por: calorimetría diferencial de barrido (DSC), microscopía electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos-X (DRX), espectrometría infrarroja (IR) y potencial Z, para determinar las características físicas y químicas de las microesferas.
- Lograr la encapsulación del fármaco en las microesferas de los dos diferentes polímeros biodegradables y determinar su nivel de encapsulación para cada uno.
- Determinar la estabilidad y liberación del fármaco (paracetamol) a utilizar en las microesferas de polímeros biodegradables realizando ensayos de liberación en condiciones fisiológicas (T=37°C y pH 7.2-7.4), mediante espectrometría luz (UV-Vis).

1.3 Hipótesis

Mediante el control adecuado de las variables de síntesis del método de emulsión y evaporación de solvente que afectan las propiedades de las microesferas (velocidad de evaporación de solvente, velocidad de agitación en la emulsión, relación entre la fase acuosa-fase orgánica, relación polímero-fármaco); se obtendrán microesferas que presenten propiedades adecuadas como son morfología y tamaño de partícula uniforme, biodegradabilidad, y superficie no porosa, con la capacidad de servir como vehículo para la liberación prolongada de sustancias activas.

2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

En esta sección, se realizó una discusión del estado de arte de las microesferas poliméricas; la cual abarca la definición, clasificación y aplicaciones de los polímeros como biomateriales. Se analizó las principales características de los materiales precursores (pectina, quitosano y paracetamol). Además se realizó un resumen de los principales métodos de síntesis de las microesferas poliméricas, el cual abarca las ventajas y desventajas de cada uno de éstos. Para la cinética de liberación de fármaco se hizo una revisión de los principales métodos matemáticos aplicados en este tipo de liberación.

2.1 Polímeros

Un polímero es un material o molécula formada de pequeñas unidades químicas llamadas monómeros que se repiten de manera regular y ordenada; también se les denomina macromoléculas. En algunos casos la repetición es lineal como una cadena de eslabones, pero también pueden ser cadenas ramificadas o interconectadas que forman retículos tridimensionales. La longitud de la cadena del polímero está definida por el número de unidades que se repiten en la cadena recibiendo el nombre de grado de polimerización [4]. Los polímeros compuestos por pocas unidades reciben el nombre de oligómero.

La polimerización se puede definir como el proceso químico por el cual se sintetiza un polímero. Los mecanismos de polimerización fueron divididos en dos grupos por Flory (1953) y Carothers Mark (1940) [4] conocidos como polimerización de condensación y de adición también se conocen como reacción por etapas y de reacción de cadena respectivamente. Para lograr la formación de un polímero es necesario que las moléculas de monómero base presenten dos o más grupos funcionales.

En la polimerización de condensación o de reacción por etapas, la formación del polímero se da entre dos moléculas polifuncionales para producir una molécula polifuncional de mayor tamaño, generalmente asociada a la eliminación de una molécula pequeña (por ejemplo, H_2O o HCl). La reacción puede continuar hasta establecer el equilibrio, el cual puede ser modificado a voluntad a altas temperaturas modificando y controlando las cantidades de los reactivos y productos.

Por otra parte la polimerización de adición o de reacción de cadena da lugar a reacciones en cadena en las que el portador de la cadena puede ser un ion o una sustancia con un electrón desapareado al cual se le llama radical libre. Los radicales libres pueden formarse por la descomposición de un material inestable llamado iniciador; estos radicales son capaces de abrir un doble enlace de un monómero y sumarse a él. Para finalizar este tipo de reacciones dos radicales libre deben de reaccionar para eliminar la actividad de crecimiento y formación de una o más moléculas de polímero [5].

El hecho es que el polímero se desarrolle a partir de un centro activo, que permita obtener polímeros de elevado peso molecular. Este es el método más utilizado industrialmente, porque se alcanzan altos pesos moleculares con una buena conversión.

El mecanismo de polimerización por adición está formado por las siguientes etapas:

1. Etapa de inicio, donde se lleva a cabo la descomposición de un iniciador para la formación de los radicales.
2. Etapa de propagación, los radicales formados en la etapa 1 reaccionan con las moléculas de monómero formando nuevos radicales que continúan reaccionando entre sí y con nuevas moléculas de monómero.
3. Etapa de terminación, la reacción llega a su fin cuando dos radicales se acoplan o se produce la transferencia de un protón.

2.1.1 Clasificación de los polímeros

En la literatura existen varios tipos de clasificación de los polímeros de acuerdo a varias características como por ejemplo: por su procedencia, disposición de las unidades que los conforman, estructura de la cadena lineal, direccionalidad, comportamiento térmico[5]; de esta clasificación una de las más importantes es por su procedencia, que pueden ser polímeros naturales cuando provienen directamente de fuentes vegetales o animales; y los polímeros artificiales son todos aquellos que su síntesis se lleva a cabo mediante procesos químicos artificiales.

2.2 Biomateriales

El término biomaterial engloba todos los materiales introducidos en el organismo con propósitos terapéuticos específicos. Este tipo de materiales deben ser biocompatibles, es decir no deben causar ninguna respuesta adversa o negativa en el organismo; cuando interactúe con los tejidos y fluidos corporales, deben biodegradarse física y químicamente en componentes no tóxicos asimilables por el organismo en el que se encuentre.

2.2.1 Polímeros biodegradables

Actualmente la extensa gama de polímeros existentes tienen muchas aplicaciones. La tendencia actual predice que en los próximos años muchas de las aplicaciones médicas y afines utilizarán los polímeros biodegradables. Una de las principales razones es la aparición de nuevas tecnologías biomédicas como por ejemplo: la ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, la terapia génica, la entrega de fármacos y la biotecnología; los cuales requieren materiales que sean biodegradables.

Las propiedades más importantes que debe poseer un biomaterial biodegradable se resumen a continuación [6]:

- El material no debe provocar una respuesta inflamatoria sostenida o tóxica tras su implantación en el cuerpo.
- El material debe tener un tiempo de conservación aceptable.
- El tiempo de degradación del material debe coincidir con el tiempo de curación o regeneración.
- El material debe tener propiedades mecánicas apropiadas para su aplicación y la variación entre las propiedades mecánicas y la degradación deben coincidir con el proceso de curación o regeneración.
- Los productos de degradación deben ser no tóxicos, y además deben de ser capaces de ser metabolizados y eliminado del cuerpo.
- El material debe presentar permeabilidad y procesabilidad apropiadas para su aplicación prevista.

Los biopolímeros presentan algunas propiedades que pueden tener efectos en su biocompatibilidad como son: peso molecular, forma y estructura del implante, química del material, hidrofiliidad/hidrofobicidad, energía superficial, degradación, solubilidad, lubricación, absorción de agua y el mecanismo de erosión [7]. Los biopolímeros se dividen en sintéticos y naturales. Dependiendo del modo de degradación de los biopolímeros se pueden clasificar adicionalmente en hidrolíticos y enzimáticos. En su gran mayoría los polímeros naturales se degradan enzimáticamente.

Los biopolímeros naturales son considerados como los primeros biomateriales biodegradables utilizados clínicamente. Se ha observado en pruebas in vivo que la velocidad de degradación enzimática de los biopolímeros naturales depende del sitio de inserción, de la disponibilidad y la concentración de enzimas. La modificación química puede afectar la velocidad de degradación; este tipo de polímeros presenta buenas características como bioactividad, la capacidad de presentar unión de ligandos de receptores celulares y la susceptibilidad a la degradación proteolítica de células (digestión intracelular) ya sea por modificación o naturalmente. Algunas de sus desventajas son su purificación y la posibilidad de transmisión de enfermedades.

Los biopolímeros sintéticos son en general biológicamente inertes, presentan características más predecibles como por ejemplo uniformidad en su producción, propiedades específicas de acuerdo a la aplicación que se le vaya a dar, éstos son desprovistos de muchas desventajas de los biopolímeros naturales [8]. El desempeño mostrado por la primer sutura sintética basada en un sistema de poli(ácido glicólico) en la década de los 60s llevó al diseño y desarrollo de una nueva gama de polímeros biodegradables para aplicaciones médicas y similares. Desde entonces numerosas investigaciones se han hecho para el diseño de polímeros biodegradables como vehículos de administración de fármacos o genes, andamios en ingeniería de tejidos, etc.

2.3 Quitosano

El quitosano es un polisacárido semicristalino formado por copolímeros de glucosamina y N-acetil glucosamina (Figura 2.1), viene de la desacetilación de la quitina, el quitosano es un polímero natural biodegradables, biocompatible, no tóxico, posee propiedades bioadhesivas, tiene características antibacterianas, antifúngico, antitumoral y una excelente capacidad de formación de películas, presenta un carácter catiónico por lo cual tiene muchas aplicaciones debido a su carácter iónico y además la posibilidad de entrecruzamiento covalente a través de sus grupos amino para

permitir la estabilización del sistema para liberación controlada de fármacos. El quitosano se ha convertido en un polímero natural prometedor para la preparación no solo de microesferas, sino también de nanoesferas y microcápsulas [9, 10].

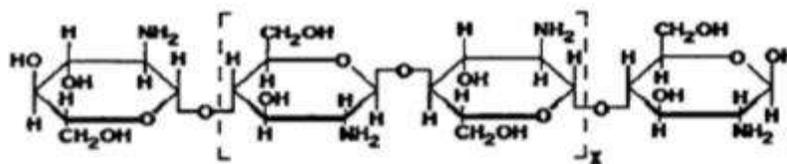


Figura 2.1. Estructura química de quitosano [10].

2.3.1 Aplicaciones

Comercialmente existen dos tipos de quitosano que se distinguen por su peso molecular y por su grado de desacetilación (DD), el quitosano de bajo peso molecular se encuentra entre 20 KDa - 190 KDa (KDa= kiloDalton; un Dalton también se conoce como UMA (unidad de masa atómica) ($1 \text{ Da} = 1.660\,538\,921\,(71) \times 10^{-27} \text{ kg}$) y su DD <75%; por el contrario el quitosano de peso molecular alto se encuentra entre 190 KDa y 375 KDa con DD >75% [10, 11]. Algunas de sus propiedades se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Propiedades de quitosano en relación con uso en aplicaciones biomédicas [11].

Aplicaciones biomédicas potenciales	Principales características
Suturas quirúrgicas	Biocompatible
Implantes dentales	Biodegradable
Piel artificial	Renovables
Reconstrucción ósea	Formación de películas
Lentes de contacto corneales	Agente hidratante
Liberación de fármacos para animales y seres humanos	Tolerancia biológico no tóxico
Material de encapsulación	Propiedades curativas de heridas Eficacia contra bacterias, virus y hongos

Actualmente la mayor aplicación del quitosano es en ingeniería de tejidos como biomaterial para la regeneración de estructuras óseas y regeneración de tejidos; el quitosano posee la capacidad de para unirse a moléculas aniónicas como glicanos de glucosamina, factores de crecimiento y ADN, lo cual lo hace un buen candidato en terapia génica. Otro sector de gran impacto en el cual tiene aplicación el quitosano es el ambiental, se utiliza para el tratamiento de aguas residuales, lixiviación de metales pesados y como biosensores [12, 13].

2.3.2 Solubilidad

El quitosano es altamente soluble en soluciones ácidas ($\text{pH} < 6$); la presencia de grupos amino indica que el pH modifica las propiedades del quitosano, a pH bajo el grupo amino se protona cargándose positivamente haciendo del quitosano un polielectrolito catiónico soluble en agua; y para $\text{pH} > 6$ el grupo amino se desprotona, el quitosano pierde su carga y se vuelve insoluble.

2.3.3 Biodegradabilidad

La biodegradabilidad juega un importante papel en el destino del quitosano, la absorción sistemática de polímeros hidrófilos requiere que el polímero tenga un peso molecular adecuado 30 KDa a 40 KDa dependiendo del polímero, si excede este peso el polímero deberá ser sometido a degradación química o enzimática para proporcionar fragmentos adecuados. Una gran variedad de microorganismos sintetiza y degrada la quitina, el precursor biológico del quitosano; la velocidad y el grado de degradación del quitosano en los organismos está ligado con el DD, el aumento en DD disminuye la velocidad de degradación.

2.4 Pectina

La pectina es una mezcla compleja de polisacáridos que constituye aproximadamente un tercio de las paredes celulares de las plantas. Presenta diversas aplicaciones debido a sus parámetros físico-químicos y biodegradabilidad. Se obtiene principalmente de cáscaras de cítricos, pulpa de manzanas, remolacha proveniente de la industria azucarera y de semillas de girasol [14].

La pectina (Figura 2.2) está compuesta por una cadena lineal de restos de ácido α -(1-4)-D-galacturónico, sus grupos carboxílicos se encuentran parcialmente metoxilados, su peso molecular oscila entre 50 KDa y 180 KDa. En pH neutro las cadenas se encuentran cargadas negativamente.

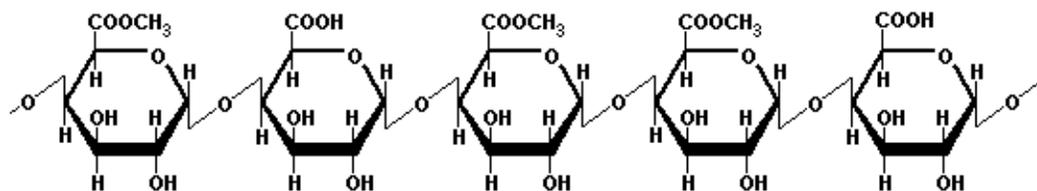


Figura 2.2. Estructura química de la pectina [14].

La pectina es una mezcla de ácidos pectínicos soluble en agua. Existen dos tipos de pectinas, altamente metiladas (HM) presentan alto grado de metilación >50% tienden a formar geles en medios ácidos y en presencia de azúcares, los geles formados con este tipo de pectinas son irreversibles. Las pectinas débilmente metiladas (LM) < 50% son también muy importantes forman geles termo-reversibles en presencia de ciertos iones metálicos divalentes como el calcio (Ca^{++}), además son independientes del pH, ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica. El grado de metilación se define como la proporción de ácidos galacturónicos metil esterificados por cada cien ácidos galacturónicos totales, si la metilación es inferior al 5% se clasifica como un ácido péctico [15].

2.4.1 Usos de la pectina en el área farmacéutica

La pectina se encuentra inscrita en la FDA (*US Food and Drug Administration*), como aditivo seguro sin límites de consumo diario, por lo que puede ser utilizada ampliamente como excipiente en la formulación de comprimidos matriciales, geles, cubiertas farmacéuticas, etc. En la literatura existen muchos autores que relacionan la pectina con la salud gastrointestinal; surgieron que el consumo diario de pectina reduce el riesgo de algunos tipos de cáncer, ayuda a la regulación de niveles de glucosa, acelera la digestión de los lípidos y ayuda al control de peso [16].

2.5 Microesferas

El término microesfera fue introducido a mediados de 1970 [17]. Las microesferas son partículas donde no existe una distinción entre la cubierta y el núcleo, su tamaño oscila entre una y varias decenas de micras (1 a 250 μm idealmente diámetros < 125 μm). Posee una estructura monolítica. Estas microesferas pueden ser preparadas como una matriz polimérica de materiales biocompatibles y biodegradables. Las características de las microesferas idóneas para aplicaciones médicas serían la selectividad por el tejido blanco, acoplamiento entre una liberación controlada y sostenida, así como evitar el daño en el tejido huésped [18].

Los sistemas de liberación de fármacos de polímeros biodegradables en forma de microesferas presentan ventajas y desventajas que se enunciarán a continuación [17]:

Ventajas:

- Comodidad y complacencia para el paciente, pues con una sola dosificación se logra un efecto terapéutico prolongado.
- La velocidad y duración de la liberación del principio activo in vivo pueden ser determinadas mediante la selección del tamaño de partícula o mediante el grado de porosidad de la microesfera.
- Las partículas son lo suficientemente pequeñas para ser administradas por medio de una inyección o mediante implantación.
- Las microesferas se biodegradan en el organismo sin causar ningún efecto negativo en el sitio de inyección o implantación.
- Estabilidad física, química y microbiológica.
- Se reducen las concentraciones sistémicas del fármaco y se promueve la concentración local en el órgano blanco, de manera que se obtiene la máxima actividad farmacológica con mínimos efectos adversos.
- Fácil fabricación con buena reproducibilidad.

Desventajas:

- En caso de presentar alguna reacción adversa o complicación no se podrá retirar el sistema implantado. Regresará al estado inicial cuando el sistema se haya degradado completamente y el fármaco se libere y elimine.

2.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las microesferas

Las propiedades fisicoquímicas de las microesferas estarán gobernadas por el tipo de fármaco y la aplicación in vivo para la que se van a emplear [18]:

- Tamaño de partícula. La ruta de administración determinará el tamaño requerido para las microesferas.
- Área superficial/porosidad. La porosidad variable facilitará el perfil de liberación del fármaco. Las microesferas porosas se utilizan para la liberación de sustancias con elevado peso molecular que no pueden difundir desde una matriz no-porosa; también se pueden emplear para liberar sustancias que presentan elevada afinidad hacia el biopolímero y no

existe liberación solo que la matriz se degrade; la degradación se puede controlar modificando la porosidad de la matriz, y así mismo se puede controlar el perfil de liberación del fármaco.

- Contenido de fármaco/liberación del fármaco. Estas dos variables dependen de la dosis que se trate de alcanzar y la velocidad de dosificación del fármaco en cada tratamiento particular.
- Tiempo de biodegradación. El tiempo requerido para degradar las microesferas completamente viene gobernado por la ruta de administración y la frecuencia de las dosis.

2.5.2 Microesferas de quitosano

Las microesferas de quitosano han sido investigadas para su uso como sistemas de liberación controlada, ya sea para implantación, administración oral y nasal; tales microesferas pueden prepararse por varios métodos; la selección del método de síntesis depende de factores como el tamaño de partícula, estabilidad química y térmica de la molécula del fármaco, la toxicidad residual asociado al producto final y la estabilidad del producto final.

Walke y col. [19] prepararon microesferas de quitosano por el método de emulsión y evaporación de solvente, para la encapsulación de proteínas antigénicas. Para la síntesis de las microesferas utilizan 10 mg de quitosano en 10 ml de agua destilada esta solución se mezcló con parafina líquida y agitaron mecánicamente a 1200 rpm por 20 minutos, estos investigadores utilizan span 80 y tween 80 como emulsionante y solución de vainillina como agente entrecruzante. Las microesferas sin carga de proteínas antigénicas presentaron superficies lisas no porosas y forma esférica; por otra parte la microesferas cargadas con antígenos presentaron superficies rugosas y porosas con forma semiesférica. El tamaño de las microesferas oscilo entre 1-4 μm ; la eficiencia de encapsulación fue del 75-78%; la hinchazón y mucoadhesión fue del 56-68%; y el porcentaje de rendimiento para la microesferas sin carga fue del 86% y para las microesferas con carga fue de 64-69%. Finalmente Walke y col. concluyeron que las microesferas de quitosano eran un vehículo prometedor para el desarrollo de vacunas orales multivalentes.

Olivera y col. [20] desarrollaron microesferas de quitosano cargadas con ADN comercial como prototipo de sistemas de liberación de nucleicos, sintetizadas por medio del método de emulsión. Para la preparación de la fase acuosa disolvieron quitosano 2% (w/v) en ácido acético al 5% (w/v)

en agitación continua por 24 horas; la fase acuosa se mezcló con la fase aceitosa compuesta por aceite de girasol, span 80 y glutaraldehído como agente entrecruzante, la mezcla resultante se mantuvo en agitación constante por 2.5 horas a 1100 rpm. Las microesferas que obtuvieron presentaron superficies rugosas y porosas con forma semiesférica; los tamaños de partícula oscilan entre 1 y 20 μm (Figura 2.3 (a)). Realizaron pruebas de liberación a pH fisiológico y observaron una liberación rápida durante la primera hora, el 85% de la sustancia activa; se liberó totalmente en dos horas como se muestra en la Figura 2.3 (b). Olivera y col. concluyeron que las microesferas de quitosano son aptas para la microencapsulación de ácidos nucleicos, debido a la protección física que otorga el quitosano contra la degradación del componente cargado.

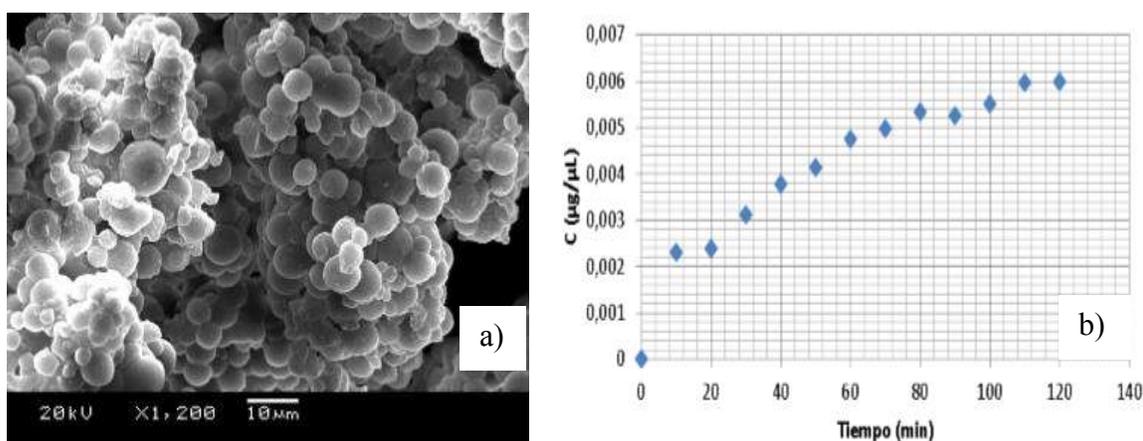


Figura 2.3. a) Microscopía MEB mostrando microesferas de quitosano cargadas con ADN, y b) perfil de liberación de ADN microencapsulado [20].

2.5.3 Microesferas de pectina

La pectina es reconocida por su capacidad para resistir la degradación en el tracto gastrointestinal. Vaidya y col. [21] desarrollaron un sistema de microesferas de pectina cargadas con metronidazol (Figura 2.4) para la entrega de medicamento directamente en el colon. Las microesferas fueron sintetizadas mediante la reacción de la pectina con metronidazol en presencia de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y dimetilsulfóxido anhidro (DMSO). El residuo de esta reacción se dispersó en una mezcla agua-isooctano y esta se vertió en aceite. La solución final se agitó hasta obtener una emulsión agua/aceite estable. Esta solución se enfrió a 10°C y se agregó acetona para deshidratar las gotículas de pectina. La solución se agitó constantemente a 1000 rpm durante 30 minutos a 30°C para la evaporación del solvente. Los

resultados fueron microesferas de superficie lisa y forma esférica, el tamaño promedio de partícula fue de 14.94 ± 0.73 a 15.42 ± 0.83 μm . La eficiencia de encapsulación fue de 92.43 ± 1.89 a $94.52 \pm 2.42\%$. Estos investigadores concluyeron que las microesferas de pectina eran una buena alternativa para la entrega del fármaco, ya que mantienen su integridad en el medio hostil del estómago e intestino delgado.

Se han sintetizado microesferas de pectina para administración nasal, los investigadores Mahajan y col. [22] sintetizaron microesferas de pectina cargadas con ondansetrón, que es un fármaco que se utiliza para prevenir las náuseas y vómitos causados en la quimioterapia, radioterapia y cirugías. Las microesferas fueron sintetizadas por el método de secado por aspersión (spray drying), utilizando una boquilla estándar de 0.7mm. Las condiciones del proceso fueron las siguientes: temperatura de entrada 105 a 110 °C, temperatura de salida 80 a 90°C, flujo de alimentación 1 a 3 mL/min; presión de aspersión 2 kg/cm². Los resultados obtenidos por estos investigadores fueron microesferas con superficie lisa y forma esférica (Figura 2.5); tamaño de partícula de 11 a 13 μm ; eficiencia de encapsulación superior al 80%; rendimiento de 23.09 a 39.45%. Este estudio concluyó que las microesferas de pectina son un vehículo prometedor para la administración nasal.

Giunchedi y col. [23] desarrollaron microesferas de pectina para aplicaciones oftálmicas para la liberación de piroxicam que es un antiinflamatorio libre de esteroides, también funciona como antirreumático. Las microesferas fueron sintetizadas por el método de secado por aspersión, utilizaron una boquilla estándar de 0.7mm. Las condiciones del proceso fueron las siguientes: temperatura de entrada 128 a 129 °C, temperatura de salida 62 a 63°C, flujo de alimentación 10 mL/min. Los resultados obtenidos por estos investigadores son microesferas con superficie lisa y forma esférica; las partículas tuvieron tamaños inferiores de 10 μm ; rendimiento de 41 a 46%; eficiencia de encapsulación 97 a 100%. Giunchedi y col. llegaron a la misma conclusión que otros investigadores; los vehículos de pectina son un buen candidato para la liberación de fármacos, aunque en algunos casos es necesaria algunas modificaciones de los métodos de síntesis. Actualmente también se estudian las microesferas de hidrogel; este tipo de microesfera se utiliza para diferentes aplicaciones como en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, se utilizan para modificación de textura, encapsulación y en modelos de liberación controlada.

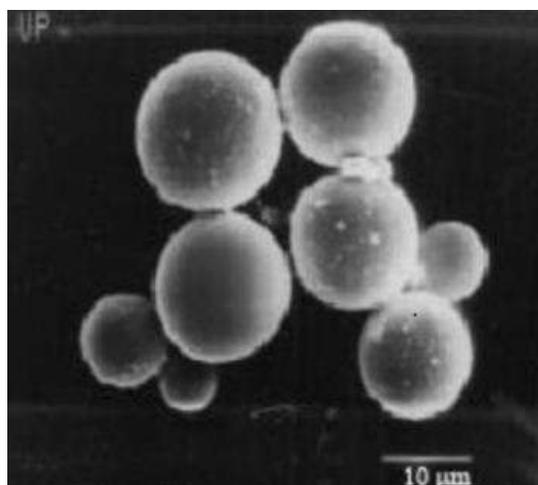


Figura 2.4. Microscopía MEB mostrando microesferas de pectina cargadas con metronidazol [21].

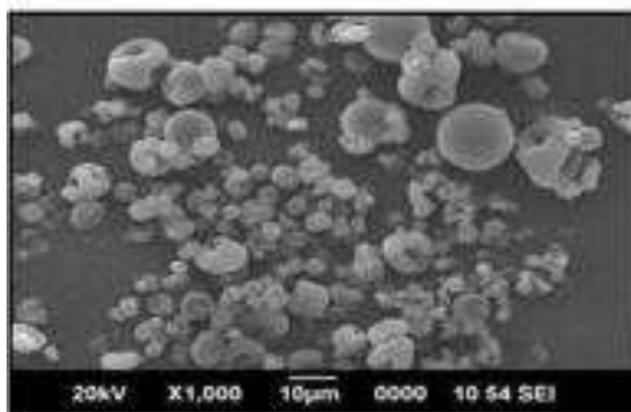


Figura 2.5. Microscopía MEB mostrando microesferas de pectina cargadas con ondansetrón [22].

2.6 Métodos de preparación de microesferas

Las microesferas de polímeros biodegradables pueden ser sintetizadas por varios métodos. Cada método posee ventajas y desventajas. Para la elección adecuada del método de síntesis se debe de tener en cuenta las propiedades deseadas en las microesferas, ya que éste determinará las características físicas y químicas de éstas. Es deseable que el método seleccionado sea fácil, reproducible, que no dañe el fármaco empleado y que las características de liberación sean modificables por medio de los parámetros de la síntesis.

2.6.1 Secado por aspersión

El método de secado por aspersión consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico, el fármaco se dispersa en esta solución mediante homogenización a alta velocidad. La dispersión obtenida se atomiza en una corriente de aire caliente, donde el solvente se evapora produciendo microesferas que oscilan entre 1 a 100 μm de tamaño, dependiendo de las condiciones de atomización. Las microesferas son recolectadas mediante un separador de ciclón.

Las ventajas que se pueden destacar de este método son reproducibilidad, control de tamaño de partícula y alta encapsulación de principio activo. Las desventajas incluyen alto costo del equipo, aglomeración, descomposición de fármacos sensibles a la temperatura, además se requiere la utilización de otras técnicas para la obtención de las microesferas, como por ejemplo liofilización [24, 25].

2.6.2 Separación de fases (coacervación)

El método de separación de fases es utilizado fundamentalmente para principios activos solubles en agua. Se disuelve el polímero en un solvente orgánico y el fármaco en agua; esta solución se emulsiona y se vierte un primer no solvente, el cual genera gotículas de coacervado. Debido a que estas gotículas son blandas para su recolección es necesaria la adición de un segundo no solvente para endurecer estas gotículas y formar las microesferas.

Este método presenta muy pocas ventajas, la más destacable es la alta eficiencia de encapsulación de fármacos solubles en agua. Entre las desventajas se encuentra la formación de aglomerados, no existe la reproducibilidad total y tiene un alto costo [25, 26].

2.6.3 Método de emulsión y evaporación de solvente

El método de emulsión y evaporación de solvente a partir de una emulsión simple es el más utilizado a nivel laboratorio y nivel industrial debido a la sencillez del proceso y del equipo requerido [26]. A grandes rasgos este método consiste en la formación de una fase acuosa la cual contiene el polímero y el fármaco; esta fase se emulsiona con una fase oleosa que contiene un estabilizador. La emulsión se agita para extraer el solvente y propiciar la formación de microesferas. Por último las microesferas son recolectadas, lavadas y secadas.

Las ventajas que más sobresalen de este método son la sencillez, reproducibilidad, alta eficiencia de encapsulación de fármaco, alto rendimiento, mejor morfología que otros métodos, tamaño de partícula uniforme y bajo costo. Su principal desventaja está relacionada con las condiciones de proceso, ya que la exposición a solventes orgánicos y agitación vigorosa puede llevar a la pérdida parcial de la actividad biológica del fármaco [26].

2.6.3.1 Características del método de emulsión y evaporación de solvente

De acuerdo a la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se esté formando las técnicas de evaporación de solvente se clasificarán en fase acuosa o en fase oleosa [27].

2.6.3.2 Fase acuosa

En el método de emulsión aceite/agua (O/W), la fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo se emulsifica en una fase acuosa que contiene un surfactante. Las gotas orgánicas emulsificadas que contienen el polímero y el principio activo son endurecidas y posteriormente obtenidas por extracción del solvente (Figura 2.6).

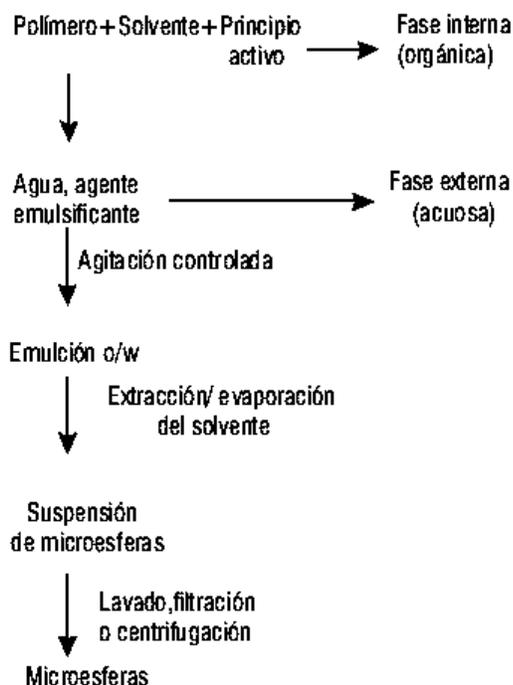


Figura 2.6. Diagrama del método de emulsión (O/W) [27].

En el método de emulsión agua/aceite/agua (W/O/W), también se conoce como método de emulsión múltiple, se utiliza para encapsular principios activos solubles en agua; el fármaco se disuelve en agua (fase acuosa) y el polímero se disuelve en un solvente orgánico (fase orgánica), ambas fases se mezclan obteniendo una emulsión (W/O), ésta se adiciona a otra fase acuosa que contiene un surfactante como el alcohol polivinílico, el solvente es eliminado y se obtienen las microesferas (Figura 2.7).

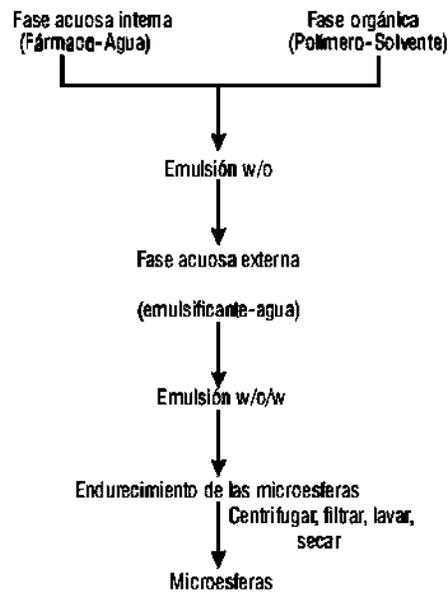


Figura 2.7. Diagrama del método de emulsión agua/aceite/agua (W/O/W) [27].

2.6.3.3 Fase oleosa

En el método de emulsión aceite/aceite (O/O), la fase continua estará formada por un líquido orgánico como un aceite mineral, se usa principalmente para encapsular eficazmente principios activos solubles en agua (Figura 2.8).

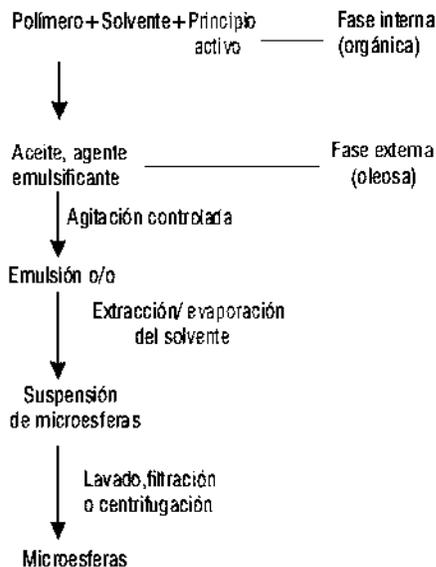


Figura 2.8. Diagrama del método de emulsión aceite/aceite (O/O) [27].

2.6.3.4 Solventes

Se ha evaluado el efecto de diferentes solventes en la formación de microsferas. Los solventes miscibles en agua no forman microsferas durante el método de emulsión, tienden a formar aglomerados irregulares debido al rápido intercambio de éste. También hay que tener en cuenta que el punto de ebullición debe ser menor que el del medio de suspensión. Los más adecuados presentan baja toxicidad, fácil eliminación y habilidad para disolver el polímero con que se va a trabajar; si se desea disolver el fármaco en la solución del polímero debe considerarse la habilidad del solvente para la disolución del fármaco [28].

