

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS,
FARMACIA E INFORMÁTICA.**

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**"ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DICLOFENACO SÓDICO
MICROENCAPSULADO EN MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE ÁCIDO
POLI(LÁCTICO-CO-GLICOLICO) PARA USO PARENTERAL Y SU EFECTO SOBRE
EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS"**

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACEUTICO.**

PRESENTADO POR:

Br. EMERSON WILLIAM PASTOR CHAMBI.

Br. CARMELIN MORMONTOY MARCAVILLACA.

ASESORAS:

M.Cs. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ.

CO-ASESORAS:

M.Cs. EMMA JESUS URRUNAGA SORIA.

Mgt. LILIANA BAUTISTA CHÁVEZ.

Ph.D. SEMA ÇALIŞ.

CUSCO – PERÚ

2013

TESIS AÚSPICIADO POR EL CONSEJO DE INVESTIGACION

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi padre Moises... "No es la carne y la sangre, sino el corazón, lo que nos hace padre e hijo".

A mi querida madre Aquilina... "Ninguna lengua es capaz de expresar la fuerza, la belleza y la heroicidad de una madre".

A mi hermana Nedía Karin que a pesar de las dificultades, siempre me ha apoyado incondicionalmente en los momentos más difíciles.

A mis hermanos Joel, Jhon y Elvis. Cuando dos hermanos trabajan juntos las montañas se convierten en oro.

A mi pequeña sobrina Enian Nailia, porque sus risas me hacen crecer y sentirme muy afortunado.

A mis queridos tíos Lucho, Ceferina, María. La Sangre no es lo que nos hace familia sino el amor que llevamos por dentro. Gracias por todo su apoyo durante mi vida universitaria.

Emerson William.

A Dios, Por haberme permitido llegar hasta este punto, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente

A mis Padres modelos de ejemplo en mi vida, por el valor mostrado para salir adelante, por acompañarme en cada decisión con sus palabras, su apoyo y guía constante, por creer en mí, por su inmenso amor. Gracias por darme una carrera, todo se los debo a Uds.

A mi Hermano, por estar conmigo y apoyarme siempre, por no perder la fe en mí, te quiero mucho.

A Todas mis Amigas, por estar a mi lado cuando las he necesitado, por haberme permitido, ver la vida con otro sentido; gracias amigas.

Carmelin Mormontoy

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Gracias por acogerme en sus aulas y hacer que cumpla con esta gran meta.

A los docentes de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias de vida durante toda mi etapa universitaria.

A nuestras estimadas asesoras de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, la M.Cs. Carla del Carpio Jiménez, docente de Farmacia y Bioquímica; M.Cs. Emma J. Urrunaga Soria, docente de Química. Gracias por ser partícipes y brindarnos todo su apoyo, confianza y aliento en los momentos difíciles durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A nuestras asesoras externas Mg. Liliana Bautista Chávez, de la Universidad Complutense de Madrid-España; Ph.D. Sema Çalis, del departamento de tecnología farmacéutica de la Universidad Hacettepe, Ankara-Turquía. Gracias por todo su apoyo incondicional y compartir sus conocimientos y sobre todo sus experiencias, en este tipo de investigaciones.

A nuestros estimados amigos del laboratorio de Cromatografía de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Mgt. Nancy B. Acostupa Quispe y Quím. Jorge Choquenayra Parí, gracias por sus consejos y acogernos en los ambientes de su trabajo, su apoyo logístico e incondicional tan necesario, para que este trabajo se realice.

A la Quím. Alicia Claverí Jarandilla. Directora encargada del Centro de Estudios de Plantas Alimenticias y Medicinales de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (CEPLAM), Gracias por su paciencia, amabilidad y todo su apoyo incondicional para que este trabajo salga adelante.

A la Dra. Ana Fernández Carballido, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid-España; Al Dr. Javier E. Rosas, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá; al Dr. Eric Allemann de la Escuela de Farmacia, de la Universidad de Génova, Switzerland - Francia. Por compartir sus trabajos de investigación, Por la sencillez que demostraron y abrimos nuevos horizontes en las ciencias farmacéuticas y en este tipo de investigaciones.

Finalmente, mas no con menor reconocimiento, agradecer infinitamente a la Mgt. Tatiana del Castillo Yañez; Q.F. Ingrid Vera Ferchau; Ig. Quím. Pedro C. Meche CColque; Br. Jharly R. Aslla Quispe. A cada una de las personas que intervinieron y pusieron su granito de arena en la ejecución del presente trabajo, gracias por el tiempo que nos regalaron, y por compartir sus experiencias y conocimientos.

INDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE ABREVIACIONES.....	v
INTRODUCCION.....	vi
	Nº PAG.
CAPITULO I	
I. ASPECTOS GENERALES.	
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1. OBJETIVOS GENERALES.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	5
1.5. LIMITACIONES.....	6
1.6. HIPÓTESIS.....	6
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO.	
2.1. VISIÓN HISTÓRICA.....	8
2.1.1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.....	8
2.1.2. MICROESFERAS BIODEGRADABLES.....	9
2.2. ANTECEDENTES.....	10
2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	10
2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES.....	13
2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	13
2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	14
2.4.1. DICLOFENACO SÓDICO.....	14
2.4.2. CARACTERÍSTICAS.....	15
2.4.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	17
2.4.3.1. CONCEPTOS Y DEFINICIONES.....	17
2.4.3.2. MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL.....	18
2.4.3.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.....	21
2.4.3.4. MATERIALES DE RECUBRIMIENTO.....	22

2.4.3.5. PLGA COMO MATRIZ POLIMÉRICA PARA LA MICROENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS.....	23
2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN.....	25
2.5.1. MÉTODO DE EVAPORACIÓN/EXTRACCIÓN DEL SOLVENTE.....	26
2.5.1.1. EN FASE ACUOSA.....	26
A. MÉTODO DE EMULSIÓN ACEITE EN AGUA O/W.....	26
B. MÉTODO DE EMULSIÓN AGUA EN ACEITE EN AGUA W/O/W.....	28
2.5.1.2. EN FASE OLEOSA.....	29
A. EMULSIÓN O/O.....	29
2.5.1.3. VARIABLES A TOMAR EN CUENTA EN EL MÉTODO EVAPORACIÓN/EXTRACCIÓN DEL SOLVENTE.....	30
a) LOS SOLVENTES.....	30
b) LOS EMULSIFICANTES.....	31
c) LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.....	32
d) ESTRUCTURA Y MASA MOLECULAR.....	32
2.5.2. MÉTODO DE SEPARACIÓN DE FASES (COASERVACION).....	33
2.6. MECANISMOS DE LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS MICROESFERAS..	35
2.6.1. PROCESAMIENTO IN VIVO.....	37
2.7. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE PLGA.....	37
2.7.1. PARÁMETROS PARA CARACTERIZAR LAS MICROESFERAS.....	38
A. MORFOLOGÍA.....	38
B. TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	39
C. CARGA Y EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN.....	40
D. PERFIL DE LIBERACIÓN.....	41
2.8. DEFINICIÓN DE TERMINOS.....	43

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	46
3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	46
A. MATERIALES DE LABORATORIO.....	46
B. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	46
C. REACTIVOS.....	47
D. INFRAESTRUCTURA.....	48
3.3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	48
3.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48

3.3.1.1. VARIABLES.....	48
I. VARIABLES IMPLICADAS.....	48
I.a. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES.....	49
I.b. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES.....	53
II. VARIABLES NO IMPLICADAS.....	55
3.3.2. ELABORACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS.....	55
3.3.2.1. MÉTODOS DE DOBLE EMULSIÓN EN LA ELABORACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS DE DICLOFENACO SÓDICO.....	56
3.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCAPSULAS DE PLGA CARGADO CON DICOFENACO SÓDICO.....	57
3.3.3.1. FORMA Y TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	57
3.3.3.2. RENDIMIENTO DEL PROCESO DE ENCAPSULACIÓN.....	57
3.3.3.3. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN.....	58
3.3.3.4. DETERMINACIÓN DE FÁRMACO ADSORBIDO (EFECTO BURST).....	59
3.3.3.5. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DICLOFENACO SÓDICO.....	59
3.3.3.6. EVALUACION IN VITRO.....	60
3.3.3.7. EVALUACION IN VIVO.....	60
3.3.3.7.1. TIPOS DE INVESTIGACIÓN DE LA EVALUACIÓN IN VIVO....	61
3.3.3.7.2. TIPOS DE HIPÓTESIS.....	62
3.3.3.7.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	62
3.3.3.7.4. VARIABLES.....	63
I. VARIABLES IMPLICADAS.....	63
II. VARIABLES NO IMPLICADAS.....	65
3.3.3.7.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	65
3.3.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
3.3.5. FLUJOGRAMA DEL PROCESO.....	67

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DE LA ELABORACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE PLGA, CARGADAS CON DICLOFENACO SODICO.....	69
4.2. DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:	71
4.3. DE LA INFLUENCIA DE LOS POSIBLES FACTORES EN LA FORMULACIÓN.....	72

4.3.1. Ajuste factorial: RENDIMIENTO vs. BIOPOLIMERO, PRINCIPIO ACTIVO, FASE ACUOSA, PVA, ISOPROPANOL, VELOCIDAD Y TIEMPO.....	72
4.3.2. Ajuste factorial: EFICACIA vs. BIOPOLIMERO, PRINCIPIO ACTIVO, FASE ACUOSA, PVA, ISOPROPANOL, VELOCIDAD Y TIEMPO.....	74
4.3.3. Ajuste factorial: EFECTO BURST vs. BIOPOLIMERO, PRINCIPIO ACTIVO, FASE ACUOSA, PVA, ISOPROPANOL, VELOCIDAD Y TIEMPO.....	76
4.4. DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO OBTENIDAS.....	82
4.4.1. DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO, EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN Y EFECTO BURST.....	86
4.5. OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA PRONOSTICA DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACION POR AJUSTE DE VARIABLES.....	91
4.6. DE LA EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS MICROESFERAS OBTENIDAS CON MEJOR CARACTERIZACIÓN.....	93
4.7. DE LA EVALUACIÓN IN VIVO DE LAS MICROESFERAS OBTENIDAS CON MEJOR CARACTERIZACIÓN.....	97
CONCLUSIONES.....	100
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXOS.....	118
LISTA DE TABLAS.	
LISTA DE GRÁFICOS.	
LISTA DE FIGURAS.	

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: FORMULACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE PLGA 50:50 CARGADAS CON DICLOFENACO SÓDICO.....	57
TABLA 2: ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.....	61
TABLA 3: DISTRIBUCIÓN ALEATORIA DE LOS GRUPOS DE ANIMALES.....	63
TABLA 4: DISEÑO TIPO PLAKETT-BURMAN (ALEATORIZADA).....	66
TABLA 5: RESULTADOS DE CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES EMPLEADAS PARA ESTUDIAR LA LINEALIDAD DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	71
TABLA 6: EFECTOS Y COEFICIENTES ESTIMADOS PARA RENDIMIENTO (UNIDADES CODIFICADAS).....	72
TABLA 7: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA RENDIMIENTO (UNIDADES CODIFICADAS).....	72
TABLA 8: DATO DE LOS PESOS FINALES DE LAS MICROESFERAS OBTENIDAS, PARA CADA TRATAMIENTO.....	74
TABLA 9: EFECTOS Y COEFICIENTES ESTIMADOS PARA EFICACIA (UNIDADES CODIFICADAS).....	74
TABLA 10: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EFICACIA (UNIDADES CODIFICADAS).....	74
TABLA 11: DATOS DE ABSORBANCIA PARA CADA TRATAMIENTO PARA OBTENER LA EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN, MEDIANTE LA ECUACIÓN DE LA RECTA.....	76
TABLA 12: EFECTOS Y COEFICIENTES ESTIMADOS PARA EFECTO BURST (UNIDADES CODIFICADAS).....	76
TABLA 13: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EFECTO BURST (UNIDADES CODIFICADAS).....	77
TABLA 14: DATOS DE ABSORBANCIA PARA CADA TRATAMIENTO PARA OBTENER EL EFECTO BURST, MEDIANTE LA ECUACIÓN DE LA RECTA.....	78
TABLA 15: DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO, EFICACIA Y ENCAPSULACIÓN Y EFECTO BURST.....	86
TABLA 16: MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO POR AJUSTE DE VARIABLES CON EL NIVEL MÁXIMO O MÍNIMO.....	91
TABLA 17: MAXIMIZACIÓN DE LA EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN POR AJUSTE DE VARIABLES CON EL NIVEL MÁXIMO O MÍNIMO.....	91
TABLA 18: MINIMIZACIÓN DEL EFECTO BURST POR AJUSTE DE VARIABLES CON EL NIVEL MÁXIMO O MÍNIMO.....	92
TABLA 19: PORCENTAJE DE LIBERACIÓN IN VITRO DE LAS MICROCAPSULAS DEL TRATAMIENTO M3 EN 2 DOSIS EN UN DETERMINADO TIEMPO.....	93
TABLA 20: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO IN VITRO.....	94
TABLA 21: AGRUPACIÓN DE INFORMACIÓN UTILIZANDO EL MÉTODO DE TUKEY.....	94

TABLA 22: EFECTO DE DICLOFENACO SÓDICO LIBRE Y DICLOFENACO SÓDICO MICROENCAPSULADO SOBRE EL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS.....	96
---	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DICLOFENACO SÓDICO.....	71
GRÁFICO 2. DIAGRAMA DE PARETO PARA EL RENDIMIENTO.....	72
GRÁFICO 3. DIAGRAMA DE PARETO PARA LA EFICACIA.....	75
GRAFICO 4. DIAGRAMA DE PARETO PARA EL EFECTO BURST.....	77
GRÁFICO 5. EFECTO DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO SOBRE A) RENDIMIENTO DEL PROCESO; B) EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN, C) EFECTO BURST,.....	79
GRAFICO 6. GRAFICA DE VALORES INDIVIDUALES PARA; A) RENDIMIENTO, B) EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN, C) EFECTO BURST.....	89
GRÁFICO 7. LIBERACIÓN IN VITRO A LO LARGO DEL TIEMPO PARA EL TRATAMIENTO M3 A DOSIS DE 10 MG Y 5 MG.....	94
GRÁFICO 8. EVOLUCIÓN DEL % DE INFLAMACIÓN SOBRE EL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA, EN RATAS RATTUS NORVEGICUS.....	97
GRÁFICO 9. EVOLUCIÓN DEL % DE INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN SOBRE EL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA, EN RATAS RATTUS NORVEGICUS, DEL EFECTO DE DICLOFENACO SÓDICO LIBRE Y MICROENCAPSULADO CON PLGA.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DICLOFENACO SÓDICO.....	15
FIGURA 2. CICLACIÓN INTRAMOLECULAR DE DICLOFENACO SÓDICO EN MEDIO ACIDO.....	16
FIGURA 3. NIVELES EN SANGRE ALCANZADA POR UN FÁRMACO.....	19
FIGURA 4. TIPOS DE ESTRUCTURA QUE PRESENTA LA PARTÍCULA RESULTANTE DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN DE UN MATERIAL LÍQUIDO.....	20
FIGURA 5. SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DEL COPOLÍMERO POLI-(D, L-LACTICO-CO-GLICOLICO), PLGA.....	24
FIGURA 6. PREPARACIÓN DEL MÉTODO DE EVAPORACIÓN/EXTRACCIÓN DEL SOLVENTE EN FASE ACUOSA O/W.....	27
FIGURA 7. FLUJOGRAMA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS POR EL MÉTODO DE EMULSIÓN MÚLTIPLE W/O/W.....	28
FIGURA 8. PREPARACIÓN DEL MÉTODO DE EVAPORACIÓN/EXTRACCIÓN DEL SOLVENTE EN FASE OLEOSA O/O.....	29