2.6.3.5 Emulsificadores

El emulsificador es un estabilizador del sistema de emulsión. Forma una lámina fina alrededor de las gotas de aceite que están conformadas por el polímero y el fármaco, de esta manera se disminuye la coalescencia y la coagulación. La concentración requerida y efectiva es diferente para cada sistema, así que se determina experimentalmente.

2.7 Fármacos

Un fármaco es una sustancia química purificada que se utiliza para el tratamiento, prevención, curación o para la reducción de efectos negativos sobre el organismo.

2.7.1 Fármacos hidrófobos

La administración de fármacos hidrófobos representa un gran reto debido a la baja solubilidad del fármaco y a la baja difusividad dentro de la matriz polimérica, por lo cual el perfil de liberación suele ser lento al igual que la constante de disolución; el proceso de difusión se rige principalmente por mecanismos de difusión o erosión. En el diseño de sistemas de liberación controlada para fármacos hidrófobos, el tamaño de partícula y la cantidad de fármaco cargado tienen un efecto significativo sobre coeficiente de difusión del fármaco.

2.7.2 Fármacos hidrófilos

La entrega de un fármaco hidrófilo representa un gran reto para los sistemas de liberación controlada, ya que estos sistemas presentan una gran ráfaga inicial de liberación de fármaco, seguida de una liberación de fármaco lenta. El coeficiente de difusión de las moléculas hidrófobas es más bajo que el de las moléculas hidrófilas, al igual que la velocidad de disolución del fármaco. La liberación de fármacos hidrófilos está influenciado por dos mecanismos, difusión del fármaco y la disolución del fármaco. Una forma de resolver el problema de ráfaga inicial de moléculas hidrófilas es la formación de una doble pared, la primera menos permeable o hecha de una matriz hidrófoba; también se puede aplicar la modificación de superficie para mejor la entrega y evitar la ráfaga inicial.

2.7.3 Paracetamol

El paracetamol es un analgésico antipirético; se obtiene mediante la acetilación de ácido p-aminofenol. Este fármaco se presenta como un polvo blanco finamente cristalino e inodoro; tiene un peso molecular de 151.17 (g/mol), su fórmula empírica es $C_8H_9NO_2$, presenta un $pka = 9.78$ y su longitud de onda máxima ($\lambda_{max.}$) oscila entre 242 y 250 nm; es soluble en agua (1 g/100 mL), etanol y acetona; su punto de ebullición es superior a 500 °C, la temperatura de fusión esta entre 169 y 170 °C y su densidad es de 1.3 g/cm³ [29].

El paracetamol forma parte de un grupo de fármacos no esteroideos (AINEs); los AINEs son analgésicos no opiáceos, esto quiere decir fármacos con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Entre éste grupo podemos encontrar el metamizol, ketorolaco, diclofenaco, naproxeno, etc., éstos comparten características terapéuticas y efectos colaterales; sin embargo,

difieren en su efecto farmacológico. Por ejemplo el paracetamol es conocido por su efecto antipirético y anestésico, pero carece de efecto antiinflamatorio; por el contrario el diclofenaco posee propiedades antiinflamatorias, pero bajo efecto anestésico y nulo efecto antipirético.

El paracetamol ayuda aliviar dolores leves y crónicos. Su mecanismo de acción es a nivel del sistema nervioso central, esto se relaciona con la inhibición de la producción de prostaglandinas, compuesto relacionado con el proceso de dolor y su acción antipirética la realiza de igual forma inhibiendo la producción de prostaglandinas a nivel hipotalámico [30].

El paracetamol es de absorción rápida y completa vía oral y rectal, tiene una vida media de 1 a 4 horas después de su ingesta. Este fármaco produce hepatotoxicidad, esto se da cuando se excede la dosis terapéutica, causando necrosis hepática fulminante; se produce por la acción de un metabolito que surge cuando el fármaco se metaboliza por oxidación del citocromo P-450 produciéndose N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI) que se detoxifica uniéndose a glutatión y se excreta por orina, pero cuando se excede la capacidad de conjugación con el glutatión se produce la necrosis hepática [31]. El desarrollo de la necrosis hepática se puede dar tan solo en 12 horas después de la ingesta; en menor medida el mismo proceso puede ocurrir en el riñón desencadenando nefrotoxicidad.

Los efectos secundarios son poco frecuentes y de menor gravedad. Algunos ejemplos de efectos secundarios producidos por el abuso en el consumo de este fármaco son:

- Lesiones en la piel y mucosas, necrosis hepática, nefrotoxicidad y alteraciones sanguíneas.
- Fiebre, náuseas, vómito, cianosis, anorexia y dolor abdominal.
- Estado de acidosis metabólica con intolerancia a la glucosa y glucosuria.
- Encefalopatía hepática que puede conducir al coma y muerte.

La seguridad y eficacia del paracetamol como analgésico y antipirético, ha aumentado su popularidad; tal popularidad lo ha transformado en uno de los fármacos más comunes en las sobredosis. En Estados Unidos y Reino Unido, el 50% de las intoxicaciones por fármacos, fue causado por éste. Bravo y col. [32] mencionan que algunos de los factores de intoxicación por este fármaco, es debido a la venta libre, bajo costo, amplia disponibilidad y múltiples presentaciones (dosificación y formulación). Muchos investigadores, estudian problemáticas involucradas con el paracetamol, tanto en humanos como en el medio ambiente.

2.8 Mecanismos de liberación de fármacos

Durante décadas, los sistemas poliméricos se han utilizado en aplicaciones farmacéuticas, especialmente para proporcionar una liberación controlada del fármaco. El desarrollo de estos sistemas comienza con el uso de polímeros no biodegradables que principalmente se basan en el proceso de difusión, y posteriormente el uso de polímeros biodegradables donde se dan fenómenos como el hinchamiento y la erosión. Tomando en cuenta las características físico-químicas del polímero, el mecanismo de liberación del fármaco se puede clasificar en tres procesos principalmente [33-35]:

- Sistema controlado por difusión; difusión del fármaco desde el polímero no degradado.
- Sistema controlado por hinchazón; aumento en la difusión del fármaco debido a la hinchazón del polímero.
- Sistema controlado por erosión; la liberación del fármaco es debido a la degradación del polímero.

2.8.1 Cinética de liberación del fármaco

El análisis cuantitativo de los datos obtenidos en un ensayo liberación/disolución se facilita al utilizar una ecuación genérica que se traduce matemáticamente como una curva de disolución del fármaco en función del tiempo. Estos modelos matemáticos, en algunas ocasiones se derivan del análisis teórico del proceso de liberación/disolución. Algunos de los factores que pueden afectar la cinética de liberación son: el tipo de fármaco, cristalinidad, tamaño de partícula, polimorfismo, solubilidad y la cantidad de fármaco [36, 37].

2.8.2 Cinética del orden cero

La disolución del fármaco a partir de vehículos que no se disgreguen y su liberación es lenta se pueden representar por:

$$W_0 - W_t = kt \quad (2.1)$$

Donde W_0 es la cantidad inicial de fármaco en las microesferas, W_t es la cantidad de fármaco en las microesferas en un tiempo (t) y k es una constante de proporcionalidad. Al dividir la ecuación se obtiene:

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

Donde $f_t = 1 - \left(\frac{W_t}{W_0}\right)$, que representa la fracción de fármaco disuelto en un tiempo t y k_0 es la constante de velocidad de disolución o constante de liberación de orden cero. Por lo tanto, una gráfica de la fracción de fármaco disuelto en función del tiempo será lineal, si se cumplen las condiciones de área constante y que se llega a condiciones de equilibrio respecto a la liberación.

Esta relación se puede utilizar para describir la disolución del fármaco en varios sistemas de dosificación como matrices tipo tableta con fármacos poco solubles, sistemas transdérmicos, sistemas de matrices recubiertas, sistemas osmóticos etc. Este tipo de perfil de liberación donde la cantidad de fármaco liberada por unidad de tiempo es la misma, es el perfil de liberación ideal a fin de lograr una acción farmacológica prolongada. Por lo tanto este modelo se puede expresar como [37, 38]:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (2.3)$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco disuelto en un tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco en la solución ($Q_0 = 0$) y K_0 es la constante de liberación de orden cero.

2.8.3 Cinética de primer orden

La cinética de primer orden no solo se puede utilizar para el estudio de la disolución de fármacos, también se ha utilizado para describir fenómenos de adsorción y eliminación de fármacos. La disolución de una partícula sólida en un medio líquido se puede describir por la ecuación de Noyes-Whitney:

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C) \quad (2.4)$$

Donde C es la concentración del soluto en un tiempo (t), C_s es la solubilidad en el equilibrio a la temperatura de trabajo y k es una constante de proporcionalidad de primer orden. Con el tiempo algunas investigaciones condujeron a la modificación de la ecuación (2.4) incorporando un valor para la zona del sólido expuesta a la disolución (S):

$$\frac{dC}{dt} = k_1 S (C_s - C) \quad (2.5)$$

Donde k_l es una constante de proporcionalidad. Otra adaptación de la ecuación de Noyes-Whitney, involucra la velocidad de transferencia del soluto en la solución respecto al tiempo como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\frac{dW}{dt} = kS(C_s - C) \quad (2.6)$$

Donde W es la cantidad de soluto en la solución en un tiempo t y k es una constante. Esta ecuación se puede reorganizar utilizando el volumen de la solución (V), el valor de capa de difusión y la constante $k = k_1V$ obtenemos:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{kS}{V}(VC_s - W) = k(VC_s - W) \quad (2.7)$$

Donde $k = K_1S$. Si se estudia una matriz con un área constante, la integración de la ecuación anterior queda de la siguiente manera:

$$W = VC_s(1 - e^{-kt}) \quad (2.8)$$

Aplicando logaritmo (\log_{10}) se obtiene:

$$\log(VC_s - W) = \log VC_s - \frac{kt}{2.303} \quad (2.9)$$

También se puede expresar como:

$$Q_t = Q_0 e^{-k_1 t} \propto \ln\left(\frac{Q_t}{Q_0}\right) = k_1 t \quad \text{ó} \quad \ln(q_t) = \ln Q_0 - k_1 t \quad (2.10)$$

$$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (2.11)$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial en solución y k_l es la constante de liberación de primer orden. De esta manera se puede presentar un gráfico del logaritmo (\log_{10}) de la cantidad liberada de fármaco en función del tiempo, el cual será lineal [37, 38]. Este tipo de fenómeno se da en matrices porosas hidrófilas, donde la liberación del fármaco es proporcional a la cantidad de fármaco dentro de la matriz, por lo tanto el fármaco liberado disminuye con el paso del tiempo.

2.8.4 Modelo de Weibull

El modelo de Weibull puede aplicarse a casi todo tipo de curvas de liberación/disolución de fármaco. Esta ecuación se expresa como la fracción acumulada del fármaco en la solución (m) el tiempo t :

$$m = 1 - e \left[\frac{-(-t - T_i)^b}{a} \right] \quad (2.12)$$

Donde a es un parámetro que define la escala del tiempo del proceso, T_i es el tiempo de retraso antes del inicio del proceso liberación/disolución, en la mayoría de los casos es cero y b depende del tipo de curva; (caso 1) curva sigmoide ($b=1$), (caso 2) curva parabólica ($b>1$) y (caso 3) curva exponencial ($b<1$); esta última ecuación puede reordenarse de la siguiente forma:

$$\log[-\ln(1 - m)] = b \log(t - T_i) - \log a \quad (2.13)$$

Se puede obtener una relación lineal de la ecuación anterior graficando $[\log(-\ln(1 - m))]$ en función del logaritmo del tiempo, b se obtiene de la pendiente del gráfico y a se obtiene del valor de la ordenada ($1/a$) en el tiempo $t=1$ [37, 38].

2.8.5 Modelo de Higuchi

El modelo de Higuchi está basado en las partículas del fármaco dispersas en una matriz uniforme en un área determinada. Para el estudio de la disolución de un sistema de matriz homogénea se tiene la siguiente ecuación:

$$f_t = Q = \sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad (2.14)$$

Donde Q es la cantidad de fármaco liberada en un tiempo t por unidad de área, C es la concentración inicial de fármaco, C_s es la solubilidad del fármaco dentro de la matriz y D es la difusividad de las partículas del fármaco (constante de difusión).

La ecuación de Higuchi se simplifica de la siguiente manera:

$$Q = f_t = k_H t^{\frac{1}{2}} \quad (2.15)$$

Donde k_H es la constante de disolución de Higuchi. El modelo de Higuchi describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión basada en la primera ley de Fick y dependiente de la raíz cuadrada del tiempo. Se puede obtener un gráfico para el modelo de Higuchi que consiste en graficar Q que es la cantidad de fármaco liberada en un tiempo t o también conocida como el porcentaje de Higuchi contra la raíz cuadrada del tiempo [37, 38].

2.8.6 Modelo de Korsmeyer-Peppas

En forma más simple Korsmeyer y col. [39], desarrollaron una ecuación semi-empírica basada en una ley de potencias para describir la liberación del fármaco a partir de sistemas controlados por hinchamiento:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2.16)$$

Donde $\frac{M_t}{M_\infty}$ es la fracción de fármaco liberado, k es una constante y n es el exponente difusional.

La ecuación de la ley de potencias se puede tomar como la superposición de dos procesos de difusión, difusión de Fick y difusión no Fickian o caso II de transporte. Donde $n=0.5$ difusión de Fick y $n=1$ para caso II de transporte. Para el caso de transporte análogo $0.5 < n < 1$. Este método se utiliza para matrices poliméricas cuando el mecanismo de liberación no es bien conocido o cuando más de un tipo de liberación este presente.

Una versión modifica de la ecuación de Korsmeyer-Pepas fue desarrollada para introducir un tiempo de retraso al inicio de la liberación del fármaco desde una matriz [37, 38].

$$\frac{M_{(t-l)}}{M_\infty} = a(t-l)^n \quad (2.17)$$

$$\log \left(\frac{M_{(t-l)}}{M_\infty} \right) = \log a + n \log(t-l) \quad (2.18)$$

Cuando se presenta un efecto ráfaga (b), la ecuación anterior toma la siguiente forma

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n + b \quad (2.19)$$

La revisión del estado del arte realizada, dio los fundamentos para sintetizar las microesferas de polímeros naturales (pectina y quitosano). Se consideraron las principales características de los materiales precursores (pectina, quitosano y paracetamol) y las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de síntesis para seleccionar el mejor. La selección adecuada del método de síntesis ayudó a encontrar las variables del proceso de producción de las microesferas poliméricas logrando sintetizar microesferas de forma esférica y tamaños adecuados para diversas aplicaciones médicas, además se logró encapsular el paracetamol, a pesar de su alto carácter hidrófilo. Los métodos matemáticos estudiados ayudaron a encontrar el mejor mecanismo que explique la cinética de liberación de paracetamol encapsulado en las microesferas poliméricas.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la metodología para la preparación de las microesferas de polímeros biodegradables, obtenidas por el método de emulsión y evaporación de solvente. Se describen brevemente los materiales, procedimientos y técnicas bajo las cuales fueron caracterizadas las microesferas con y sin carga de fármaco.

3.1 Materiales

Los polímeros biodegradables, el fármaco y reactivos fueron adquiridos comercialmente en laboratorios Sigma-Aldrich. Las características se presentan en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Características de los materiales precursores.

Reactivo	Presentación	Color	Características
Pectina	Polvo	Amarillo con tendencia a marrón	Alta metilación $\geq 74\%$. Soluble en agua
Quitosano	Polvo	Marrón	Soluble en agua a pH bajos. Bajo peso molecular 20 a 190 KDa. Alta desacetilación $\geq 75\%$
Paracetamol	Polvo cristalino	Blanco	Soluble en agua, acetona y etanol. Pureza $\geq 99\%$
Glutaraldehído	Líquido	Amarillo fosforescente	Solución al 10% (v/v)
Span 80	Líquido	Marrón	No iónico Densidad 0.986 g/mL.
Aceite mineral	Líquido	Incoloro	Densidad 0.80g/mL. Punto de ebullición 150°C

Nota: Da = unidad de masa atómica o Dalton = $1.660538921 (73) \times 10^{-27}$ kg

3.2 Preparación de las microesferas de polímeros biodegradables

Para la síntesis de microesferas de polímeros biodegradables; primero se realizó la síntesis de las microesferas sin fármaco, para encontrar las variables óptimas del proceso como temperatura,

cantidad de polímero, velocidad y tiempo de agitación. Al encontrar las condiciones óptimas del proceso, se incorporó el paracetamol en la fase acuosa. Para la realización de la emulsión se utilizó un emulsionador marca IKAT-10 (3000-25000 rpm) y para la evaporación del solvente se utilizó una plancha con agitación magnética marca IKA C-MAG HS 7 (100-1500 rpm). Para la determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de las microesferas se realizaron varios experimentos; para reducir el número de variables se mantuvo constante la cantidad de fase acuosa y fase orgánica, ya que al modificar la cantidad de estas fases se podía invertir la emulsión; las variables que se modificaron en los experimentos de pectina y quitosano, así como la nomenclatura utilizada, se presentan a continuación en las Tablas 3.2 y 3.3 respectivamente; todos los experimentos se realizaron por triplicado para verificar su reproducibilidad; en el caso del quitosano se realizó un menor número de experimentos debido a que ya se tenía la experiencia de la pectina respecto a las variables de la síntesis.

Tabla 3.2. Experimentos realizados con pectina para la preparación de microesferas.

Nombre de la formulación	Cantidad de pectina (g)	Temperatura de evaporación de solvente (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)	Cantidad de glutaraldehído (mL)	Cantidad de span 80 (mL)
PL1	1	60	10000	15	0	0.5
PL2	1	70	10000	15	0	0.5
PL3	1	80	13500	20	0	0.5
PL4	6	60	10000	15	1	1
PL5	6	70	10000	15	1	1
PL6	6	80	13500	20	1	1
PL7	3	60	10000	15	0	0.5
PL8	3	80	13500	15	0	0.5
PL9	3	80	13500	20	3	0.5
PL10	1.5	60	10000	15	3	0.5
PL11	1.5	70	10000	15	3	0.5
PL12	1.5	80	13500	20	3	0.5

* PL= pectina libre de fármaco.

Tabla 3.3. Experimentos realizados con quitosano para la preparación de microesferas.

Nombre de la formulación	Cantidad de quitosano (g)	Temperatura de evaporación de solvente (°C)	Tiempo de agitación (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Cantidad de glutaraldehído (mL)	Cantidad de span 80 (mL)
QL1	3	80	20	10000	3	0.5
QL2	1	80	20	10000	3	0.5
QL3	3	60	20	10000	3	0.5

* QL= quitosano libre de fármaco.

En base a las mejores condiciones determinadas experimentalmente, se utilizaron las siguientes composiciones que se muestran en las Tablas 3.4 y 3.5 para la síntesis de microesferas de pectina y quitosano con carga de fármaco.

Tabla 3.4. Experimentos realizados con pectina y paracetamol para la síntesis de microesferas.

Nombre de la formulación	Cantidad de pectina (g)	Cantidad de fármaco (g)	Relación polímero : fármaco	Temperatura de evaporación del solvente (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
P1	1.5	0.2	7.5:1	80	13500	20
P2	1.5	0.3	5:1	80	13500	20
P3	1.5	0.4	3.75:1	80	13500	20
P4	1.5	0.5	3:1	80	13500	20

* P = Microesferas de pectina

Tabla 3.5. Experimentos realizados con quitosano y paracetamol para la síntesis de microesferas.

Nombre de la formulación	Cantidad de quitosano (g)	Cantidad de fármaco (g)	Relación polímero : fármaco	Temperatura de evaporación del solvente (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
Q1	1.0	0.2	5:1	80	10000	20
Q2	1.0	0.3	3.3:1	80	10000	20
Q3	1.0	0.4	2.5:1	80	10000	20
Q4	1.0	0.5	2:1	80	10000	20

* Q=Microesferas de quitosano

3.2.1 Síntesis de microesferas de pectina y quitosano

Las microesferas de pectina y quitosano se sintetizaron por el método de emulsión agua/aceite (W/O), utilizando como agente estabilizante glutaraldehído y como emulsificador span 80 (HLB = balance hidrofílico-lipofílico = 4.3). El quitosano solo presenta solubilidad a pH bajos, para esto se preparó una solución acuosa de ácido acético al 5%. La emulsión se llevó a cabo a temperatura ambiente y la evaporación del solvente se llevó a cabo a 80°C. Se describe a continuación más detalladamente la síntesis, en el Figura 3.1 se muestra el proceso de las microesferas de pectina y en la Figura 3.2 se muestra el desarrollo para las microesferas de quitosano:

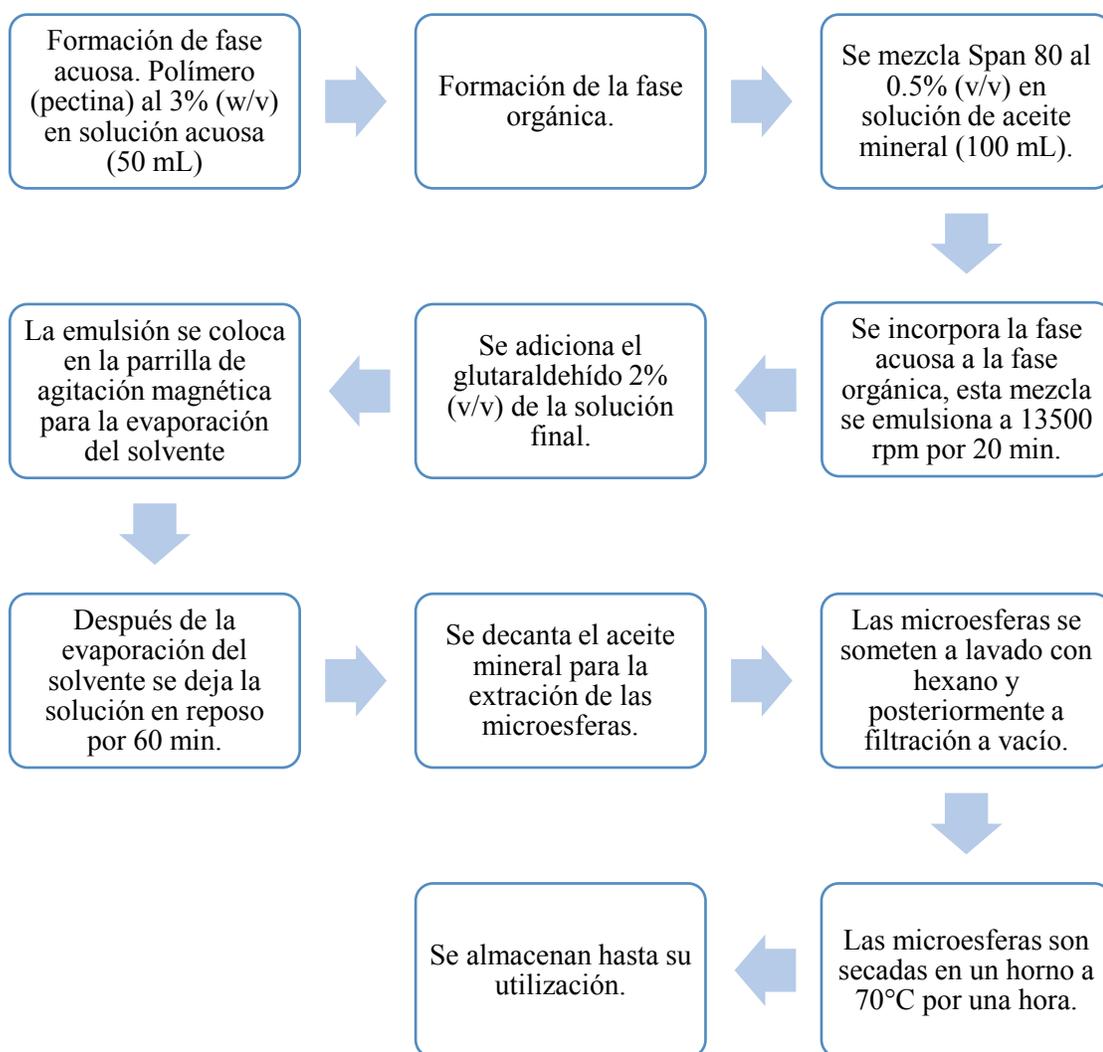


Figura 3.1. Síntesis para la preparación de microesferas de pectina.

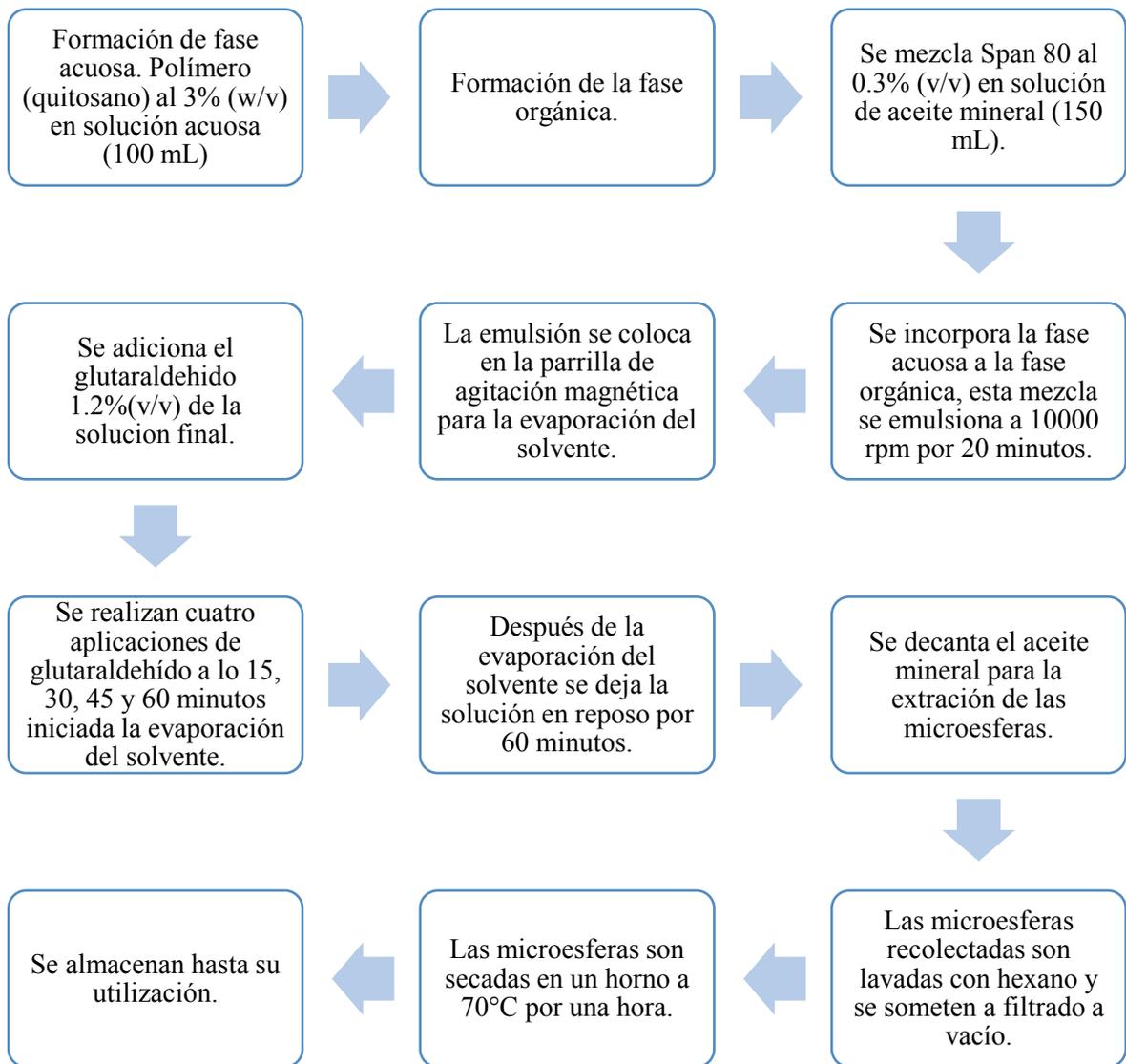


Figura 3.2. Síntesis para la preparación de microsferas de quitosano.

3.3 Caracterización

3.3.1 Difracción de rayos X (DRX)

Se realizaron mediciones de difracción de rayos X explorativas para la pectina, quitosano, paracetamol y microesferas de ambos polímeros con y sin carga de fármaco utilizando el método de polvos con una configuración 2θ , voltaje de aceleración de 40 KV y una intensidad de corriente de 40 mA; se utilizó filtro $K\alpha$ radiación de Cu, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$. El análisis se realizó en el difractómetro D8 ADVANCE Bruker como el que se muestra en la Figura 3.3; el rango de barrido fue de 5 a 120° , con un tiempo de 2 s por paso y pasos de 0.02° . Las fases presentes que se detectaron en el análisis se identificaron por medio de las tarjetas JCPDS reportadas por el software del equipo. Esta técnica de caracterización utiliza un haz de rayos X que interactúa con la materia; el haz al entrar en contacto con la materia se dispersa en varias direcciones debido a la simetría y agrupación de los átomos, dando lugar a un patrón de rayos X debido a la interferencia resultante, el cual puede interpretarse según la ubicación de los átomos, aplicando la ley de Bragg.



Figura 3.3. Difractómetro D8 ADVANCE Bruker.

3.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el estudio morfológico de la pectina, quitosano, paracetamol y microesferas de ambos polímeros con y sin carga de fármaco, se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JEOL JSM-7600F) como el que se muestra en la Figura 3.4, a un voltaje de 5 a 15 kV. Como los

polvos no son conductores, se metalizaron con cobre (Cu) para su análisis. Esta técnica consiste en enfocar un haz de electrones fino sobre una muestra, ésta es barrida por el haz como si fueran pinceladas y da como resultado electrones secundarios debido a la incidencia, estos electrones son recolectados por un detector que lo transforma en imágenes.



Figura 3.4. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JEOL JSM-7600F).

3.3.3 Determinación y distribución de tamaño de partícula

Para la determinación y distribución de tamaño de partícula las microesferas de pectina y quitosano con y sin paracetamol, fueron fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JEOL JSM-7600F) a un voltaje de 5 a 15 kV; se tomaron 15 fotografías, de estas fotografías se determinó el tamaño promedio de partícula y la distribución de tamaño de partícula, utilizando el software *ImageJ* y haciendo uso de la estadística.

3.3.4 Espectrometría infrarroja (FT-IR)

En la técnica de infrarrojo los fotones de radiación infrarroja son absorbidos por los enlaces de una molécula pasando a niveles vibracionales superiores cada tipo de enlace absorbe radiación infrarroja a una frecuencia distinta, lo que permite obtener un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de sustancias orgánicas e inorgánicas y por lo tanto su identificación.

El análisis de infrarrojo se llevó a cabo para determinar los principales grupos funcionales presentes en los precursores (pectina, quitosano y paracetamol) y en las microesferas con y sin carga de

fármaco. El análisis se realizó en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier modelo Tensor27 Bruker, como el que su muestra en la Figura 3.5. Para la preparación de la muestra a analizar se mezcló bromuro de potasio con la muestra problema; posteriormente se compacto cada muestra para la formación de una pastilla la cual fue analizada. Las bandas presentes en los espectros se compararon con las existentes en la literatura.



Figura 3.5. Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Tensor 27 Bruker.

3.3.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido, es una técnica termoanalítica, donde la diferencia de calor entre una muestra referencia y una muestra problema es medida en función de la temperatura. Por ello, ambas muestras se mantienen casi a la misma temperatura durante todo el experimento. Ésta técnica permite determinar temperaturas de transformación y la entalpía de sólidos y líquidos.

Se utilizó un analizador térmico simultáneo (DSC/TG) STA Q600 TA Instruments como el que se muestra en la Figura 3.6, para la determinación de las temperaturas de transición vítrea, de fase y de fusión en los precursores (pectina, quitosano y paracetamol) y en las microesferas con carga de fármaco. Para todos los análisis se utilizó un crisol de alúmina, además el proceso se llevó bajo atmósfera controlada de Ar. En la Tabla 3.6 se observa las variables que se utilizaron para la realización de los termogramas:



Figura 3.6. Analizador térmico simultáneo (DSC/TG) STA Q600 TA Instruments.

Tabla 3.6. Variables para la realización de los estudios DSC.

Muestra	Masa analizada (mg)	Temperatura de inicio (°C)	Temperatura final (°C)	Velocidad de calentamiento (°C/min)
Pectina pura	25.8020	25	300	10
Quitosano puro	23.0870	25	250	10
Paracetamol	23.8880	25	250	5
MPP ⁽¹⁾	38.9300	25	200	10
MQP ⁽²⁾	22.4210	25	250	10

Nota: ⁽¹⁾ MPP= Microesferas de pectina con carga de paracetamol; ⁽²⁾ Microesferas de quitosano con carga de paracetamol.

3.3.6 Eficiencia de encapsulación

Para la determinación de la eficiencia de encapsulación se utilizó un espectrómetro UV-Vis lambda 25 marca PerkinElmer como el que se muestra en la Figura 3.7. Para la calibración del espectrómetro UV-Vis, se preparó una disolución patrón de hidróxido de sodio (NaOH) 0.175 mM (pH=8); a partir de esta disolución, se prepararon 5 disoluciones de paracetamol de concentración conocida (2.5, 5, 10, 20 y 30 ppm), las disoluciones se guardaron en viales de polipropileno de 15 mL hasta su uso.

Para la preparación de las disoluciones de las microesferas de pectina con carga de fármaco, se tomó 0.1 g de microesferas, se diluyeron en 50 mL de la disolución de NaOH. Las disoluciones de

microesferas de pectina, se sometieron a agitación magnética por 60 min a una velocidad de 480 rpm para liberar el paracetamol de las microesferas. Posteriormente las disoluciones se filtraron a vacío dos veces para asegurar la separación del polímero de las disoluciones y así evitar su interferencia en la medición del espectro de absorción; en la primera filtración se utilizó papel filtro whatman número 42, el cual retiene partículas $\geq 2.5 \mu\text{m}$; en la segunda filtración se utilizó papel filtro millipore, el cual retiene partículas $\geq 0.45 \mu\text{m}$. Las disoluciones resultantes se colocaron en viales de polipropileno de 100 mL hasta su utilización.

Para la preparación de las disoluciones de las microesferas de quitosano con carga de fármaco, se tomó 0.05 g de microesferas, se diluyeron en 50 mL de la disolución de NaOH. Las disoluciones de microesferas de quitosano, se sometieron a agitación magnética por 48 h a una velocidad de 480 rpm para liberar el paracetamol de las microesferas. El proceso de filtrado fue el mismo que para las microesferas de pectina.



Figura 3.7. Espectrómetro UV-Vis lambda 25 marca Perkin-Elmer.