FIGURA 9. MÉTODO DE SEPARACIÓN DE FASES (COACERVACIÓN).....	34
FIGURA 10. VISTA AL MICROSCOPIO ÓPTICO DE LAS MICROESFERAS PARA CADA TRATAMIENTO A 20X. VISTA DE LAS MICROESFERAS EN EL PROCESO FINAL (POLVO LIOFILIZADO).....	69
FIGURA 11. FOTOGRAFÍA AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM) A 3000X, DEL TRATAMIENTO M1 DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO.....	82
FIGURA 12. FOTOGRAFÍA AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM) A 6000X, DEL TRATAMIENTO M2 DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO.....	82
FIGURA 13. FOTOGRAFÍA AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM) A 6000X, DEL TRATAMIENTO M3 DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO.....	83
FIGURA 14. FOTOGRAFÍA AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM) A 1000X, DEL TRATAMIENTO M4 DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO.....	83
FIGURA 15. RESPUESTA PRONOSTICADA OPTIMIZADA DEL PROCESO DE RENDIMIENTO POR AJUSTE DE VARIABLES.....	91
FIGURA 16. RESPUESTA PRONOSTICADA OPTIMIZADA DEL PROCESO DE EFICACIA POR AJUSTE DE VARIABLES.....	92
FIGURA 17. RESPUESTA PRONOSTICADA OPTIMIZADA DEL PROCESO DE EFECTO BURST POR AJUSTE DE VARIABLES.....	92

RESUMEN

Se planteó la siguiente investigación con el objetivo, de elaborar microesferas biodegradables de PLGA conteniendo diclofenaco sódico, una forma farmacéutica de liberación prolongada para uso parenteral, se preparó para administración Intraperitoneal, utilizando los métodos de doble emulsión (W/O/W) y sus variantes propuestos por Bautista. Ch, 2009 ⁽¹⁾; M. Tuncay et. al 2000 ⁽²⁾. Los productos obtenidos fueron caracterizados utilizando un diseño estadístico experimental, tipo Plakett-Burman con siete factores de orden tecnológico, a dos niveles. Las siete variables estudiadas fueron: concentración del polímero, concentración de alcohol polivinílico (PVA), cantidad de fármaco, volumen de isopropanol, volumen de fase acuosa, velocidad de homogenización y tiempo de homogenización. Como variables respuesta se evaluaron: **a)** el rendimiento del proceso, **b)** la eficacia de encapsulación y **c)** la cantidad de fármaco liberado después de 2 horas en un tampón fosfato PBS, pH 6,8 (efecto Burst). Se complementó con estudios in vitro durante 5 días observándose una liberación sostenida del principio activo. Para los estudios in vivo, se usó carragenina para inducir edema plantar en los animales de experimentación Ratas albinas (*Rattus norvegicus*). Se usó dosis de 5 mg/Kg, 10 mg/Kg de las microcapsulas con mejor caracterización por inyección Intraperitoneal, el proceso antiinflamatorio se midió a las 1, 3, 5, 9, 15 y 24 horas en un pletismómetro. También se calculó el parámetro "Área bajo la curva", para analizar el efecto antiinflamatorio a lo largo del tiempo. Los factores de orden tecnológico que influyeron de manera negativa en las formulaciones fueron la fase acuosa, la velocidad y tiempo de agitación, una variación de estos desde el nivel inferior al superior serian desfavorables en las formulaciones, mientras que el resto de los factores influyeron de manera positiva una variación desde el nivel inferior al superior favorecen positivamente en las formulaciones. Se obtuvieron microesferas con buena morfología y tamaños adecuados para uso parenteral, en el mejor de los casos el rendimiento fue de 88% y una eficacia de 96%, con un efecto Burst mínimo. Las pruebas in vitro durante 5 días con la mejor formulación, se demostró que libera el principio activo desde las microesferas de manera prolongada con una concentración casi constante durante ese tiempo. La evaluación del proceso

antiinflamatorio después de la terapia en los animales tratados con 10 mg/kg no mostraron ninguna diferencia significativa en comparación con el grupo patrón (10 mg/Kg de DIC. SOD. Libre) las dosis de MP. DIC.SOD. de 10 y 5 mg/kg mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo control (SSN).

Palabras Clave: *poli (lactida-co-glicólico ácido) microesferas; diclofenaco sódico; método evaporación; inflamación.*

ABSTRACT

Was raised the following research with the objective to develop biodegradable microspheres of PLGA containing diclofenac sodium, a pharmaceutical form of extended-release for parenteral use, was prepared for intraperitoneal administration, using the methods of double emulsion (W/O/W) and its variants proposed by Bautista. Ch, 2009 ⁽¹⁾; M. Tuncay et. Al 2000 ⁽²⁾. The products obtained were characterized using a statistical experimental design, type Plakett-Burman with seven variables, on two levels. The variables studied were: the polymer concentration, concentration of PVA, amount of drug, volume of isopropanol, volume of aqueous phase, speed of homogenization, time of homogenization. As response variables were evaluated: (a) the process performance, (b) the effectiveness of encapsulation and c) the amount of drug released after 2 hours in a PBS phosphate buffer, pH 6.8 (effect Burst). It is complemented by in vitro studies during 5 days showing a sustained-release the beginning active. For in vivo studies, carrageenan was used to induce plantar edema in experimental animals (Albino rats). It is use doses of 5 mg/kg, 10 mg/kg of the microcapsules with better characterization by intraperitoneal injection, the inflammatory process was measured at 1, 3, 5, 9, 15 and 24 hours in a plethysmometer. It is also calculating the parameter "area under the curve", to analyze the antiinflammatory effect over time. The order of technological factors that have influenced in a negative way in the formulations were the aqueous phase, the speed and time of agitation, A variation of these from the lowest to the highest level would be unfavorable in formulations, while the rest of the factors positively influenced a variation from the lowest to the highest level favor positively in the formulations. Beads were obtained with good morphology and sizes suitable for parenteral use, in the best of cases, the yield was 88% and an efficiency of 96 %, with a minimum burst effect. In vitro tests for 5 days with the best formulation, it was demonstrated that releases the active principle from the microspheres so prolonged concentration with a nearly constant during that time.

The evaluation of the process after the anti-inflammatory therapy in animals treated with 10 mg/kg showed no significant difference in comparison with the standard group (10 mg/Kg of DIC. SOD. Free) doses of MP. DIC.SOD 10 and 5 mg/kg showed significant differences in comparison with the control group (SSN).

Key Words: *poly(lactida-co-glycolic) acid microspheres; diclofenac sodium; evaporation method; inflammation.*

LISTA DE ABREVIACIONES

AINES:	ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEO,
BSA:	ALBUMINA SÉRICA BOVINA.
BIOPOL:	BIOPOLIMERO.
DCM:	DICLOROMETANO.
DA:	DALTONS.
DIC. SOD:	DICLOFENACO SÓDICO.
FDA:	FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.
KDA:	KILO DALTONS.
ME:	MICROESFERAS
MBLC:	MICROSCOPIO DE BARRIDO LASER CONFOCAL.
MP:	MICROPARTICULAS.
PLGA:	POLI (D, L- LÁCTIDA-CO-GLICOLIDA) ACIDO.
P.A:	PRINCIPIO ACTIVO.
PLA:	POLI LACTIDA ACIDO.
PV:	POLI Δ-VALEROLACTONA
PCL:	POLICAPROLACTONA
PVA:	POLIVINIL ALCOHOL
PBS:	TAMPÓN FOSFATO SALINO:
SSN:	SOLUCIÓN SALINA NORMAL.
SLC:	SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA.
SEM:	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.
SO:	MONÓXIDO DE ASUFRE.
USP:	UNITE STATE PHARMACOPEIA.
TIM:	TIEMPO.
VEL:	VELOCIDAD.
[]:	CONCENTRACIÓN.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una de las respuestas más comunes del organismo ya sea aguda o crónica, que se producen por diferentes causas como lesiones, golpes, enfermedades degenerativas, etc. Que afectan a una gran parte de la población. La medicación utilizada para su tratamiento incluye los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs).⁽³⁾ Estos medicamentos no son suficientemente eficaces, por esta razón, en varios casos, deben ser administrados en forma conjunta con inyecciones de corticoides. Sin embargo, la administración de esteroides puede generar efectos adversos graves, tales como osteoporosis, elevación de la presión arterial, el síndrome de Cushing, etc.⁽⁴⁻⁶⁾ La administración de los AINEs podría ser una alternativa a la administración de corticosteroides, evitando sus devastadores efectos. Sin embargo, debido a la corta vida media que presentan la mayoría de los AINEs, éstas requieren inyecciones frecuentes para mantener niveles terapéuticos. En las dos últimas décadas y en la actualidad un considerable interés viene suscitado el uso de polímeros biodegradables para aplicaciones especializadas como las formulaciones de liberación controlada de drogas. El poli (lactida-co-glicolida) PLGA. Ha demostrado ser excelente portador de fármacos para los sistemas de micropartículas debido a sus ventajas, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad. La administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) por vía parenteral en pacientes con enfermedad inflamatoria crónica es complicada debido a la corta duración del efecto. Además, la administración de estos dispositivos formulados como microcápsulas proporciona la ventaja de facilitar su inyección a través de agujas normales de infiltración. El PLGA se ha estudiado extensamente como polímero portador de micropartículas biodegradables. Por lo tanto, principalmente debido a su larga historia de seguridad humana, utilizada en forma de suturas quirúrgicas y su disponibilidad comercial en diferentes relaciones de monómeros y pesos moleculares hacen factible su uso. La experiencia ha demostrado que múltiples factores afectan la eficacia de encapsulación y la tasa de liberación del fármaco de estas micropartículas, que podrían ser de orden tecnológico, cantidades y tipo de excipientes y principio activo usado y el método de elaboración. Muchos de los investigadores han examinado el peso molecular del PLGA como uno de los principales factores que afectan la liberación del fármaco. Observaron perfiles, con tasas de liberación de fármacos que van disminuyendo a medida que aumenta el peso molecular del PLGA.⁽⁷⁾ Por otro

lado, algunos han informado de que el peso molecular no es un factor determinante y en su lugar atribuyen los efectos obtenidos con la viscosidad de la fase interna de la emulsión que se forma cuando se hace la preparación de las microesferas. ^(8, 9) Además, algunos autores ⁽¹⁰⁾ han reportado mayores tasas de degradación con una liberación más rápida, tasa de la droga a partir de polímeros de bajo peso molecular. El aumento de la tasa de degradación se asocia con un alto contenido de grupos carboxilo terminal (COOH) de los polímeros de bajo peso molecular, y que los grupos actúan como catalizadores. Con el fin de mejorar su utilidad terapéutica, se propone desarrollar microesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico, PLGA), que contienen diclofenaco sódico microencapsulado para administración parenteral en el tratamiento de procesos inflamatorios. Teniendo en cuenta que el diclofenaco sódico es un AINE agente de uso general en el tratamiento de las inflamaciones agudas y crónicas como: trastornos artríticos, tales como espondilitis anquilosante, la artritis reumatoidea y osteoartritis, también como analgésico y antipirético. El desarrollo de un sistema biodegradable de diclofenaco sódico, sobre la base de micropartículas, tiene caso de ser de gran interés. Sin embargo, estudios previos indican que los AINEs muestra una gran explosión inicial, cuando se está formulando como microesferas. Para evitar este efecto, se ha considerado el uso de un aditivo en la formulación. De hecho, algunos investigadores ⁽¹¹⁻¹³⁾ ya han propuesto el uso de diferentes aditivos para modular la difusión de los principios activos a través de la matriz. El estudio tiene como objetivo preparar microesferas de PLGA 50:50 cargado con diclofenaco sódico para la administración parenteral, capaz de liberar el principio activo, durante un período de tiempo posible. Los sistemas microcapsulares obtenidos con las mejores condiciones previamente establecidas fueron evaluados para determinar su efecto en el modelo antiinflamatorio de edema plantar inducido por carragenina, en ratas. La formulación fue diseñada para obtener un efecto antiinflamatorio local y por lo tanto reducir al mínimo los efectos secundarios.

CAPITULO I

I. GENERALIDADES

ASPECTOS GENERALES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los fármacos recetados con mayor frecuencia en todo el mundo en sus diferentes presentaciones: comprimidos, cremas e inyectables. Sin embargo, su utilidad clínica sigue siendo limitada principalmente por los efectos secundarios nocivos que producen sobre todo en el tracto gastrointestinal ⁽¹⁴⁾. Todos los fármacos AINEs comunes producen una acción local en el epitelio gástrico debido a su naturaleza ácida. En el medio gástrico ácido, sus formas lipofílicas son absorbidas por las células con mayor facilidad. Sin embargo, el elevado pH intracelular da lugar a la captura de los fármacos AINEs ionizados, que muestran a continuación su acción antiprostaglandínica local aún con mayor intensidad y provocan un daño en la mucosa gástrica, cada vez que ocurre una lesión celular las prostaglandinas son liberadas y aparecen como exudados inflamatorios. Existen dos formas de enzimas ciclooxigenasas, la ciclooxigenasa 1 (COX 1), una isoforma constitutiva encontrada en células y tejidos normales, y la ciclooxigenasa 2 (COX 2), encontrada en condiciones de inflamación. Estas enzimas convierten al ácido araquidónico en prostaglandinas, los AINEs inhiben esta enzima evitando la formación de prostaglandinas que desencadenan los procesos inflamatorios. ⁽¹⁵⁾ El diclofenaco sódico es un fármaco analgésico y antiinflamatorio derivado del ácido fenilacético creado específicamente como antiinflamatorio. Es ampliamente utilizado en la terapéutica actual para el tratamiento sintomático de procesos agudos o crónicos relacionados con dolor e inflamación. ⁽¹⁶⁾ En el mercado farmacéutico peruano, el diclofenaco sódico se presenta en tabletas, inyectables y en geles. ⁽¹⁷⁾ Al igual que otros AINEs (antiinflamatorios no esteroideos), el diclofenaco sódico es uno de los fármacos que se puede utilizar en el desarrollo de sistemas nano y microencapsulados, por sus propiedades fisicoquímicas que los hacen fármacos modelos de buena solubilidad, y por sus características farmacológicas y su aplicación terapéutica. Según el sistema de clasificación biofarmacéutica el diclofenaco se encuentra en el grupo II, es decir, se considera que tiene baja solubilidad y alta permeabilidad. ⁽¹⁸⁾ Por lo antes mencionado, el interés de la

liberación de fármacos a través de portadores se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Las razones son obvias, si el portador tiene el potencial para dirigir el fármaco a su sitio de acción, un efecto farmacológico óptimo podría obtenerse y al mismo tiempo, los efectos adversos de los fármacos podrían disminuir. ⁽¹⁹⁾ Este deseo de dirigir los fármacos a los órganos blancos específicos es un viejo sueño discutido desde comienzo del siglo XXI. La ciencia farmacológica actual encamina sus estudios hacia la búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción, a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos. De acuerdo con este criterio, se han desarrollado últimamente nuevos sistemas de administración de fármacos, como los liposomas, las nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas y microcápsulas entre otros, siendo portadores coloidales particulares que se usan como sistemas de liberación de fármacos. ⁽²⁰⁾ Los sistemas de transporte basado en materiales sólidos poliméricos en forma de nanocápsulas y microcápsulas presentan mayores ventajas que los liposomas en cuanto a estabilidad y reproducibilidad, en un intento de favorecer la penetración de los fármacos en zonas corporales de difícil acceso (barreras hísticas, neoplasias, etc). ⁽²⁰⁾ Por un lado deben evitarse concentraciones excesivas que provoquen mayor frecuencia y gravedad de efectos colaterales y por otro lado, concentraciones insuficientes que pueden originar la pérdida del efecto terapéutico. ⁽²⁰⁾ La importancia de los polímeros en la industria farmacéutica recientemente, se ha visto incrementada debido a que cumple dos funciones; como encapsulantes y como portadores. Los encapsulantes protegen y los portadores regulan la liberación del principio activo. Por todo lo mencionado anteriormente es necesario realizar estudios orientados a la metodología de elaboración para el uso parenteral, aplicar modelos en la investigación farmacológica; que nos permitan corroborar la biodegradabilidad e inocuidad de los polímeros usados, así como prolongar el efecto terapéutico del principio activo en el organismo.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Durante la elaboración y caracterización de microesferas biodegradables para uso parenteral a partir de ácido poli(láctico-co-glicólico) conteniendo diclofenaco sódico, los factores de orden tecnológico actuarán de manera positiva o negativa en las formulaciones y cuál será el efecto que tendrán las microesferas sobre edema plantar inducido por carragenina en ratas?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVOS GENERALES

Elaborar y caracterizar diclofenaco sódico microencapsulado en microesferas biodegradables de ácido poli (láctico-co-glicólico) para uso parenteral y evaluar el efecto sobre edema plantar inducido por carragenina en ratas.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elaborar micropartículas biodegradables a partir de ácido poli (láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 conteniendo diclofenaco sódico.
- Evaluar la influencia de posibles factores tecnológicos que influyen en la formulación de las micropartículas elaboradas con las proporciones del biopolímero (PLGA 50:50), principio activo, excipientes, tiempo y velocidad de agitación.
- Caracterizar las micropartículas obtenidas en: forma, tamaño de partícula, rendimiento del proceso de encapsulación, eficacia de encapsulación y determinación de fármaco adsorbido (efecto Burst).
- Realizar la evaluación in vitro de la forma farmacéutica obtenida con mejor caracterización, en tampón fosfato pH = 6,8 a diferentes intervalos de tiempo durante 120 horas.
- Realizar la evaluación de la actividad antiinflamatoria de la forma farmacéutica obtenida con mejor caracterización, por vía intraperitoneal en animales de experimentación (ratas albinas), utilizando la prueba de edema plantar inducido por carragenina.

1.4. JUSTIFICACIÓN

DESDE EL PUNTO DE VISTA INDUSTRIAL.

La industria farmacéutica moderna busca constantemente tecnologías para la obtención de transportadores de diferentes fármacos como citostáticos, antiinflamatorios, péptidos y hormonas, entre otros que se está poniendo a disposición de la terapéutica, pero que debido a sus características biofarmacéuticas y/o estabilidad in vivo y toxicidad, su aplicación en terapéutica es muy limitada. Dentro de estas tecnologías se destaca el empleo de microesferas biodegradables de ácidos polilácticos como sistemas poliméricos matriciales de liberación controlada. Los polímeros se emplean como materiales transportadores o controladores de la liberación de fármacos cuando se elaboran micropartículas. Deben ser biocompatibles y en el caso de las micropartículas de uso parenterales, también deben ser biodegradables.

DESDE EL PUNTO DE VISTA DE SU APLICACIÓN

Por lo tanto los investigadores buscan nuevas alternativas que impliquen una reducción de su toxicidad y una liberación sostenida o controlada para lograr el efecto terapéutico con una sola dosis. En el presente estudio pretendemos contribuir en la elaboración de una forma farmacéutica como son microcápsulas biodegradables conteniendo como principio activo diclofenaco sódico y evaluar su eficacia terapéutica como antiinflamatorio inducido experimentalmente en ratas albinas. En cualquier caso, la demostración de su mecanismo y de la acción en sí, necesitará la realización de ensayos farmacológicos experimentales *in vitro* e *in vivo* que se pueden realizar a partir de la forma farmacéutica adoptada.

DESDE EL PUNTO DE VISTA ECONÓMICO Y SOCIAL

Con el tiempo tener una posibilidad de lanzamiento al mercado farmacéutico, beneficiando a los pacientes que sufren enfermedades inflamatorias crónicas, pues con una sola dosis se logra un efecto terapéutico prolongado y así abaratar los costos de las múltiples aplicaciones que se dan con los fármacos convencionales.

DESDE EL PUNTO DE VISTA CIENTÍFICO

Las experiencias que se puedan encontrar en esta investigación, serán de mucho interés para las futuras generaciones, realizando más estudios de las formulaciones, de la forma farmacéutica y estandarizando métodos de microencapsulación, podrían ser aplicados para otros tipos de principios activos, y productos naturales y así mejorar su utilidad terapéutica.

1.5. LIMITACIONES

De orden bibliográfico:

En la literatura acerca de la elaboración de micropartículas (microcápsulas, microesferas) con principios activos hidrosolubles es muy limitada, puesto que sigue siendo materia de investigación. Las bibliografías utilizadas en este trabajo de investigación son resúmenes que se encuentran en revistas especializadas de acceso limitado, en la presente investigación se adoptaron las metodologías y sus variantes propuestas por, Bautista Ch. 2009. y M. Tuncay; et.al. 2000. ^(1, 2)

De orden tecnológico:

En los laboratorios de tecnología farmacéutica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, no se cuenta con la tecnología y equipamiento adecuado para la elaboración de las microcapsulas; razón por la cual se solicitó la compra de los equipo T-25 digital Ultra turax y Eurostar power, que demoró un tiempo prolongado; también por no contar con los demás equipos y materiales de trabajo, en un solo área de investigación, se solicitó el uso de otros laboratorios y el traslado de algunos equipos, de los diferentes laboratorios para implementar un área de trabajo adecuado.

1.6. HIPÓTESIS.

Los factores de orden tecnológico actuaran mayormente en forma positiva en las formulaciones de elaboración y caracterización de microesferas biodegradables para uso parenteral a partir de ácido poli(láctico-co-glicólico) conteniendo diclofenaco sódico y las microesferas tendrán efecto sobre edema plantar inducido por carragenina en ratas.

CAPITULO II
MARCO TEORICO
CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTORICA

2.1.1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

La historia de los antiinflamatorios no esteroideos es conocida desde hace mucho tiempo debido a la capacidad curativa que tienen las cortezas de árboles como el caso del sauce, usada por diferentes culturas. Tal es el caso del reverendo Edmund Stone, que a mediados del siglo XVIII en Inglaterra señalaba buenos resultados al usar ésta corteza para curar fiebres. El efecto terapéutico era debido a un glucósido que salía de la corteza llamado salicina, de la cual se logró la purificación en 1829 por Henri Leroux, quién demostró que también existían efectos antipiréticos. La hidrólisis de la salicina genera glucosa y alcohol salicílico, que puede transformarse en ácido salicílico in vivo o por manipulación química. El salicilato de sodio se usó contra la fiebre reumática, y para 1875 se usó como antipirético observándose también efectos uricosúricos y actividad contra la gota. Posteriormente la preparación del ácido acetilsalicílico fue continuada por Félix Hoffmann quién trabajaba para la compañía Bayer, y Heinrich Dresser lo comenzó a utilizar para el año 1899 bajo el nombre aspirina que hace referencia a la especie vegetal Spiraea, de la que inicialmente se preparó éste ácido.

Son los compuestos sintéticos los que aún se usan por ser menos costosos que los compuestos naturales, al igual que muchos otros que se descubrieron en el siglo pasado y que comparten los mismos efectos o casi todos. Entre ellos tenemos a los derivados del p-aminofenol (acetaminofén) o a la indometacina. ⁽²¹⁾ Existen un gran número de agentes antiinflamatorios que poseen actividad analgésica, los cuales podemos clasificar como analgésicos débiles y fuertes. Estos últimos también son denominados como narcóticos u opiáceos. Los débiles también presentan usualmente propiedades antipiréticas y antireumáticas. ⁽²²⁾ Dentro de los analgésicos débiles o no narcóticos encontramos al diclofenaco, que tiene las propiedades terapéuticas mencionadas de antiinflamatorio, antipirético y antireumático. Este fármaco se encuentra en el grupo denominado antiinflamatorios no esteroideos o AINEs. ⁽²²⁾ No todos los AINEs han sido aprobados por la FDA para todas las enfermedades reumáticas, es probable que

todos sean eficaces para la artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome musculoesqueléticos localizados (esguinces y torceduras) y gota (excepto tolmetin, el cual resulta ser ineficaz). Debido a efectos adversos de la aspirina por administraciones prolongadas o dosis más altas de las recomendadas, puede presentarse dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómito, anemia hemolítica, prurito, exantema, daño renal y/o hepático, por lo que se han desarrollado otros AINEs para mejorar la eficacia y disminuir la toxicidad de la aspirina. ^(23, 24)

2.1.2. MICROESFERAS BIODEGRADABLES

El interés de la liberación de drogas a través de portadores se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Las razones son obvias, si el portador tiene el potencial para dirigir la droga a su sitio de acción, un efecto farmacológico óptimo podría obtenerse y al mismo tiempo, los efectos adversos de la droga podrían disminuir. ⁽²⁵⁾ Es un hecho conocido que la distribución del fármaco una vez administrado al organismo puede provocar efectos secundarios en otras zonas de éste. Se debe establecer por tanto, un adecuado balance entre los efectos beneficiosos producidos por el medicamento y las reacciones adversas que pueden desencadenarse en diferentes órganos. ⁽²⁰⁾ Este deseo de dirigir las drogas a los órganos blancos específicos es un viejo sueño discutido desde comienzo de este siglo. ⁽²⁰⁾ La ciencia farmacológica actual encamina sus estudios hacia la búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción (tejido diana), a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos. De acuerdo con este criterio, se han desarrollado últimamente nuevos sistemas de administración de fármacos, ⁽²⁰⁾ como los liposomas, nanopartículas y micropartículas, entre otros, siendo portadores coloidales particulares que se usan como sistemas de liberación de drogas. ⁽²⁵⁾ Los sistemas de transporte a base de materiales sólidos poliméricos en forma de nanopartículas y micropartículas presentan mayores ventajas que los liposomas en cuanto a estabilidad y reproducibilidad, en un intento de favorecer la penetración de los fármacos en zonas corporales de difícil acceso (barreras hísticas, neoplasias, etc). ^(26,27) Por un lado deben evitarse concentraciones excesivas que provoquen mayor frecuencia y gravedad de efectos colaterales y

por otro, concentraciones insuficientes que pueden originar la pérdida del efecto terapéutico. ⁽²⁸⁾

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. Antecedentes Internacionales.

❖ **Nihant et al. En 1995.** Analizaron el efecto de la composición del copoliéster láctida/glicolida utilizado como cobertura, sobre la estabilidad de la primera y segunda emulsión y sobre la morfología final de las micropartículas obtenidas. Ellos observaron, que la primera emulsión, era más estable a medida que el copolímero empleado era menos hidrófobo, atribuyendo este efecto a la interface diclorometano/agua, ya que la tensión interfacial decrece cuando la hidrofobia del polímero también decrece. Estos autores también demostraron que el uso de soluciones de polímero en altas concentraciones, induce a la formación de esferas más grandes; en contraste, cuando las soluciones de agente dispersante fue alta, obtuvieron microesferas más pequeñas en diámetro. Es decir que el tamaño de las microesferas puede ser controlado con el uso de la concentración adecuada de polímeros y/o agente dispersante. ⁽²⁹⁾

❖ **Alvarez et al. En 1998.** Obtuvieron resultados interesantes con microesferas de PLGA para la administración de dexametasona. Estos estudios demostraron que la microencapsulación de dexametasona, basada en la técnica de evaporación del solvente daba lugar a rendimientos superiores de encapsulación que los obtenidos con el fosfato de dexametasona, obteniendo eficacias medias de incorporación del fármaco superior al 66%. También, se puso de manifiesto que un aumento en la cantidad de dexametasona se traducía en un incremento tanto de la dosis como en la cesión inicial del fármaco. La adición de dextrosa generó un aumento de la cantidad cedida de dexametasona, a pH 7,4, durante sólo los dos primeros días del ensayo de la cesión, lo que no aportó una ventaja significativa. ⁽³⁰⁾

❖ **Lin et al. En el 2000.** Elaboraron microesferas cargadas con un AINE (diclofenaco), destinados a la administración intra-articular, se han desarrollado utilizando poliésteres diferentes, tales como PLA, PLGA y Poli δ-valerolactona (PV).⁽³¹⁾

❖ **Tuncay et al. En el 2000.** Realizaron estudios, de liberación controlada de formulaciones parenterales de diclofenaco sódico utilizando PLGA, para administración intra-articular, evaluaron *in vitro* para ver el tamaño de partícula, la carga de fármaco, rendimiento, morfología superficial y características de liberación. Para los estudios *in vivo*, utilizaron tecnecio 99m marcador humano policlonal, también usaron immuno gamma globulina (99m Tc-HIG) como radiofármaco para demostrar las lesiones artríticas por radiación de gammagrafía. La evaluación de las lesiones artríticas después de la terapia en los conejos no mostraron ninguna diferencia significativa en el grupo tratados con microesferas de PLGA (50:50) (peso molecular 34 000) en comparación con los grupos de control.⁽²⁾

❖ **Herrero-Vanrell et als. En el 2000.** Elaboraron microesferas de PLGA y ganciclovir con el objetivo de obtener una formulación esterilizada de microesferas PLGA para la liberación controlada intraocular de ganciclovir. Los resultados mostraron que la dispersión del fármaco en suero fisiológico aumentaba la eficiencia de encapsulación, con valores de hasta un 95% en microesferas de 300-500 µm. Estas microesferas cedieron ganciclovir hasta el día 21 de forma constante, pero luego la velocidad disminuyó desde el día 25 hasta el día 42 (final del ensayo de cesión). No se observaron diferencias significativas en el perfil de cesión después de la esterilización.⁽³²⁾

❖ **Yi-Yang et als. En el 2000.** Realizaron un estudio morfológico, de distribución del fármaco y perfiles de liberación "*in vitro*" de microesferas de policaprolactona (PCL) y poli (láctida-co-glicolida) en una relación 65/35 conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) preparada por el método de doble emulsión y evaporación del disolvente, a fin de establecer una correlación entre estos factores, para emplearlos en dispositivos de liberación controlada en peces de zonas tropicales. Empleando un microscopio de barrido láser confocal (MBLC)

ellos encontraron en las micrografías que la concentración de polivinil alcohol (PVA como emulsificante) en la fase externa acuosa influye fuertemente en la distribución del fármaco dentro de las microesferas y en los perfiles de liberación, y que esta técnica provee una buena aproximación para explorar la estructura interna de las microesferas y distribución del fármaco. ⁽³³⁾

❖ **Panyan et al. En 2003.** Investigaron el efecto del tamaño de partícula de nano y micropartículas de poli (D, L- Láctida-co-glicolida) (PLGA 50/50) en la degradación del polímero y liberación de albúmina sérica bovina (BSA), emplearon la técnica de doble emulsión agua/aceite/agua y evaporación del disolvente para preparar estas nano y micropartículas. Ellos encontraron que la degradación del polímero en nano y micropartículas de PLGA, con una rápida degradación durante los primeros 20-30 días seguido por una lenta fase de degradación. ⁽³⁴⁾

❖ **Fernandez A. et al. En 2003.** Con el fin de mejorar su utilidad terapéutica, han logrado desarrollar microcapsulas de ácido poli (láctico-co-glicólico, PLGA), que contienen ibuprofeno microencapsulado para administración intra-articular en el tratamiento de la artritis reumatoidea, logrando mantener *in vitro* concentraciones terapéuticamente adecuadas durante más de ocho días. ⁽³⁵⁾

❖ **Chiappetta D, Legaspi MJ, Niselman v, et al. En el 2005.** Obtuvieron microesferas de poly(D,L-láctico) conteniendo progesterona por medio de una emulsión simple aceite en agua empleando una técnica de evaporación de solvente. Encontraron que la cantidad de principio activo, cantidad de polímero y concentración de alcohol polivinílico, influyeron significativamente sobre la encapsulación de progesterona. Los estudios de liberación *in vitro* han mostrado que de acuerdo al tamaño de partícula se pueden obtener formulaciones que logran liberar progesterona en pocos días u obtener una liberación sostenida durante 28 días. Los estudios muestran que existe una interacción fisicoquímica entre la progesterona y el polímero. ⁽³⁶⁾

❖ **Aragón et al. En el 2010.** Elaboran micropartículas de un polímero biodegradable, ácido poli (láctico-co-glicólico), cargadas con naproxeno. Concluyeron que las mejores condiciones para la elaboración de las micropartículas son determinadas experimentalmente, encontrando que la relación fármaco/polímero, la cantidad de isopropanol, el volumen de fase acuosa, la velocidad de agitación y el tiempo de agitación influyen significativamente en las características de las micropartículas obtenidas. En el modelo de edema plantar inducido por carragenina en ratas Wistar, se encuentra que el naproxeno microencapsulado en dosis de 5 mg/Kg y 10 mg/Kg presenta mayor efecto antiinflamatorio que el naproxeno libre en dosis de 10 mg/Kg. ⁽³⁷⁾

2.2.2. Antecedentes Nacionales

❖ **Bautista Ch. En el 2009.** Evaluó si los Biopolímeros son válidos para obtener micropartículas por el método de la doble emulsión (A1/O/A2) - evaporación del solvente, método específico para la microencapsulación de fármacos hidrosolubles. La capacidad de cada uno de ellos para obtener micropartículas fue evaluada a través del aspecto de las micropartículas (MP) y del rendimiento del proceso. Realizó una optimización del método empleado en la elaboración de las MP, evaluando la posible influencia de factores tecnológicos y de formulación en el aspecto y tamaño de las MP. Con el método optimizado elaboró micropartículas biodegradables conteniendo un fármaco hidrosoluble, capaces de controlar la liberación de fármaco durante al menos una semana y que se puedan administrar por vía parenteral mediante inyección subcutánea. ⁽¹⁾

No se halló más trabajos de investigación similares durante las revisiones bibliográficas en nuestro país.