Para este análisis, se midió el espectro de absorción de las disoluciones patrón de paracetamol desde 190 a 1100 nm y se localizó su máximo de absorción. Esto proporcionó una recta de calibración. Para el análisis de las muestras problema se realizó el mismo procedimiento. Con la ecuación de la línea recta proporcionada por la curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de paracetamol en las muestras problema. Para la determinación de la eficiencia de encapsulación se utilizó la Ec. (3.1).

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{masa de fármaco encapsulado en las microesferas}}{\text{masa real del fármaco}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.7 Liberación del fármaco de las microesferas cargadas

Para las pruebas de liberación de fármaco se prepararon 18 diferentes muestras, cada una contenía 0.1 g de microesferas (pectina o quitosano) cargadas con fármaco en 50 mL de solución PBS (buffer fosfato salino) pH= 7.2-7.4, las muestras se incubaron a 37 ± 2 °C con agitación constante de 100 rpm. Para la determinación de la concentración se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Las alícuotas fueron analizadas por UV-Vis para la medición de la absorbancia y así determinar la concentración del fármaco a un tiempo determinado por medio de una curva de calibración.

3.3.8 Pérdida de humedad

Para la determinación de la pérdida de humedad; después del filtrado a vacío, las microesferas fueron pesadas, este peso se registró, y las microesferas fueron colocadas en un horno por 1 h a 70°C, pasado este tiempo las microesferas fueron puestas en un desecador por 48 h a temperatura ambiente, el peso final se determinó cuando ya no hubo variación de peso de la muestra. La pérdida de humedad se calculó utilizando la Ec. (3.2).

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.9 Porcentaje de rendimiento

El rendimiento se obtuvo utilizando la Ec. (3.3) para las microesferas de pectina y para las microesferas de quitosano se utilizó la Ec. (3.4), [40]. El porcentaje de rendimiento se realizó para cada lote.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{masa recuperada}}{\text{masa real}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso de las microesferas producidas}}{\text{peso del agente entrecruzante} + \text{peso de quitosano}} \quad (3.4)$$

3.3.10 Potencial Z

Se determinó el potencial Z del paracetamol y de las microesferas poliméricas con y sin carga de fármaco para determinar la carga electrostática de las partículas, utilizando el equipo Zeta-meter 3.0+ (Fig. 3.8). Se prepararon alícuotas de cada muestra problema a 10 ppm en solución PBS y se utilizó un voltaje de 40 milivolts (mV).

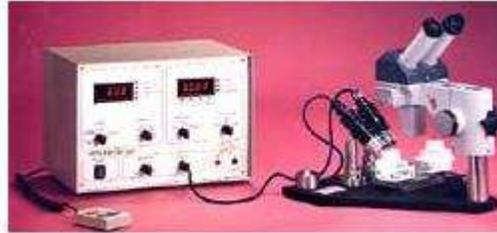


Figura 3.8. Sistema Zeta-meter 3.0+.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección se describen los resultados obtenidos de la caracterización estructural tanto de los materiales precursores (pectina, quitosano y paracetamol), como de las microesferas poliméricas con y sin carga de fármaco, mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), espectrometría infrarroja (FT-IR), determinación y distribución de tamaño de partícula, potencial Z y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se evaluaron propiedades como la eficiencia de encapsulación, cinética de liberación de fármaco, pérdida de humedad y el porcentaje de rendimiento de las microesferas poliméricas.

4.1 Determinación de las variables para la síntesis de microesferas de pectina y quitosano

Como se expuso en el apartado 3.2 del desarrollo experimental se realizaron varios experimentos para encontrar las variables adecuadas para la síntesis de microesferas, los resultados obtenidos para la pectina se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resultados de los experimentos realizados con pectina.

Nombre de la formulación	Cantidad de pectina (g)	Temperatura de evaporación de solvente (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)	Resultado obtenido
PL1	1	60	10000	15	Formación de un gel.
PL2	1	70	10000	15	Microesferas
PL3	1	80	13500	20	Microesferas
PL4	6	60	10000	15	Formación de un gel.
PL5	6	70	10000	15	Formación de un gel.
PL6	6	80	13500	20	Formación de un gel.
PL7	3	60	10000	15	Formación de un gel.
PL8	3	80	13500	15	Microesferas

PL9	3	80	13500	20	Microesferas
PL10	1.5	60	10000	15	Formación de un gel.
PL11	1.5	70	10000	15	Microesferas
PL12	1.5	80	13500	20	Microesferas

En el caso de las formulaciones PL1, PL4, PL7 y PL10 el resultado fue la formación de un gel, debido a que la temperatura no fue la adecuada para la evaporación del solvente. Al ser la temperatura demasiado baja, la evaporación del solvente es demasiado lenta, propiciando la formación de un gel, el cual al ser lavado y secado se obtuvo una masa rígida sin forma, de color beige, la cual no puede ser rehidratada (Figura 4.1).

Para las formulaciones PL5 y PL6 también hubo formación de un gel debido al exceso de pectina que se utilizó, al no aumentar la fase acuosa y la fase orgánica la formación de un gel fue más rápida, en aproximadamente dos horas de iniciada la evaporación del solvente ya se apreciaba el gel debido a un incremento en la viscosidad de la solución. En el caso de las formulaciones PL2 y PL3, se obtuvieron polvos finos de color marrón y sin aglomerados a simple vista, en las micrografías de las Figuras 4.2 y 4.3 se observa la formación de agregados para estas formulaciones, también se observó que las partículas agregadas son semi-esféricas. PL8 y PL9 son formulaciones similares, pero la formulación PL8 no contenía glutaraldehído, los resultados de estas formulaciones fueron polvos finos de color beige sin aglomerados visuales. La diferencia entre estas dos formulaciones se observó en el microscopio, ya que las partículas de la formulación que no contenía glutaraldehído (Fig.4.4), son más grandes, de superficie rugosa e irregular, presentan algunos agregados y su forma es semi-esférica. Para la formulación que contenía glutaraldehído (Fig. 4.5), se observaron partículas más pequeñas y más esféricas, la superficie de algunas microesferas fue rugosa, pero esto es debido a la deshidratación que sufren cuando se les retira la humedad.

Por último, las formulaciones PL11 y PL12 fueron una réplica a escala de la formulación PL9; para estas dos formulaciones se observaron las mismas características que para la formulación PL9. Se pudo observar que para la evaporación del solvente la temperatura adecuada es a 80°C, con 70°C también se obtuvieron buenos resultados pero el tiempo de evaporación del solvente se extiende y las características finales de las microesferas son muy similares a cuando se evapora el solvente a

80°C. Para la realización de la síntesis de microesferas de pectina con paracetamol, se utilizó la formulación PL12 por las buenas características que se obtuvieron en las microesferas, además como el proceso fue a escala la cantidad de fase orgánica se redujo, por lo tanto se redujo el desecho de aceite mineral.



Figura 4.1. Gel de pectina después del lavado con hexano.

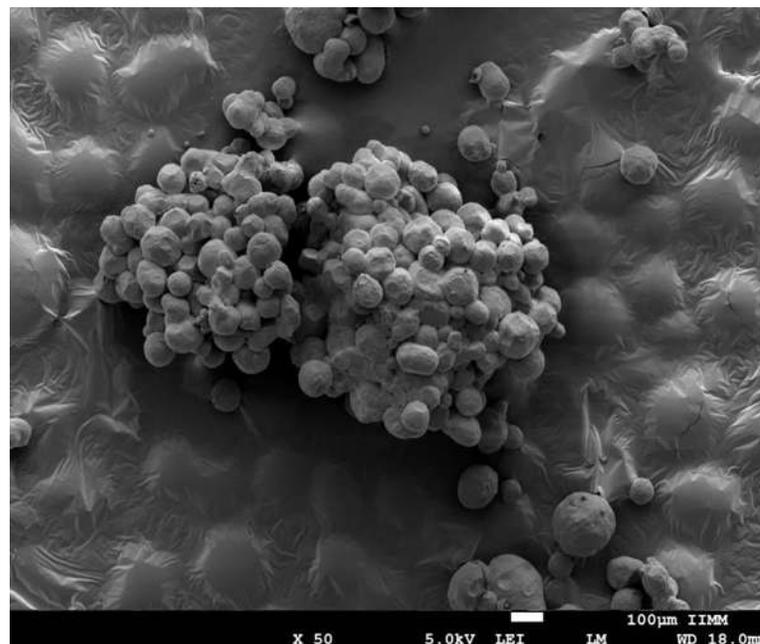


Figura 4.2. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL2 a 50X.

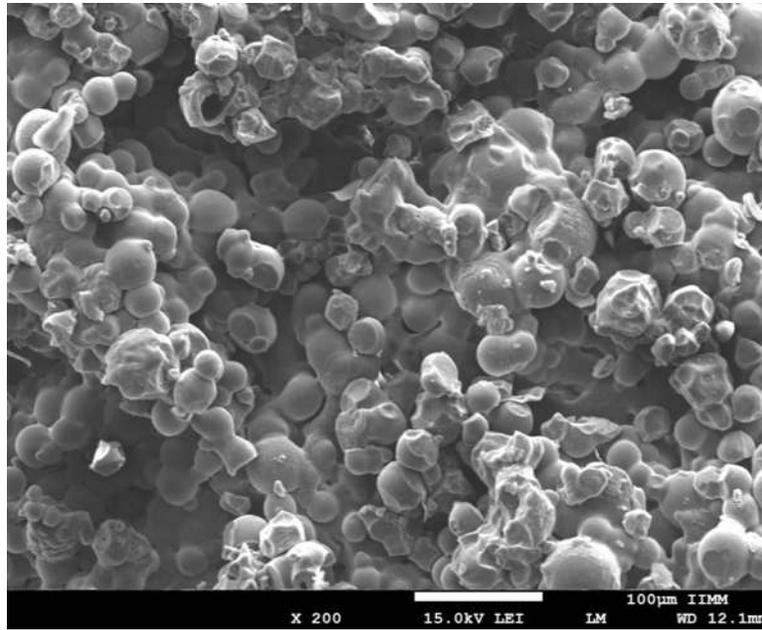


Figura 4.3. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL3 a 200x.

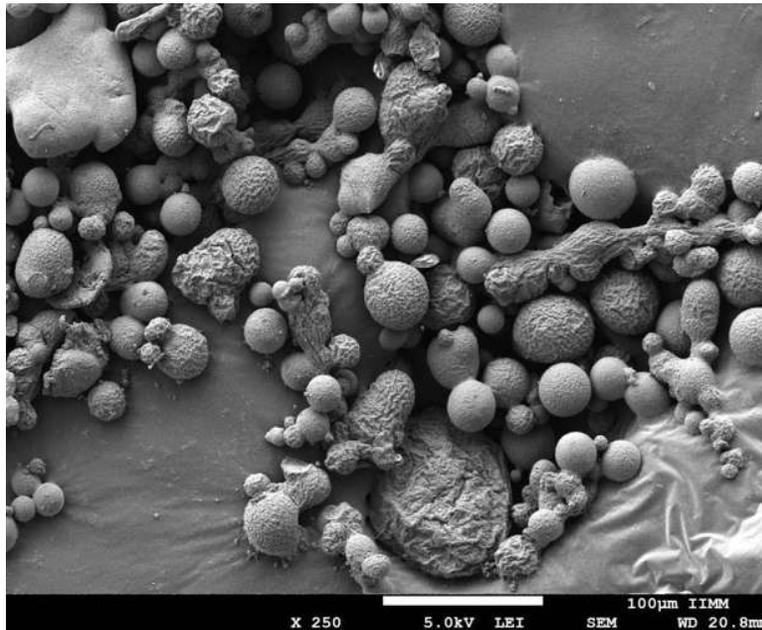


Figura 4.4. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL8 a 250x.

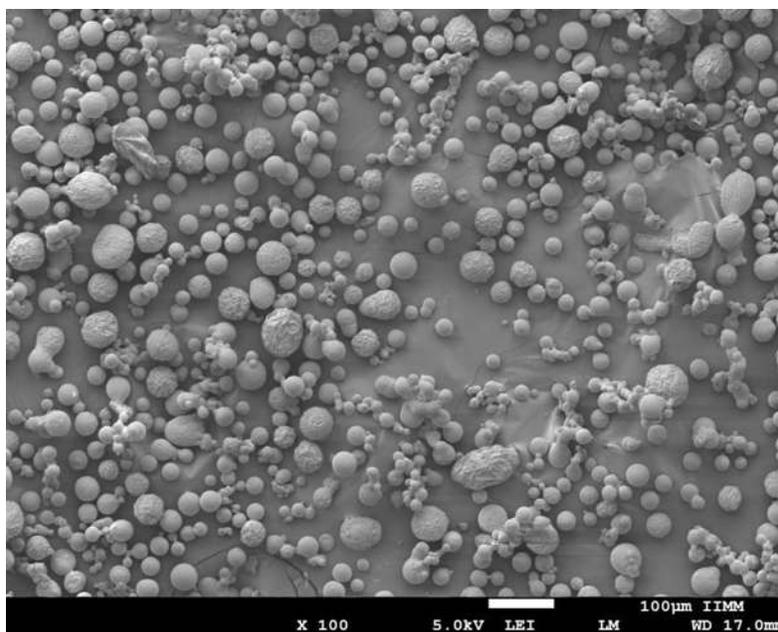


Figura 4. 5. Micrografía de microesferas de pectina formulación PL9 a 100x.

Los resultados de la experimentación realizada con quitosano se muestran en la Tabla 4.2; la primera formulación QL1 presentó buenos resultados para la formación de microesferas, se obtuvieron polvos finos de color café oscuro y no presentaron aglomerados a simple vista; en las micrografías de esta formulación (Figura 4.6), se observó que las microesferas fueron de tamaño pequeño y superficie lisa.

La segunda formulación QL2 solo fue una réplica a escala del primer experimento, para verificar que a escala también se dieran las mismas propiedades en las microesferas de quitosano. Se observaron las mismas propiedades que en la formulación QL1; polvos finos de color café y sin aglomerados a simple vista, en el estudio en el microscopio electrónico de barrido se observaron microesferas de superficie lisa y tamaño pequeño.

Para la formación QL3 el resultado obtenido fue la formación de un gel, debido a que la temperatura no fue la adecuada para la evaporación del solvente. Se decidió realizar la experimentación con la formulación QL2; de igual manera que en la pectina para reducir la fase orgánica y por lo tanto el residuo de aceite mineral.

Tabla 4.2. Resultados de los experimentos realizados con quitosano.

Nombre de la formulación	Cantidad de quitosano (g)	Temperatura de evaporación de solvente (°C)	Tiempo de agitación (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Resultado obtenido
QL1	3	80	20	10000	Microesferas
QL2	1	80	20	10000	Microesferas
QL3	3	60	20	10000	Formación de gel

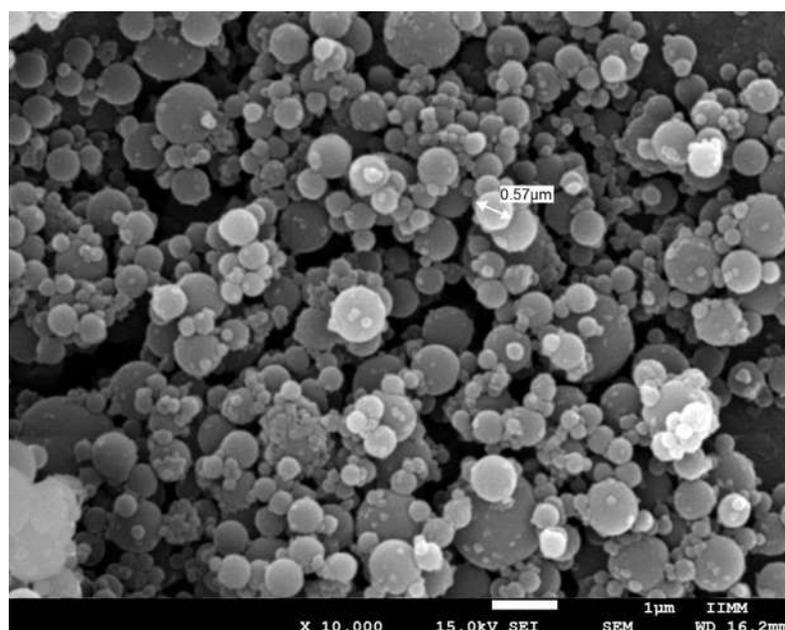


Figura 4.6. Micrografía de microesferas de quitosano formulación QL1 a 10000x.

4.2 Caracterización de materiales precursores y microesferas con y sin carga de fármaco

Es de gran importancia conocer las características de los materiales precursores con los cuales se realizó la síntesis de las microesferas de pectina y quitosano, así mismo las características de las microesferas con carga y sin carga de fármaco. En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de los materiales precursores y de las microesferas con carga y sin carga de paracetamol.

4.2.1 Difracción de rayos X (DRX)

Para conocer si los materiales precursores son amorfos o presentan fases cristalinas se realizaron estudios de difracción de rayos X. En la Figura 4.7 se muestra el espectro de la pectina pura en el cual se puede verificar que la pectina es un material amorfo, presenta dos protuberancias en el ángulo 2θ que comienzan en 10° y terminan en 25° . Este análisis también demostró la baja cristalinidad de la pectina de alta metilación $\geq 74\%$; cuando se tiene una pectina de baja metilación $\leq 50\%$ se obtiene alta cristalinidad por el menor número de ácidos galacturónicos metil esterificados.

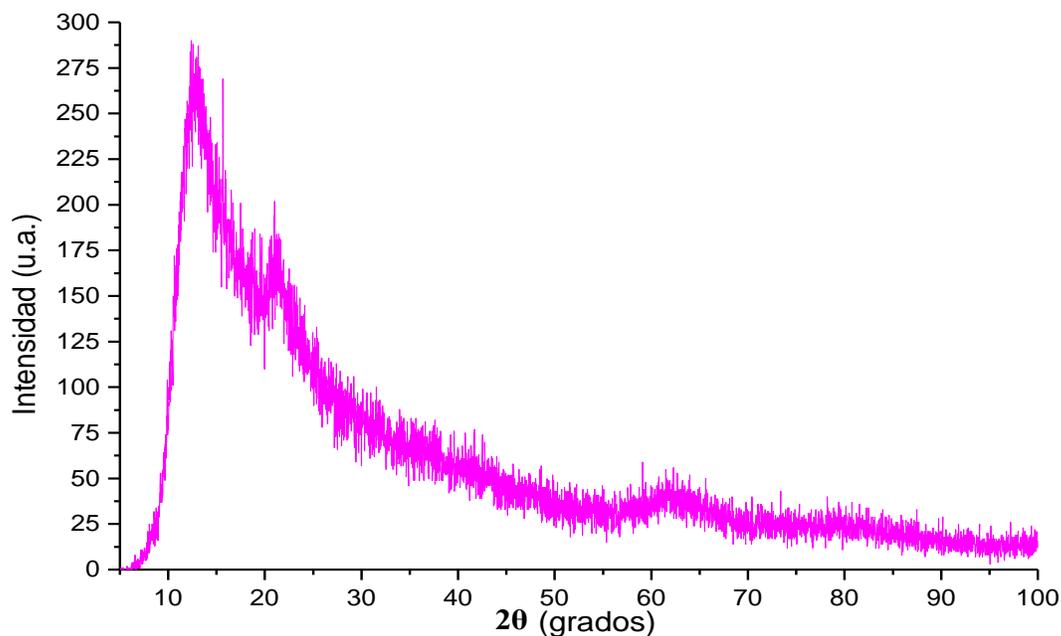


Figura 4.7. DRX de pectina pura de alta metilación $\geq 74\%$.

Carbinatto y col. [41] estudiaron las propiedades físicas de mezclas pectina-almidón reticuladas con trimetafosfato de sodio. Al analizar por difracción de rayos X encontraron una serie de picos bien definidos a 12.7° , 18.42° , 28.22° y 40.14° (2θ), como se muestra en la Figura 4.8, con lo cual se demuestra el comportamiento cristalino de la pectina de baja metilación; siguiendo con el estudio encontraron que la mezclas de pectina-almidón reticuladas en medio básico, disminuyen la cristalinidad de la pectina. Estos investigadores atribuyen este comportamiento a que el tratamiento alcalino promueve una reorganización estructural, resultando en un deterioro del grado de cristalinidad.

Otro ejemplo claro de que la pectina no siempre se presenta amorfa es el que presentan Mishra y col. [42], éstos investigadores desarrollaron membranas de hidrogel de una mezcla de pectina y polivinilpirrolidona (PVP) para la entrega de drogas; al caracterizar la pectina por difracción de rayos X, observaron que la pectina pura muestra picos en 9° , 12.70° , 18.42° , 28.22° y 40.14° (2θ) como se indica en la Figura 4.9, lo cual indica claramente el comportamiento cristalino de la pectina. El grado de cristalinidad de esta muestra fue de 42.89%.

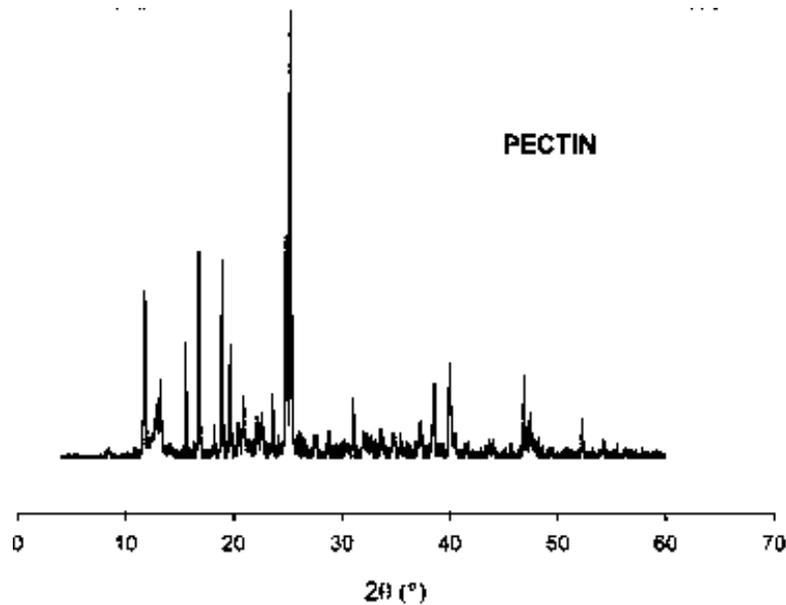


Figura 4.8. DRX de pectina pura en su forma cristalina [41].

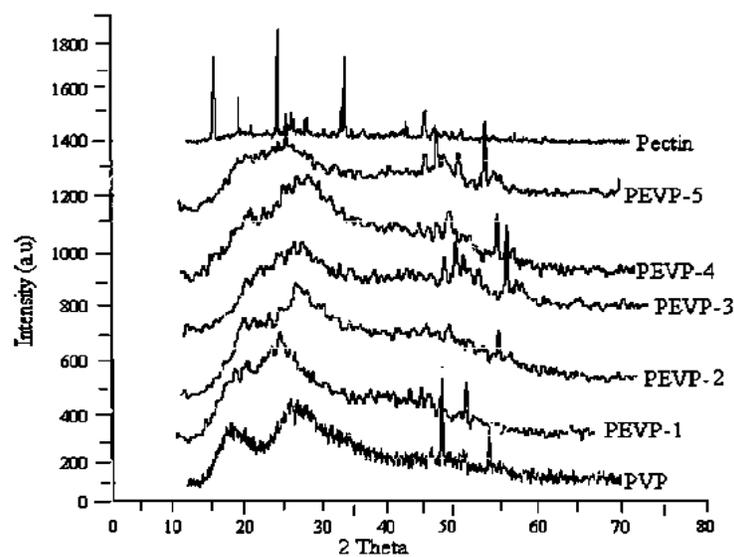


Figura 4.9. Patrón de DRX de pectina, y membranas de pectina/PVP [42].

En el caso de quitosano se observaron dos semi-picos en 14.5° y 20° (2θ), como se muestra en el espectro de la Figura 4.10; lo que indica que el quitosano es un polímero semicristalino, de acuerdo con la literatura el quitosano muestra una celda unitaria ortorrómbica. Esta cristalinidad se debe a la regularidad del empaquetamiento de sus cadenas, por el alto grado de desacetilación $\geq 75\%$. La mayoría de los investigadores reportan este comportamiento semicristalino por ejemplo Vongchan y col.[43] encontraron un patrón de difracción de rayos X, muy parecido al encontrado en este trabajo, encontraron semi-picos en 11.1° y 19.9° (2θ) como se muestra en la Figura 4.11. El movimiento del primer pico se debe al mayor grado de desacetilación, estos investigadores utilizaron quitosano con un grado de desacetilación de 89%.

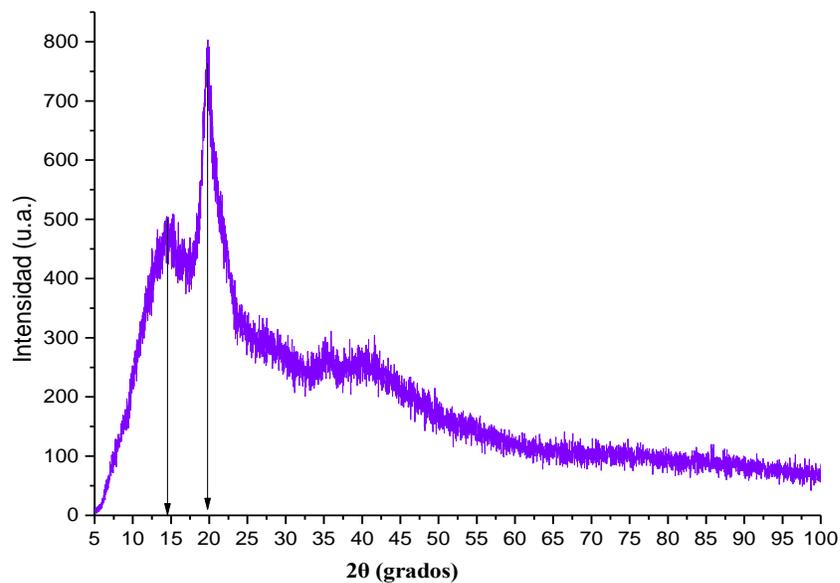


Figura 4.10. DRX de quitosano puro de alta desacetilación $\geq 75\%$.

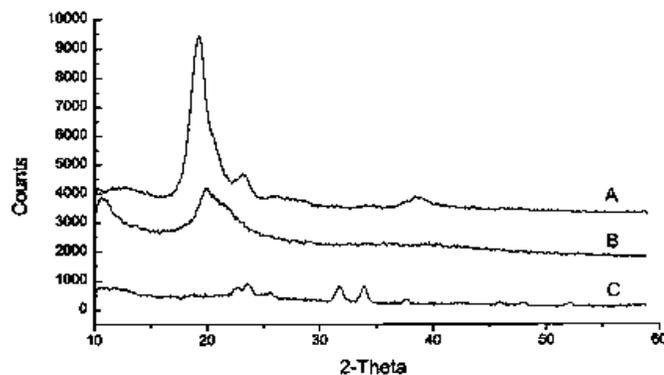


Figura 4.11. DRX de derivados de esqueletos de cangrejos: (A) quitina, (B) quitosano, (c) polisulfato de quitosano [43].

El último precursor, el paracetamol muestra un patrón de difracción de rayos X bien definido como se observa en la Figura 4.12. Éste presenta una estructura monoclinica, este tipo de estructura es típica del paracetamol comercial. Para la indexación se tomó de referencia la tarjeta patrón COD 2300230, proporcionada por el software del difractómetro D8 ADVANCE. Se realizó una comparación del espectro de difracción obtenido con el logrado por Nichols y col. [44] (Fig. 4.13). Para esta comparación solo se utilizaron las primeras 30 reflexiones con mayor intensidad, ya que estos autores mencionan que la huella dactilar del paracetamol esta representada por éstas de mayor intensidad. En la Tabla 4.3 se muestra esta comparación. Se realizaron comparaciones respecto a las distancias interplanares ($d(\text{Å})$) (Angstroms), planos (hkl) y los ángulos en 2θ . Se observó que los espectros de rayos X son muy parecidos; respecto a la Tabla 4.3, se observa que las distancias interplanares y los ángulos en 2θ son muy parecidos, donde se encuentra un poco de diferencia es en los planos (hkl), esta diferencia se da porque estos investigadores solo analizan un cristal de paracetamol y la orientación del haz está bien definida en un sola orientación del cristal.

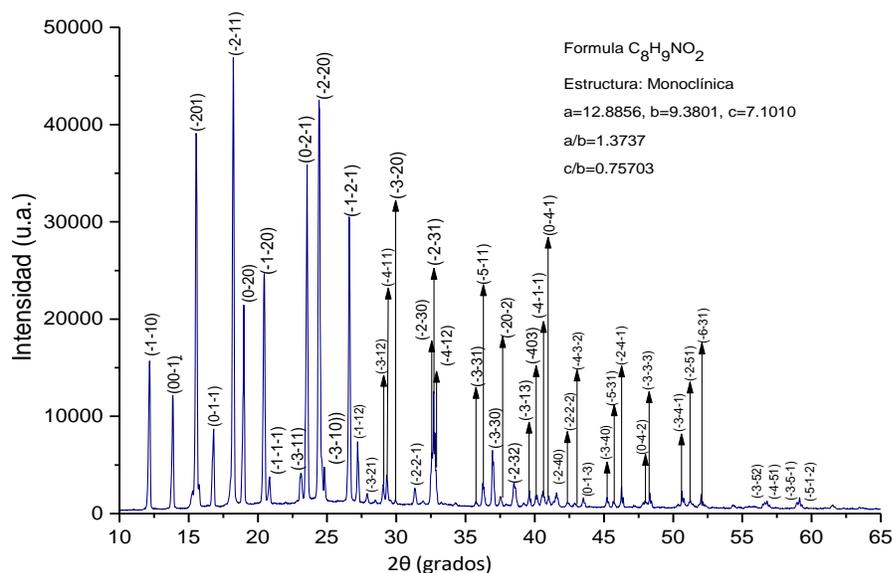


Figura 4.12. DRX de paracetamol puro $\geq 99\%$.

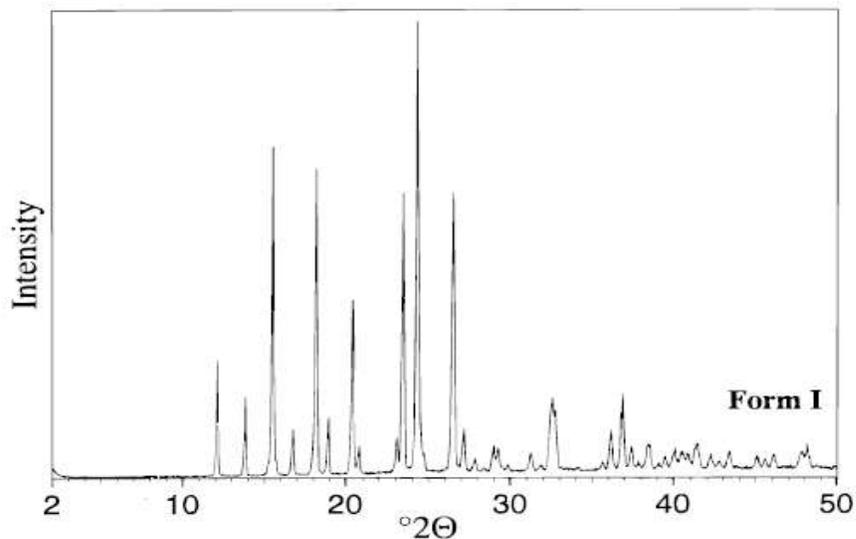


Figura 4.13. Patrón de difracción de rayos X para paracetamol monoclinico [44].

Tabla 4.3. Comparación de parámetros de paracetamol puro $\geq 99\%$ y paracetamol de referencia [44]

Paracetamol Pureza $\geq 99\%$			Paracetamol referencia [44]		
<i>d</i> (Å)	<i>hkl</i>	<i>2θ</i>	<i>d</i> (Å)	<i>hkl</i>	<i>2θ</i>
7.296	$\bar{1}\bar{1}0$	12.120	7.301	001	12.112
6.398	00 $\bar{1}$	13.829	6.398	10 $\bar{1}$	13.830
5.805	$\bar{2}00$	15.250	5.809	002	15.240
5.702	$\bar{2}01$	15.526	5.709	101	15.508
5.631	$\bar{1}\bar{1}1$	15.724	5.640	110	15.700
5.285	0 $\bar{1}\bar{1}$	16.759	5.294	11 $\bar{1}$	16.732
4.936	$\bar{2}\bar{1}0$	17.954	4.877	111	18.175
4.690	0 $\bar{2}0$	18.906	4.690	020	18.905
4.348	$\bar{1}\bar{2}0$	20.406	4.355	021	20.376
4.268	$\bar{1}\bar{1}1$	20.793	4.276	11 $\bar{2}$	20.756
3.903	$\bar{1}\bar{2}1$	22.763	3.849	112	23.087
3.848	$\bar{3}\bar{1}1$	23.094	3.785	12 $\bar{1}$	23.483
3.648	$\bar{2}\bar{2}0$	24.378	3.650	022	24.367
3.593	$\bar{2}0\bar{1}$	24.757	3.596	10 $\bar{3}$	24.741
3.355	$\bar{2}\bar{1}1$	26.568	3.355	12 $\bar{2}$	26.545
3.276	$\bar{1}\bar{1}2$	27.193	3.280	21 $\bar{1}$	27.165
3.199	00 $\bar{2}$	27.864	3.201	20 $\bar{2}$	27.847

3.136	$\bar{3}\bar{2}1$	28.430	3.140	122	28.403
3.074	$\bar{3}\bar{1}2$	29.018	3.075	211	29.012
3.046	$\bar{4}\bar{1}1$	29.296	3.048	113	29.887
2.985	$\bar{3}\bar{2}0$	29.909	2.987	$02\bar{3}$	31.273
2.852	$\bar{2}\bar{2}\bar{1}$	31.335	2.858	221	31.877
2.809	$0\bar{3}\bar{1}$	31.829	2.805	$032/131$	32.575
2.752	$\bar{2}\bar{3}0$	32.499	2.747	$13\bar{2}$	34.173
2.618	$\bar{1}\bar{3}\bar{1}$	34.211	2.622	132	35.706
2.512	$\bar{3}\bar{3}\bar{1}$	35.712	2.513	114	36.195
2.477	$\bar{5}\bar{1}\bar{1}$	36.223	2.480	033	36.094
2.432	$\bar{3}\bar{3}0$	36.928	2.434	204	37.466
2.397	$\bar{2}0\bar{2}$	37.477	2.398	213	37.896

La técnica de difracción de rayos X para las microesferas de pectina con y sin carga de paracetamol (Fig. 4.14), reveló que la pectina continuó con su comportamiento amorfo después de la síntesis para la formación de las microesferas, tal como se muestra en el espectro de color rojo; el espectro de color negro corresponde a la pectina pura, se colocó solo como referencia.