2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Uno de los criterios fundamentales en la elección del material polimérico utilizado en la preparación de las microcápsulas es su biocompatibilidad. ⁽³⁸⁾ El poly (D, L. láctico-co-glicólico, PLGA) ha suscitado en los últimos años la mayor atención, por tratarse de polímeros biodegradables y biocompatibles. ⁽³⁹⁾ En la preparación de microesferas destinadas a la administración por vía parenteral se deben utilizar

polímeros biodegradables y biocompatibles. La ventaja de estos polímeros es que, una vez administrada la formulación en el lugar de acción, el fármaco es liberado de forma controlada y el polímero se degrada paulatinamente en productos biológicos de fácil eliminación. A tal efecto, resulta particularmente interesante la utilización de copolímeros derivados de los ácidos lácticos y glicólico (PLGA).⁽⁴⁰⁾ El copolímero láctico-glicólico se hidroliza en ácidos láctico y glicólico, metabolitos biocompatibles y carentes de toxicidad.^(41, 42) El ácido láctico es un producto metabólico de algunos aminoácidos. El ácido poliglicólico es cristalino, quebradizo y con un proceso de degradación muy rápido, mientras que el ácido poliláctico es resistente y poco elástico, con un bajo grado de permeabilidad, lo que prolonga su hidrólisis durante meses.

El número de técnicas de microencapsulación ha experimentado un crecimiento continuo en los últimos tiempos. La elección de una de ellas depende de la naturaleza tanto del polímero como de la sustancia activa a encapsular.

El diclofenaco sódico es un AINE que es uno de los más utilizados en la terapia del dolor, inflamación y fiebre, en la forma farmacéutica de inyectable por tal motivo merece una atención especial puesto que la dosis e intervalo de aplicación está dado por el tiempo de vida media y la biodisponibilidad que presenta. Al microencapsular el diclofenaco sódico, sería una forma de garantizar mejor la biodisponibilidad con una sola dosis con periodos de aplicación prolongados de esta manera evitar dolores de aplicación en el paciente con los fármacos convencionales. Al realizar la prueba in vivo en edema plantar inducido por carragenina en ratas lo que se desea es demostrar que una formulación de microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico puede tener un buen efecto farmacológico con una sola dosis.

2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.4.1. DICLOFENACO SÓDICO

El diclofenaco sódico es un potente antiinflamatorio, es derivado del ácido fenilacéticos de amplio uso en nuestro país, en forma de sal sódica (diclofenaco sódico), encontrándose en preparaciones orales, parenterales, rectales y tópicas.
(43)

Su denominación química es: [o-(2,6-dicloroanilino) fenil] acetato de sodio.

Su fórmula molecular desarrollada es:

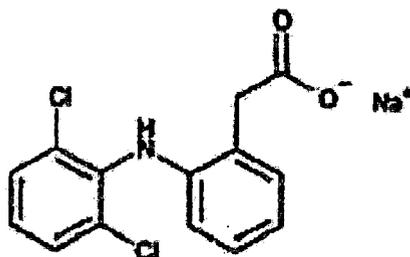


Figura 1. Estructura Química del Diclofenaco Sódico.

Fuente: United States Pharmacopeia Convention. USP 34. NF 29. Vol 1; The United States Pharmacopeial. The National Formulary. Rockville: 2011; p.2763.

Fórmula empírica: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$.

Mw: 318.13.

2.4.2. CARACTERÍSTICAS

Polvo cristalino, blanco o ligeramente amarillento, ligeramente higroscópico, bastante soluble en agua, fácilmente soluble en metanol, soluble en alcohol y poco soluble en acetona.

Funde a aproximadamente 280 °C, con descomposición. ⁽⁴⁴⁾

Es un ácido débil de pK, 4 y coeficiente de reparto n-octanol/tampón pH 7,4 de 13,4. ⁽⁴⁵⁾ Es uno de los antiinflamatorios más utilizados en el mundo. Pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y como otros medicamentos de este grupo posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. ⁽⁴⁶⁾

Los AINEs son medicamentos que reducen los signos y síntomas de la inflamación precisando una administración continuada para ejercer su efecto. La supresión del tratamiento se acompaña de la reaparición de los síntomas.

El mecanismo de acción de diclofenaco sódico, junto con el resto de AINE, es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en los tejidos inflamados, afectando a la actividad farmacológica mediada por el ácido araquidónico de diversas formas:

- Actuando como un potente inhibidor de la ciclo-oxigenasa, disminuyendo de esta manera la producción de prostaglandinas y tromboxano.

- Disminuyendo la síntesis de leucotrieno, posiblemente como consecuencia de la inhibición de la lipo-oxigenasa.

Inhibiendo la liberación y estimulando la recaptación del ácido araquidónico. En cuanto a las reacciones adversas hay que destacar su toxicidad gastrointestinal, ya que como otros antiinflamatorios no esteroideos, y debido fundamentalmente a su mecanismo de acción como inhibidor de las prostaglandinas, en algunos casos puede dar lugar a lesiones en la mucosa digestiva en distintas intensidades, desde simples irritaciones a la producción de úlceras pépticas o perforaciones intestinales.⁽⁴⁷⁾ Prácticamente la absorción por vía oral es total detectándose concentraciones plasmáticas de 0,5 a 2 horas después de la ingestión de diclofenaco por vía oral y alcanzándose la concentración plasmática máxima al cabo de 1,5 a 2,5 horas.^(48, 49) Se fija en un 99% a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina y su volumen de distribución es de 0,17 +/- 0,11 L/Kg. Es metabolizado fundamentalmente en el hígado dando lugar a cuatro metabolitos, el principal de los cuales es el 4'-hidroxi-diclofenaco que parece ser activo en humanos. La semivida plasmática del diclofenaco es de 1,2 a 1,8 horas, su eliminación se realiza por vía renal (<65% de la dosis) y por vía fecal (35%). El diclofenaco sódico es susceptible de sufrir una ciclación intramolecular en medio ácido según la Figura 2.⁽⁴⁹⁾

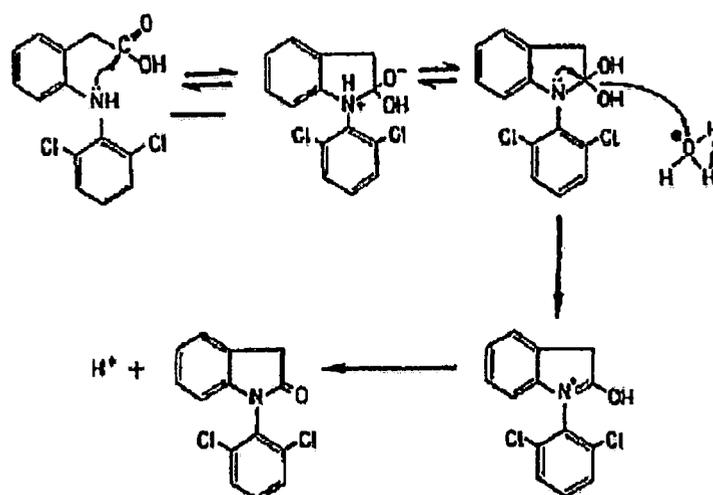


Figura 2. Ciclación Intramolecular de Diclofenaco Sódico en Medio Acido.

Fuente: RACZ 1. Drug formulation. Ed. J. Wiley; 1989. p. 165-166.⁽⁴⁹⁾

En soluciones ácidas, el grupo amino existente se encuentra en forma de base libre y el grupo carboxilo está ionizado. El producto resultante de esta ciclación tiene una estructura lactámica. Debido a ello es recomendable evitar que el producto se encuentre en medio ácido ya que esto conduce a la inactivación del mismo. Por las razones argumentadas, la semivida plasmática corta, ciclación intramolecular en medio ácido y producción de irritación gástrica, el diclofenaco sódico es un principio activo idóneo para ser formulado en formas de cesión prolongada con un doble objetivo, controlar el lugar de cesión del mismo y prolongar su liberación en el tiempo. Por todo lo expuesto hemos seleccionado este principio activo para obtener formulaciones de liberación prolongada.

2.4.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

2.4.3.1. CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Para un mejor entendimiento del presente trabajo, se definirán algunos términos como sistemas de liberación controlada, micropartículas, nanopartículas, microcápsulas, microesferas, nanocápsulas y nanoesferas.

- A. **SLC (sistemas de liberación controlada):** Preparaciones que modifican la velocidad o sitio de liberación del principio activo para lograr objetivos terapéuticos específicos que no se logran con las formas convencionales ⁽⁵⁰⁾.
- B. **Micropartículas y nanopartículas:** Sistemas sólidos coloidales, en las que el principio activo se puede encontrar disuelto, atrapado, encapsulado o adsorbido en el seno de la matriz. Se diferencian en el tamaño, las micropartículas tienen tamaño en el orden de los micrómetros (1-250 μm), y las nanopartículas en el orden de los nanómetros (10-999 nm). Dentro de las micropartículas están incluidas las microcápsulas y las microesferas y dentro de las nanopartículas, las nanocápsulas y las nanoesferas. ^(51, 52)
- C. **Microcápsulas y nanocápsulas:** Términos empleados para definir partículas o sistemas poliméricos de tipo reservorio, formadas por una cápsula o pared de

polímero que contiene un volumen interno, que puede ser lipídico o no, donde se encuentra disuelto el fármaco. Tienen perfectamente definido núcleo y pared ⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

D. Microesferas y Nanoesferas: Partículas compactas de polímeros, en las que el fármaco se encuentra disperso o solubilizado en el interior de una matriz polimérica (sistema polimérico matricial), en los que no es posible diferenciar núcleo y pared. ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ Fueron introducidas a mediados de 1970. Son partículas esféricas sin una distinción entre cubierta y núcleo. Tienen una estructura monolítica. ⁽⁵⁵⁾

Los SLC pueden ser clasificados teniendo en cuenta la naturaleza de los polímeros utilizados, llamándoles entonces biodegradables o bioerosibles, los que pueden ser transformados por el organismo y eliminados. En este caso y además de origen natural se encuentran los ácidos polilácticos, la gelatina, la albúmina, el colágeno, la policaprolactona, la quitosana y el ácido poliacrílico; y de origen sintético, el alcohol polivinílico, los polietilenglicoles y los polialquilmecanoacrilatos. ^(53, 56) La otra clasificación es "no biodegradables" que se refiere a los que no son atacados por los fluidos biológicos y se acumulan en el organismo. Como ejemplo de estos están los derivados de la celulosa como polímeros naturales y las poliácridamidas y los metacrilatos como sintéticos. ^(53, 56)

2.4.3.2. MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL

Recientemente han resultado útiles para formulaciones de liberación controlada de uso parenteral los sistemas de liberación consistentes en polímeros biodegradables, debido a sus posibilidades de controlar la liberación del fármaco de forma efectiva. Entre estos polímeros han desempeñado una función importante los ácidos lácticos y glicólico teniendo en cuenta su disponibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y biocompatibilidad. ⁽⁵⁷⁾ Dentro de estas formulaciones se encuentran las microesferas que se han utilizado exitosamente para encapsular una amplia variedad de principios activos, incluyendo citostáticos, antiinflamatorios, péptidos y hormonas, entre otros. ^(58, 59)

Estas microesferas son partículas esféricas análogas de las microcápsulas pero sin una distinción clara entre núcleo y pared. Tiene una estructura monolítica preparada a partir de materiales biodegradables y con un gran espectro de velocidad de cesión y propiedades degradativas, donde el principio activo o agente terapéutico está distribuido a través de la matriz como una dispersión molecular o de partículas. Se han usado varios métodos para la preparación de microesferas de diferentes polímeros biodegradables, incluyendo polímeros naturales y sintéticos. La selección de un método de preparación adecuado depende de las propiedades del polímero y el principio activo que se utilice y puede afectar las características de las microesferas. ⁽⁶⁰⁾

Los sistemas de liberación controlada de fármacos consistentes de polímeros biodegradables permiten controlar la liberación de fármacos efectivamente dentro del rango terapéutico deseado, evitando las consecuencias de un exceso o un déficit, que podrían comprometer su eficacia antes de la administración de la siguiente dosis. Ellos consisten de una matriz polimérica o un dispositivo adecuado que contiene el principio activo y pueden administrarse fácilmente por la vía parenteral.

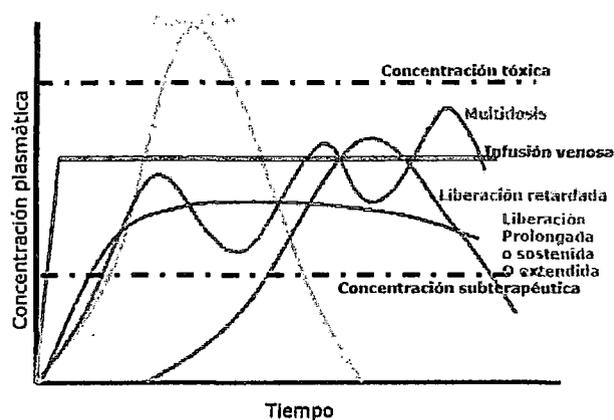


Figura 3. Niveles en Sangre Alcanzada por un Fármaco.

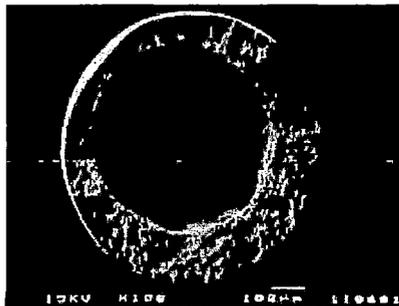
Fuente: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/.../liberacionmodificada_11437.pdf. Acceso el 8 de agosto 2012. ⁽⁶¹⁾

El tipo de estructura depende, en gran medida, del procedimiento de encapsulación empleado, así como de las propiedades de la sustancia que se encapsulará y del material de cubierta, Figura 4. La microencapsulación surge en el año 1931, con la

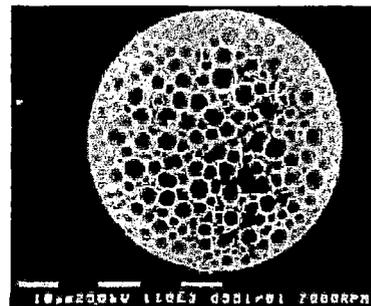
publicación de un estudio que describía la formación de microcápsulas de gelatina, según un procedimiento que se llamó “coacervación”.⁽⁶²⁾ Esta técnica fue objeto de múltiples variaciones durante los años 40, y su aplicación más importante se dirigió a la encapsulación de colorantes para la elaboración del papel para calcar.

En los años siguientes, la aplicación de la microencapsulación se extendió a diferentes ramas:

- La agricultura, en la microencapsulación de fertilizantes y pesticidas.



Estructura reservorio.



Estructura matricial.

Figura 4. Tipos de Estructura que Presenta la Partícula Resultante del proceso de Microencapsulación de un Material Líquido.

Fuente: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/.../liberacionmodificada_11437.pdf. Acceso el 8 de agosto 2012.⁽⁶¹⁾

Las construcciones navales, en la elaboración de cubiertas de tornillos y remaches con el objetivo de protegerlos contra la corrosión.

- La industria cosmética, en la elaboración de productos como desodorantes, champús, nebulizadores, para mejorar su estabilidad o biodisponibilidad.
- La industria médico-farmacéutica, en la cual se han explotado más ampliamente

las bondades de la microencapsulación con diversos propósitos: enmascarar propiedades organolépticas indeseables que pueden presentar algunas sustancias (olor, color, sabor desagradable); aislar algún componente de una formulación sensible a las condiciones ambientales o también algún componente tóxico para los operarios o el ambiente; revestir partículas, que por su forma irregular, son difíciles de comprimir; convertir principios activos líquidos en sólidos, ya que son más

fáciles de manipular y sobre todo, en el diseño de formulaciones de liberación controlada de fármacos con diferente fines.