Por otra parte, el espectro de difracción de rayos X para las microesferas de pectina con paracetamol de color rosa, reveló que continuó el comportamiento amorfo de la pectina, pero hicieron presencia 9 picos correspondientes al fármaco, estos picos de difracción son de los primeros picos de mayor intensidad en el espectro del fármaco, en este caso se presentó con menor intensidad debido a la presencia de la pectina, en la Tabla 4.4 se presentan las características de estos picos y se comparan con los picos del paracetamol encontrados anteriormente; la presencia de estos picos fue debido al paracetamol que recubre las microesferas de pectina.

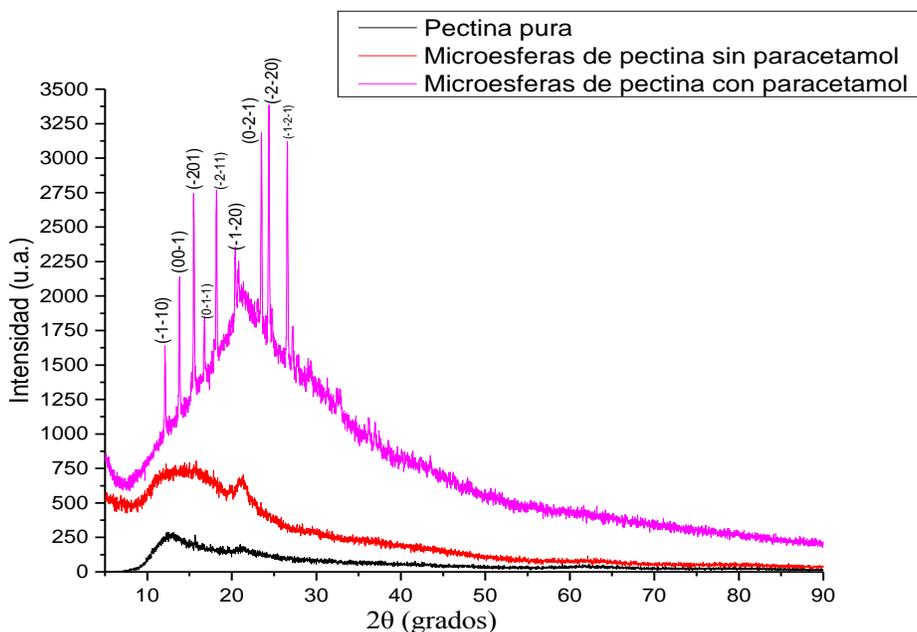


Figura 4.14. Espectro de difracción de rayos X para las microesferas de pectina con y sin paracetamol.

Tabla 4.4. Comparación de los ángulos 2θ encontrado en el espectro de las microesferas de pectina con paracetamol y el espectro de paracetamol puro.

Ángulo 2θ encontrado en el espectro de las microesferas de pectina con paracetamol	Ángulo 2θ del patrón de difracción de rayos X	Planos (hkl)
12.120	12.120	($\bar{1}10$)
13.904	13.829	($00\bar{1}$)
15.566	15.526	($\bar{2}0\bar{1}$)
16.759	16.759	($0\bar{1}\bar{1}$)
18.100	18.190	($\bar{2}\bar{1}1$)
20.379	20.406	($\bar{1}\bar{2}0$)
23.400	23.500	($0\bar{2}\bar{1}$)
24.354	24.378	($\bar{2}\bar{2}0$)
26.600	26.542	($\bar{1}2\bar{1}$)

El espectro de difracción de rayos X para las microesferas de quitosano con y sin paracetamol (Fig. 4.15) muestra que el quitosano continuó con su comportamiento amorfo después de la síntesis. En color rojo se representa el espectro de difracción de rayos X de las microesferas de quitosano sin fármaco y se observó que desaparece la protuberancia más sobresaliente que se encontró en el

espectro de quitosano puro a 20° (2θ), el espectro de difracción de rayos X del quitosano puro se encuentra representado por el espectro de color negro para su comparación. Por lo tanto la síntesis para la producción de las microesferas no afectó al quitosano.

En color azul se muestra el espectro de difracción de rayos X de las microesferas de quitosano con paracetamol y se observó que también continúa con el comportamiento amorfo después de la síntesis, pero en este caso solo se presentó una protuberancia a 20.5° (2θ), esta protuberancia se presentó con más intensidad debido a la presencia del fármaco, pero a diferencia de las microesferas de pectina en el espectro de las microesferas de quitosano no se difractó ningún pico del paracetamol de manera paralela con el espectro del quitosano, esto debido a que la cantidad de fármaco en la superficie de las microesferas es casi nula.

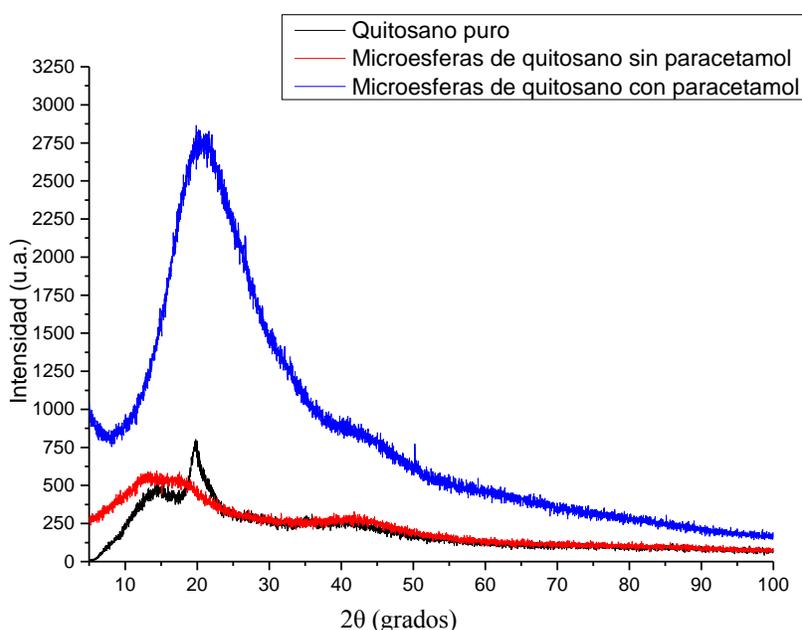


Figura 4.15. Espectro de difracción de rayos X para las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.

4.2.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para conocer la morfología de los precursores se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido; en el caso de la pectina pura que se muestra en la Figura 4.16 (a), se observó que está constituida por partículas irregulares alargadas, con un amplio rango de tamaño de partícula, su

superficie no es totalmente lisa, ya que muestra zonas donde la superficie es rugosa. En el caso del quitosano puro que se muestra en la Figura 4.16 (b), presentó partículas en forma de hojuelas alargadas, de superficie lisa e irregular y de diversos tamaños. En el paracetamol puro que se muestra en la Figura 4.17 se observaron partículas grandes e irregulares, semi-planas y de superficie lisa con pequeñas incrustaciones de pequeñas partículas del mismo fármaco.

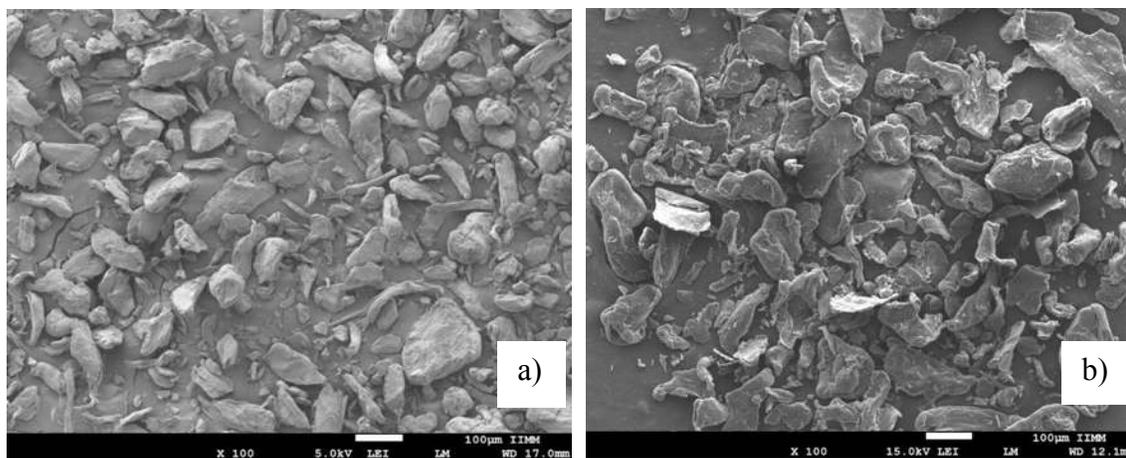


Figura 4.16. Micrografía de (a) pectina pura 100X y (b) de quitosano puro 100X.

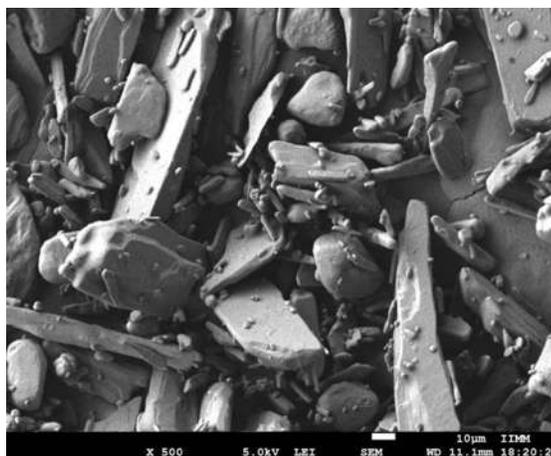


Figura 4.17. Micrografía de paracetamol puro 500X.

En la Figura 4.18 se observan varias micrografías de microesferas de pectina sin carga de paracetamol, en la micrografía (a) se muestra una vista general de las microesferas de pectina sin carga de fármaco, donde se observó el tamaño; en la micrografía (b) se presenta un acercamiento

de las microesferas de pectina donde se observó la superficie y la forma; en la micrografía (c) se observó que las microesferas presentaron forma esférica y superficies rugosas con formación de estrías, este tipo de estrías se presentan debido a la pérdida de humedad y a la temperatura a la cual fueron expuestas para la metalización la cual se realiza para que éstas puedan ser vistas en el microscopio electrónico de barrido ya que no son conductoras; en la micrografía (d) se muestra una microesfera de pectina con forma esférica en la cual no se observó presencia de poros en la superficie. En la Figura 4.19, se presentan dos micrografías donde se observa que las microesferas de pectina presentaron porosidad en su interior, en la micrografía (a) se muestran los poros de una microesfera cortada por la mitad, y en la (b) se presenta una fracción de una microesfera de pectina, el tamaño de los poros es de aproximadamente de 2 a 3 μm , por lo tanto son poros de tamaño medio comparado con el tamaño de las microesferas. Este tamaño de poro, asegura una mayor eficiencia de encapsulación.

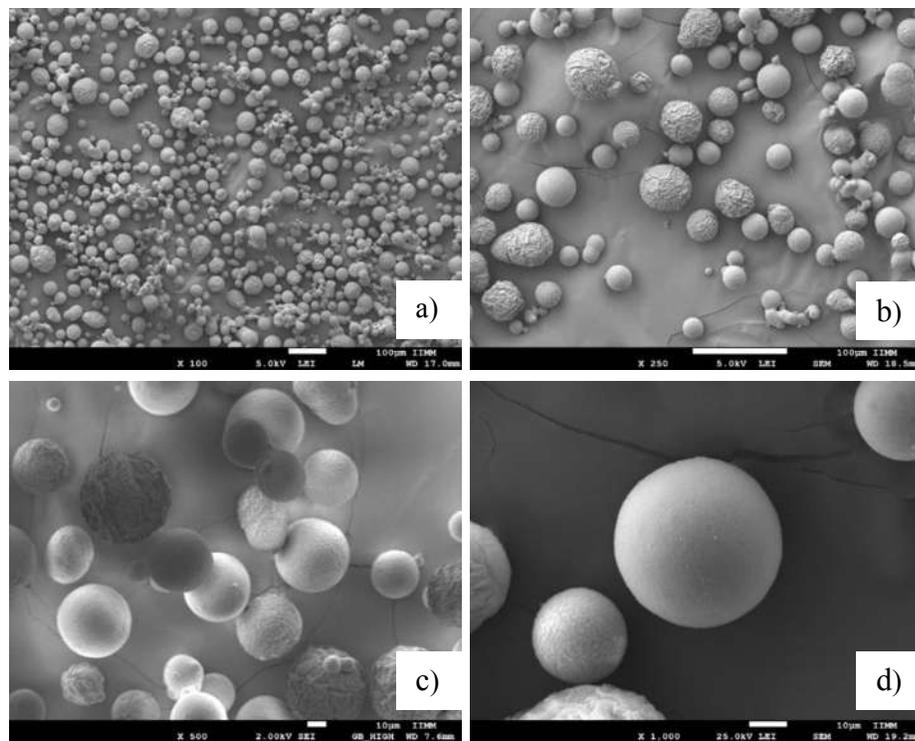


Figura 4.18. Micrografías de microesferas de pectina sin carga de paracetamol (a) 100x, (b)250x, (c)500x y (d)1000x, formulación PL12 .

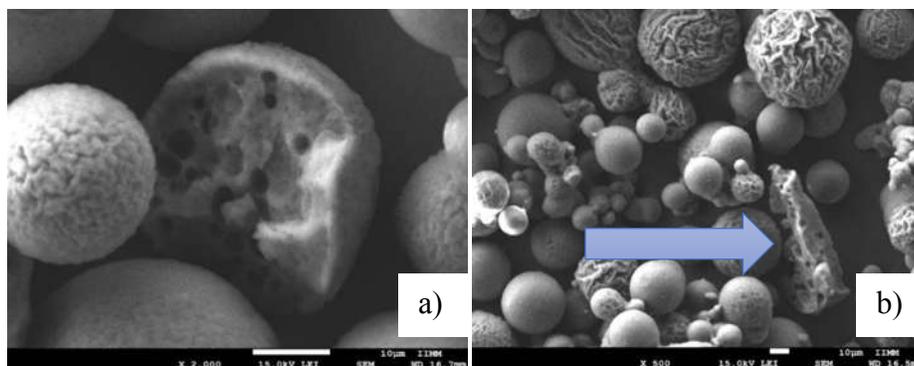


Figura 4.19. Micrografías de las microsferas de pectina sin paracetamol mostrando la porosidad interior, (a) 2000x y (b) 500x, formulación PL12.

Las microsferas de pectina con carga de fármaco presentaron características morfológicas un poco diferentes a las características de las microsferas de pectina sin carga. En la Figura 4.20, en la micrografía (a) se observan las microsferas de manera general, y se observaron tamaños de partícula menores que en las microsferas de pectina sin carga de fármaco; en la micrografía (b) y (c) se observaron las microsferas a mayores aumentos, su forma fue esférica, en cambio su superficie fue rugosa e irregular, no presentó poros en la superficie y se observó que el paracetamol recubre las microsferas en forma de escamas irregulares tal como se muestra en la micrografía (d).

El método de emulsión y evaporación de solvente es un método eficiente para la obtención de microsferas de polímeros con la morfología y las características superficiales requeridas en comparación con otros métodos [45]. Algunos investigadores como Lee y col. [46] utilizaron el método de secado por aspersión y obtuvieron partículas irregulares como las que se muestran en la Figura 4.21, en la cual se observan partículas semiesféricas con presencia de estrías parecidas a las que presentaron las microsferas de pectina de este trabajo.

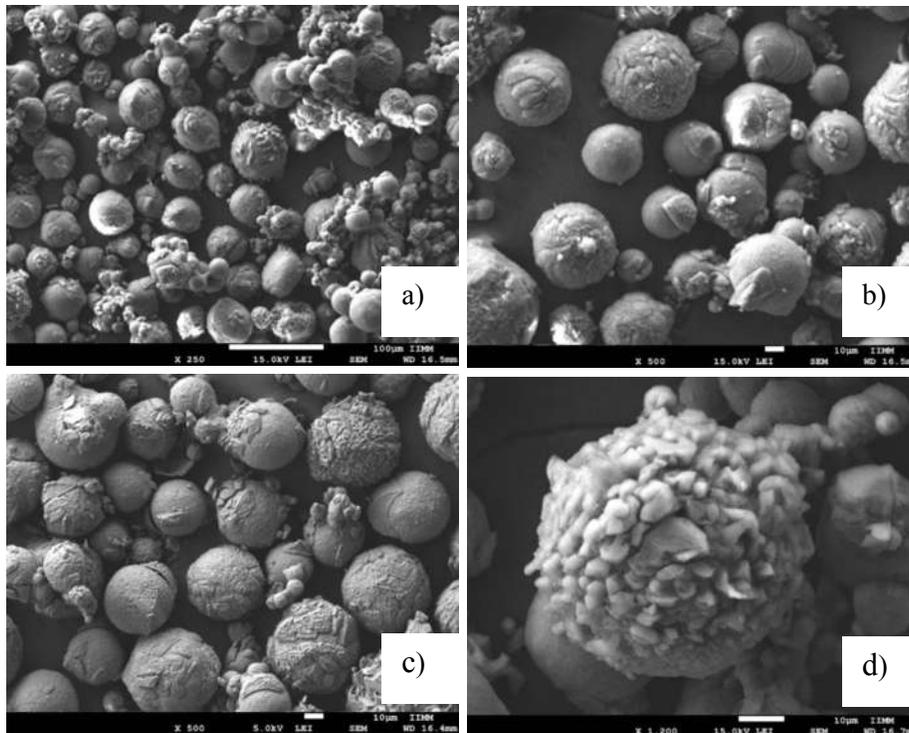


Figura 4.20. Micrografías de microesferas de pectina con carga de paracetamol (a) 250x, (b)500x, (c)500x y (d)1200x, formulación P4.

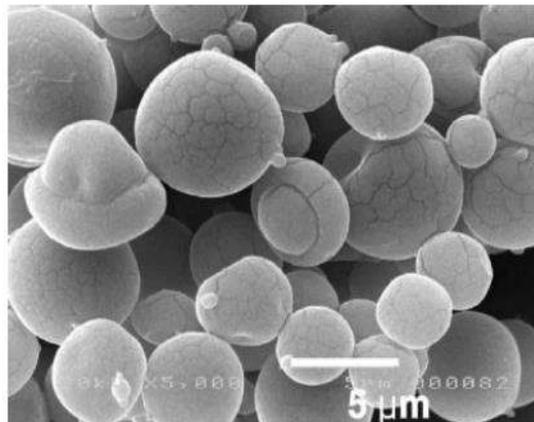


Figura 4.21. Micrografía de microesferas de pectina sintetizadas por secado por aspersión [46].

Continuando con el estudio morfológico de las microesferas de quitosano, en la Figura 4.22 se observan las microesferas de quitosano; en las micrografías (a), (b) y (c) se observó un amplio rango de tamaños de partículas de forma esférica y superficie lisa, en la micrografía (d) se presenta

una microesfera de quitosano a mayores aumentos donde se observa a detalle la forma esférica y su superficie rugosa. En ninguna de las micrografías se observó porosidad en la superficie. En la Figura 4.23 se muestran dos micrografías, en la micrografía (a) se muestra los poros internos de una microesfera de quitosano, los poros fueron de tamaño medio comparados con el tamaño de las microesferas, estos poros aseguran una mayor eficiencia de encapsulación de paracetamol.

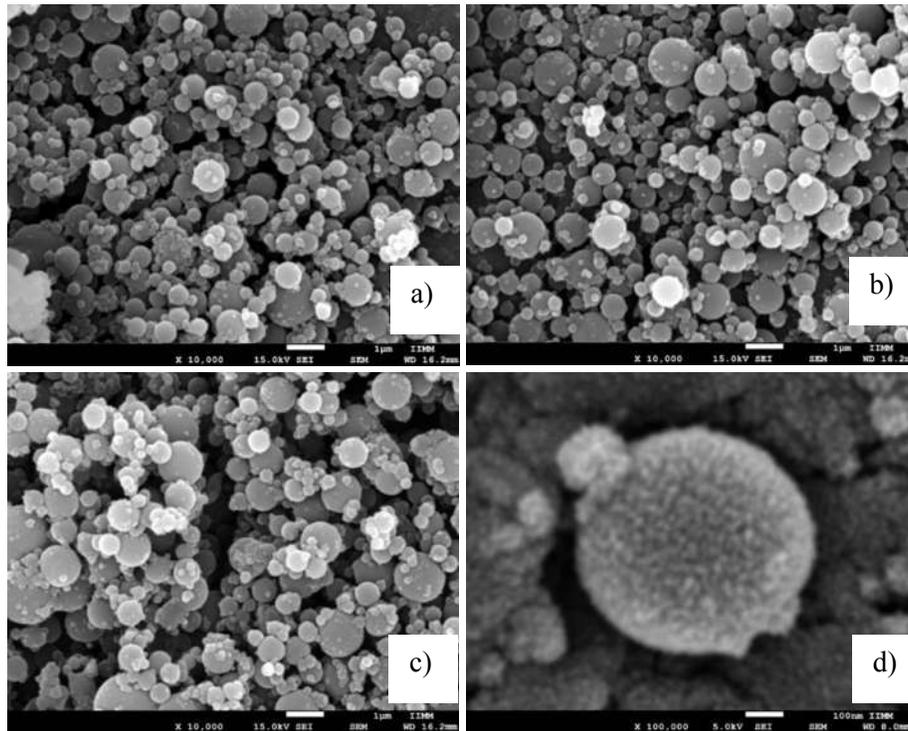


Figura 4.22. Micrografías de las microesferas de quitosano sin paracetamol, (a) 10000x, (b) 10000x, (c) 10000x y (d) 100000x, formulación QL2.

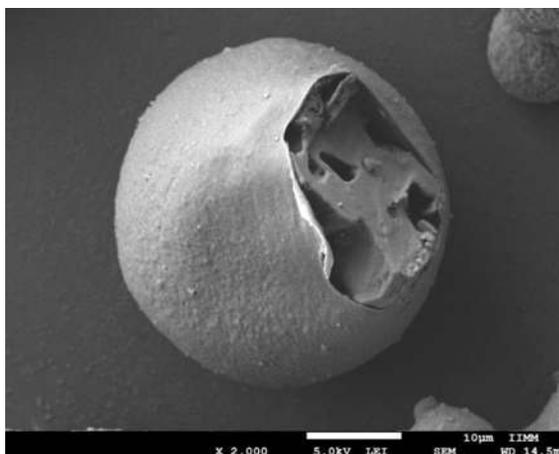


Figura 4.23. Micrografía de una microesfera de quitosano sin paracetamol mostrando la porosidad interna, 2000x formulación QL2.

Las microesferas de quitosano cargadas con paracetamol presentaron características un poco diferentes a las características morfológicas de las microesferas sin carga. En la Figura 4.24 se observan varias micrografías de las microesferas de quitosano con carga de fármaco; en la micrografía (a) se observó de manera general el tamaño de las microesferas, en este caso el tamaño fue menor que en las microesferas sin carga debido a la interacción fármaco–polímero. En las micrografías (b), (c) y (d) se observó que las microesferas tienen forma esférica y morfología lisa; en este caso no se observó fármaco en la superficie.

Genta y col. [47] desarrollaron microesferas de quitosano para la liberación de drogas, aplicando el método de emulsión y evaporación de solvente para la síntesis, el estudio de la morfología de estas microesferas mostró la formación de partículas con forma esférica, superficie lisa y con la presencia de poros en la superficie, tal como se muestra en la Figura 4.25; también se puede observar que las microesferas se encuentran agregadas, lo cual no se presentó en este trabajo.

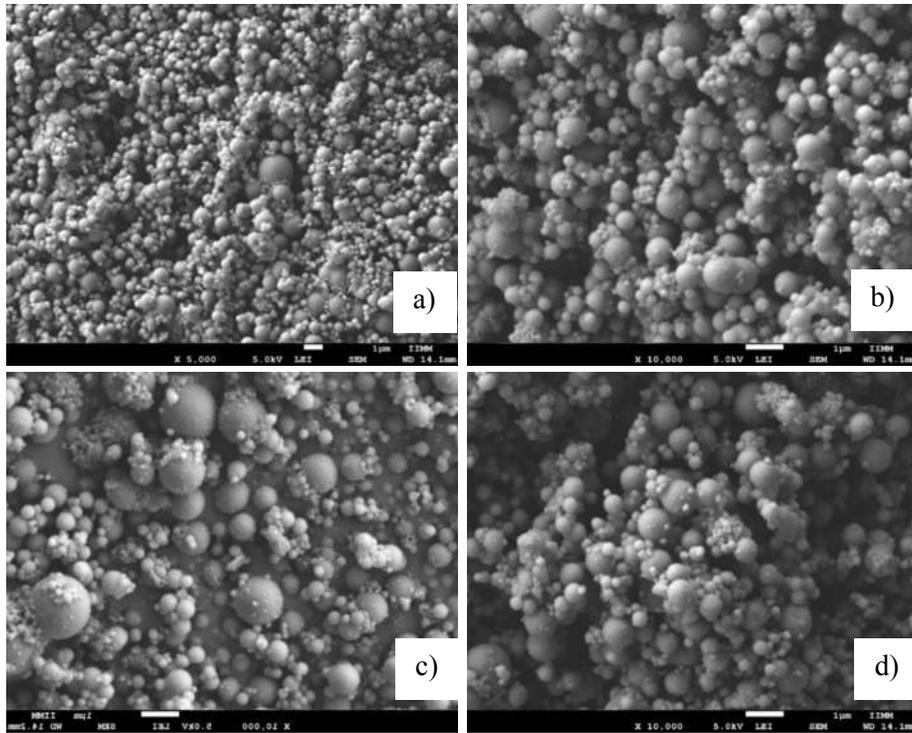


Figura 4.24. Micrografías de las microsferas de quitosano con paracetamol, (a) 5000x, (b) 10000x, (c) 10000x y (d) 10000x, formulación Q4.

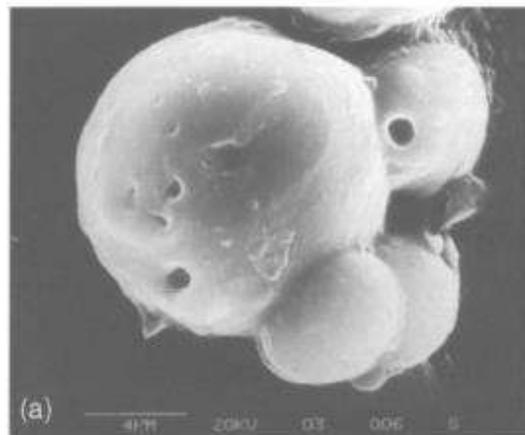


Figura 4.25. Micrografía de microsferas de quitosano [47].

4.2.3 Determinación y distribución de tamaño de partícula

En la Figura 4.26 se observa una gráfica de frecuencia acumulada de tamaño de partícula de las microesferas de pectina sin cargada de fármaco, donde se observó que el 50% de las partículas presentaron un diámetro inferior a 20.5 μm , y el 75% de las partículas presentaron diámetros menores a 28 μm . La Figura 4.27 muestra un histograma donde se observa con más detalle qué número de partículas corresponde a cada clase de tamaño de diámetro; el mayor número de partículas se encontró entre 18.8 a 34.9 μm de diámetro. El histograma muestra una distribución de tamaño de partícula que va desde 2.7 hasta 83.3 μm lo cual es relativamente amplio, pero cabe mencionar que el número de partículas que se encontró después de 59.1 μm es bajo. En los datos estadísticos se encontró que el diámetro promedio es de 26 μm , con una desviación estándar de 11.31.

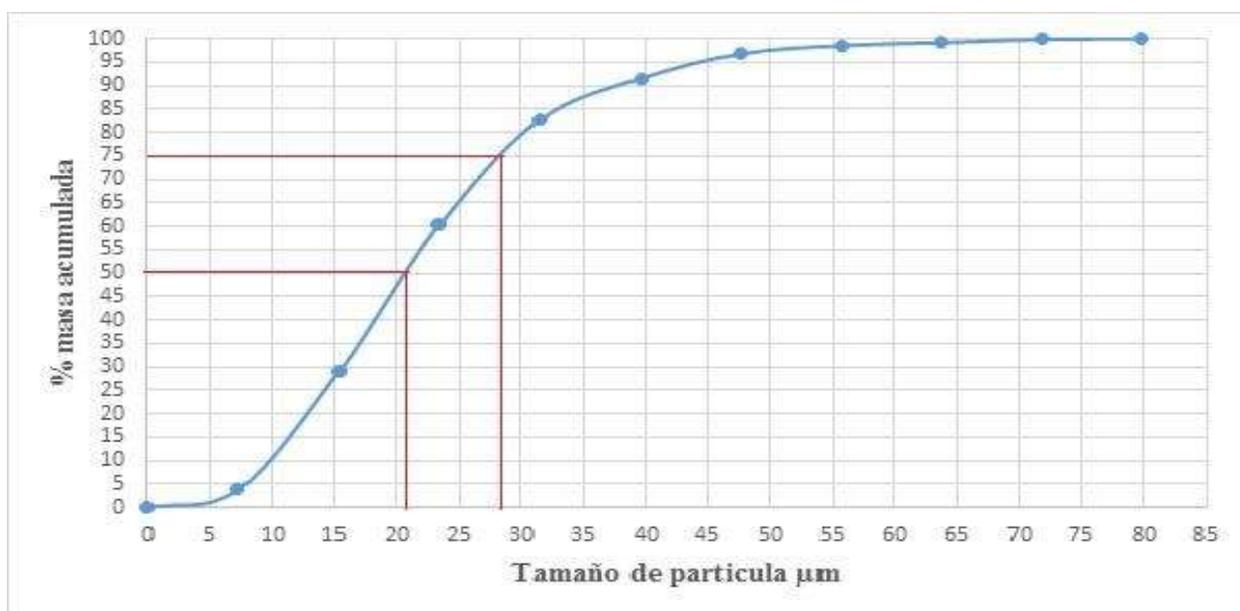


Figura 4.26. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de pectina sin carga de paracetamol.

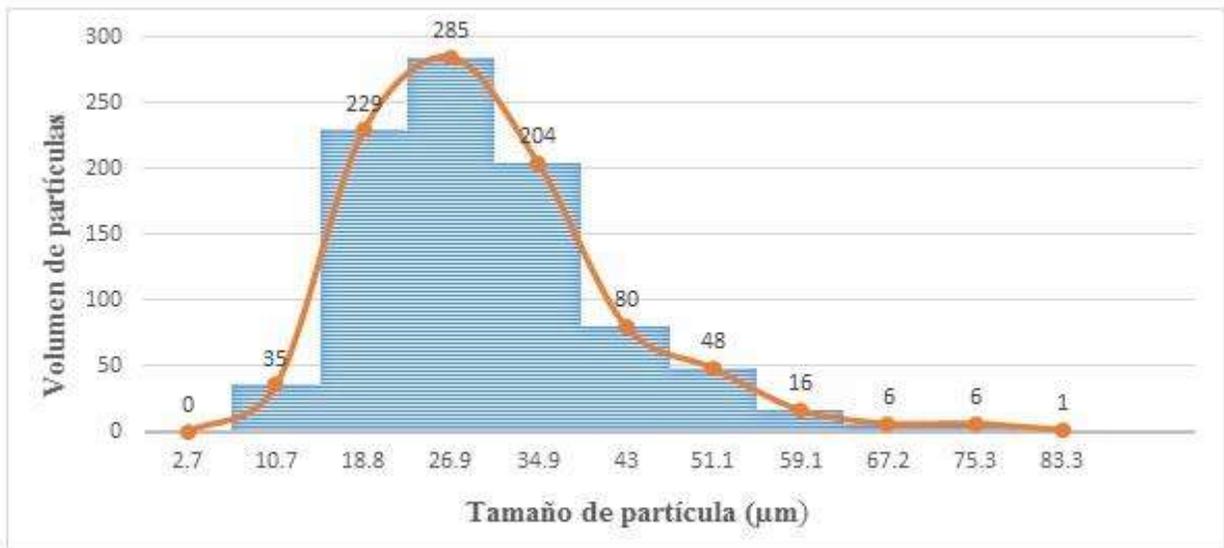


Figura 4.27. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de pectina sin carga de paracetamol.

Comparando los resultados de las microesferas de pectina sin paracetamol con las que si contenían, se encontró que el 50% de las microesferas con carga de fármaco tienen un diámetro menor a 19.5 µm y el 75% tiene diámetros menores a 31.5 µm, tal como se muestra en la gráfica de frecuencia acumulada de la Figura 4.28. Este aumento de diámetro se debió a que la distribución de tamaños fue más pequeña tal como se muestra en el histograma de la Figura 4.29. El diámetro promedio de las microesferas de pectina con paracetamol fue de 25 µm con una desviación estándar de 13.68. El tamaño de las microesferas de pectina sin y con paracetamol se mantuvo constante, ya que la diferencia de diámetros es de solo 1 µm aproximadamente; por lo tanto la incorporación del fármaco no afectó el tamaño de la microesfera.

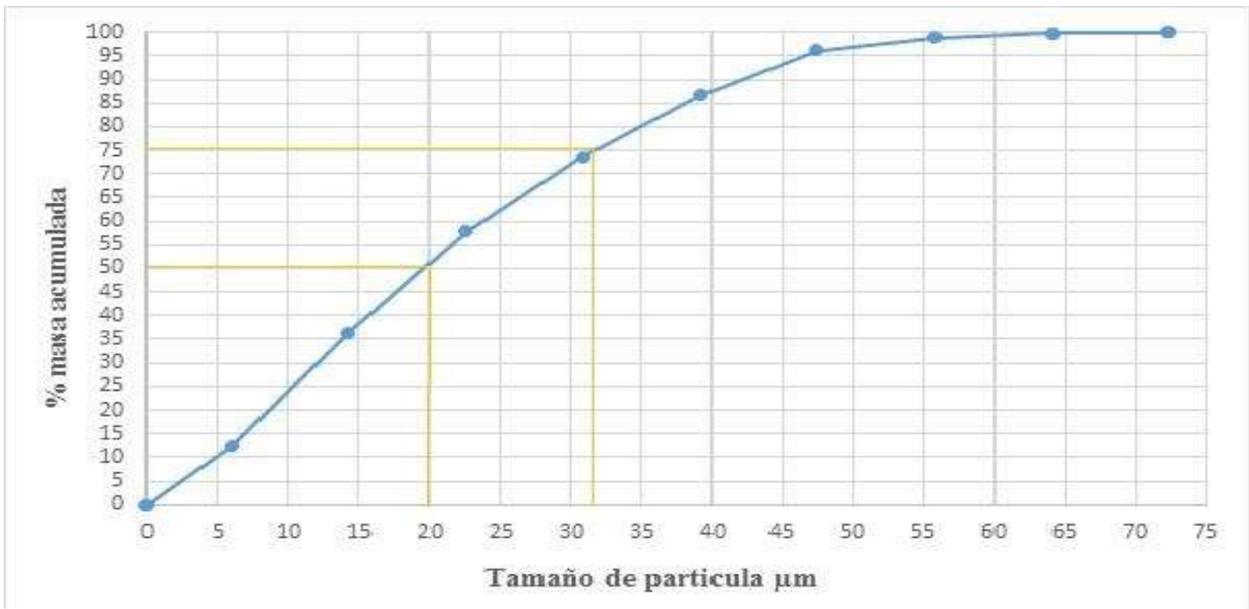


Figura 4.28. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de pectina con carga de paracetamol.