La microencapsulación para el desarrollo de medicamentos comenzó en la década de los años 50 del siglo XX, cuando una compañía farmacéutica introdujo esta tecnología, con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de los fármacos. ⁽⁶²⁾ Con esa intención y la de prevenir la irritación gástrica fue microencapsulada la aspirina, la cual aparece citada en la bibliografía como uno de los primeros medicamentos microencapsulados, A pesar de la aplicación tardía de este método en el campo de los medicamentos, su difusión fue muy rápida, y en un corto período llegó a ser una tecnología ampliamente extendida en la industria farmacéutica.

2.4.3.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS

VENTAJAS

- Complacencia para el paciente, pues con una sola dosificación se logra un efecto terapéutico prolongado. ⁽⁶⁰⁾
- El sistema proporciona el grado de control necesario para lograr un orden de liberación del principio activo cercano a cero. ⁽⁶³⁾
- La velocidad y duración de la liberación del principio activo *in vivo* pueden ser determinadas mediante la selección del tamaño de las partículas. ⁽⁵⁶⁾
- Las partículas son lo suficientemente pequeñas para ser administradas por medio de una inyección y se biodegradan en el organismo sin causar ningún efecto indeseable en el sitio de inyección o implantación. ⁽⁶³⁾
- Se evita el efecto del primer paso. ⁽⁶⁰⁾
- Estabilidad física, química y microbiológica.
- Se reducen las concentraciones sistémicas de la droga y se promueve la concentración local en el órgano blanco, de manera que se obtiene la máxima actividad farmacológica con mínimos efectos adversos sistémicos. ⁽⁵⁶⁾
- Protección del principio activo frente a posibles inactivadores en el medio biológico antes de alcanzar el lugar de acción. ⁽⁵²⁾
- Fácil fabricación con buena reproducibilidad.

DESVENTAJAS

- En el caso que ocurra alguna reacción adversa o complicación no se podrá retirar el sistema implantado; solamente se recuperará el estado inicial cuando el sistema se haya degradado totalmente y se libere y elimine completamente el principio activo.

2.4.3.4. MATERIALES DE RECUBRIMIENTO

La variedad de materiales que pueden emplearse para la microencapsulación se ha ampliado gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de esta técnica. De modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros. ⁽⁶²⁾

Grasas: La cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica.

Proteínas: La gelatina fue el primer material utilizado en la microencapsulación, y es, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micropartículas.

Polímeros: Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; se destacan el alginato, la dextrana, la goma arábiga y la quitosana. Los polímeros semisintéticos engloban los derivados de la celulosa, de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad. Por ejemplo, la etilcelulosa y el acetobutirato de celulosa son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa presenta una solubilidad dependiente del pH. Los polímeros sintéticos más utilizados son los derivados acrílicos y los poliésteres.

Entre los derivados acrílicos están los polímeros insolubles con diferente grado de permeabilidad y también variedades con solubilidad dependiente del pH. Estos ofrecen amplias posibilidades para controlar la liberación del material encapsulado. Los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, lo que permite su administración por la vía parenteral. Entre ellos, los más conocidos son la poli- ϵ -caprolactona, el ácido poliláctico, y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico (PLGA, siglas en inglés).

De acuerdo con la aplicación del producto que va a ser microencapsulado, se selecciona el material adecuado. Sin embargo, es imprescindible que sea soluble en el solvente de elección; que produzca matrices o membranas homogéneas, con la porosidad deseada; que sea estable en las condiciones ambientales y en general en las condiciones en las que se almacene, e inerte frente a los demás compuestos que estén en contacto con él. Si se destinan al diseño de medicamentos, deben carecer de toxicidad y de actividad farmacológica.

Los materiales más empleados específicamente con fines farmacéuticos y sobre todo en la elaboración de microesferas que van a ser inyectadas son los homopolímeros del ácido láctico y los copolímeros de este con el ácido glicólico, debido a sus bondades en cuanto a biocompatibilidad y capacidad para lograr diferentes perfiles de liberación de los fármacos encapsulados.

2.4.3.5. PLGA, COMO MATRIZ POLIMÉRICA PARA LA MICROENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS.

Los PLGA son poliésteres que se obtienen mediante la policondensación lineal de los hidroxiácidos o mediante la apertura del anillo de las lactonas correspondientes, Figura 5. ⁽⁶⁶⁾ Estos polímeros son solubles en solventes orgánicos como diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y tetrahidrofurano; pero no son solubles en agua. Algunos son cristalinos y otros amorfos, en dependencia de su composición en cuanto a ácido láctico y glicólico. Los amorfos son los más empleados en el diseño de formulaciones de liberación controlada. Ellos difieren en la proporción de los monómeros que lo componen, en su masa molecular (entre 5 y 100 KDa, aproximadamente) y en el grupo terminal (-COOH o -COOR). Estos tres parámetros determinan, en gran medida, su hidrofobicidad y su cinética de

degradación, y a su vez, la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada. ⁽⁶⁵⁾ El término biodegradable en estos polímeros se refiere a la hidrólisis de sus enlaces éster por contacto con los fluidos biológicos o artificiales. Esta reacción produce ácido láctico y glicólico, los cuales son metabolizados en el ciclo de Krebs hasta formar agua y CO₂. ⁽⁶⁵⁾ Por otro lado, y aunque resulte paradójico, puede ser más fácil para una microesfera introducirse en una célula que para el fármaco libre, ya que una nano o micropartícula de tamaño adecuado es incorporada fácilmente como vacuola por fagocitosis.

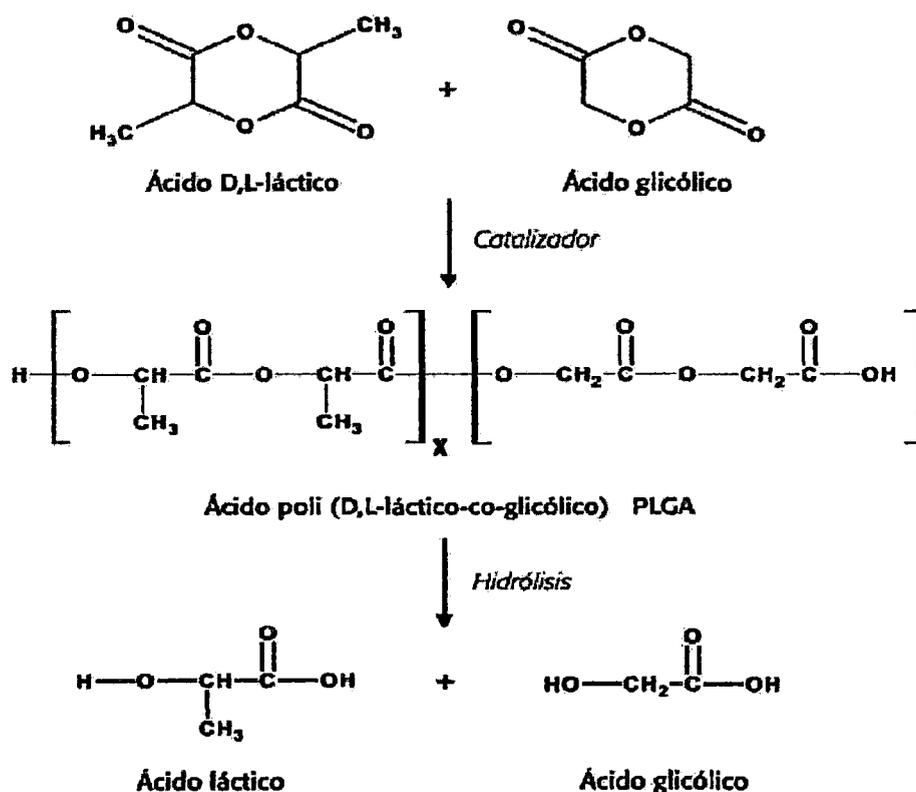


Figura 5. Síntesis e Hidrólisis del Copolimero Poli-(D, L-Lactico-co-glicolico), PLGA.
 Fuente: Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 36 (2), 2007.p. 134-153 ⁽⁶⁶⁾.

Al ser empleados como matrices en la obtención de microesferas, la degradación de estos polímeros ocurre en dos etapas. La primera comprende la escisión hidrolítica de los enlaces éster, llamada degradación, y en la cual se generan

oligómeros y monómeros, con la consiguiente disminución de la masa molecular del polímero original. En la segunda etapa, llamada erosión, ocurre la pérdida de masa de la matriz, y la velocidad de escisión de los enlaces puede aumentar debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida. ⁽⁶⁷⁾ Precisamente por no ser solubles en agua pero sí degradables por ella, son muy utilizados en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Los PLGA son biocompatibles, ya que no provocan toxicidad cuando se introducen en el organismo por diferentes vías. ^(68, 69) De hecho, desde hace muchos años, estos polímeros se utilizan en la fabricación de hilo de sutura biodegradable, así como en la fabricación de dispositivos ortopédicos de fijación, tales como discos, tornillos y pernos. ⁽⁷⁰⁾

2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Existen varios métodos para la preparación de microesferas biodegradables preparadas de polímeros de ácido láctico y glicólico.

El método de evaporación/extracción del solvente y de separación de fases son los 2 principales métodos usados para estos fines.

La elección de la técnica de microencapsulación se hace principalmente sobre la base de las características físico-químicas del polímero y del principio activo a encapsular y se deben tener en cuenta los requerimientos siguientes:

- El rendimiento de microesferas con el intervalo de tamaños deseado debe ser alto.
- La eficiencia de encapsulación del principio activo debe ser alta.
- La actividad biológica del principio activo debe mantenerse durante el proceso de encapsulación.
- La reproducibilidad lote a lote en términos de un perfil cualitativo y de liberación del principio activo debe estar dentro de los límites especificados.
- El perfil de liberación debe ser ajustable mediante el control de la composición y las variables del proceso.

- Las microesferas no deben agregarse, deben ser un polvo fino que fluya libremente.
- Por otra parte algunas de las propiedades de las microesferas deben ser optimizadas como son:
 - Tamaño y distribución de tamaños.
 - Propiedades de superficie.
 - Carga de principio activo.
 - Velocidad de liberación del principio activo.
 - Velocidad de degradación de la matriz.

Otros aspectos como esterilidad, apirogenicidad y contenido de solvente residual tienen que ser satisfactorios. ⁽⁷¹⁾

A continuación se discutirán varios métodos de preparación de microesferas obtenidas a partir de polímeros biodegradables.

2.5.1. MÉTODO DE EVAPORACIÓN/EXTRACCIÓN DEL SOLVENTE.

En este método están incluidos todos los procesos en los que tiene lugar la eliminación del solvente, en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de este. En todos los casos previamente tiene que formarse una emulsión. En dependencia de la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se forme se clasificarán en técnicas de evaporación/extracción del solvente en fase acuosa o en fase oleosa. ^(72, 73)

2.5.1.1. En fase acuosa:

A. Método de la emulsión aceite en agua (O/W).

En este método la fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo se emulsifica en una fase acuosa que contiene un tensioactivo. Posteriormente las gotas orgánicas emulsificadas que contienen el polímero y el principio activo son endurecidas como microesferas por eliminación del solvente orgánico. ⁽⁷⁴⁾

En la Figura 6 aparece representado el esquema de preparación de este método.



Figura 6. Preparación del Método de Evaporación/Extracción del Solvente en Fase Acuosa O/W.
Fuente: Rev. Cubana. Farm. 2001; 35 (2). p. 126-35 ⁽⁷⁵⁾.

Ventajas del método O/W:

- ✓ Es ampliamente usado en la encapsulación de p.a. liposolubles, debido a que se logra una eficiente incorporación de principio activo lipofílicos.
- ✓ Amplio rango de tamaños (desde grandes hasta pequeños) esencialmente controlados por la velocidad y las condiciones de agitación.
- ✓ Las microsferas tendrán propiedades superficiales hidrofílicas, lo que permite su resuspensión sin agregación.

Desventajas del método O/W:

- ✓ La incorporación de principios activos solubles en agua es muy baja debido a la repartición del principio activo en la fase acuosa externa de la emulsión.

(73)

B. Método de la emulsión agua en aceite en agua (W/O/W).

También se conoce como método de la emulsión múltiple. Es una modificación del método o/w. Se utiliza para encapsular principios activos solubles en agua y se ha probado que es muy eficiente para encapsular este tipo de sustancia. En este método el principio activo se disuelve en agua (fase acuosa) y el polímero se disuelve en un solvente orgánico (fase orgánica). Ambas fases se mezclan obteniéndose la emulsión W/O, la que se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un emulsificante como el alcohol polivinílico. Luego el solvente orgánico es eliminado y se obtienen las microesferas. ⁽⁷³⁾ En la Figura 7 se muestra el esquema de preparación de este método. *Jeffery* y otros prepararon microesferas de albúmina de ácido poliláctico-co-glicólico usando este método y evaluaron el efecto de los parámetros de la formulación sobre las características de las microesferas obtenidas. ^(76, 77)

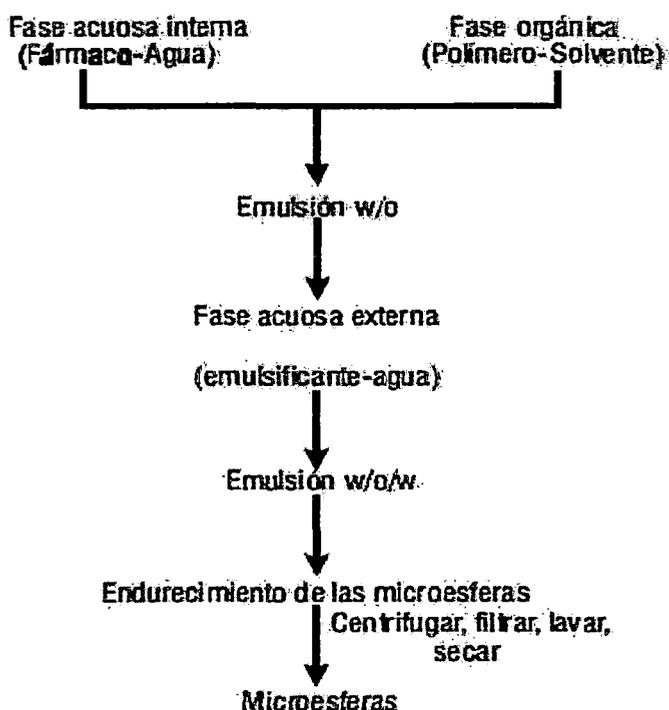


Figura 7. Flujograma Para la obtención de las Microcapsulas por el Método de Emulsión Múltiple W/O/W.

Fuente: Rev. Cubana. Farm. 2001; 35 (2): 126-35. ⁽⁷⁵⁾

2.5.1.2. En fase oleosa:

A. Emulsión O/O. Este método es otra modificación de la emulsión o/w y la fase continua estará formada por un líquido orgánico como el aceite mineral ^(78, 46) y se forma la emulsión O/O. Se usa para encapsular eficazmente principios activos solubles en agua. ⁽⁵⁷⁾ En la Figura 8 aparece representado este método.

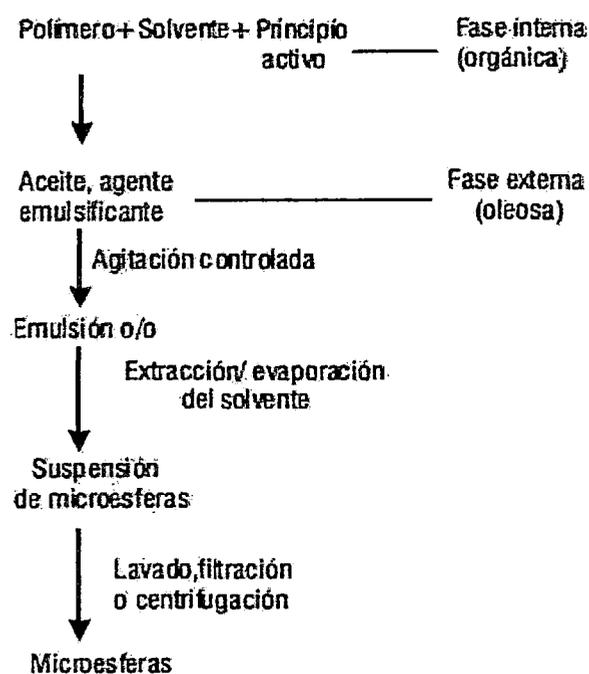


Figura 8. Preparación del Método de Evaporación/Extracción del Solvente en Fase Oleosa O/O.
Fuente: Rev. Cubana. Farm. 2001; 35 (2): 126-35 ⁽⁷⁵⁾.

Tsai y otros, usaron este método para encapsular mitomicina C en microsferas de ácido poliláctico ⁽⁷⁹⁾.

Desventajas del método O/O:

- ✓ Se hace difícil la obtención de microsferas pequeñas (menores de 50 μm). ⁽⁸⁰⁾
- ✓ las microsferas tienden a agregarse cuando se resuspenden en vehículos acuosos debido a la naturaleza hidrófoba de su superficie y la ausencia de un estabilizador hidrofílico. ⁽⁷¹⁾

Aunque el método de evaporación/extracción del solvente es conceptualmente simple, existen muchas variables que pueden influir en las características de las microesferas obtenidas. ^(81, 82) Estas variables son:

- Solvente orgánico.
- Naturaleza y cantidad de emulsificante.
- Naturaleza y solubilidad del principio activo.
- Temperatura de evaporación del solvente.
- Relación de volumen de las fases orgánica y acuosa.
- Relación principio activo y polímero.
- Estructura y masa molecular del polímero.
- Tipo y velocidad de agitación.

2.5.1.3. VARIABLES A TOMAR EN CUENTA EN EL MÉTODO DE EVAPORACIÓN / EXTRACCIÓN DEL SOLVENTE

A continuación revisaremos las variables antes mencionadas:

a) **Los solventes:** Cuando se usa el proceso de evaporación/extracción del solvente, el solvente para los polímeros de ácido láctico/glicólico debe ser inmisible o solo ligeramente soluble en el medio de suspensión (acuoso u oleoso). *Bodmeier y Mcginity en 1988*, evaluaron el efecto de diferentes solventes en la formación de microesferas de ácido poli (DL-láctico). ^(83, 84) Ellos encontraron que los solventes miscibles en agua, como la acetona y el dimetilsulfóxido, no conducen a la formación de microesferas durante la emulsificación. Por el contrario, se forman aglomerados irregulares debido al rápido intercambio del solvente. Sin embargo, *Kawashina Y, Yamamoto H en 1998*, y otros utilizan solventes como la acetona para realizar mezclas que contribuyen a mejorar el proceso de evaporación del solvente y así reducir el tiempo de formación de las microesferas. ⁽⁸⁵⁾ Adicionalmente, el punto de ebullición del solvente debe ser más bajo que el del medio de suspensión si el solvente es eliminado por evaporación.

Los solventes más comúnmente utilizados son el acetato de etilo y el diclorometano, por su baja toxicidad, su fácil eliminación y su excelente habilidad para disolver polímeros. Otros solventes que se han usado son el cloroformo y el acetonitrilo.

Si se desea la disolución del principio activo en la solución del polímero, se necesita tener también en consideración la habilidad del disolvente para disolver el principio activo. También se han utilizado mezclas de solventes para disolver el polímero y el principio activo, ⁽⁵⁸⁾ por ejemplo, diclorometano (inmiscible en agua) más metanol, etanol o propilenglicol (miscibles en agua). El uso de estos 3 últimos permite una rápida eliminación del solvente y una rápida precipitación del polímero.

b) **Los emulsificantes:** Los emulsificantes proporcionan una lámina fina protectora alrededor de las gotículas de aceite, polímero y principio activo, y de esta forma disminuyen la coalescencia y la coagulación y estabilizan el sistema emulsión.

Frecuentemente, la dificultad inicial encontrada en el desarrollo de un procedimiento de microencapsulación es la aglomeración de las gotículas de aceite durante el proceso de fabricación. Cuando se está eliminando el solvente, el emulsificante continúa manteniendo las gotículas de aceite en su configuración esférica y las previene de la agregación hasta que el solvente es eliminado completamente y las microsferas son endurecidas como partículas discretas. ⁽⁸⁶⁾

Los emulsificantes más comúnmente empleados en el proceso de evaporación/extracción del solvente son los coloides poliméricos hidrofílicos y los surfactantes aniónicos o no iónicos. Ejemplos de ellos son el alcohol polivinílico, ^(87, 88) la polivinilpirrolidona, los alginatos, ⁽⁸⁹⁾ la gelatina, ⁽⁹⁰⁾ la metilcelulosa, la hidroxialquilcelulosa, ⁽⁸³⁾ el polisorbato, ^(91, 92) el span, ⁽⁷⁹⁾ la lecitina, ⁽⁷⁵⁾ etc.

El emulsificante más comúnmente empleado en el método O/W es el alcohol polivinílico. La concentración requerida y la efectividad de cada emulsificante es diferente, y el mejor emulsificante para una aplicación en particular es determinado experimentalmente.

Las propiedades físicoquímicas, las propiedades estructurales y la concentración del emulsificante influyen en las características de las microsferas. ^(86,92, 93)

Generalmente se dice que para un emulsificante dado, a mayor concentración se obtienen microsferas más pequeñas. Sin embargo, han aparecido concentraciones limitantes, por encima de las cuales el emulsificante no aumenta

su efecto. Esto se debe probablemente a que se haya alcanzado la concentración óptima de empaquetamiento de la emulsión.

c) Los principios activos: Debido a que el método O/W involucra una emulsión acuosa, este se limita a encapsular en las microesferas aquellos principios activos que presentan una baja solubilidad en agua, ya que si el principio activo es soluble en agua se repartirá desde la fase orgánica hacia la fase acuosa. Esta pérdida del principio activo traerá como resultado una pobre eficiencia de encapsulación. ^(91, 93) Por el contrario, los principios activos liposolubles como los esteroides, pueden ser encapsulados exitosamente en microesferas usando este método O/W. ⁽⁹⁵⁾ Para minimizar la pérdida de principios activos ionizables hacia la fase acuosa durante el proceso de microencapsulación O/W, el pH de la fase acuosa puede ajustarse para suprimir la ionización del principio activo y consecuentemente reducir la solubilidad de este en dicha fase. Este resultado negativo puede también reducirse por la previa saturación de la fase acuosa con el mismo principio activo. *Wakiyama* en 1981 y otros observaron que al presaturar la fase acuosa de una emulsión con el principio activo (tetracaína) a encapsular aumentaba el contenido de este en las microesferas formadas ⁽⁸⁶⁾.

Si el principio activo a ser incorporado en las microesferas es insoluble en el solvente usado para disolver el polímero, este puede ser pulverizado o micronizado para proporcionar una distribución homogénea de partículas discretas mediante la emulsión y la microesfera resultante. Si el principio activo no es completamente soluble en el solvente orgánico empleado, este puede cristalizar dentro de la microesfera a ciertas concentraciones. En este sentido los cristales deben concentrarse en algunas regiones de las microesferas, como en la superficie, dando una distribución heterogénea del principio activo que alterará su perfil de liberación. ^(93, 95)

d) Estructura y masa molecular: La naturaleza del polímero, la secuencia de los monómeros y de ahí su masa molecular permiten ajustar la liberación del fármaco al tiempo en que se alcanzan las concentraciones terapéuticas en sangre.

usado en la separación de fases, son: diclorometano, acetato de etilo, acetonitrilo y tolueno.

Los no solventes influyen sobre la separación de fases y sobre el endurecimiento de las nuevas microesferas formadas. Además, debe tenerse mucho cuidado en su selección. El no solvente no debe disolver al polímero o al principio activo, pero debe ser inmisible con el solvente para el polímero. El primer no solvente debe ser fácilmente removido por lavado con el segundo no solvente. El segundo no solvente debe ser relativamente volátil. Ejemplos del primer no solvente son líquidos viscosos polibutadienos y polímeros metacrílicos (líquidos de bajo peso molecular), aceite de silicona, aceites vegetales y aceite de parafina líquida. ^(96- 98) Los hidrocarburos alifáticos como el heptano, hexano y éter de petróleo se han usado comúnmente como segundo no solvente. ⁽⁹⁹⁾ Fong en 1979, patentó una única técnica de separación de fases que utiliza bajas temperaturas, ⁽¹⁰⁰⁾ donde microencapsuló 2 principios activos en ácido poliláctico usando tolueno como solvente para el polímero e isopropanol como único no solvente. Soriano Torres en 1995 y otros, también estudiaron el proceso de separación de fases usando ácido poliláctico-co-glicólico para formar microesferas que contenían triptorelina ⁽¹⁰¹⁾ y concluyeron que la naturaleza físicoquímica del polímero, la concentración del polímero, la viscosidad del aceite de silicona y la relación polímero-aceite de silicona afectaban la estabilidad del sistema emulsión en el proceso de separación de fases y por tanto la formación y calidad de la microesfera.

2.6. MECANISMOS DE LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS MICROESFERAS

La liberación de principios activos convencionales desde microesferas (ME) de ácido poliláctico/poliglicólico generalmente ocurre por difusión a través de la matriz del polímero, así como a través de los poros de la estructura del polímero. Sin embargo, la biodegradación de la matriz del polímero y disolución del polímero degradado continuamente cambia la geometría de la ME y la textura de la matriz del polímero. Como resultado, el modelo de liberación de principios activos es una combinación de difusión y degradación. ⁽¹⁰²⁾

Los polímeros de diferentes masas moleculares varían en sus viscosidades intrínsecas, parámetro que determina en la eficiencia del proceso de obtención de las microesferas y en sus propiedades.

El resto de los parámetros influyen en el proceso de optimización del método de obtención y están íntimamente relacionados con el solvente, el polímero, el emulsificante y el principio activo.

2.5.2. MÉTODO DE SEPARACIÓN DE FASES (COACERVACIÓN).

Es un método no acuoso de preparación de microesferas y es utilizada fundamentalmente para principios activos solubles en agua. Consiste en disolver primeramente el polímero en el solvente orgánico y el principio activo en agua.

Luego la emulsión microfina se obtiene por la adición de la solución acuosa a la solución orgánica. Un primer no solvente (co-solvente) para el polímero se adiciona lentamente al sistema, formándose las microesferas de coaservado que son muy blandas para ser recolectadas, por lo que se hace necesaria la adición de una mayor cantidad de un segundo no solvente para endurecer las microesferas, las que ahora serán llamadas microesferas, Figura 9. ⁽⁷³⁾

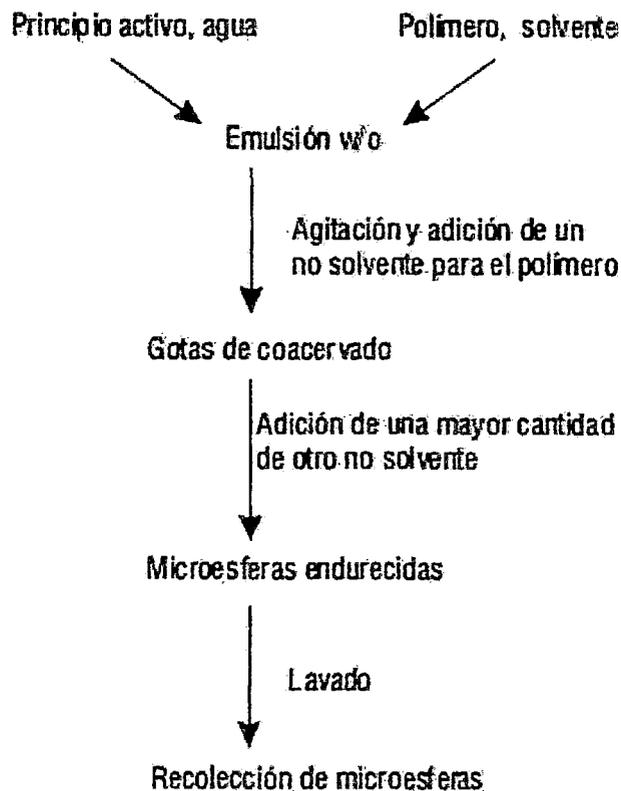


Figura 9. Método de Separación de Fases (Coacervación).

Fuente: Rev. Cubana. Farm. 2001; 35 (2): 126-35 ⁽⁷⁹⁾.

Desventajas del método de separación de fases:

- ✓ Frecuente aglomeración porque no hay un estabilizador.
- ✓ La variación lote a lote ha causado problemas tanto en el proceso de coacervación como en el perfil de velocidad de liberación. ⁽⁷¹⁾
- ✓ Más costoso comparado con los otros métodos debido a la gran cantidad de solventes que se necesitan aumentando la contaminación ambiental.

Muchos solventes para el polímero pueden usarse en el proceso de separación de fases. En comparación con el método de evaporación/extracción del solvente, los requerimientos para el solvente del polímero son menos rigurosos. El solvente no tiene que ser inmiscible con el agua y el punto de ebullición puede ser mayor que el del agua. Sin embargo, el solvente debe disolver solo al polímero y no al p.a., es decir, se prefiere que el p.a. esté disperso en lugar de disuelto en la solución que contiene el polímero. ⁽⁷³⁾ Algunos de los ejemplos de solventes para el polímero

Debido a que la biodegradación del polímero generalmente involucra la erosión de la masa; la ME toma agua antes de comenzar la degradación de la matriz y disolución. Después que la hidratación de la matriz del polímero ha ocurrido, la molécula de principio activo encapsulado comienza a disolverse en el medio acuoso y difunde fuera de la matriz del polímero, por lo tanto, el mecanismo de liberación de principios activos puede verse como en 3 etapas:

- 1) Una liberación inicial del principio activo enlazado a la superficie o embebida en la región superficial de la ME.
- 2) Liberación difusional del principio activo a través de la matriz del polímero y a través de los poros durante la degradación de la matriz.
- 3) Liberación erosional del principio activo por la desintegración de la matriz del polímero y disolución después que la matriz pierde su integridad y las cadenas del polímero son degradadas a un tamaño lo suficientemente pequeñas como para ser solubilizadas.

Todas estas etapas pueden desempeñar una parte importante en el proceso de liberación, lo que depende de la naturaleza del principio activo encapsulado, las propiedades físicoquímicas del polímero y la estructura de la ME.

El perfil de liberación de un principio activo desde la ME depende en gran parte, de la distribución del principio activo. Si el principio activo está heterogéneamente distribuido en la matriz del polímero, la curva de liberación puede poseer un modelo trifásico. Si el principio activo está homogéneamente distribuido en la matriz del polímero la curva de liberación puede poseer un modelo bifásico, es decir, la primera fase no ocurre porque no existe principio activo enlazado a la superficie de la ME. ⁽¹⁰²⁾

En el caso de proteínas y péptidos no hay difusión a través de la matriz del polímero sólido porque los principios activos no son solubles en el polímero, solamente ocurre difusión a través de los poros o canales acuosos. Estos canales acuosos facilitan la liberación de principios activos solubles en agua. Luego de este primer mecanismo ocurre la liberación por degradación del polímero que está

asociado con la generación de porosidad, debido a la toma de agua y final desintegración de la matriz del polímero.

Existen varios factores que afectan la liberación del principio activo desde estos sistemas. Entre ellos se encuentran la composición y masa molecular del polímero, el contenido de principio activo y el tamaño y porosidad de la microesfera ⁽¹⁰³⁾.

2.6.1. PROCESAMIENTO IN VIVO

El destino de las microesferas administradas *in vivo* se encuentra bien establecido para algunas vías de administración, siendo el tamaño de partícula una variable importante en su procesamiento. La administración subcutánea e intramuscular de microesferas de PLGA induce a la formación de una cápsula fibrosa alrededor del lugar de inyección. Así mismo, en éste se produce una infiltración por macrófagos que fagocitan una fracción de las microesferas en un proceso dependiente del tamaño. Estudios realizados sobre fagocitosis de micropartículas han puesto de manifiesto que *in vitro* las microesferas de PLGA de tamaño inferior a 12 μm son fagocitadas por macrófagos, mientras que *in vivo*, las microesferas de tamaño entre 1 y 20 μm son rodeadas por macrófagos. ^(104, 105) Se considera que la acción inmunoestimulante de las microesferas se debe principalmente a la fracción fagocitada, transportada a los nódulos linfáticos y procesada intracelularmente, para finalmente presentar los fragmentos del antígeno a los linfocitos T. Esto puede explicar por qué en algunos estudios, microesferas de mayor tamaño fueron menos inmunogénicas que microesferas menores. ^(106, 107)

2.7. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE PLGA

De manera rutinaria, para la caracterización de cualquier muestra de microesferas, se determina un conjunto de parámetros: morfología, tamaño de la partícula, eficiencia de encapsulación, carga, perfil de liberación, solvente residual, entre otras características.