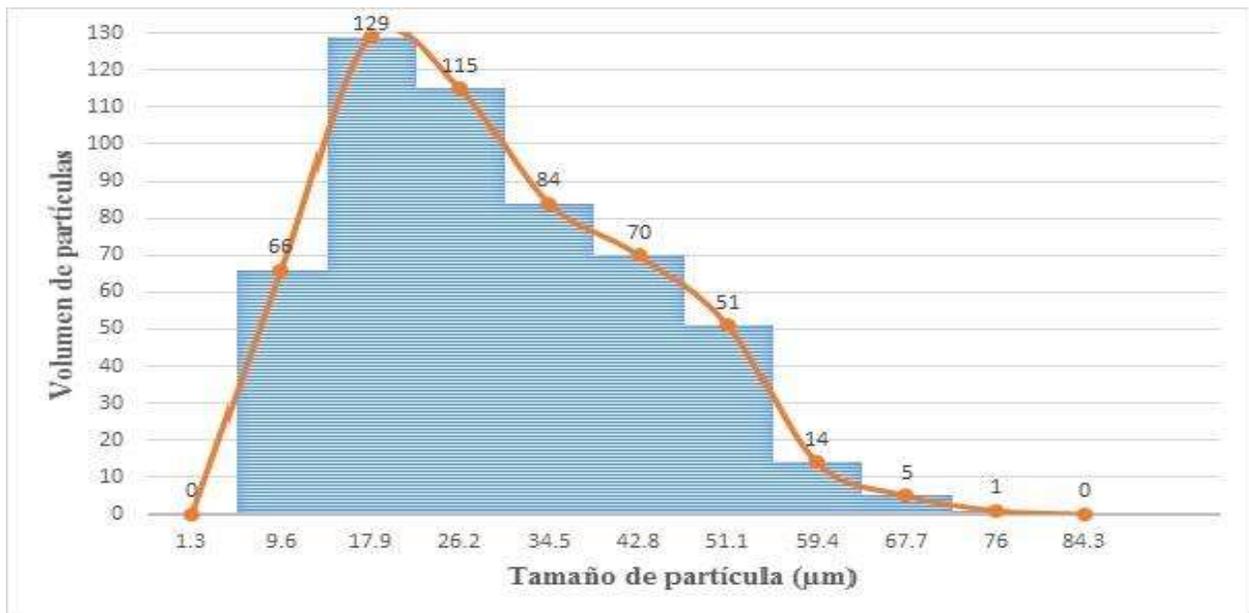


Figura 4.29. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de pectina con carga de paracetamol.

Para las microesferas de quitosano sin paracetamol se obtuvieron microesferas muy pequeñas tal como se muestra en la gráfica de frecuencia acumulada de tamaño de partícula (Fig. 4.30); el 50% de las partículas presentaron diámetros menores a $0.4 \mu\text{m}$ y el 75% de las partículas presentaron un diámetro menor a $0.6 \mu\text{m}$, esto quiere decir que el 75% de las partículas no rebasaron la micra de tamaño. En el histograma de la Figura 4.31 se demuestra que la mayoría de las partículas se encontraron en el rango de 0.4 a $0.8 \mu\text{m}$ y que la distribución de tamaño fue pequeña ya que abarca de 0.2 a $1.9 \mu\text{m}$. El diámetro promedio de estas microesferas fue de $0.6 \mu\text{m}$ con una desviación estándar de 0.25 .

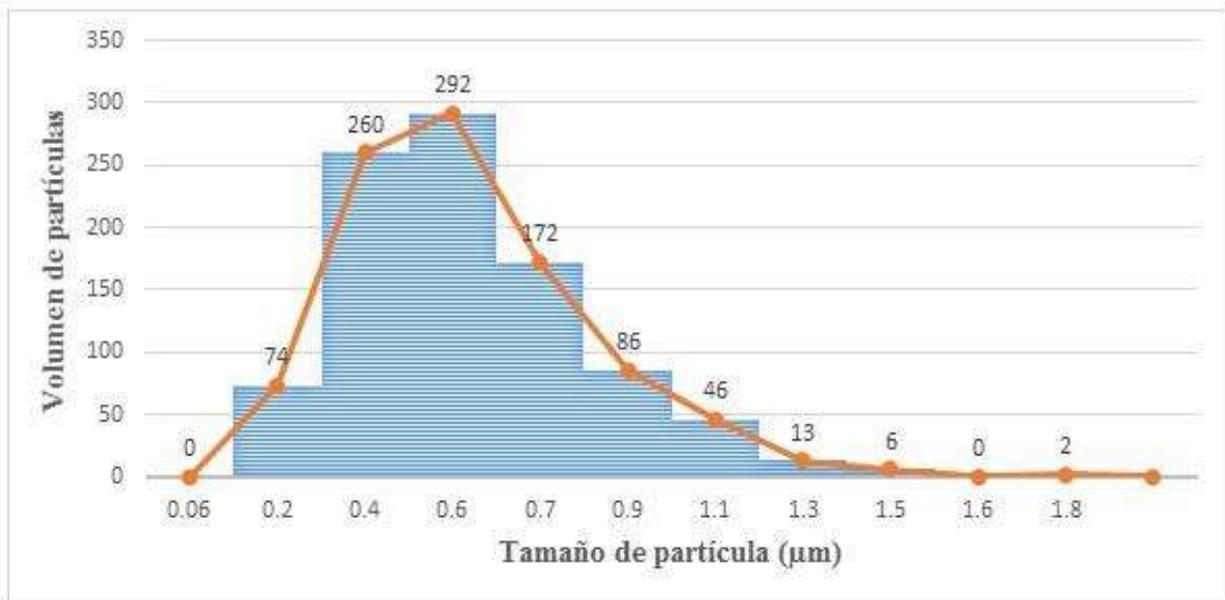


Figura 4.30. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de quitosano sin carga de paracetamol.

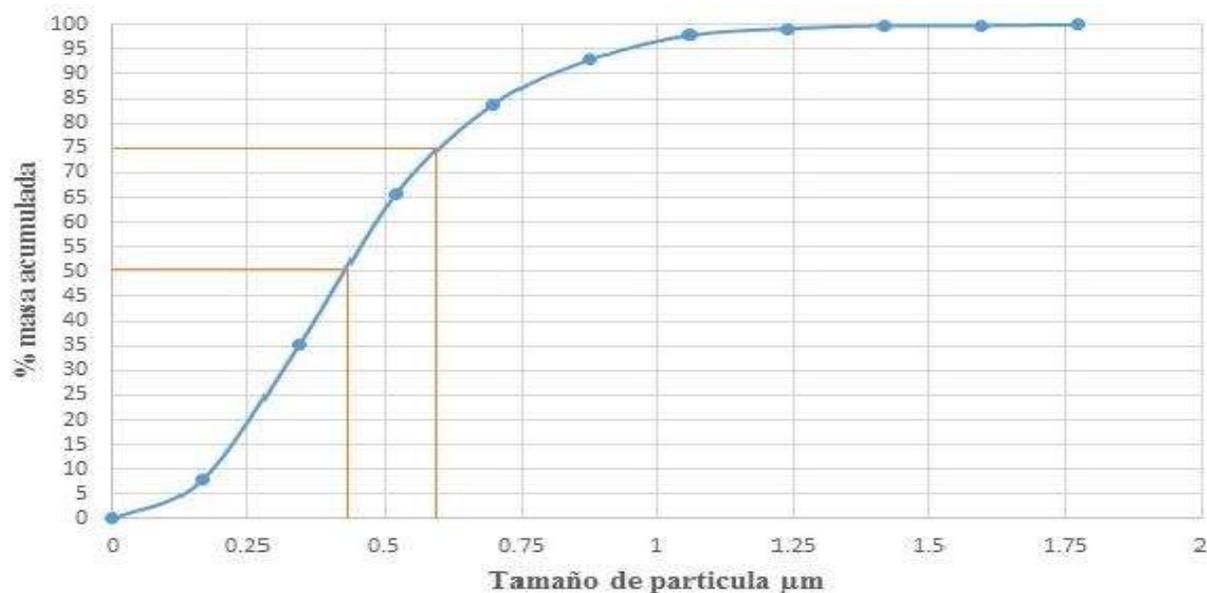


Figura 4.31. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de quitosano sin carga de paracetamol.

Las microesferas de quitosano cargadas con paracetamol presentaron un comportamiento similar a las microesferas sin carga; en la Figura 4.32 se muestra la gráfica de frecuencia acumulada de las microesferas de quitosano con carga de fármaco, donde se observó que el 50% de éstas presentaron diámetros menores a 0.5 µm, comparando este valor con el de las microesferas de quitosano sin carga, la diferencia solo fue de 0.07 µm. El 75% de las partículas con carga de paracetamol presentó un diámetro menor a 0.7 µm, nuevamente la diferencia entre las microesferas con y sin carga fue mínima, 0.05 µm. El histograma de la Figura 4.33 muestra que la mayoría de las partículas se encontraron entre 0.5 a 0.9 µm, el rango de distribución de tamaño también fue pequeño abarcó de 0.1 a 2 µm, se debe de mencionar que a partir de 1.5 µm, el número de partículas fue pequeño. El tamaño promedio de partícula para las microesferas de quitosano con carga fue de 0.6 µm con una desviación estándar de 0.24.

Se realizó una comparación con los datos encontrados por otros investigadores, se observó que el tamaño de las microesferas de quitosano obtenido en este trabajo es inferior. Nayak y col. [48] reportan valores de tamaño de partícula de 62 a 210 µm. Esta diferencia de tamaño se debe a que estos investigadores utilizaron menor cantidad de agente entrecruzante (glutaraldehído), recordemos que el glutaraldehído ayuda a disminuir el tamaño de las microesferas.

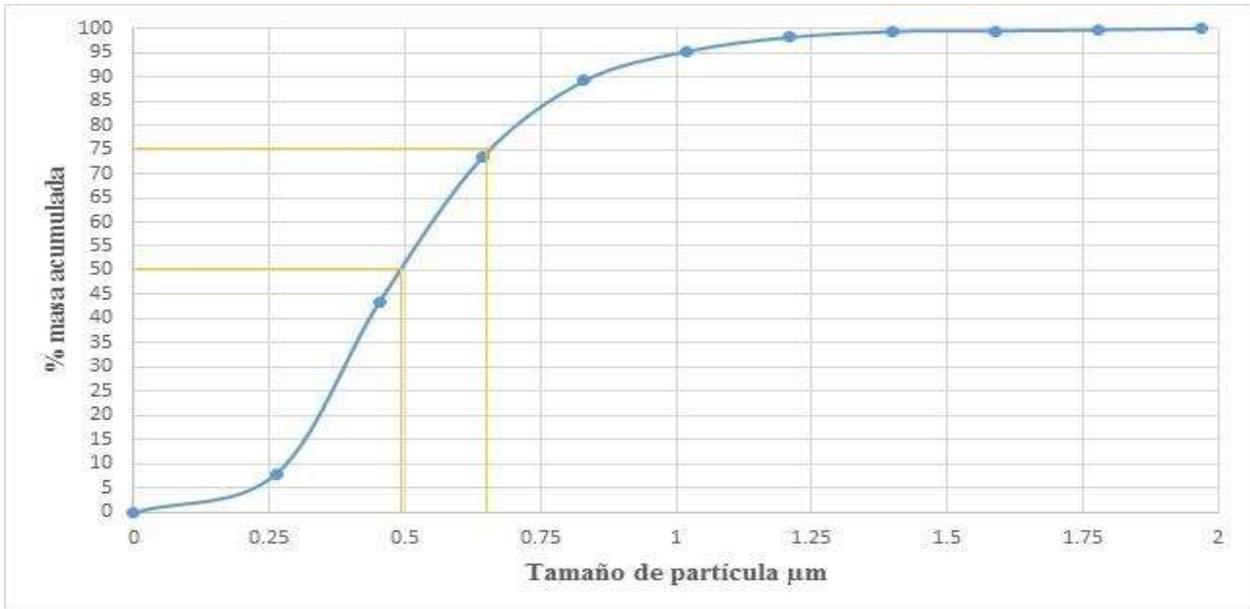


Figura 4.33. Gráfica de frecuencia acumulada de la distribución de tamaño de las microesferas de quitosano con carga de paracetamol.

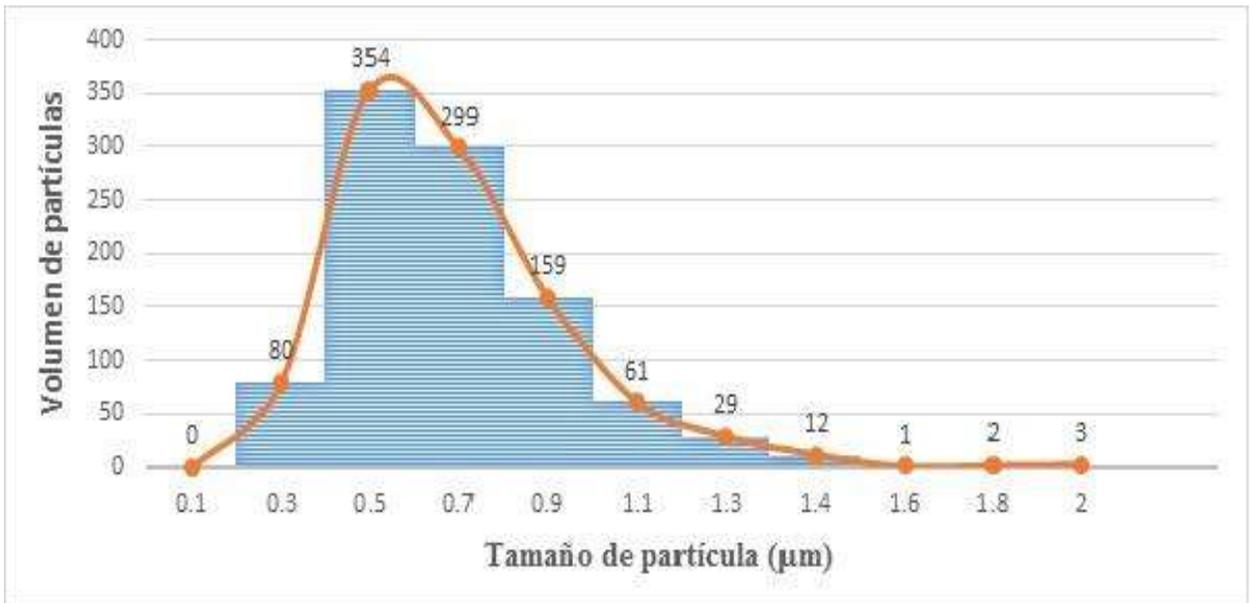


Figura 4.32. Histograma de tamaño de partícula de las microesferas de quitosano con carga de paracetamol.

4.2.4 Espectrofotometría infrarroja (FT-IR)

Para conocer los principales grupos funcionales que están presentes en los precursores, se realizó un análisis de espectrofotometría de infrarrojo. En el caso del espectro de la pectina pura (Fig. 4.34), la literatura menciona que se traslapan muchas bandas, por lo cual solo se identificaron los principales grupos funcionales de la huella dactilar. En la Tabla 4.5 se muestran las principales bandas que se tomaron en cuenta para el estudio. Los grupos presentes son hidroxilo (-OH), carbonilos (C=O), nitrilo (-CN), metil (-CH₃), metilo (-CH) y metileno (-CH₂). Se comparó este análisis con el realizado por Kumar y col. [49] estos investigadores encontraron bandas similares para la pectina a las encontradas en este trabajo, por ejemplo, el grupo (-OH) a 3403 cm⁻¹, (-CH) a 2932 cm⁻¹, (-CO) a 1648 cm⁻¹, (-CH₂) a 1458 cm⁻¹, (-OH) a 1381 cm⁻¹ y por último (-CN) a 1018 cm⁻¹; el desfase de algunas bandas se debe al grado de metilación de la pectina que se utilizó.

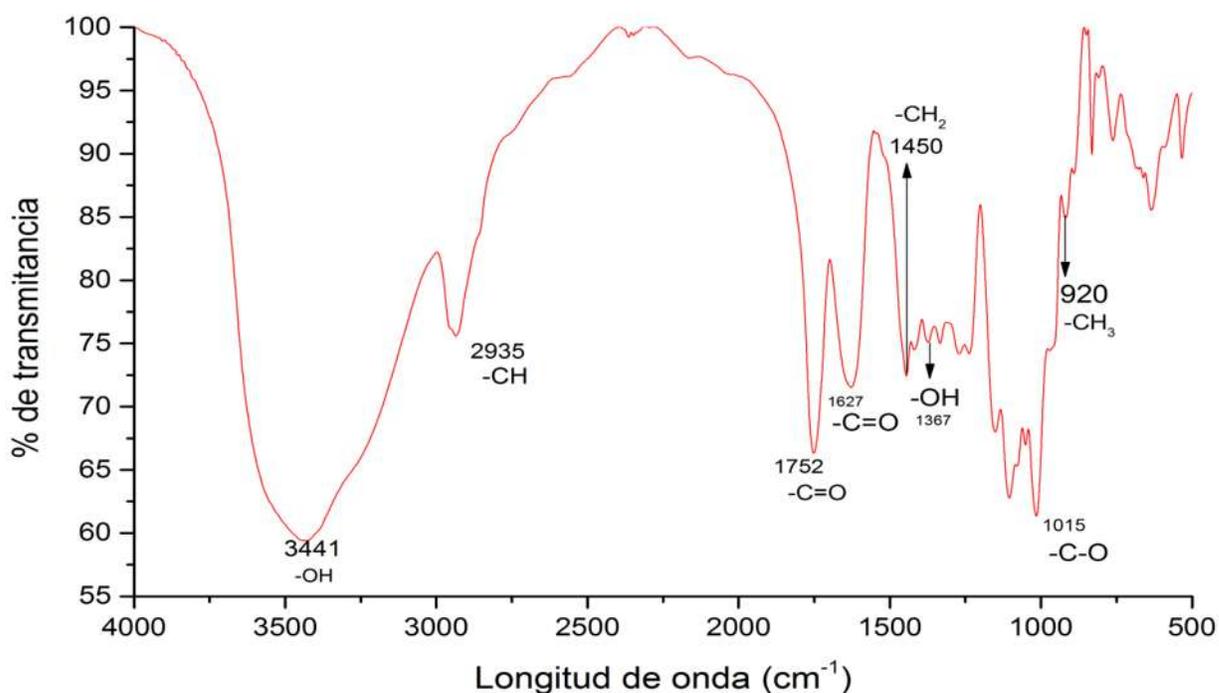


Figura 4.34. Espectro de infrarrojo de la pectina pura.

Tabla 4.5. Principales grupos funcionales detectados en el espectro de infrarrojo de la pectina pura.

Grupo funcional	Número de onda (cm⁻¹)
-OH	3441
-CH	2935
C=O	1752
C=O	1627
-CH₂	1450
-OH	1367
C-O	1015
-CH₃	920

En el espectro de infrarrojo del quitosano (Fig. 4.35), se encontraron 11 bandas principales las cuales son características de la molécula de quitosano, estas bandas se muestran en Tabla 4.6. Es evidente la presencia de la banda del grupo (OH) a 3417 cm⁻¹, a 2893 cm⁻¹ se presentó la banda del grupo (-CH), a 1660 cm⁻¹ se observó el primer grupo (C=O), en 1578 cm⁻¹ se presentó la primer amina, algunos autores señalan una banda a 3215 cm⁻¹ aproximadamente donde aparece un amina, tal banda no se presentó en el epectro de infrarrojo del quitosano de este trabajo, a 1426 cm⁻¹ se presentó el grupo (-CH₂), a 1319 el grupo (C-N), en 1072 se aprecia el grupo (-C-O), por último, las bandas 1021 cm⁻¹, 895 cm⁻¹, 661 cm⁻¹ y 573 cm⁻¹ se deben a un enlace glucosídico (C-O-C). Autores como Hernández y col [50] encontraron este tipo de bandas a partir de 1070 cm⁻¹ hasta aproximadamente 556 cm⁻¹, ellos atribuyen estas bandas a la presencia de grupos piranósicos.

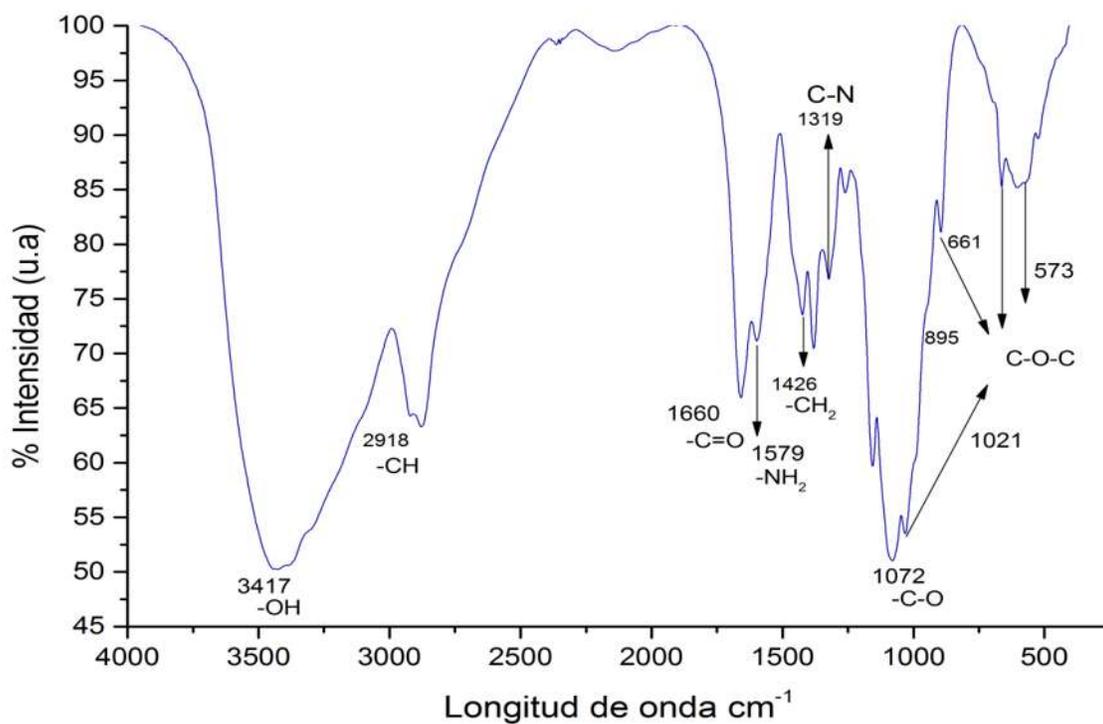


Figura 4.35. Espectro de infrarrojo de quitosano puro.

Tabla 4.6. Principales grupos funcionales detectados en el espectro de infrarrojo del quitosano puro.

Grupo	Número de Onda (cm ⁻¹)
-OH	3417
-CH	2893
C=O	1660
-NH ₂	1579
-CH ₂	1426
C-N	1319
C-O	1072
	1021
C-O-C	895
	661
	563

Para el espectro de infrarrojo del paracetamol (Fig. 4.36) se tomaron en cuenta las bandas más representativas. Las bandas tomadas en cuenta se muestran en la Tabla 4.7. La banda a 3324 cm^{-1} corresponde a (-NH), algunos investigadores encontraron una banda de (-OH), tal es el caso de Bashpa y col. [51] que encontraron esta banda a 3300 cm^{-1} , en este trabajo no se observó esta banda, en cambio se registró una banda a 3100 cm^{-1} correspondiente a (-CH); siguiendo con el estudio la siguiente banda que se identificó fue a 1805 cm^{-1} y pertenece a (-CH₂), a 1654 cm^{-1} se presentó el primer grupo (C=O), muy cerca de este a 1616 cm^{-1} se observó el grupo (C=C), a 1564 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} y 1250 cm^{-1} se identificó nuevamente el grupo (-NH), pero a esta longitud de onda la presencia de este grupo es por flexión no por estiramiento como en la primer banda que se registró a 3324 cm^{-1} , a 1438 cm^{-1} se identificó el grupo (C-C) y por ultimo a 1110 cm^{-1} y 841 cm^{-1} se encontró el grupo (-CH); estas son las bandas que conforman la huella dactilar del paracetamol.

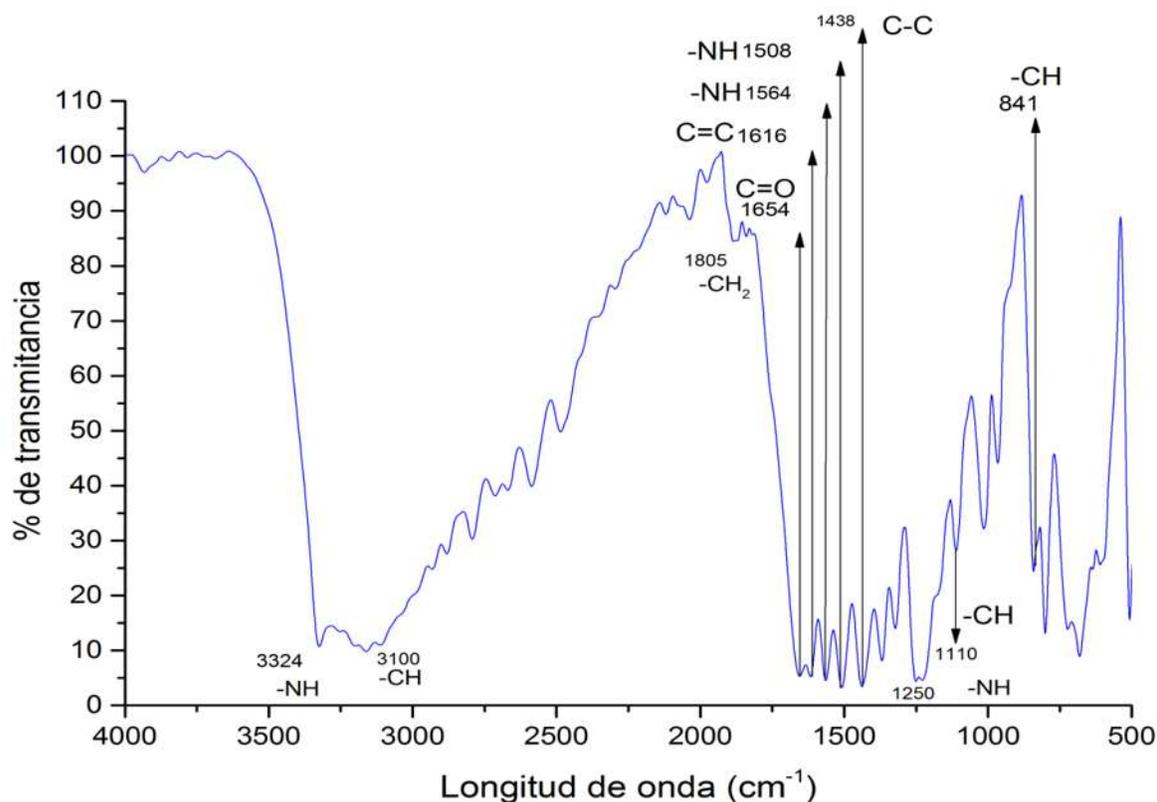


Figura 4.36. Espectro de infrarrojo del paracetamol puro.

Tabla 4.7. Principales grupos funcionales detectados en el espectro de infrarrojo del paracetamol puro.

Compuesto	Número de onda (cm⁻¹)
-NH	3325
-CH	3107
-CH₂	1851
C=O	1651
C=C	1610
NH	1564
	1508
	1256
C-C	1432
-CH	1174
	833

Las bandas identificadas en los espectros de infrarrojo de los materiales precursores son características de los grupos funcionales presentes en estos. Estas bandas fueron comparadas con las bandas registradas después de la síntesis de las microesferas poliméricas para identificar si existió una modificación del polímero y una interacción polímero-fármaco, lo cual se reflejaría en el movimiento de las bandas de los espectros de infrarrojo de los materiales. En el estudio de infrarrojo realizado a las microesferas de pectina sin y con paracetamol, se observó que el fármaco no interactúa con la pectina. En la Figura 4.37 aparecen 4 espectros de infrarrojo; el espectro de color verde pertenece a la pectina pura, el espectro de color rojo representa las microesferas de pectina sin carga de fármaco, el espectro de color azul representa a las microesferas con carga de fármaco y por último el espectro de color rosa representa el paracetamol puro. Analizando los espectros se observó que no hay modificación entre la pectina pura y las microesferas de pectina sin carga, ya que se mantuvieron las mismas bandas, nuevamente se demuestra que la síntesis de las microesferas no modifica la pectina.

Para las microesferas de pectina con carga de fármaco se observó la presencia del grupo (-OH) a 3438 cm⁻¹, y justo en la prolongación de esta banda se presentó el grupo (-NH) del fármaco a 3330 cm⁻¹, el grupo (OH) se presentó a 1365 cm⁻¹ este grupo pertenece a la pectina, la siguiente banda identificada es la del grupo (-CH) a 2931 cm⁻¹ perteneciente a la pectina, el grupo (-CH) del paracetamol que se encontró en 3100 cm⁻¹ no se denota totalmente solo se observa una protuberancia no definida, por lo cual esta banda podría estar traslapa o difracta con muy poca intensidad, a 1452 cm⁻¹ se observó el grupo (-CH₂), la siguiente banda identificada fue a 1749 cm⁻¹

¹ del grupo (-C=O), estas dos bandas pertenece a la pectina, el grupo (-C=O) se volvió a presentar a 1651 pero esta banda corresponde al fármaco, a 1619 cm^{-1} se observó el grupo (C=C), a 1565 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} y 1247 cm^{-1} se encontró el grupo (-NH) estos dos últimos grupos pertenecen al paracetamol, a 1438 cm^{-1} se presentó el grupo (C-C) y a 1106 cm^{-1} y 837 cm^{-1} se identificó el grupo (-CH), estos grupos también pertenecen al fármaco, por último a 1014 cm^{-1} se observó el grupo (-C-O) y a 917 cm^{-1} se presentó el grupo (-CH₃), estas bandas pertenecen a la pectina; en la Tabla 4.8 y 4.9 se presenta un resumen de las bandas identificadas para cada espectro. Este estudio confirmó que el paracetamol y la pectina no reaccionan y que no hay una modificación del polímero en la síntesis de las microesferas.

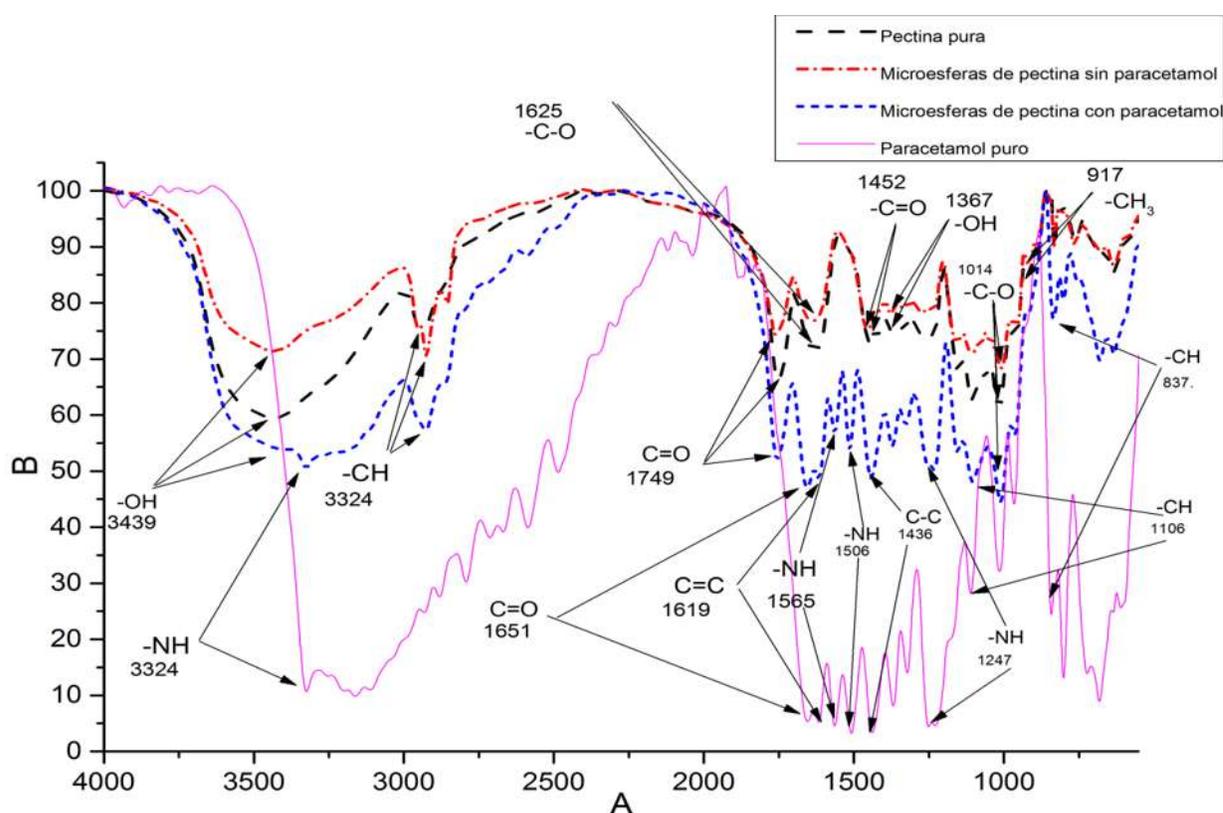


Figura 4.37. Espectros de infrarrojo para la pectina pura, microesferas de pectina con y sin carga de paracetamol y paracetamol puro.

Tabla 4.8. Comparación del número de onda (cm^{-1}) de las bandas encontradas en el paracetamol y las microesferas de pectina con paracetamol.

Paracetamol	Referencia	Microesferas de pectina con paracetamol
Grupo funcional	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1}) encontradas
-NH	3325	3330
-CH	3107	0
-CH₂	1851	0
C=O	1651	165
C=C	1610	1619
NH	1564	1565
	1508	1506
	1256	1247
C-C	1432	1436
-CH	1174	1106
	833	837

Tabla 4.9. Comparación del número de onda (cm^{-1}) de las bandas encontradas en la pectina pura y las microesferas de pectina con y sin paracetamol.