2.7.1. PARÁMETROS PARA CARACTERIZAR LAS MICROESFERAS

Aunque casi todos esos parámetros deben formar parte de los controles de calidad de las formulaciones farmacéuticas elaboradas con las microesferas, resulta necesario medirlos al concluir el proceso de fabricación de estas, ya que constituyen un producto intermedio en el proceso de formulación.

A. Morfología

Los estudios morfológicos de las muestras de micropartículas revelan sus características importantes, tales como: forma, regularidad de la superficie, continuidad de la membrana (en las microcápsulas), presencia de poros y uniformidad de su distribución (en las partículas), así como el tamaño de estos, homogeneidad del tamaño (de las partículas), presencia de defectos (en las partículas) y agregación. Estos estudios permiten tener una idea del tamaño de las partículas, aunque no son los más apropiados para determinar este parámetro.

Estas características tienen repercusión en las propiedades y aplicaciones de las micropartículas obtenidas.

Por ejemplo, la presencia de agregación resulta indeseable, ya que afecta la homogeneidad del producto elaborado; además, si se desea inyectar las partículas, las agujas se pueden obstruir. A su vez, la cantidad y el tamaño de los poros pueden incidir en la liberación de la sustancia encapsulada y hasta modificar el mecanismo por el cual ocurre esta liberación. La morfología de las partículas se estudia mediante técnicas de microscopía, de las cuales la más empleada es la microscopía electrónica de barrido. ⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾ Aunque con menor frecuencia, también se han usado otros tipos de microscopía; por ejemplo, la microscopía de fuerza atómica, fundamentalmente para el estudio de superficies de nanoesferas; la microscopía confocal, para obtener evidencias de la acidez generada en el interior de las microesferas, como consecuencia de la degradación del PLGA o para estudiar la distribución de la proteína en el interior de la partícula; ⁽¹¹²⁾ y la microscopía de fluorescencia, para determinar la estructura interna de las partículas. ⁽¹¹³⁾

Las propiedades morfológicas de las micropartículas pueden ser definidas por la técnica de microencapsulación empleadas y particularmente, por las condiciones

experimentales en que estas se obtengan. Por ejemplo, el tipo de solvente y su velocidad de evaporación pueden ocasionar diferencias importantes en la morfología de las partículas. ^(114, 115) También la adición de sales en alguna de las fases acuosas de la doble emulsión, o incluso en ambas, puede generar partículas con diferente estructura interna. ⁽¹¹⁶⁾

B. Tamaño de la partícula

El tamaño de las microesferas es un parámetro importante. Para microesferas que van a ser administradas por la vía parenteral, este no debe ser superior a 180 μm . ^(97, 117) Además, debe lograrse que sea reproducible entre los diferentes lotes, ya que puede influir en el perfil de liberación y en otros parámetros, tales como la eficiencia de encapsulación. Varias condiciones experimentales afectan el tamaño de las microesferas elaboradas mediante cualquiera de los métodos relacionados antes. El tipo de polímero y su masa molecular ^(118, 119) la proporción entre el polímero y el fármaco ^(103, 119) la concentración del polímero en la fase orgánica, ^(120, 121) la concentración de alcohol polivinílico en la fase acuosa externa ^(103, 109, 120) y la velocidad de agitación en el momento de formar las partículas, ^(122, 123) son los factores que más inciden en este parámetro. Por todo lo anterior, el tamaño de las microesferas y su distribución debe ser determinado cuidadosamente. Existen muchas técnicas para determinar ésta característica en un sistema particulado de diversas naturalezas:

Centrifugación, sedimentación, ultra centrifugación analítica, conductividad eléctrica, microscopía óptica y electrónica, dispersión de la luz y difracción láser, entre otros. ⁽¹²⁴⁾ Sin embargo, las diferencias entre los principios de medición de cada uno y los requerimientos de cada equipo para construir los modelos a partir de los datos experimentales, generan inconsistencia en los resultados de diferentes equipos al analizar una muestra. Todas las técnicas no cubren el rango de tamaños que pueden tener estos sistemas; sólo la microscopía electrónica posee esta ventaja.

Burgess et.al. en el 2004. Ofrecen un análisis exhaustivo de este tema y recomiendan seleccionar el método más apropiado para cada caso particular, teniendo en cuenta el proceso productivo, el tamaño de partícula requerido para los

lotes destinados a la clínica y la existencia de fenómenos de segregación de las partículas, de acuerdo con el tamaño durante los procesos de obtención y el almacenamiento de las formulaciones. ⁽¹²⁴⁾

C. Carga y eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es la fracción, expresada en por ciento, del principio activo encapsulado con respecto a la cantidad total que se emplea para realizar el proceso. ⁽¹²¹⁾ Es un parámetro muy importante para indicar la calidad del proceso, que es mejor o más eficiente en la medida en que se logre encapsular una fracción mayor del fármaco.

A su vez, la carga es la cantidad de principio activo encapsulado por la masa de las microesferas, y también se expresa en porcentajes. ⁽¹²¹⁾ Este parámetro puede tener un rango de valores amplios, de acuerdo, fundamentalmente, con la dosis del principio activo que se requiere administrar y se debe determinar de forma exacta, justo porque define la cantidad de microesferas que deben incluirse en una dosis de la formulación.

Para determinar estos parámetros, se han utilizado varias formas de llevar la materia prima encapsulada a una fase acuosa, en la cual pueda ser cuantificada adecuadamente. Entre ellas está la extracción en dos fases líquidas inmiscibles, la precipitación con solventes orgánicos seguida de filtración y la hidrólisis acelerada del polímero mediante la incubación de las microesferas en presencia de NaOH. ⁽¹²⁵⁾ De estos tres procedimientos, el más generalizado es el último, ya que genera soluciones acuosas que luego de neutralizadas, pueden analizarse por varios ensayos de cuantificación de principio activo totales: absorbancias específicamente a la longitud de onda de máxima absorción para el principio activo que se está siendo estudiando.

Estos parámetros se afectan grandemente por el método de encapsulación y por las condiciones experimentales en que se obtienen las micropartículas. Entre los factores que más los afectan están el volumen de la fase acuosa interna y la concentración del principio activo en ella, la concentración de polímero en la fase orgánica, el tipo de polímero, los tiempos de emulsificación, así como la presencia de aditivos en las diferentes fases de las emulsiones. ^(121, 126, 127)

D. Perfil de liberación

El perfil de liberación es un parámetro de gran importancia al diseñar microesferas de diclofenaco sódico con fines terapéuticos. Se estudia *in vitro* y puede relacionarse o no con las características de la liberación *in vivo*. No obstante, generalmente el estudio *in vitro* ofrece una idea de la potencialidad del sistema obtenido para la liberación controlada del principio activo.

La liberación del principio activo contenidas en microesferas de PLGA exhibe comúnmente un patrón compuesto por tres etapas. Una, de liberación inicial rápida, que por lo general ocurre durante el primer día. En lo fundamental está determinada por el principio activo que se encuentra en la superficie de las microesferas, y de los poros y canales que componen la estructura interna de la micropartícula, los cuales se llenan con el medio de incubación durante las primeras horas del ensayo. Otra, de liberación lenta, en la que se libera muy poca o ninguna de principio activo. La última, de liberación más rápida, determinada por la erosión de las partículas.⁽¹¹⁸⁾ En ocasiones, la liberación puede ocurrir en dos etapas y el perfil muestra una forma asintótica.⁽¹²⁵⁾ A la liberación del principio activo contribuyen los procesos de difusión de esta a través de los poros y canales que tienen las partículas, y la exposición de las moléculas del principio activo al medio de incubación, debido a la erosión superficial de las partículas, lo cual también ocurre como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica. Los poros y canales de las micropartículas se forman como producto del propio proceso de fabricación o por la modificación de la estructura como consecuencia de la degradación del polímero.⁽¹²⁸⁾ Por esta razón, existen varios factores que influyen en el perfil de liberación de los principios activos encapsuladas en microesferas de PLGA. Entre ellos se destacan las características de la matriz polimérica empleada y del principio activo encapsulado, la estructura de la micropartícula obtenida, la técnica de encapsulación y las condiciones experimentales en que esta se realiza, así como la co-encapsulación de aditivos con fines diversos.⁽¹²⁹⁾ Además de las características de las microesferas que determinan el perfil de liberación, existen otros factores relacionados con las condiciones en que se realizan estos estudios, los que también pueden afectar la liberación; por ejemplo, la composición y el

volumen del medio de incubación, la temperatura, el dispositivo que se emplea para estudiar el perfil, la forma y la velocidad de agitación, y el modo de recambiar el medio de incubación (parcial o completo). ^(110, 130, 131) Al realizar los estudios de liberación en las microesferas cargadas con principios activos, a menudo se obtiene una gran variabilidad en los resultados, debido a la degradación de las biomoléculas, como consecuencia del efecto del medio ácido generado por los productos de degradación de la matriz polimérica y de la exposición de estas al medio acuoso. Este inconveniente puede ser resuelto cambiando el medio de incubación con frecuencia o midiendo la cantidad de principio activo que queda en las microesferas en vez de la concentración en la solución de incubación ⁽¹²⁴⁾.

2.8. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

EFEECTO BURST.- Significa explosión, ráfaga, arranque; es la cantidad de principio activo liberado 2 horas después de su aplicación in vitro en un medio de tampón fosfato.

DISPERSOR.- Equipo de muy altas velocidades, Herramienta muy útil para desarrollo de productos en general. Tiene alta capacidad de dispersión. Puede romper el tejido de animales y vegetales. Puede formar emulsiones.

HOMOGENIZADOR.- Equipo de alta velocidad que está diseñado para disolver, dispersar y mezclar materiales con las viscosidades diferentes en los laboratorios. La máquina puede terminar las funciones de la dispersión, molido y mezcla.

PLETISMÓMETRO.- Es un aparato que se usa para medir cambios de volumen, generalmente pequeños, y generalmente en segmentos o partes de un ser vivo, como la inflamación de los pies de humanos y las patas de los animales.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO.- Es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación.

LIOFILIZADOR.- Equipo que se utiliza para retirar el agua de una sustancia o de una disolución, mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material seco, manteniendo la estructura molecular de la sustancia, que luego puede ser hidratado con facilidad. Se utiliza en la deshidratación de los alimentos, materiales biológicos y otros productos sensibles al calor.

ESPECTROFOTÓMETRO UV.- El espectrofotómetro es el instrumento que mide la cantidad de luz que pasa a través de un medio a una longitud de onda específica. La cantidad de luz absorbida por un medio es proporcional a la concentración del soluto presente. Así, la concentración de un soluto colorido en solución puede ser determinada en el laboratorio mediante la medición de su absorción de luz a una longitud de onda específica.

CURVA DE CALIBRACIÓN.- La curva de calibración es un método de control de calidad en espectrofotometría, su objetivo es disminuir al máximo el error y que los resultados se encuentren lo más cerca posible del valor verdadero.

BIODEGRADABLE.- Se dice de una sustancia o materia que es biodegradable cuando se descompone en elementos químicos naturales por la acción de agentes biológicos (como el sol, el agua, las plantas o los animales) y de microorganismos (como las bacterias, algas, hongos o levaduras) que las utilizan para producir energía y elementos químicos que pueden ser reabsorbidos de nuevo por la naturaleza.

TENSIOACTIVO.- (también llamados surfactantes) son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (p.ej., dos líquidos insolubles uno en otro). Cuando se utilizan en la tecnología doméstica se denominan como emulgentes o emulsionantes; esto es, sustancias que permiten conseguir o mantener una emulsión

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

➤ ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratas albinas machos de la especie *Rattus norvegicus* de dos meses y medio de edad con pesos promedios entre 240-250 gramos, que fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud de Lima (ver anexo 4).

3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

A. MATERIALES DE LABORATORIO.

- Tubos de ensayo de 10 y 20 mL.
- Pipetas de 1, 2, 3 y 10 mL.
- Vasos de Precipitados de 25, 100, 200 y 500 ml.
- Fiolas de 10, 50, 100 y 500 mL.
- Probetas de 100 mL.
- Micropipetas Graduadas de 10 – 1000 Microlitros.
- Baguetas.
- Laminas porta y cubre objetos.
- Gradillas.
- Soporte Universal.
- Nylon filter membranes 0.45 um y papel filtro 250 mm.
- Viales color Ambar.
- Placas Petri.

B. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO:

- Balanza Analítica sensible al 0.0001 gr. Explorer. Pro (OHAUS®).
- Baño Maria. ISOTEM 205 (Fisher scientific®).
- Cronómetro.
- Centrifuga. Model PLC- 012E (K®. Universal Centrifuge).
- Estufa. Isotemp Ovea (Fisher scientific®).
- UV-2100 Spectrophotometer (UNICO™).
- Microscopio óptico 2005 – BBM (Labor Tech).
- Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 (FEI COMPANY^{MT}).
- Agitados vortex (VWR™)

- Dispensador hasta 24000 rpm. T-25 Digital Ultra-turrax (IKA®).
- Homogeneizador hasta 2000 rpm. EUROSTAR Power-b (IKA®).
- Baño de ultrasonido. BRANSON® 3510.
- Ultra Congelador de bajas temperaturas (ilShinBioBase®)
- Liofilizador L101 (LIOTOP®).
- Equipo de bomba al vacío: MEDI® – PUMP.
- Equipo de pletismómetro.

C. REACTIVOS:

Biopolimero:

- Poly (D, L-lactico-co-glicólico) PLGA 50:50. (Mw 7,000 – 17,000 Da)
Aldrich® Chemistry.

Solventes:

- Diclorometano (DCM) EMSURE® ACS, (MERCK).
- Metanol P.A. (J.T.Baker®).
- 2-Propanol EMSURE® ACS, (MERCK).

Tensioactivo:

- Poly(vinyl Alcohol) (PVA) (Mw 31,000 - 50,000) 87 - 89 %
hidrolizado. Aldrich® Chemistry.

Principio activo hidrosoluble:

- Diclofenaco sódico (Materia Prima) LABORATORIO NATURGEN.

Otros:

- Cloruro de sodio.
- Carragenina al 3%.
- Tampón fosfato (PBS) pH = 6,8
- Jeringas descartables de 5 y 10 mL.
- Algodón.
- Jaulas.
- Papel aluminio.

D. INFRAESTRUCTURA

- Laboratorio del Área de Cromatografía UNSAAC.
- Laboratorio del Área de Bioquímica UNSAAC.
- Laboratorio del CEPLAM; UNSAAC.
- Laboratorio del Área de Tecnología Farmacéutica UNSAAC.
- Instituto de Investigación en Microscopia Electrónica de Barrido, Lima.

3.3. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Con el fin de evaluar la influencia de los factores tecnológicos en la elaboración de micropartículas de PLGA 50:50 cargadas con diclofenaco sódico, se utilizó un diseño estadístico experimental tipo Plakett-Burman con siete variables, a dos niveles. Las variables a estudiar fueron: concentración del polímero, concentración de PVA, concentración de fármaco, volumen de isopropanol al 2%, volumen de fase acuosa, velocidad de homogenización, tiempo de homogenización ⁽¹³²⁾. Como variables respuestas se evaluaron:

- a) El rendimiento del proceso.
- b) La cantidad de fármaco liberado después de 2 horas en un tampón de fosfatos PBS a pH = 6,8 (efecto Burst).
- c) La eficiencia de encapsulación.

3.3.1.1. VARIABLES

I. VARIABLES IMPLICADAS

A. VARIABLE INDEPENDIENTE

- Los siete factores de orden tecnológico (concentración de biopolímero, concentración de principio activo, volumen de fase acuosa, concentración de PVA, volumen de isopropanol al 2%, velocidad y tiempo de homogenización) que podrían influir durante la elaboración de las microcápsulas.

B. VARIABLES DEPENDIENTES

- Rendimiento del proceso de encapsulación, eficacia de encapsulación y efecto Burst para cada tratamiento después de la elaboración de las microesferas.