Pectina pura	Referencia	Microesferas de pectina sin paracetamol	Microesferas de pectina con paracetamol
Grupo funcional	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})
-OH	3341	3341	3438
-CH	2935	2935	2931
C=O	1752	1752	1749
C=O	1627	1627	1625
-CH₂	1450	1450	1452
-OH	1367	1367	1365
C-O	1015	1015	1014
-CH₃	920	920	917

El estudio de infrarrojo realizado para las microesferas de quitosano con y sin carga de paracetamol, se muestra en la Figura 4.38. El espectro de color morado representa el quitosano puro, el espectro de color rojo representa las microesferas de quitosano sin carga, el espectro de color azul representa las microesferas de quitosano con carga de fármaco y por último el espectro de color rosa representa el paracetamol.

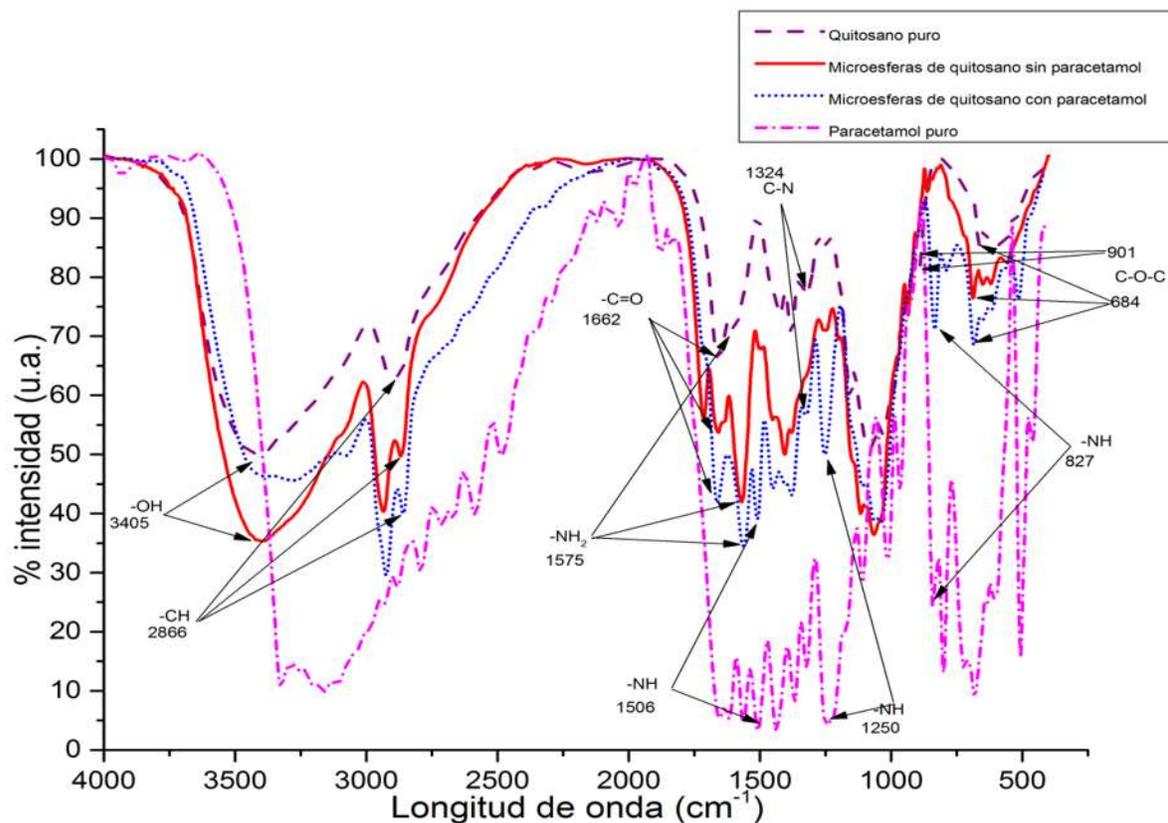


Figura 4.38. Espectros de infrarrojo para el quitosano puro, microesferas de quitosano con y sin carga de paracetamol y paracetamol puro.

En el caso del espectro del quitosano puro y las microesferas de quitosano sin paracetamol se observó que los espectros se comportan de la misma manera, sin cambio en las principales bandas representativas del quitosano. Por otra parte en el espectro de las microesferas de quitosano con carga de fármaco se observó un traslape de bandas, debido a que algunos grupos son similares tanto en el quitosano como en el paracetamol, por ejemplo, el grupo (OH), también se observó que hay menor presencia de las bandas de paracetamol, una de las razón es la baja cantidad de fármaco en la superficie de las microesferas de quitosano por lo tanto se presentan bandas de paracetamol con muy poca intensidad y estas pueden ser bloqueadas por las bandas de alta intensidad del polímero.

En el espectro de infrarrojo de las microesferas de quitosano con fármaco, la primer banda encontrada es la del grupo (-OH) a 3405 cm^{-1} , seguida del grupo (-CH) a 2866 cm^{-1} , estos dos grupos pertenecen a bandas características del quitosano, en este rango no se encontró la presencia grupo (-NH) del paracetamol, el siguiente grupo es el (-C=O) a 1662 cm^{-1} , el grupo (-NH₂) a 1575

cm⁻¹ y a 1324 cm⁻¹ se identificó el grupo (C-N) , a 901 cm⁻¹ y 684 cm⁻¹ se encontró el grupo (C-O-C), estos grupos corresponden a bandas representativas del quitosano; en este estudio solo se encontró tres bandas representativas del fármaco, a 1506 cm⁻¹ y 1250 cm⁻¹ se identificó el grupo (-NH) y el grupo (-CH) a 834 cm⁻¹, la presencia de pocas bandas del paracetamol pudo ser debido a una interacción a nivel molecular del quitosano y el paracetamol. En las tablas 4.10 y 4.11 se hace un resumen de las principales bandas encontradas en las microesferas de quitosano con y sin fármaco.

Tabla 4.10. Comparación de la longitud de onda (cm⁻¹) de las bandas encontradas en el paracetamol puro y las microesferas de quitosano con paracetamol.

Paracetamol	Referencia	Microesferas de quitosano con paracetamol
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹) encontradas
-NH	3324	0
-CH	3100	0
-CH₂	1805	0
C=O	1654	0
C=C	1616	0
NH	1564	0
	1508	1506
	1250	1250
C-C	1438	0
-CH	1110	0
	841	834

Tabla 4.11. Comparación de la longitud de onda (cm⁻¹) de las bandas encontradas en el quitosano puro y las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.

Quitosano	Referencia	Microesferas de quitosano sin paracetamol	Microesferas de quitosano con paracetamol
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)
-OH	3417	3417	3405
-CH	2893	2893	2866
C=O	1660	1660	1662
-NH₂	1579	1579	1575
-CH₂	1426	1426	0
C-N	1319	1319	1324
C-O	1072	1072	0

	1021	1021	0
C-O-C	895	895	901
	661	661	684
	563	563	0

4.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En este apartado se muestran los resultados del análisis calorimétrico del paracetamol, pectina, quitosano y microesferas de pectina y quitosano con carga de paracetamol. En la Figura 4.39 se muestra el termograma del paracetamol puro, en éste se observó que no hay una transición vítrea en el rango de temperatura en el cual se realizó el análisis, además se presentó un pico endotérmico a 167.8 °C que corresponde a su temperatura de fusión y la entalpía de fusión (el área bajo la curva) fue de 205.9 J/g. Este valor es similar al reportado por Sacchetti [52], además confirma que el paracetamol con el que se trabajó es de estructura monoclinica debido a esta temperatura de fusión.

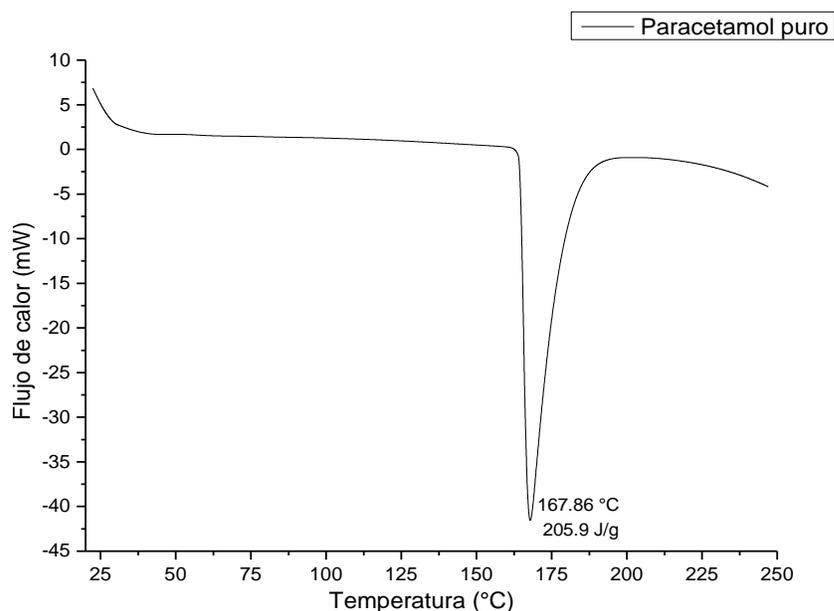


Figura 4.39. DSC del paracetamol puro.

En la Figura 4.40 se muestran los termogramas de la pectina pura y de las microesferas de pectina con carga de fármaco. El termograma de la pectina mostró dos picos uno endotérmico y uno exotérmico; el pico endotérmico se presentó a 101 °C que corresponde a la fusión de la pectina y

el valor de su entalpía de fusión fue de 215.5 J/g; siguiendo con el análisis del termograma de la pectina pura, el pico exotérmico se presentó a 238 °C y corresponde a la temperatura de cristalización de la pectina, su entalpía de cristalización fue de 132.5 J/g. Respecto al termograma de las microesferas de pectina con carga de paracetamol se presentó un pico endotérmico a 91 °C, por lo tanto la temperatura de fusión de las microesferas disminuye aproximadamente 10°C, esto puede ser debido a la presencia del paracetamol, en este mismo termograma se presentó un segundo pico endotérmico a 166°C con una entalpía de 4.52 J/g, este pico es del paracetamol presente en las microesferas, lo cual indica que el paracetamol se encuentra presente en su forma cristalina; además demostró que no existe interacción de la pectina y el fármaco. Devi y col. [53], en su investigación para la preparación de pellets de pectina para el suministro dirigido del fármaco aceclofeno, realizaron análisis de calorimetría diferencial de barrido para la pectina y encontraron un valor de temperatura de fusión de 91.5°C, este valor se aproxima al encontrado en este trabajo; además en el análisis de calorimetría realizado para la mezcla pectina-aceclofeno, mostró solo un pico endotérmico a 160°C el cual corresponde a la temperatura de fusión del fármaco empleado, indicando por lo tanto, que no hay interacción entre la pectina y el fármaco.

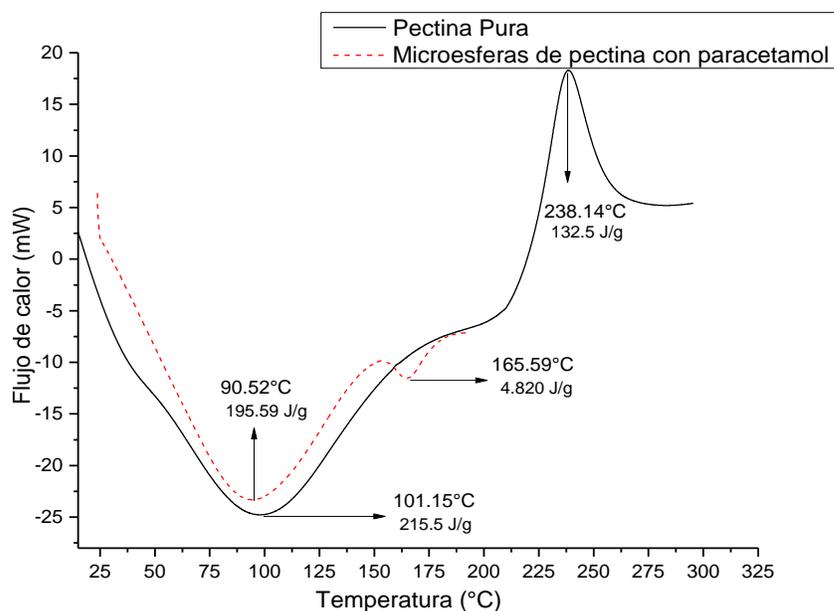


Figura 4.40. DSC de pectina y microesferas de pectina con carga de paracetamol.

En la Figura 4.41 se muestran los termogramas para el quitosano puro y las microesferas de quitosano con carga de paracetamol. En el termograma de quitosano puro se encontró un pico endotérmico a 87°C, el cual corresponde a la temperatura de fusión para el quitosano puro con un calor de fusión es de 287.4 J/g; Devi y col. [54] reportan una temperatura de fusión para el quitosano de 92 °C, muy cerca a la obtenida en este trabajo. Por otra parte el termograma de las microesferas de quitosano con carga de fármaco muestra este tipo de pico endotérmico a 79 °C como se puede observar nuevamente la temperatura de fusión se reduce en aproximadamente 10°C, tal como sucedió en las microesferas de pectina con carga de fármaco. Devi y col. [54] también reportan una disminución de 5° C en la temperatura de fusión después de sintetizar el quitosano para encapsular aceclofenaco. Continuando con el análisis del termograma de las microesferas de quitosano con carga, se observa la presencia de dos picos exotérmicos un a 187 °C y el otro a 225 °C con valores de entalpía de 2.52 J/g y 7.21 J/g respectivamente. De acuerdo con la literatura y con algunas investigaciones, por ejemplo Dong y col. [55], el primer pico a 187 °C se puede relacionar con la interacción polímero-fármaco y el segundo pico a 225.14°C puede relacionarse a la temperatura de cristalización del quitosano puro.

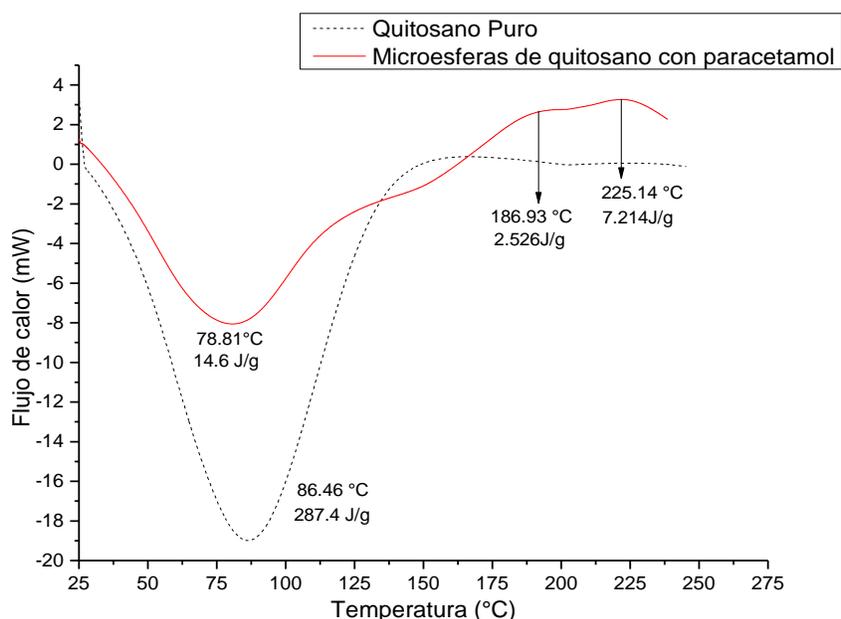


Figura 4.41. DSC de quitosano y microesferas de quitosano con carga de paracetamol.

4.2.6 Eficiencia de encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulación de los 12 experimentos realizados de cada polímero. Para la curva de calibración se utilizaron los espectros que se muestran en la Figura 4.42, estos espectros corresponden a las muestras de concentración conocida de paracetamol (2.5, 5, 10, 20, 30 ppm). Utilizando la concentración conocida de fármaco y la absorbancia que mostraron los espectros de estas muestras, se realizó la gráfica que se muestra en la Figura 4.43, los datos se ajustaron a una línea recta y a partir de la ecuación de la línea recta se obtuvo la Ec. (4.1) para el cálculo de la concentración de fármaco en las muestras problema.

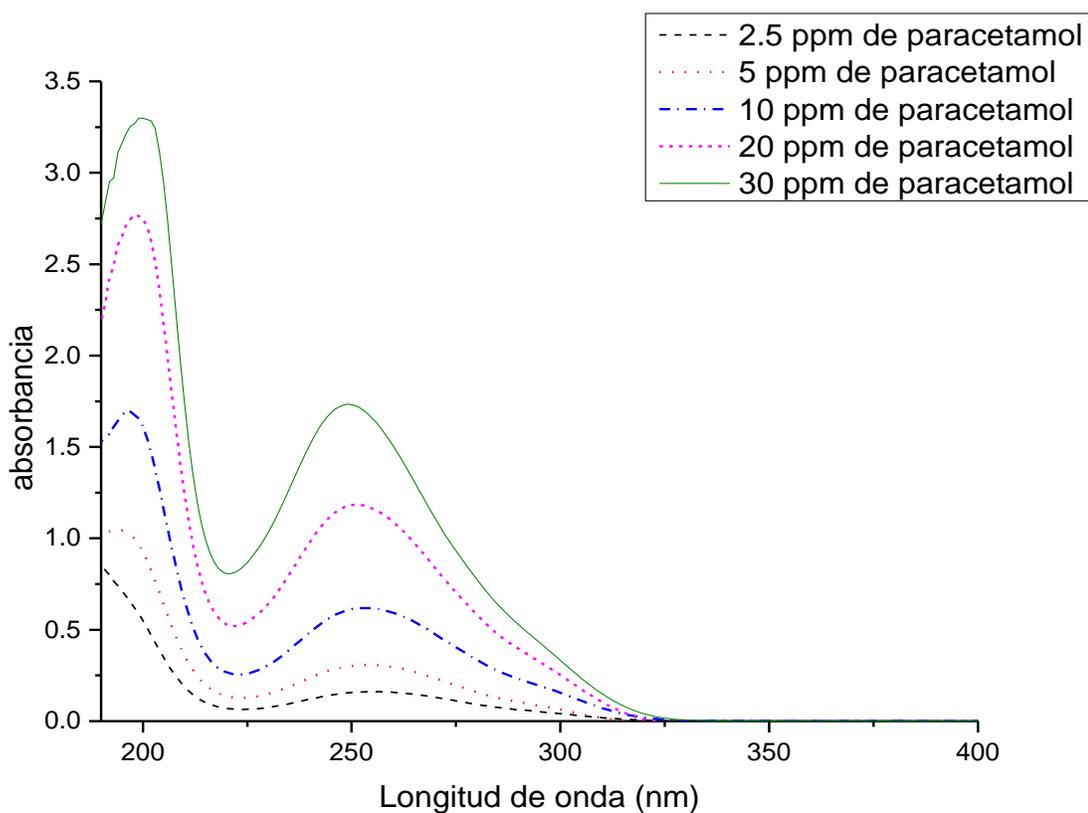


Figura 4.42. Espectros UV-Vis de las muestras patrón de paracetamol.

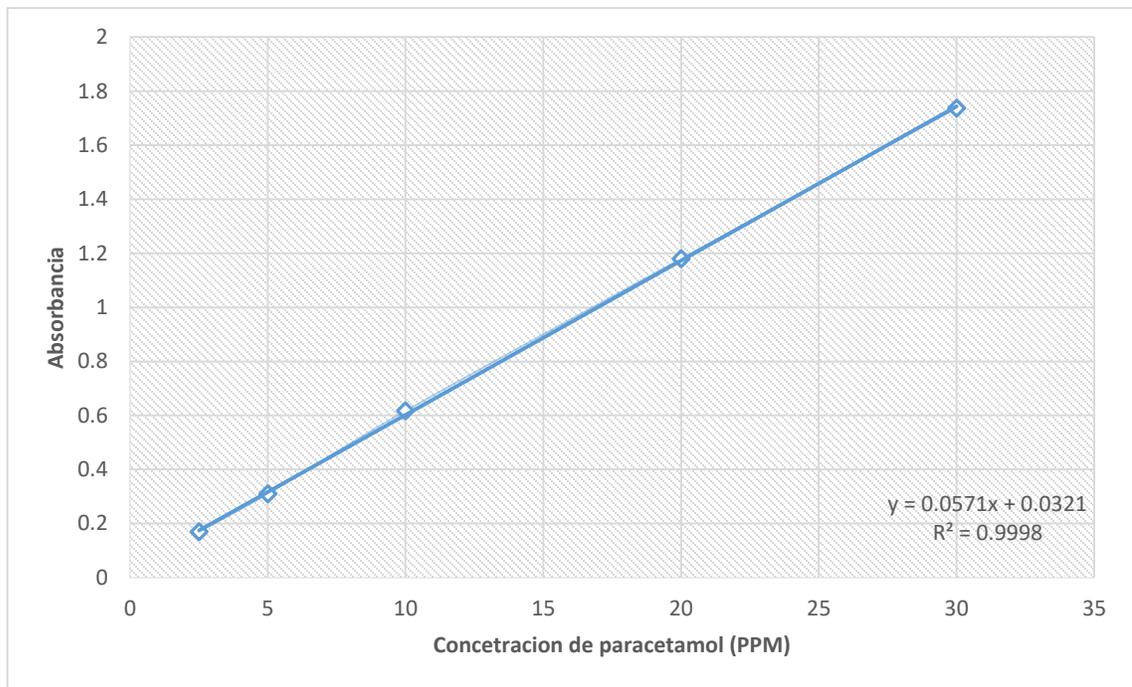


Figura 4.43. Curva de calibración para la cuantificación de paracetamol en microesferas poliméricas.

$$\text{Concentración de paracetamol (PPM)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0321}{0.0571} \quad (4.1)$$

En la Tabla 4.12 se resumen los resultados de la eficiencia de encapsulación de las microesferas de pectina con carga de paracetamol. La eficiencia de encapsulación más baja fue para la formulación P1 con 18.86% de encapsulación, respecto a las dos siguientes formulaciones P2 y P3, los resultados de encapsulación son muy similares y mayores a las formulaciones P1 y P4, la mayor eficiencia de encapsulación se obtuvo para la formulación P3 con 37.13%. La eficiencia de encapsulación de fármaco en todas las formulaciones fue baja comparada con la que otros investigadores reportan. Se pudo observar que conforme se aumenta la cantidad de fármaco se incrementa la eficiencia de encapsulación, hasta llegar a un límite donde a pesar de incrementar la cantidad de paracetamol la eficiencia de encapsulación se mantienen constante, como se puede observar en la formulación P4.

Tabla 4.12. Eficiencia de encapsulación de paracetamol de las microesferas de pectina.

Formulación Pectina	Masa de microesferas de pectina con paracetamol (g)	Paracetamol teórico (g)	Paracetamol encontrado en las microesferas de pectina (g)	% de eficiencia de encapsulación
P1	0.920	0.2	0.0377	18.86
P2	1.020	0.3	0.1036	34.55
P3	1.220	0.4	0.1485	37.13
P4	1.180	0.5	0.1292	25.85

Dashora y col. [56] en la investigación sobre la encapsulación de prednisolona en microesferas de pectina reportan eficiencias de encapsulación de 52.29 hasta 74.85% utilizando el método de emulsión y evaporación de solvente. La prednisolona es un fármaco que se utiliza para el tratamiento de colitis ulcerosa. Por otra parte Baracat y col. [57] reportan eficiencias de encapsulación muy parecidas a las obtenidas en este trabajo; en su investigación para la formulación de nuevos sistemas de liberación utiliza mezclas de pectina/caseína y paracetamol, sintetizadas por el método de coacervación compleja, estos investigadores obtienen eficiencias de encapsulación de 38 a 57%.

Una de las razones de la baja eficiencia de encapsulación es la velocidad de agitación para la formación de la emulsión, muchos investigadores utilizan velocidades de 500 hasta 1500 rpm solo para la emulsión y una velocidad de 400 a 700 rpm para la evaporación del solvente y en este trabajo se utilizaron velocidades de agitación para la formación de la emulsión de 10000 a 13500 rpm y una velocidad de agitación para la evaporación de solvente de 840 rpm, lo que puede producir la adhesión de partículas de paracetamol a las paredes del vaso de precipitados, lo cual resulta en una mala dispersión del fármaco, y por lo tanto, baja eficiencia de encapsulación.

La viscosidad de la pectina en solución puede influenciar la eficiencia de encapsulación, tal como lo menciona Jyothi y col. [58], al aumentar la viscosidad se retarda la difusión del fármaco dentro de las gotas de polímero formadas. Por lo tanto la alta viscosidad de la pectina evita la difusión del fármaco dentro de las gotículas de pectina durante el proceso de formación de las microesferas. Estos mismos investigadores mencionan que la alta temperatura de eliminación de solvente facilita la solidificación de la fase dispersa y facilita la difusión de fármacos o proteínas en la fase continua; lo cual se puede traducir como el aumento de temperatura en la eliminación de solvente facilita la

solidificación de las microesferas de pectina, por lo cual mejora la difusión del paracetamol en el aceite mineral, lo cual provoca una baja encapsulación.

Otro factor a considerar es el peso molecular del polímero, por ejemplo Fu y col. [59] investigaron los efectos del peso molecular sobre la eficiencia de encapsulación y la liberación in vitro de microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con huperzina A, este es un suplemento herbolario que ayuda al tratamiento de la demencia senil; las microesferas fueron preparadas por el método de emulsión y evaporación del solvente. Los resultados que obtuvieron indican que las microesferas de bajo peso molecular (PLGA 10000) tenían mejor eficiencia de encapsulación que las microesferas de medio y alto peso molecular (PLGA 20000 y PLGA 30000), los porcentajes fueron 62.75, 27.52 y 16.63 respectivamente. En el caso de las microesferas de pectina se utilizó pectina de alto peso molecular (180 KDa), lo cual contribuyó a la baja eficiencia de encapsulación, para las microesferas de quitosano se utilizó quitosano de bajo peso molecular y se observó mayor eficiencia de encapsulación que en las microesferas de pectina.

En la Tabla 4.13 se muestran los resultados de la eficiencia de encapsulación de las microesferas de quitosano con carga de fármaco. Se pudo observar un aumento en la eficiencia de encapsulación; para la formulación Q4 se alcanza el 64.33% de encapsulación valor muy superior al máximo encontrado para las microesferas de pectina. Respecto a las otras formulaciones, el valor mínimo encontrado corresponde a las formulaciones Q1 y Q2 presentan valores muy similares que oscilan en 47% de encapsulación; la formulación Q3 tiene una eficiencia del 53.35%. Se observó que al incrementar la cantidad de fármaco aumenta la eficiencia de encapsulación. Los valores encontrados son muy parecidos a los reportados por otros investigadores o en algunos casos superiores.

Tabla 4.13. Eficiencia de encapsulación de paracetamol de las microesferas de quitosano.

Formulación quitosano	Masa de microesferas de quitosano con paracetamol (g)	Paracetamol teórico (g)	Paracetamol encontrado en las microesferas de quitosano (g)	% de eficiencia de encapsulación
Q1	1.513	0.2	0.0948	47.44
Q2	1.556	0.3	0.1409	46.97
Q3	1.680	0.4	0.1583	53.35
Q4	1.720	0.5	0.3028	64.33

Abd-Allah y col. [60] reportan valores de eficiencia de encapsulación de 13.5 a 59.5% para microesferas de quitosano cargadas con lornoxicam sintetizadas por gelación inotrópica con tripolifosfato (TPP). Estos investigadores atribuyen la baja encapsulación a la eficiencia de la reacción entre el quitosano y el (TPP), y a la baja solubilidad del fármaco en la solución de quitosano.

Cosco y col. [61] desarrollaron microesferas de quitosano cargadas con rutin sintetizadas por el método de secado por aspersión obteniendo eficiencias de encapsulación de 61.6 a 75.1%. Observaron que el aumento de carga de rutin en la preparación de las microesferas causa una disminución en el porcentaje de rendimiento, pero un aumento en la concentración de fármaco aumenta la eficiencia de encapsulación; esto es similar a los resultados obtenidos para el quitosano al aumentar la cantidad de fármaco.

Al igual que en las microesferas de pectina existen varios factores que afectan la eficiencia de encapsulación del fármaco en las microesferas de quitosano; como los que ya se han mencionado, velocidad de agitación para la formación de la emulsión, velocidad de evaporación del solvente y la viscosidad. Además de estos factores debe tomarse en cuenta la interacción entre el quitosano, agente entrecruzante (glutaraldehído) y fármaco; ya que al mezclar el quitosano con ácido acético el grupo amina (NH_2) del quitosano se protona lo cual provoca interacciones con el grupo hidroxilo terminal (OH) del glutaraldehído, disminuyendo la interacción con el fármaco lo cual da como resultado la baja eficiencia de encapsulación. La interacción entre el quitosano y el paracetamol es otra de las razones por la cual se obtuvo mayor eficiencia de encapsulación en las microesferas de quitosano en comparación con las microesferas de pectina. Algunos investigadores mencionan que el aumento de quitosano en las formulaciones disminuye la eficiencia de encapsulación debido a la viscosidad y propicia la formación de partículas más grandes por el exceso de polímero [62].

4.2.7 Cinética de liberación

Todos los estudios de liberación de fármaco se realizaron en solución PBS (buffer fosfato salino) $\text{pH} = 7.2-7.4$, en una incubadora con agitación marca Labtech LSI-3016A, la velocidad de agitación usada fue de 100 rpm y la temperatura fue 37 ± 2 °C, cada matraz contenía 50 mL de solución PBS y 0.1 g de microesferas cargadas de fármaco (pectina o quitosano). Para determinar la cantidad de fármaco liberado, se tomaron alícuotas a tiempos específicos, las alícuotas fueron filtradas y

centrifugadas para retirar el polímero y detener la liberación de paracetamol. La cuantificación del fármaco se realizó por espectroscopia UV-Vis. Las pruebas de liberación de fármaco tuvieron una duración de 20 días. Los datos obtenidos de las disoluciones, fueron analizados para investigar el modelo de liberación del fármaco, se analizaron de acuerdo a los siguientes modelos matemáticos: orden cero (Ec. 4.2), primer orden (Ec. 4.3), segundo orden (Ec. 4.4), modelo de Weibull (Ec. 4.5), Higuchi (Ec. 4.6) y Korsmeyer-Peppas (Ec. 4.7) [37-39].

$$M_t = M_0 + Kt \quad ec. 4.2$$

$$\ln M_t = \ln M_0 + K_1 t \quad ec. 4.3$$

$$\frac{1}{M_t} = \frac{1}{M_0} + K_2 t \quad ec. 4.4$$

$$\log[-\ln(1 - M_t)] = b \log(t - T_i) - \log a \quad ec. 4.5$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad ec. 4.6$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} t^n \quad ec. 4.7$$

Donde:

M_t : Cantidad de fármaco disuelto en el tiempo t .

M_0 : Cantidad inicial de fármaco en la solución ($M_0 = 0$).

t : Tiempo.

K : Constante de liberación de orden cero.

K_1 : Constante de liberación de primer orden.

K_2 : Constante de liberación de segundo orden.

M_∞ : Cantidad de fármaco total.

$\frac{M_t}{M_\infty}$: Fracción de fármaco liberado a un tiempo t .

b : Depende del tipo de curva; (caso 1) curva sigmoide ($b = 1$), (caso 2) curva parabólica ($b > 1$) y (caso 3) curva exponencial ($b < 1$).

a : Escala del tiempo del proceso.

T_i : tiempo de retraso ($T_i = 0$).

K_H : Constante de Higuchi.

K_{KP} : Constante de Korsmeyer-Peppas.

n : es el exponente de liberación, que caracteriza el mecanismo de liberación del fármaco y cuyos valores dependen de la forma de la matriz. Si $n \leq 0.45$ la liberación es por un proceso de difusión; si $n \geq 0.89$ la liberación es gobernada por la relajación de las cadenas poliméricas (caso II de transporte); si $0.45 \geq n \geq 0.89$ la liberación se da por la combinación de los procesos de difusión y relajación del polímero (transporte no Fickiano). En la Tabla 4.14 y 4.15 se muestran los datos obtenidos de las disoluciones de las microesferas poliméricas cargadas con fármaco y en la Tabla 4.16 los resultados obtenidos para cada pendiente de la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas poliméricas.

Tabla 4.14. Datos obtenidos de la liberación de paracetamol de las microesferas de pectina.

Tiempo (min)	Horas (h)	Miligramos (mg)	Concentración (mg/L)
0	0	0	0
15	0.25	9.80	196.17
30	0.5	10.64	212.96
90	1.5	11.12	222.56
180	3	11.14	222.82
720	12	12.27	245.47
1080	18	13.40	268.11
1440	24	14.04	280.91
2880	48	14.67	293.47
4320	72	15.03	300.73
5760	96	15.40	308
7200	120	16.00	320.04
8640	144	16.70	334.19

10080	168	17.50	350.12
11520	192	18.82	376.51
12960	216	20.45	409.06
14400	240	22.04	440.83

Tabla 4.15. Datos obtenidos de la liberación de paracetamol de las microesferas de quitosano.

Tiempo (min)	Tiempo (h)	miligramos (mg)	Concentración (mg/L)
0	0	0	0
30	0.5	8.60	172.00
60	1	8.64	172.80
120	2	9.08	181.71
180	3	9.33	186.74
240	4	9.43	188.74
480	8	9.51	190.31
720	12	9.62	192.50
1440	24	9.77	195.41
2880	48	9.79	195.84
4320	72	10.29	205.97
5760	96	10.48	209.63
7200	120	11.07	221.41
8640	144	13.29	265.95
10080	168	16.24	324.96
11520	192	16.45	329.14
12960	216	16.72	334.43
14400	240	16.78	335.67
15840	264	17.27	345.51
17280	288	17.34	346.82
18720	312	17.57	351.49
20160	336	18.10	362.07
21600	360	18.19	363.94
23040	384	18.24	364.94
24480	408	18.37	367.49

Tabla 4.16. Resultados de los modelos matemáticos aplicados en las pendientes de la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas poliméricas.

Número de pendiente y modelo matemático	Microesferas de pectina con paracetamol	Número de pendiente y modelo matemático	Microesferas de quitosano con paracetamol
#1 Orden cero	$M_t = 784.7 t$ $K = 784.7 \text{ mg/h}$ $R^2 = 1$	#1 Orden cero	$M_t = 344 t$ $K = 344 \text{ mg/h}$ $R^2 = 1$
#2 Modelo de Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0.003t + 0.034$ $K_H = 0.003 h^{-\frac{1}{2}}$ $R^2 = 0.9617$	#2 Modelo de Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0.0023t + 0.025$ $K_H = 0.0023 h^{-\frac{1}{2}}$ $R^2 = 0.9635$
#3 Segundo orden	$\frac{1}{M_t} = -4e^{-5}t + 0.178$ $K_2 = -4e^{-5} \text{ mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ $R^2 = 0.9891$	#3 Primer orden	$\ln M_t = 0.0355t + 5.125$ $K_1 = 0.0355 \text{ mg/h}$ $R^2 = 0.9714$
#4 Primer orden	$\ln M_t = 0.0032t + 5.31$ $K_1 = 0.0032 \text{ mg/h}$ $R^2 = 0.9993$	#4 Primer orden	$\ln M_t = 0.008t + 4.438$ $K_1 = 0.008 \text{ mg/h}$ $R^2 = 0.9993$
#5 Korsmeyer - Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0.0011 t - 2.56$ $K_{KP} = 0.0011 h^{-0.8476}$ $n = 0.8476$ $R^2 = 0.9734$	#5 Segundo orden	$\frac{1}{M_t} = -2e^{-6}t + 0.003$ $K_2 = -2e^{-6} \text{ mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ $R^2 = 0.9742$
		#6 Segundo orden	$\frac{1}{M_t} = -5e^{-7}t + 0.002$ $K_2 = -5e^{-7} \text{ mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ $R^2 = 0.9739$

Para la liberación de paracetamol de las microesferas de pectina se realizó un ajuste para cada uno de los modelos matemáticos ya mencionados, debido a la complejidad del sistema se realizó un ajuste por partes como se muestra en la Figura 4.44. La pendiente 1 muestra la liberación ráfaga inicial, que corresponde al 3% del total de fármaco encapsulado, esta cantidad es liberada en un lapso de tiempo de 0.25 h. Para la segunda pendiente el mejor ajuste fue para el modelo matemático de Higuchi, esto indica que la liberación de fármaco en esta etapa está gobernada por la relajación del polímero y por un fenómeno de difusión debido al fármaco que se encontraba en la superficie de las microesferas. Después de las 24 h la liberación es gradual como se puede ver en las pendientes 3 y 4, donde el mejor ajuste matemático fue para el modelo de segundo orden y primer orden respectivamente, este tipo de cinética de liberación está relacionada con la penetración de la

solución PBS en la matriz polimérica [63], lo cual provoca una relajación del polímero y la liberación por difusión del paracetamol. Este doble mecanismo de liberación de fármaco se confirma con el valor de n en la ecuación de Korsmeyer-Peppas que menciona que si este valor se encuentra entre 0.45 y 0.89 la liberación se da por la combinación de los procesos de difusión y relajación del polímero (transporte no Fickiano), el valor encontrado en este trabajo fue de 0.8476. La pendiente 5 muestra que la liberación de paracetamol llegó a la estabilidad, por lo cual ya no hay más liberación de fármaco. En las primeras 24 h se liberó el 29.12% del fármaco encapsulado y el 50% es liberado en aproximadamente 120 h (5 días), la liberación total del fármaco duró 10 días, se siguió monitoreando la solución por 15 días y 1 mes, pero ya no se observó un cambio en la concentración de la solución. En el apéndice A1 se muestran las gráficas de los diferentes modelos matemáticos aplicados para determinar la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas de pectina. La cantidad de paracetamol total liberada fue de 22.04 mg, que corresponde a una eficiencia de encapsulación del 44.08%. Algunos investigadores que trabajan con microesferas de pectina mencionan que entre menor cantidad de fármaco encapsulado la liberación es más lenta debido a que la pectina en pH entre 5.5 y 7.4 se desprotona dando lugar a la formación de grupos carboxilato, estos grupos interactúan con el fármaco dando como resultado una liberación fármaco más lenta. [64, 65].

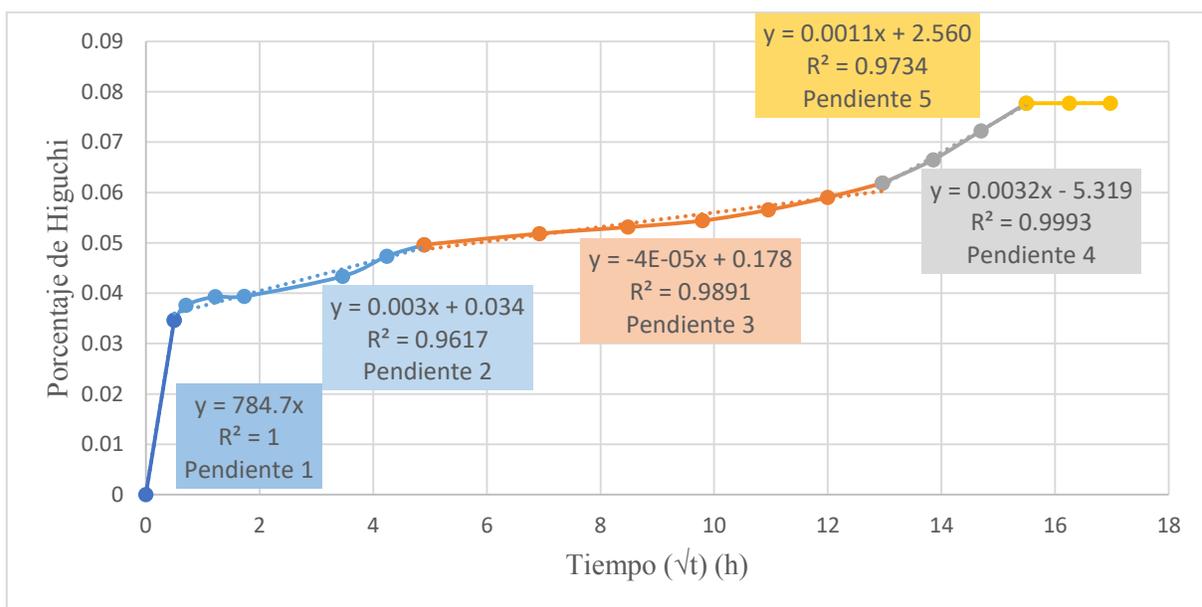


Figura 4.44. Cinética de liberación de las microesferas de pectina cargadas con paracetamol (modelo de Higuchi).

La liberación de fármacos en medio ácido suele ser más rápida que en medio básico, similar a lo sucedido en la liberación de paracetamol de las microesferas de pectina, la cual fue lenta por encontrarse a pH básico; una opción para proteger los medicamentos de cambios de pH es producir sistemas de liberación de doble capa para proteger el fármaco hasta su llegada a la zona blanco. La cinética de liberación en este tipo de sistemas depende en gran medida de las características fisicoquímicas tanto del polímero y del fármaco, así como del medio en el cual se realice la liberación [65, 66].

Chaudhary y col. [67] desarrollaron comprimidos osmóticos microporosos bicapa para la liberación controlada de clorhidrato de dicitlomina y diclofenaco potásico en el colon. La primera capa estaba compuesta por Eudragit L-100 y la segunda capa estaba compuesta por pectina, acetato de celulosa y los fármacos. En los estudios in vitro observaron que la primera capa protege la segunda capa hasta su llegada al colon, ya en el colon la pectina es hidratada por fluidos colónicos y degradada por microorganismos; esta degradación provoca poros a través de los cuales los fármacos son liberados, generando un fenómeno de difusión con una cinética de orden cero. La liberación sostenida de los fármacos solo se logró por un periodo de 24 h. Estos investigadores también utilizaron el modelo matemático de Korsmeyer-Peppas y confirmaron por el valor de n que las formulaciones mostraban una cinética de difusión no Fickiano; estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo. Orhan y col. [68] sintetizaron microesferas de pectina cargadas con hidrocloreuro de ciproflacina por medio de secado por aspersion, y observaron un efecto ráfaga al inicio de las pruebas de liberación, este efecto aumentó a medida que disminuía la relación pectina:fármaco, por lo tanto entre menor cantidad de fármaco y mayor cantidad de polímero la liberación puede ser sostenida por más tiempo, la liberación total del fármaco se llevó en 48 h.

Existen diferentes formas de vehículos de pectina para la administración de fármacos, por ejemplo, Kubo y col. [69] desarrollaron formulaciones de pectina (soles) con la capacidad de gelificar in situ, estas soluciones son administradas por vía oral para la administración sostenida de paracetamol; prepararon soluciones de pectina que contenían citrato sódico, cloruro de calcio y paracetamol; el citrato de sodio se añadió a la formulación para formar un complejo de iones de calcio (Ca^{+2}) con la pectina, estos iones de calcio (Ca^{+2}) en forma compleja son los responsables de mantener la formulación en estado líquido (sol) y de inducir la gelificación de la pectina en

medio ácido (H^+). Estos geles lograron una liberación sostenida de paracetamol por 6 h, y la cinética de liberación se apegó al modelo de Higuchi, lograron observar que el 50% del paracetamol se liberó en 1 h y el resto en un total de 5 h por un proceso de difusión.

El potencial de las microesferas de pectina no solo se limita a la liberación de fármacos algunos autores como Munarin y col. utilizaron microesferas de pectina para inmovilizar células para la regeneración del tejido óseo. Las microesferas de pectina lograron mantener la viabilidad, la actividad metabólica, la morfología y la diferenciación osteogénica de preosteoblastos (MC3T3-E1) por 29 días. Además estudiaron microesferas de pectina-RGD, (pectina modificada con un péptido de secuencia Ar-Gly-Asp) y concluyeron que esta modificación mejoraba la adhesión celular y su proliferación dentro de la microesfera, también lograron observar que las células eran capaces de organizar estructuras tridimensionales fuera de las microesferas produciendo una matriz extracelular mineralizada. Con estos resultados sugieren que la pectina puede ser propuesta como un vehículo celular inyectable para la regeneración de tejido óseo.

Referente a las microesferas de quitosano, el modelo cinético de la liberación de paracetamol se muestra en la Figura 4.45. La pendiente 1 muestra la liberación ráfaga inicial que corresponde al 2.6% del total de paracetamol encapsulado, este porcentaje de fármaco se libera en un lapso de 0.5 h. La pendiente 2 se ajustó al modelo de Higuchi lo cual indica que la liberación está gobernada por un proceso doble, penetración del líquido buffer y la liberación del paracetamol por difusión. La pendiente 3 y 4 se ajustan al modelo matemático de primer orden, este comportamiento se debe a un proceso de liberación por difusión [71]. El proceso de difusión se confirma con el valor de n en la ecuación de Korsmeyer-Peppas, cuando el valor de $n < 0.45$, indica un proceso de difusión, en este trabajo el valor de n fue de 0.16. La pendiente 5 se ajustó al modelo matemático de segundo orden esto indica que nuevamente se combinan dos procesos, la penetración del líquido buffer en las microesferas o el hinchamiento de éstas y la liberación de fármaco por difusión. Por último la pendiente 6 muestra que la liberación de paracetamol se estabilizó, por lo tanto ya no se liberó más fármaco. En las primeras 24 h se liberó el 23.10% del fármaco encapsulado y el 50% de éste fue liberado en 192 h (8 días), la liberación total de paracetamol se dio en 17 días; se continuó monitoreando la solución por un mes pero no se detectaron cambios en la concentración de la solución. En el apéndice A2 se muestran las gráficas de los diferentes modelos matemáticos aplicados para determinar la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas de quitosano.

La cantidad de paracetamol total liberada fue de 18.37 mg, que corresponde a una eficiencia de encapsulación del 62.56%. La liberación de fármaco a partir de microesferas de quitosano se produce después del hinchamiento de las microesferas, al entrecruzar el quitosano con glutaraldehído durante la síntesis aumenta la hidrofobicidad de las microesferas aumentando el tiempo de hinchamiento, por lo cual, se prolonga el tiempo de liberación de fármaco [71]. Esta es la razón por la cual se logra la liberación sostenida de paracetamol por 17 días, este periodo de tiempo es muy superior al encontrado para las microesferas de pectina.

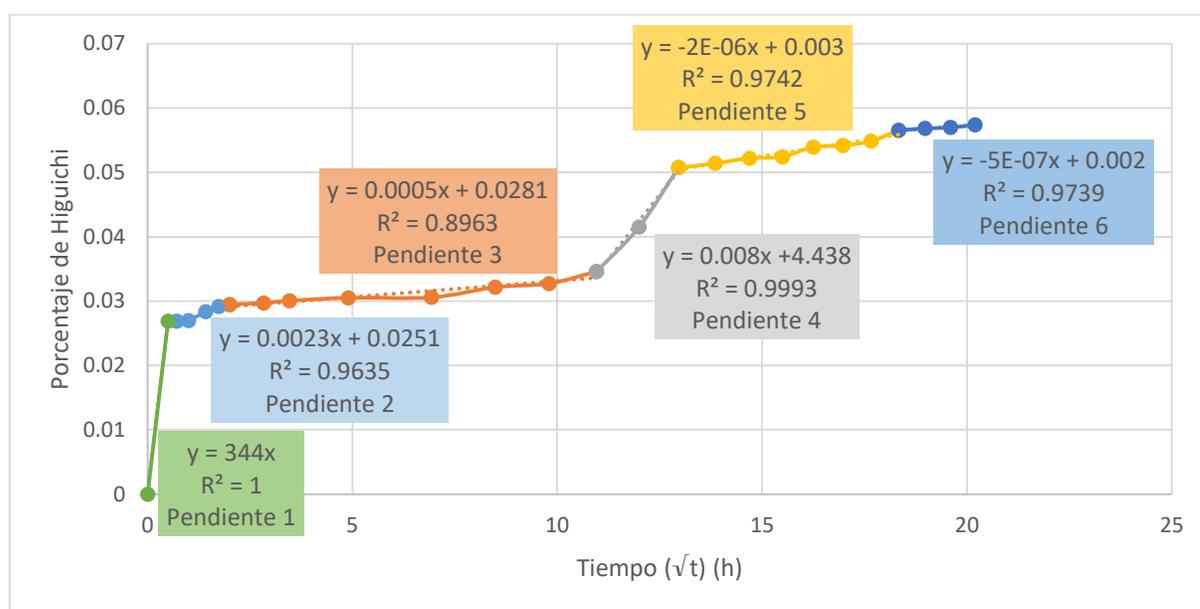


Figura 4.45. Cinética de liberación de las microesferas de quitosano cargadas con paracetamol (modelo de Higuchi).

Patel y col. [71] desarrollaron microesferas de quitosano para la liberación sostenida de nicorandil para reducir la frecuencia de dosificación. Las microesferas fueron sintetizadas por el método de emulsión. En el estudio de liberación de fármaco encontraron que el modo de liberación del nicorandil fue por difusión, observaron el efecto ráfaga debido a partículas de fármaco que se encontraban en la superficie de las microesferas. La liberación de nicorandil se dio en un periodo de 12 h tiempo muy inferior al obtenido en este trabajo. Estos investigadores concluyen que la velocidad de liberación de fármaco a partir de este tipo de matriz disminuye con el aumento de la concentración de quitosano, al aumentar la cantidad de polímero la pared de las microesferas

aumenta su espesor, esto se refleja en el aumento de tiempo para la penetración de fluidos en el interior de las microesferas, por lo tanto se requiere de más tiempo para la difusión del fármaco.

Varios investigadores que estudian el efecto de la liberación de fármacos de matrices poliméricas, han demostrado que la liberación de fármacos se ve afectada principalmente por tres factores, hinchamiento de la matriz polimérica, porosidad y solubilidad del fármaco. En algunos casos el aumento de la concentración de fármaco en la síntesis de microesferas disminuye la liberación de éste desde la matriz [72, 73].

Mothilal y col. [74] desarrollaron microesferas de quitosano para la liberación controlada de aceclofenaco. Las microesferas se prepararon por la técnica de reticulación iónica. El comportamiento de la liberación de aceclofenaco in vitro mostró un efecto ráfaga, liberando el 19.24% en 1 h, en las siguientes 6 h se liberó el 40.23%. El mejor modelo para la liberación de fármaco fue el de Higuchi con un coeficiente de correlación de 0.9890, este modelo indica que la liberación de aceclofenaco desde la microesferas de quitosano se da por un fenómeno de difusión y desdoblamiento del polímero.

Pandey y col. [75] produjeron microesferas de alginato-quitosano cargadas con tres fármacos (rifampicina, isoniazida y pirazinamida), para la administración oral para el tratamiento de la tuberculosis en conejillos de indias. Este estudio reveló que la administración oral de una sola dosis de microesferas, era capaz de mantener niveles sostenidos de fármaco en el plasma del conejillo de indias por un periodo de 7 días y en los órganos hasta por 9 días. Por lo cual, la vida media y el tiempo medio de residencia de los fármacos se incrementó de 13 a 15 veces comparado con una dosificación tradicional. Además la administración de una dosis de microesferas a intervalos de 10 días produjo el aclaramiento de bacilos (disminución de bacterias dañinas), este resultado es equivalente al tratamiento convencional durante 6 semanas. En este tipo de microesferas, el quitosano se utiliza para retardar la erosión del alginato y para controlar la liberación de fármaco.

Realizando una comparación de las microesferas de pectina y quitosano de este trabajo se pudo observar que se obtiene una mejor liberación sostenida de paracetamol de las microesferas de quitosano, esta se logró por un periodo de 17 días, en cambio para las microesferas de pectina la liberación de paracetamol tuvo una duración de 10 días. Ambos periodos de tiempo son superiores a los reportados por otros investigadores. Por lo tanto ambos polímeros son adecuados para la liberación sostenida de fármacos. Las microesferas de quitosano cargadas de fármacos hidrófobos

pueden lograr eficiencias de encapsulación superiores y la liberación de este tipo de fármacos se puede prolongar por largos periodos de tiempo debido a la combinación de la hidrofobicidad del quitosano reticulado y el fármaco.

4.2.8 Porcentaje de pérdida de humedad

Como se muestra en las Tablas 4.17 y 4.18, la humedad que quedó en las microesferas de pectina y quitosano después del lavado con hexano es relativamente baja. Por lo tanto la evaporación del solvente en la síntesis de las microesferas es casi total, lo que asegura la estabilidad del polímero y del paracetamol durante su almacenamiento.

Tabla 4.17. Resultados de la pérdida de humedad de las microesferas de pectina con y sin paracetamol.

Formulación Pectina	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de pérdida de humedad
PL12	1.034	1.015	1.83
P1	0.933	0.920	1.39
P2	1.050	1.020	2.85
P3	1.250	1.220	2.4
P4	1.210	1.180	2.47

Tabla 4.18. Resultados de la pérdida de humedad de las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.

Formulación Quitosano	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de pérdida de humedad
QL2	1.560	1.490	4.48
Q1	1.600	1.513	4.18
Q2	1.626	1.556	4.30
Q3	1.760	1.680	4.54
Q4	1.800	1.720	4.44

4.2.9 Porcentaje de rendimiento

En el estudio del porcentaje de rendimiento se observó que las microesferas de pectina (Tabla 4.19) tienen un rendimiento bajo, el rendimiento promedio para las microesferas de pectina fue de 60.32%, comparando este valor con el reportado por otros investigadores es bajo; Banerjee y col. [76] reportan valores de rendimiento de 76.10 a 88.08%. En contraste, para las microesferas de quitosano (Tabla 4.20) se observó mayor rendimiento, el rendimiento promedio de las microesferas de quitosano fue de 82.80%. Raval y col. [77] reportan valores de rendimiento de 66 a 89%, valores similares a los obtenidos en este trabajo. La diferencia de rendimientos entre las microesferas

poliméricas se debió principalmente a las velocidades de agitación utilizadas en la formación de la emulsión, para la pectina se utilizó la velocidad de agitación más alta (13500 rpm) para lograr una emulsión homogénea, ya que debido a la alta viscosidad de la pectina no se lograba una emulsión homogénea a la velocidad de emulsión del quitosano (10000 rpm); esta velocidad de agitación pudo provocar la adherencia del polímero a las paredes del vaso de precipitado, dando como resultado un menor rendimiento para las microesferas de pectina.

Tabla 4.19. Resultados del porcentaje de rendimiento de las microesferas de pectina con y sin paracetamol.

Formulación Pectina	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de rendimiento
PL12	1.5	1.015	67.66
P1	1.7	0.920	54.11
P2	1.8	1.020	56.66
P3	1.9	1.220	64.21
P4	2	1.180	59.00

Tabla 4.20. Resultados del porcentaje de rendimiento de las microesferas de quitosano con y sin paracetamol.

Formulación Quitosano	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de rendimiento
QL2	1.678	1.490	88.79
Q1	1.878	1.513	80.56
Q2	1.978	1.556	78.66
Q3	2.078	1.680	80.84
Q4	2.17	1.720	78.97

4.2.10 Potencial Z

El potencial Z da una estimación de la carga neta real de las partículas más la carga asociada con cualquiera de los iones que se mueven junto con la partícula en el campo eléctrico [78]; se puede utilizar para realizar una predicción sobre la estabilidad de dispersiones de coloides, un alto potencial Z ($> |30| mV$) propicia una repulsión eléctrica que evita la agregación de partículas [79].

En la Tabla 4.21 se muestran los resultados obtenidos para el paracetamol y las microesferas poliméricas; se analizaron 20 muestras de cada polímero y de paracetamol. La carga electrostática para el paracetamol fue de -178.80 SD 26.3; las microesferas poliméricas libres de fármaco presentan cargas electrostáticas positivas; algunos autores también reportan cargas positivas, por

ejemplo, Sun y col. [80] encontraron valores de 25.97 mV para microesferas de quitosano; además mencionan que el valor de la carga electrostática depende del grado de reticulación del quitosano; cuando la reticulación es total existe un aumento en la carga electrostática de la partícula. Subudhi y col. [79] encontraron valores negativos de carga electrostática para partículas de pectina (-27.5 mV), atribuyen este valor a la saturación parcial de grupos de ácido galacturónico de la pectina; por lo tanto el valor positivo obtenido en este trabajo es debido a la casi completa saturación de los grupos de ácido galacturónico de la pectina. Los valores negativos encontrados para las microesferas con carga de fármaco son debido a las partículas de paracetamol que comienzan a liberarse en el momento en que las microesferas se ponen en contacto con la solución SBF.

Tabla 4.21. Resultados de potencial Z para el paracetamol y microesferas poliméricas.

	Paracetamol	Microesferas de pectina sin fármaco (PL12)	Microesferas de pectina con fármaco (P3)	Microesferas de quitosano sin fármaco (QL2)	Microesferas de quitosano sin fármaco (Q4)
Potencial	-178.80 SD	112 SD 31.3	-115.32 SD	130.09 SD	-182.35 SD
z	26.3		13.9	24.4	19.9

Mediante el control adecuado de las variables de síntesis del método de emulsión y evaporación de solvente, se logró sintetizar microesferas de polímeros naturales (pectina y quitosano) cargadas con paracetamol. Estas microesferas poliméricas presentaron propiedades adecuadas como buena morfología, tamaño de partícula uniforme, superficie no porosa y biodegradabilidad; estas características las convirtieron en un vehículo adecuado para la liberación prolongada de paracetamol y para su aplicación médica.

5. CONCLUSIONES

- El método de emulsión y evaporación de solvente es eficaz para la obtención de microesferas de polímeros biodegradables, ya que se obtiene microesferas de forma esférica y tamaño de partícula uniforme, con porosidad interna que no alcanzan la superficie.
- La pectina y el quitosano son polímeros adecuados para la encapsulación de medicamentos, ya que se logró encapsular el paracetamol, el cual es un medicamento difícil de encapsular debido a su alto carácter hidrófilo.
- Aunque la eficiencia de encapsulación resultó baja (37.13% para la pectina y 64.33% para el quitosano), se pueden realizar algunas modificaciones del método de síntesis para lograr eficiencias más altas; otra opción es realizar microesferas con doble capa que ayudaría a mejorar la eficiencia de encapsulación y además protegería el fármaco de cambio de pH.
- Los tamaños de partícula obtenidos (25 μm para la pectina y 0.6 μm para el quitosano) son adecuados para diversas aplicaciones, tales como la aplicación nasal, ocular, subcutánea y oral.
- Se demostró el potencial de las microesferas de pectina y de quitosano como vehículos para el transporte de fármacos ya que el perfil de liberación de fármaco de las microesferas de pectina es adecuado para la liberación sostenida de paracetamol por 10 días y el de las microesferas de quitosano es por 17 días, ambos en pH básico, este resultado es prometedor ya que se puede pensar en encapsular medicamentos de carácter hidrófobo, esperando una eficiencia de encapsulación alta y un perfil liberación lento, este tipo de liberación ayudaría a reducir la dosis y la frecuencia de ingesta de medicamentos que presentarán un gran número de efectos secundarios en el organismo.

RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO

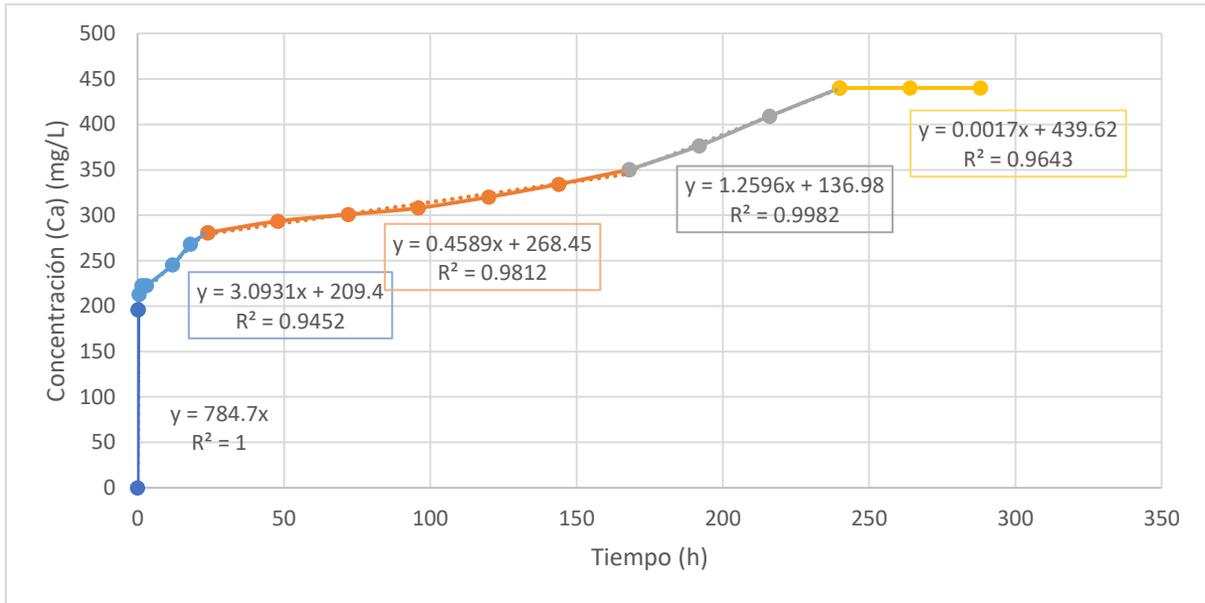
Se recomienda modificar el proceso de síntesis de las microesferas poliméricas para obtener mayor eficiencia de encapsulación de fármaco y mayor rendimiento. La disminución de la velocidad de agitación para la formación de la emulsión ayudaría a facilitar la difusión del fármaco en las microesferas y la disminución de la velocidad de agitación para la evaporación del solvente disminuiría la pérdida de fármaco y polímero debido a la agitación violenta, de este modo también se aumentaría el porcentaje de rendimiento, volviendo el proceso de síntesis más rentable. Otro factor que se puede modificar para aumentar la eficiencia de encapsulación, es la disminución de la cantidad de polímero, ya que al disminuir éste, la viscosidad disminuye y la difusión del fármaco en la microesferas es mayor, además entre menor cantidad de polímero el tamaño de partícula disminuye, aumentando las aplicaciones de las microesferas poliméricas. También se sugiere el cambio de la fase aceitosa o fase continua, para evitar el lavado de las microesferas con hexano y evitar residuos de aceite en las microesferas. El uso de un liofilizador, ayudaría a volver el proceso más eficiente y se evitaría el uso de solventes como hexano, acetona, diclorometano, metanol etc.

Como trabajo futuro las microesferas poliméricas serán adheridas a andamios de biovidrio para la regeneración ósea, las microesferas poliméricas serán cargadas con factores de crecimiento o antibióticos. Actualmente las microesferas de quitosano han sido adheridas a andamios porosos de biovidrio CEL2. Éstas microesferas fueron incorporadas a las paredes del andamio por inmersión; los andamios son preparados mediante el método combinado de metalurgia de polvos y espumado de polímeros usando el biovidrio CEL2, el cual se prepara por la ruta convencional de fusión y temple. Los resultados preliminares indican que los andamios tienen una microestructura y propiedades mecánicas apropiadas para su uso como implantes óseos, y las microesferas tienen una morfología y tamaño adecuado para ser incorporadas dentro de una matriz tridimensional [81].

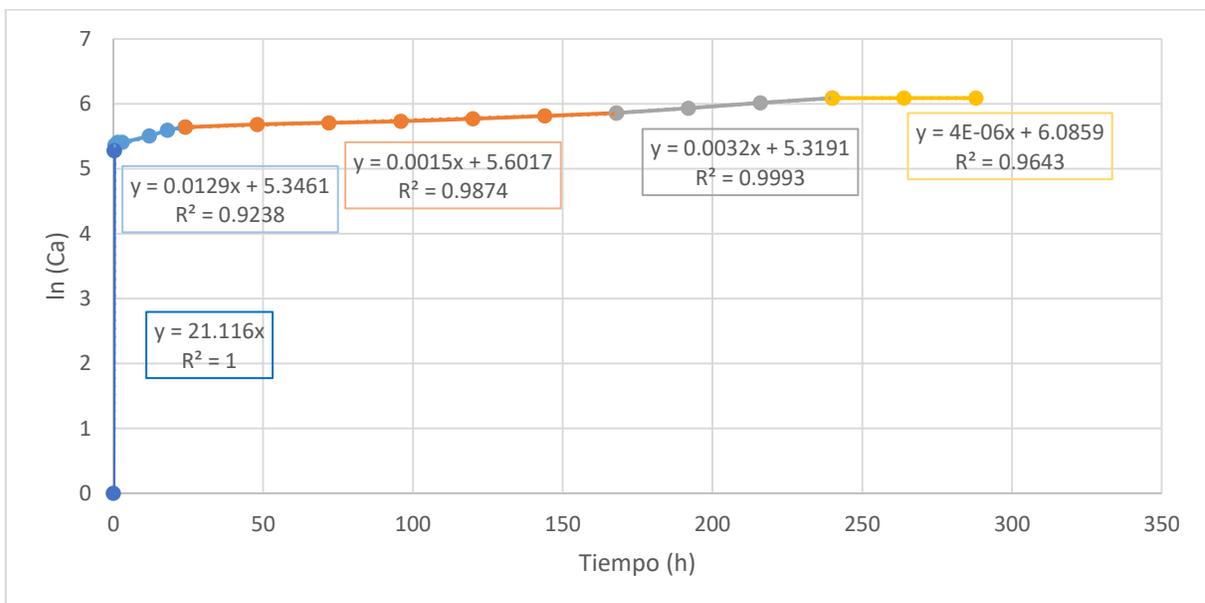
APÉNDICE A1

Modelos matemáticos aplicados a la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas de pectina:

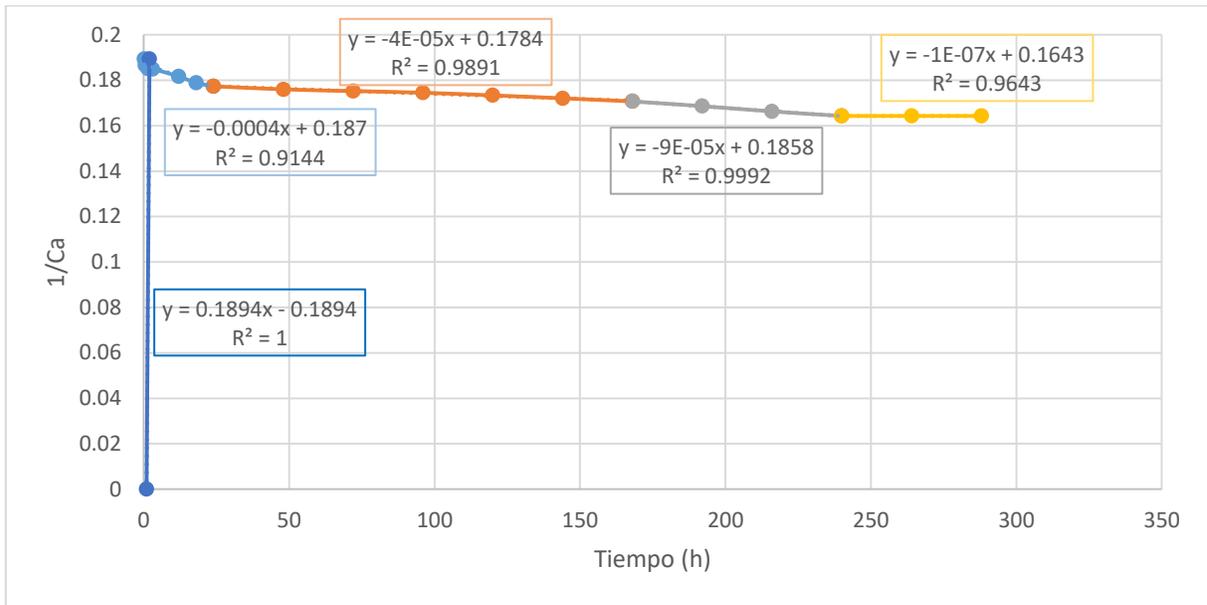
- Orden cero



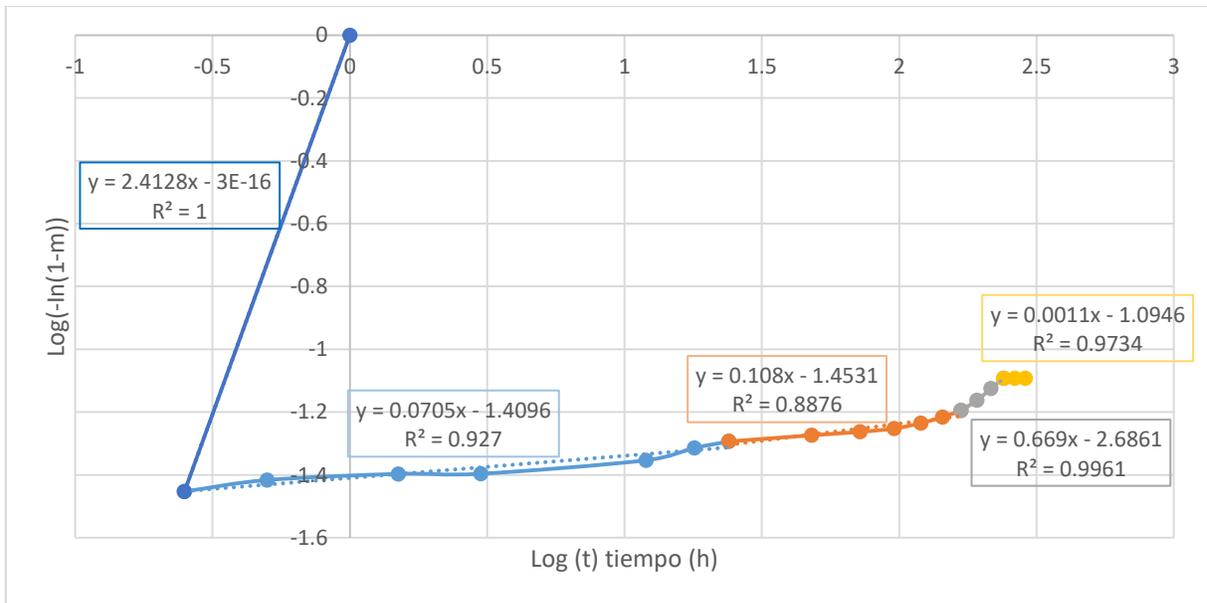
- Primer orden



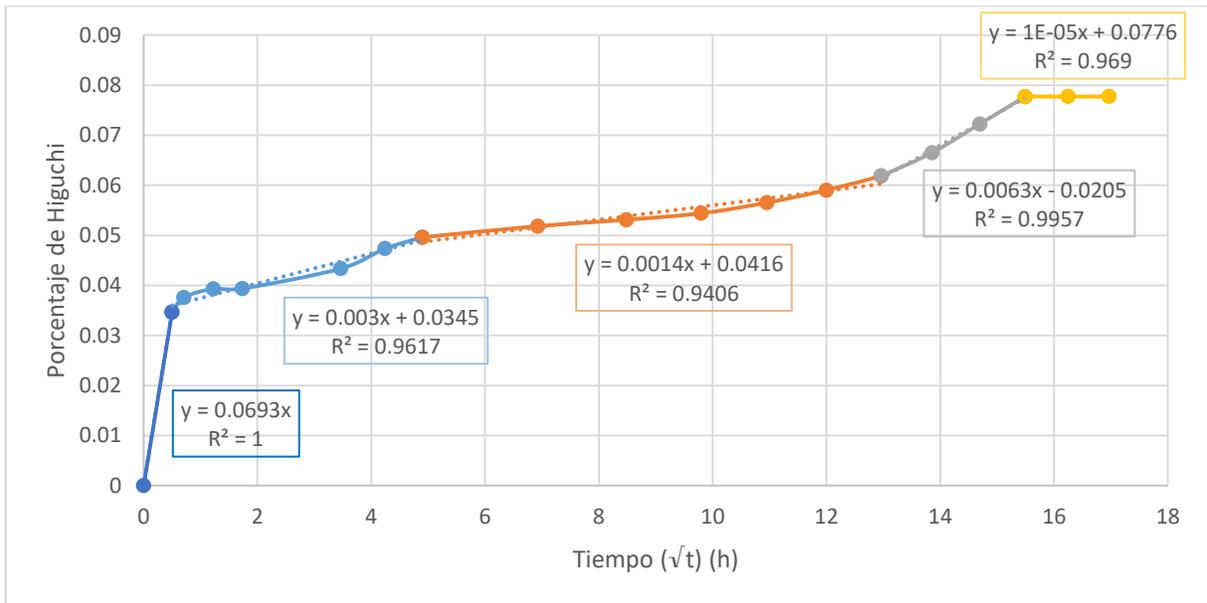
- Segundo orden



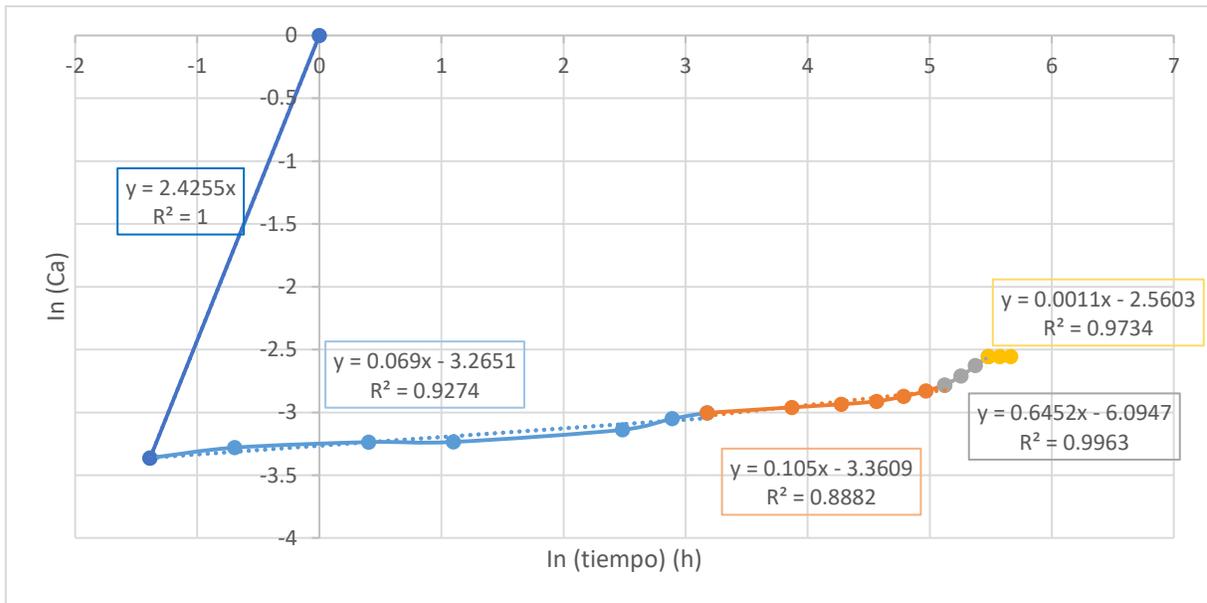
- Modelo de Weibull



- Modelo de Higuchi



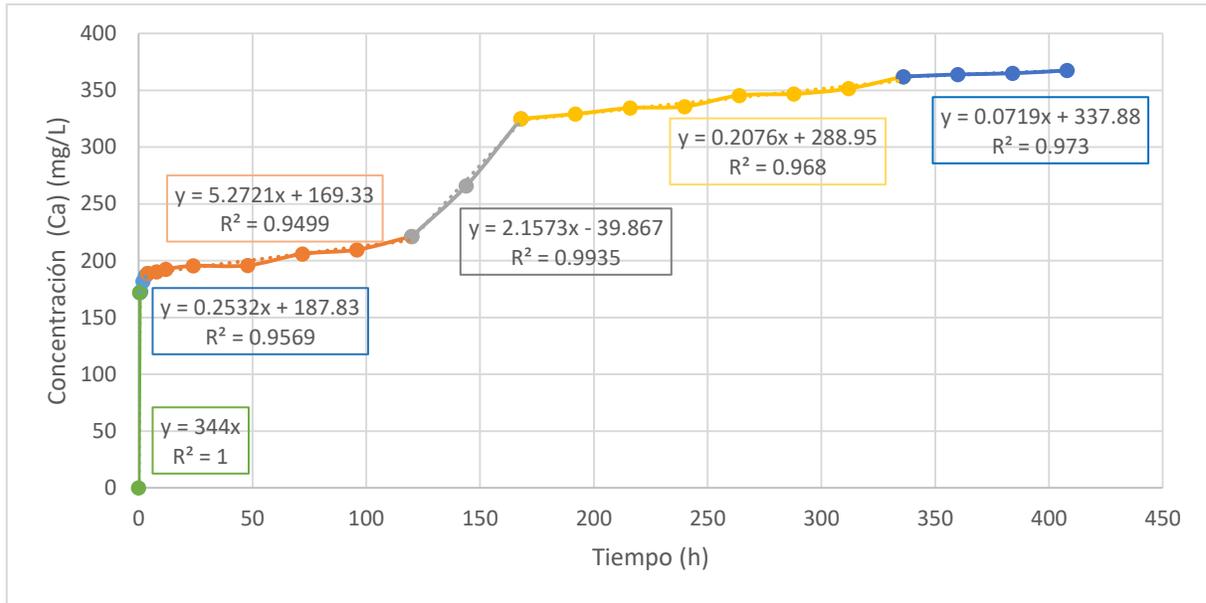
- Modelo de Korsmeyer – Peppas



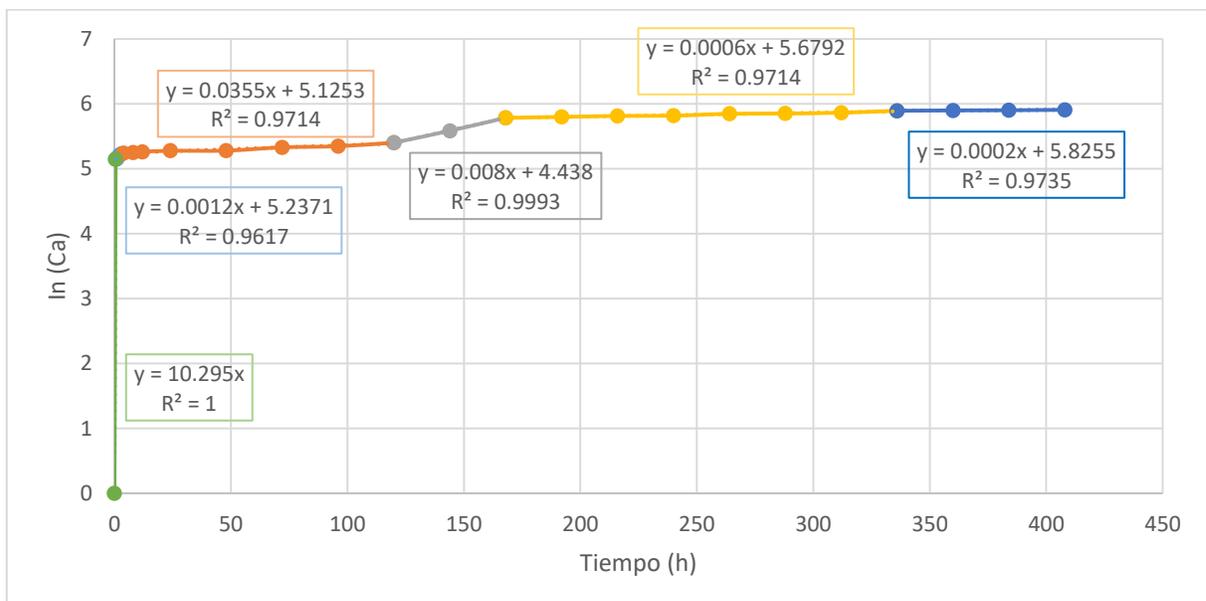
APÉNDICE A2

Modelos matemáticos aplicados a la cinética de liberación de paracetamol de las microesferas de quitosano:

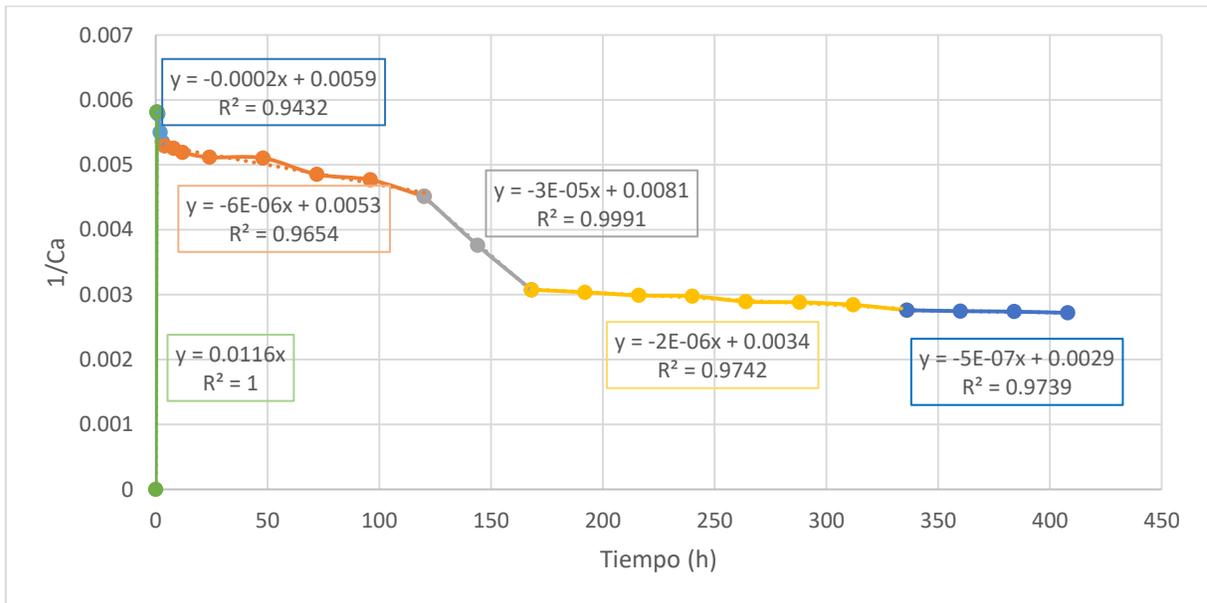
- Orden cero.



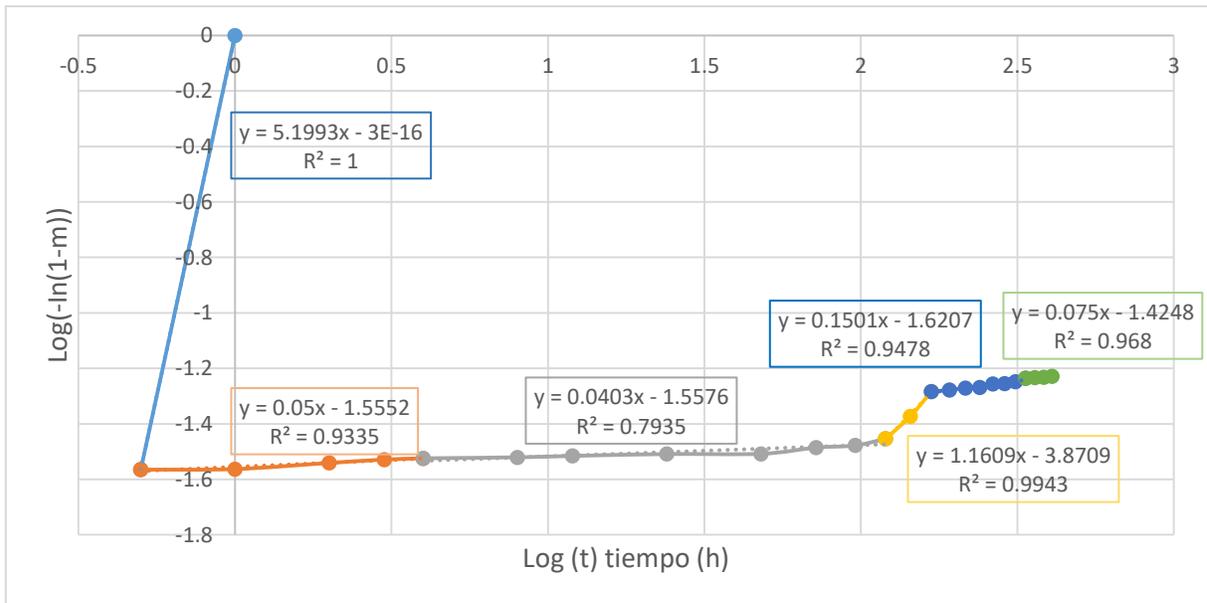
- Primer orden



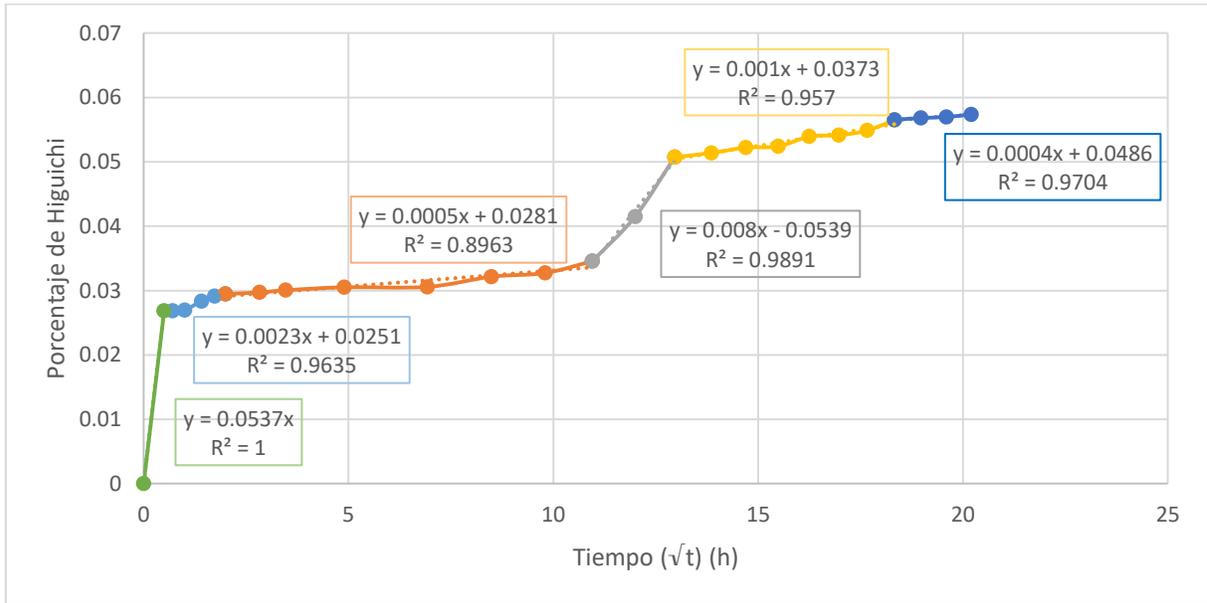
- Segundo orden



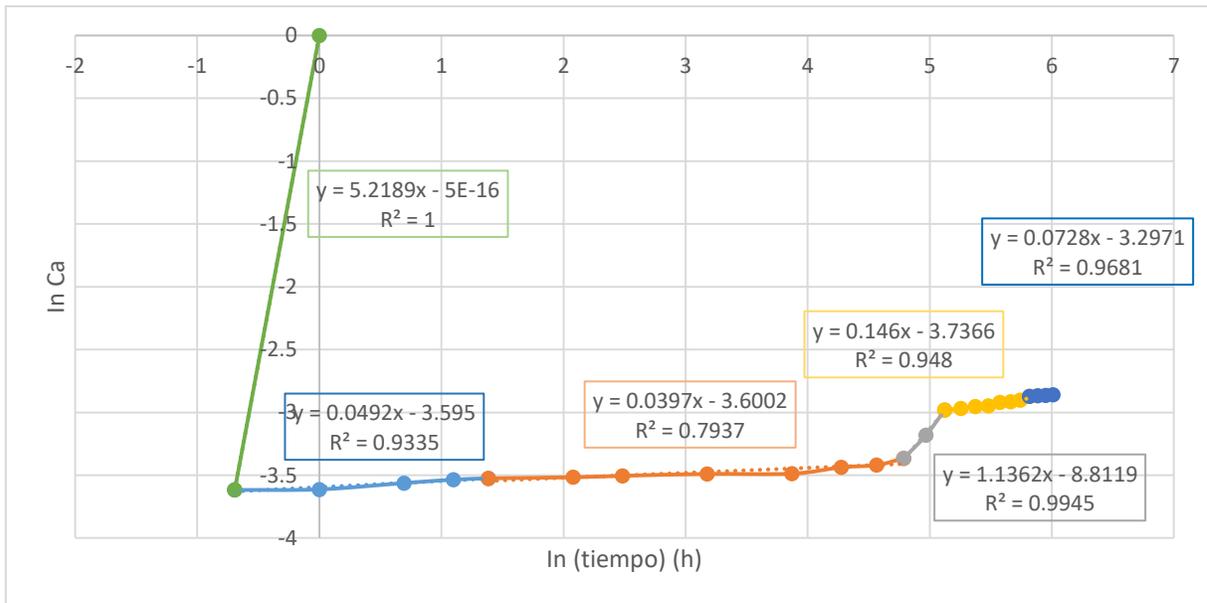
- Modelo de Weibull



- Modelo de Higuchi



- Modelo de Korsmeyer – Peppas



REFERENCIAS

- [1] ZWEERS M L T. Biodegradable nanoparticles for intravascular drug delivery. Thesis Doctoral Dissertation. University of Twente. Enschede, The Netherlands 2003.
- [2] CHAMBERLAIN P, SYMES K C. Polymeric formulations of pest control agents Encapsulation and Controlled Release. Woodhead Publishing. Place. Published. 2005.
- [3] PAVANETTO F, CONTI B, GENTA I, GIUNCHEDI P. Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *International Journal of Pharmaceutics*. 84(2), 151-159, 1992.
- [4] BILLMEYER F W. Textbook of polymer science segunda Barcelona, España 2004.
- [5] MUÑOZ S. Estructura y caracterización de los polímeros. ETSEIB CPDA. 2002.
- [6] FAMBRI L, MIGLIARESI C, KESENCI K, PISKIN E. Biodegradable Polymers. *Integrated Biomaterials Science*. Springer US. Place. Published. 2002.
- [7] NAIR L S, LAURENCIN C T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 32(8-9), 762-798, 2007.
- [8] GUNATILLAKE P, MAYADUNNE R, ADHIKARI R. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnology Annual Review*. Elsevier. Place. Published. 2006.
- [9] MITRA A, DEY B. Chitosan Microspheres in Novel Drug Delivery Systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(4), 355-366, 2011.
- [10] DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE R M, CHIELLINI E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 36(8), 981-1014, 2011.
- [11] RINAUDO M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31(7), 603-632, 2006.
- [12] DHAWAN S, SINGLA A K, SINHA V R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech*. 5(4), 122-128, 2004.
- [13] DE SOUZA J R R, DE CARVALHO J I X, TREVISAN M T S, DE PAULA R C M, RICARDO N M P S, FEITOSA J P A. Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin. *Food Hydrocolloids*. 23(8), 2278-2286, 2009.
- [14] MAY C D. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*. 12(1), 79-99, 1990.
- [15] TORRES N. Determinación del potencial nutritivo y nutraceutico de cuatro cultivares de tomate de arbol. Ph. Doctoral Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior de Politecnico de Chimborazo. Riobamba, Ecuador 2006.
- [16] WICKER L, KIM Y, KIM M-J, THIRKIELD B, LIN Z, JUNG J. Pectin as a bioactive polysaccharide – Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*. 42, Part 2(251-259), 2014.
- [17] RAMOS PICOS D, GÓMEZ CARRIL M, FERNÁNDEZ MENA D, NÚÑEZ DE LA FUENTE L. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Revista Cubana de Farmacia*. 34(70-77), 2000.
- [18] SÁEZ V, HERNÁNDEZ E, SANZ L, KATIME I. Liberación controlada de fármacos: micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5(2), 87-101, 2004.
- [19] WATKINS S, SRIVASTAVA G, NIKALJE M, DOSHI J, KUMAR R, RAVETKAR S, DOSHI P. Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation. *Carbohydrate Polymers*. 128(188-198), 2015.
- [20] OLIVERA A D, BARREIRO M F, LOPRETTI M. Microesferas de quitosano como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos. *Revista iberoamericana de polímeros*. 13(5), 238-244, 2012.

- [21] VAIDYA A, JAIN S, AGRAWAL R K, JAIN S K. Pectin–metronidazole prodrug bearing microspheres for colon targeting. *Journal of Saudi Chemical Society*. 19(3), 257-264, 2015.
- [22] MAHAJAN H S, TATIYA B V, NERKAR P P. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. *Powder Technology*. 221(168-176), 2012.
- [23] GIUNCHEDI P, CONTE U, CHETONI P, SAETTONE M F. Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 9(1), 1-7, 1999.
- [24] LÓPEZ HERNÁNDEZ O D, GÓMEZ CARRIL M. Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*. 42(0-0), 2008.
- [25] SINHA V R, TREHAN A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*. 90(3), 261-280, 2003.
- [26] HERNÁNDEZ J R, PENICHE C, SAEZ V. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnología aplicada*. 24(2), 98-107, 2007.
- [27] RAMOS PICOS D, GÓMEZ CARRIL M, FERNÁNDEZ MENA D. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Revista Cubana de Farmacia*. 35(126-135), 2001.
- [28] BODMEIER R, MCGINITY J W. Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics*. 43(1), 179-186, 1988.
- [29] ACOFARMA. Paracetamol FDS Ph. Eur. F. d. d. s. C. a. r. C. N. 1907/2006. Europa 2006.
- [30] VARGAS M P. Intoxicación por acetaminofén en adulto. *Medicina Legal de Costa Rica*. 33(1), 1-7, 2016.
- [31] ORTIZ V, LOPEZ M, ARROITA A, AGUILERA L, AZKUE J, TORRE F, ISLA A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol in pain treatment. *Gac Med Bilbao*. 104(148-155), 2007.
- [32] BRAVO V, ROMÁN M, BETTINI M, CERDA P, MIERES J J, PARIS E, RÍOS J C. Caracterización de la ingestión por sobredosis de paracetamol: Reporte de un centro de información toxicológica chileno. *Revista médica de Chile*. 140(313-318), 2012.
- [33] PEPPAS N A, NARASIMHAN B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 190(75-81), 2014.
- [34] ARIFIN D Y, LEE L Y, WANG C-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58(12–13), 1274-1325, 2006.
- [35] SIEPMANN J, SIEPMANN F. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 364(2), 328-343, 2008.
- [36] KUMAR S, ARIF A, BARIK B, SENAPATI P. Microspheres and in vitro evaluation of Eudragit microspheres of stavudine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 369-375, 2005.
- [37] COSTA P, SOUSA LOBO J M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13(2), 123-133, 2001.
- [38] TAMIZHRASI S, SHUKLA A, SHIVKUMAR T, RATHI V, RATHI J C. Formulation and evaluation of lamivudine loaded polymethacrylic acid nanoparticles. *International Journal of PharmTech Research*. 1(3), 411-415, 2009.
- [39] KORSMEYER R W, LUSTIG S R, PEPPAS N A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. I. Mathematical modeling. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 24(2), 395-408, 1986.
- [40] VARSHOSAZ J, SADRAI H, ALINAGARI R. Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. *Journal of Microencapsulation*. 21(7), 761-774, 2004.
- [41] CARBINATTO F M, DE CASTRO A D, CURY B S F, MAGALHÃES A, EVANGELISTA R C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *International Journal of Pharmaceutics*. 423(2), 281-288, 2012.

- [42] MISHRA R K, DATT M, BANTHIA A K. Synthesis and Characterization of Pectin/PVP Hydrogel Membranes for Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech.* 9(2), 395-403, 2008.
- [43] VONGCHAN P, SAJOMSANG W, , KASINRERK W, SUBYEN D, KONGTAWOLET P. Anticoagulant activities of chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi-heterogeneous conditions. *Science Asia.* 29(115-120), 2003.
- [44] NICHOLS G, FRAMPTON C S. Physicochemical Characterization of the Orthorhombic Polymorph of Paracetamol Crystallized from Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 87(6), 684-693, 1998.
- [45] MUHAIMIN. Study of microparticle preparation by the solvent evaporation method using focused beam reflectance measurement (FBRM). Department of Biology, Chemistry and Pharmacy, University of Berlin. Indonesia 2013.
- [46] LEE C-M, KIM D-W, LEE H-C, LEE K-Y. Pectin microspheres for oral colon delivery: Preparation using spray drying method and in vitro release of indomethacin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 9(3), 191-195, 2004.
- [47] GENTA I, COSTANTINI M, ASTI A, CONTI B, MONTANARI L. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers.* 36(2), 81-88, 1998.
- [48] NAYAK U Y, GOPAL S, MUTALIK S, RANJITH A K, REDDY M S, GUPTA P, UDUPA N. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. *Journal of Microencapsulation.* 26(3), 214-222, 2009.
- [49] KUMAR M, MISHRA R K, BANTHIA A K. Development of pectin based hydrogel membranes for biomedical applications. *International Journal of Plastics Technology.* 14(2), 213, 2011.
- [50] HERNÁNDEZ COCOLETZI H, ÁGUILA ALMANZA E, FLORES AGUSTIN O, VIVEROS NAVA E L, RAMOS CASSELLIS E. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío.* 22(57-60), 2009.
- [51] BASHPA P, BIJUDAS K, ANJALI M T, ARCHANA P K, MURSHIDA K P, NOUFALA K B, AMRITHA R K, VIMISHA K. Polymorphism of paracetamol: A comparative study on commercial paracetamol samples. *International Journal of Chemical Studies.* 1(6), 25-29, 2014.
- [52] SACCHETTI M. Thermodynamic Analysis of DSC Data for Acetaminophen Polymorphs. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 63(2), 345-350, 2000.
- [53] DEVI U, THIRUGANESH R, SURESH S. Preparation and characterization of pectin pellets of aceclofenac for colon targeted drug delivery. *Journal of chemical and pharmaceutical research.* 2(1), 361-374, 2010.
- [54] DEVI S K, THIRUGANESH R, SURESH S. Preparation and characterization of chitosan tablets of aceclofenac for colon targeted drug delivery. *JPRHC.* 2(1), 46-65, 2010.
- [55] DONG Y, RUAN Y, WANG H, ZHAO Y, BI D. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science.* 93(4), 1553-1558, 2004.
- [56] DASHORA A, JAIN C P. Development and characterization of pectin-prednisolone microspheres for colon targeted delivery. *International Journal of ChemTech Research.* 1(3), 751-757, 2009.
- [57] BARACAT M M, NAKAGAWA A M, CASAGRANDE R, GEORGETTI S R, VERRI W A, DE FREITAS O. Preparation and Characterization of Microcapsules Based on Biodegradable Polymers: Pectin/Casein Complex for Controlled Drug Release Systems. *AAPS PharmSciTech.* 13(2), 364-372, 2012.
- [58] JYOTHI N V, PRASANNA P M, SAKARKAR S N, PRABHA K S, RAMAIAH P S, SRAWAN G Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul.* 27(3), 187-97, 2010.
- [59] FU X, PING Q, GAO Y. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *J Microencapsul.* 22(7), 705-14, 2005.

- [60] ABD-ALLAH H, KAMEL A O,SAMMOUR O A. Injectable long acting chitosan/tripolyphosphate microspheres for the intra-articular delivery of lornoxicam: Optimization and in vivo evaluation. *Carbohydr Polym.* 149(263-73, 2016.
- [61] COSCO D, FAILLA P, COSTA N, PULLANO S, FIORILLO A, MOLLACE V, FRESTA M,PAOLINO D. Rutin-loaded chitosan microspheres: Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity. *Carbohydrate Polymers.* 152(583-591, 2016.
- [62] HE P, DAVIS S S,ILLUM L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics.* 187(1), 53-65, 1999.
- [63] WANG X, VENKATRAMAN S S, BOEY F Y C, LOO J S C,TAN L P. Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix. *Biomaterials.* 27(32), 5588-5595, 2006.
- [64] NERNPLOD T,SRIAMORNSAK P. Effect of solvent on properties of pectin microspheres prepared by emulsion-dehydration technique. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 11(1), 217-218, 2016.
- [65] WONG T W, CHAN L W, LEE H Y,HENG P W. Release characteristics of pectin microspheres prepared by an emulsification technique. *J Microencapsul.* 19(4), 511-22, 2002.
- [66] LIU L, FISHMAN M L,HICKS K B. Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose.* 14(1), 15-24, 2007.
- [67] CHAUDHARY A, TIWARI N, JAIN V,SINGH R. Microporous bilayer osmotic tablet for colon-specific delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 78(1), 134-140, 2011.
- [68] ORHAN Z, CEVHER E, MULAZIMOGLU L, GURCAN D, ALPER M, ARAMAN A,OZSOY Y. The preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan and pectin microspheres: their evaluation in an animal osteomyelitis model. *J Bone Joint Surg Br.* 88(2), 270-5, 2006.
- [69] KUBO W, KONNO Y, MIYAZAKI S,ATTWOOD D. In situ gelling pectin formulations for oral sustained delivery of paracetamol. *Drug Dev Ind Pharm.* 30(6), 593-9, 2004.
- [70] MUNARIN F, GUERREIRO S G, GRELLIER M A, TANZI M C, BARBOSA M A, PETRINI P,GRANJA P L. Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules.* 12(3), 568-77, 2011.
- [71] PATEL K S,PATEL M B. Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing nicorandil. *International Journal of Pharmaceutical Investigation.* 4(1), 32-37, 2014.
- [72] GONÇALVES V L, LARANJEIRA M C M, FÁVERE V T,PEDROSA R C. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros.* 15(6-12, 2005.
- [73] BAYOMI M A, AL-SUWAYEH S A, EL-HELW A M,MESNAD A F. Preparation of casein–chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 73(4), 187-192, 1998.
- [74] MOTHILAL M, NAGALAKSHMI M, P.S. S,N. D. OPTIMISATION AND CHARACETRISATION OF CHITOSAN MICROSPHERES OF ACECLOFENAC. *International Journal of Pharma Sciences and Research.* 2012.
- [75] PANDEY R,KHULLER G K. Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. *J Antimicrob Chemother.* 53(4), 635-40, 2004.
- [76] BANERJEE P, DEB J, ROY A, GHOSH A,CHAKRABORTY P. Fabrication and Development of Pectin Microsphere of Metformin Hydrochloride. *ISRN Pharmaceutics.* 2012(7, 2012.
- [77] RAVAL J A, PATEL J K,PATEL M M. Formulation and in vitro characterization of spray dried microspheres of amoxicillin. *Acta Pharm.* 60(4), 455-65, 2010.
- [78] ESQUIVEL CHAVÉZ A. Desarrollo y caracterización de nanopartículas a base de zeína estabilizadas con pectina y β -lactoglobulina. Tesis de maestría. Posgrado de alimentos del centro de la república Universidad Autónoma de Querétaro Querétaro, México 2013.
- [79] SUBUDHI M, JAIN A, JAIN A, HURKAT P, SHILPI S, GULBAKE A,JAIN S. Eudragit S100 Coated Citrus Pectin Nanoparticles for Colon Targeting of 5-Fluorouracil. *Materials.* 8(3), 832, 2015.

- [80] SUN Q, HAN D, LEI H, ZHAO K, ZHU L, LI X, FU H. Preparation and characterization of chitosan microsphere loading bovine serum albumin. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 27(3), 459-464, 2012.
- [81] E. VILLICAÑA MOLINA. Preparación e incorporación de microesferas de quitosano en andamios porosos de biovidrio cel2 Tesis doctoral (en proceso) Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacan, Mexico. 2016.