I.a. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES INDEPENDIENTES.

- **Concentración de biopolímero.**
- **Concentración de principio activo.**
- **Volumen de fase acuosa.**
- **Concentración de alcohol polivinílico PVA.**
- **Volumen de isopropanol al 2%.**
- **Velocidad de homogenización.**
- **Tiempo de homogenización.**

CONCENTRACIÓN DE BIOPOLÍMERO

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad en miligramos (mg) de biopolímero PLGA 50:50, que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (210 mg y 420 mg) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Balanza analítica.

Expresión de medida: mg.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar la cantidad de biopolímero PLGA 50:50, se pesa en miligramos equivalente a dos niveles de peso, que se deben ser usados en las formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

CONCENTRACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad en miligramos (mg) de principio activo Diclofenaco Sódico, que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (15 mg y 30 mg) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Balanza analítica.

Expresión de medida: mg.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar la cantidad de principio activo, se pesa en miligramos equivalente a dos niveles de peso, que se deben ser usados en las formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

VOLUMEN DE FASE ACUOSA

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad en mililitros (mL) de agua destilada, que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (2,5 mL y 5 mL) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Pipeta graduada.

Expresión de medida: mL.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar la cantidad del volumen de agua destilada, se mide a dos niveles de volumen, que se deben ser usados para disolver el principio activo en las formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

PROPORCIÓN DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la concentración en porcentaje (%) de PVA, que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (1% y 3%) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Balanza analítica.

Expresión de medida: gr x 100 mL.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar la concentración de PVA se mide a dos niveles de peso, que se deben ser usados en 100 mL de agua destilada en las formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

VOLUMEN DE ISOPROPANOL AL 2%

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad en mililitros (mL) de isopropanol al 2%, que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (5 mL y 10 mL) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Pipeta graduada.

Expresión de medida: mL.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar la cantidad del volumen de isopropanol al 2%, se mide a dos niveles de volumen, que se deben ser usados en las

formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

VELOCIDAD DE HOMOGENIZACIÓN

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la velocidad del equipo de homogenización en (r.p.m), que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (800 r.p.m. y 1700 r.p.m.) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Equipo Eurostar Power.

Expresión de medida: r.p.m.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar la velocidad de homogenización del equipo, se mide a dos niveles de velocidad, que deben ser usados en las formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

TIEMPO DE HOMOGENIZACIÓN

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es el tiempo de homogenización en el equipo Eurostar Power medido en (min.), que será usado a dos niveles un mínimo y un máximo (30 min. y 60 min.) para la elaboración de las microcápsulas.

B. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable independiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Cronometro.

Expresión de medida: Minutos.

Expresión final de la variable: Positivo y Negativo.

Procedimiento: para expresar el tiempo de homogenización se mide a dos niveles de tiempo, que se deben ser usados en las formulaciones para elaborar las microcápsulas, luego observar cómo afectan estos niveles en el rendimiento, eficacia y efecto Burst.

I.b. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES DEPENDIENTES.

- **Rendimiento del proceso de microencapsulación.**
- **Eficacia de microencapsulación.**
- **Efecto Burst.**

RENDIMIENTO DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad de microesferas obtenidas en cada tratamiento después de todo el proceso de elaboración.

B. DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable dependiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Balanza analítica.

Expresión de medida: mg.

Expresión final de la variable: Adecuado, No Adecuado.

Procedimiento: Para expresar el rendimiento para cada tratamiento, se pesa antes del proceso las cantidades de biopolímero y principio activo, y luego se pesa las microesferas obtenidas al final de todo el proceso, para hallar el porcentaje de rendimiento: se expresa, la cantidad de microesferas obtenidas sobre los pesos del biopolímero y principio activo multiplicado por cien.

EFICACIA DE MICROENCAPSULACIÓN

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad de principio activo microencapsulado en cada tratamiento después de todo el proceso de elaboración.

B. DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable dependiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Espectrofotómetro Uv.

Expresión de medida: nm.

Expresión final de la variable: Adecuado, No Adecuado.

Procedimiento: Para expresar la eficacia para cada tratamiento, se pesa una cantidad conocida de microesferas que es suspendido en un volumen conocido de buffer, luego es llevado al espectrofotómetro y medido a una determinada longitud de onda.

EFECTO BURST

A. DEFINICIÓN CONCEPTUAL.- Es la cantidad de principio activo liberado después de dos horas en tampón fosfato desde las microesferas, para cada tratamiento.

B. DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Tipo de variable: Variable dependiente.

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Instrumento de medición: Espectrofotómetro Uv.

Expresión de medida: nm.

Expresión final de la variable: Adecuado, No Adecuado.

Procedimiento: Para expresar el efecto Burst para cada tratamiento, se pesa una cantidad conocida de microesferas que es suspendido en un

volumen conocido de buffer, luego de dos horas en el medio es llevado al espectrofotómetro y medido a una determinada longitud de onda .

II. VARIABLES NO IMPLICADAS

A. VARIABLES INTERVINIENTES:

➤ Con respecto a los factores tecnológicos.

❖ Las cantidades medidas y todo el proceso de elaboración se hizo bajo las mismas condiciones, por un mismo analista, con intervalos de tiempos cortos, mismos instrumentos y reactivos.

➤ Con respecto al rendimiento, eficacia y efecto Burst.

❖ todo el procesos de medición para el rendimiento, la eficacia y efecto Burst se hizo bajo las mismas condiciones, por un mismo analista, con intervalos de tiempos cortos, mismos instrumentos, estas determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.2. ELABORACIÓN DE LAS MICROCAPSULAS

Existen varios métodos para la preparación de microcapsulas biodegradables, los métodos de obtención comúnmente empleados, encontrados en la literatura ya se mencionaron anteriormente, en este caso se utilizó el método de doble emulsión ($W_1/O/W_2$) evaporación del solvente con algunas variantes utilizada por *Bautista Ch. En el 2009* ⁽¹⁾ y *Tuncay M. et. al. En el 2000* ⁽²⁾ La elección de la técnica de microencapsulación se realizó principalmente sobre la base de las características fisicoquímicas del biopolímero y del principio activo a microencapsular. Método también conocido como emulsión múltiple. Este método es específico cuando se requiere microencapsular principios activos hidrosolubles. En este método el polímero se disuelve en un solvente orgánico, en este caso en diclorometano (DCM) (*Fase orgánica*). El principio activo se disuelve en agua (*Fase interna acuosa*). Se incorpora la fase acuosa (W_1) sobre la fase orgánica (O) y se obtiene la primera emulsión (W_1/O), la que se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un tensioactivo (*Fase externa acuosa*) y se forma la segunda emulsión o emulsión final. Luego el solvente orgánico es eliminado por evaporación y se obtienen las micropartículas.

3.3.2.1. MÉTODOS DE DOBLE EMULSIÓN EN LA ELABORACIÓN DE LAS MICROCAPSULAS DE DICLOFENACO SÓDICO:

Dada la solubilidad acuosa del fármaco en estudio, se utilizó el método **de la doble emulsión (W1/O/W2) evaporación del solvente**, recomendado para este tipo de compuestos ⁽¹⁾ y previamente descrito para otros AINEs. ⁽²⁾ Se utilizaron los métodos y sus variantes elaboradas por *Bautista Ch. en el 2009* ⁽¹⁾ y *Tuncay M, et. al. En el 2000* ⁽²⁾ respectivamente. Ambos métodos se armaron en cuatro tratamientos cruzados, como se muestra en la Tabla 01. Cada prueba se realizó por triplicado, efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.

A. Se disolvió 420 mg de biopolímero en 10 mL de diclorometano (DCM), se agitó en vortex para formar la fase oleosa **Fase O**. Se incorporó la **fase W1**, (2:1 de agua en proporción al solvente, en el cual está el principio activo en proporción 14:1 al polímero) a la **fase O**, luego se agito en el equipo Ultra Turrax a 24 000 r.p.m/5min. La primera emulsión formada **W1/O** se añadió a los 100 ml de la **fase W2** (Solución de PVA al 3% + NaCl 9%), y se agitó en el equipo Eurostar power a 1700 r.p.m/60 min. Posteriormente se añadió 10 mL de isopropanol al 2% y se continuó con la agitación, disminuyendo la velocidad de agitación a 200 r.p.m/4horas. Se observó al microscopio óptico para ver si se han formado las microcapsulas, se continúa con la eliminación del exceso de PVA, utilizando filtro de bomba al vacío, lavando con agua destilada por tres veces. Finalmente se llevó a un equipo de liofilización por un tiempo de 24 h.

B. Se disolvió 210 mg de biopolímero, fue disuelto en 10 mL de diclorometano (DCM), para formar la **fase O**. Se incorporó la **fase W1** (14:1 de principio activo en proporción al biopolímero, disuelto en agua, 4:1 de proporción al solvente) a la **fase O**, luego se llevó al equipo Ultra Turrax a 15000 r.p.m/3 min. La primera emulsión formada **W1/O**, se añadió a los 100 mL de la **fase W2** (solución de alcohol PVA al

1% + NaCl 9%), y se agitó en el equipo Eurostar power a 800 r.p.m/ 30 min. Posteriormente se añadió 5 mL de 2-propanol al 2% y se continúa con la agitación, pero disminuyendo la velocidad e agitación a 200 r.p.m/4 horas. Se observó al microscopio óptico para ver si se han formado microcapsulas, se continúa con la eliminación de solventes lavando con agua destilada por tres veces mediante centrifugación a 5000 r.p.m. por 10 min. Finalmente se llevó a un equipo de liofilización durante 24 horas.

Tabla 1:

Formulación de las Microesferas de PLGA 50:50 cargadas con Diclofenaco Sódico.

TRATAMIENTOS	[] BIOPOL (mg)	[] P.A. (mg)	VOL. DE FASE ACUOSA (mL)	[] DE PVA %	VOL. DE ISOPROPANOL AL 2% (mL)	VEL. 1 r.p.m.	TIM. 1 min	VEL. 2 r.p.m.	TIM. 2 min
M1	420.00	15.00	5	3	10	24 000	5	1 700	60
M2	210.00	30.00	2.5	1	5	15 000	3	800	30
M3	420.00	30.00	2.5	1	5	15 000	3	800	30
M4	210.00	15.00	5	3	10	24 000	5	1 700	60

Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C. 2012.

3.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCAPSULAS DE PLGA CARGADOS CON DICLOFENACO DE SÓDIO

Las microcápsulas obtenidas fueron caracterizadas según la forma y el tamaño de la partícula, rendimiento del proceso de microencapsulación, eficiencia de encapsulación, y determinación del fármaco adsorbido, de acuerdo con los siguientes procedimientos:

3.3.3.1. FORMA Y TAMAÑO DE PARTÍCULA: Para la determinación de la forma y tamaño de las partículas obtenidas se empleó microscopía electrónica de barrido. Las micropartículas liofilizadas fueron montadas sobre talones de grafito y recubiertas e impregnadas con una capa de paladio en un aparato Emitech y examinadas al microscopio electrónico de barrido.

3.3.3.2. RENDIMIENTO DEL PROCESO DE ENCAPSULACIÓN: Las microesferas obtenidas fueron pesadas para determinar el rendimiento del proceso. La

determinación se realizó en condiciones de repetitividad, es decir, único analista, mismo instrumento, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis, este proceso se realizó por triplicado. Se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{W_{\text{micro}}}{(W_{\text{PLGA}} + W_{\text{dic sod}})} \times 100$$

Dónde:

W micro = masa de las microcapsulas obtenidas.

W PLGA = masa del biopolimero.

W dic sod = masa del diclofenaco sódico.

3.3.3.3. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN: Para determinar la cantidad de fármaco microencapsulado y la eficiencia de este proceso, se adaptó el procedimiento y sus variantes descritos por A. Fernández-Carballido *et.al.* En el 2004 ⁽³⁵⁾ y Tuncay M, *et. al.* En el 2000. ⁽²⁾ Se pesó 10 mg de microesferas y se disolvieron en 10 ml de diclorometano (DCM). Posteriormente se adicionó 10 mL de tampón fosfato (PBS), pH 6,8 y se llevó a baño de ultrasonido por 15 min. Luego se mantuvo en agitación continua durante 2 horas en baño María a 37 C°. Una vez transcurrido el tiempo, el sistema se centrifugó y el fármaco presente en la fase acuosa es cuantificado por espectrofotometría UV a 276 nm. Esta determinación se realizó por triplicado, la determinación se realizó en condiciones de repetitividad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis. La eficiencia de encapsulación (%) se calculó a partir de la relación entre el fármaco incorporado y la cantidad de fármaco inicial en el proceso de microencapsulación, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia}(\%) = \frac{C_{\text{dic sod exp}}}{C_{\text{dic sod te}}} \times 100$$

Dónde:

Cdic sod exp = cantidad de fármaco encontrado experimentalmente.

Cdic sod te = cantidad total de fármaco adicionado.

3.3.3.4. DETERMINACIÓN DE FÁRMACO ADSORBIDO (EFECTO BURST):

Para determinar la cantidad de fármaco liberado desde las microesferas en las primeras dos horas, se adaptó el procedimiento descrito por A. Fernández Carballido *et. al. En el 2004* ⁽³⁵⁾ Se pesó 10 mg de microcapsulas, se adicionó 10 ml de tampón de fosfatos pH 6,8 y se dejó en agitación continua durante 2 horas en baño María a 37 C°. Una vez transcurrido el tiempo se filtró el sistema y el fármaco liberado fue cuantificado por espectrofotometría a 276 nm. La determinación se realizó en condiciones de repetitividad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis, esta determinación se realizó por triplicado. El fármaco adsorbido es calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ liberado } 2H = \frac{\text{Cdic sod } 2H}{\text{Cdic sodreal}} \times 100$$

Dónde:

Cdic sod *2H* = cantidad de fármaco encontrado después de 2 horas de agitación.

Cdic sod *real* = cantidad de fármaco encapsulado.

3.3.3.5. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DICLOFENACO SÓDICO: Para la cuantificación del Diclofenaco sódico presente en las microcápsulas estudiadas, se elaboró una curva de calibración, a la que se le determinaron distintos parámetros para validar la metodología analítica. Se pesaron 125 mg de estándar de Diclofenaco de sodio, los que se disolvieron en 100 mL de tampón fosfato pH 6,8 (preparado según las indicaciones de la USP.34-29 NF ⁽⁵⁰⁾ y ajustado a pH 6,8 ± 0,05 utilizando HCl 2N a una temperatura ambiente de 25 °C). De esta forma se obtuvo una solución de concentración 1,25 mg/mL. De la solución anterior se tomó una alícuota de 1 mL, mediante una micropipeta p-1000, y se realizó una nueva disolución con el medio correspondiente hasta un volumen exacto de 100 mL. Se obtiene una solución de concentración 0,0125 mg/ml ó 12,5 µg/mL, la cual fue considerada la solución madre *stock* para la elaboración de la curva de calibración. La solución *stock* fue almacenada a 21 °C hasta realizar los análisis, protegida de

la luz y excesiva humedad. Los estándares de trabajo fueron preparados por dilución de la solución *stock* con tampón fosfato pH 6,8. La elaboración de los estándares para la curva de calibración se realizaron tomando de la solución *stock* (solución de concentración 12,5 µg/mL) alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 mL respectivamente, mediante una pipeta aforada de volumen exacto y transferido a matraces volumétricos de 10 mL y aforando con el tampón fosfato. De esta manera se consiguen soluciones estándares de 2,5; 5,0; 7,5; 10 y 12,5 µg/mL. El intervalo de concentraciones se determinó estimando la concentración máxima a obtener en las cinéticas de disolución, considerando las diluciones necesarias para no salirse del intervalo de linealidad de la curva. Los cuales fueron medidos al espectrofotómetro a 276 nm, por triplicado. La determinación se realizó en condiciones de repetibilidad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis.

3.3.3.6. EVALUACIÓN IN VITRO: se pesaron 10 mg y 5 mg de microesferas de la muestra con mejor caracterización, fueron colocados en 10 mL (pH 6,8) de tampón fosfato salino (PBS) en un tubo de ensayo de vidrio de 25 ml. Las microesferas en el medio se agitaron en un baño María a temperatura de 37 °C. Las muestras fueron retiradas a intervalos de tiempo apropiados y se centrifugo a 10 000 r.p.m. por 15 min. y se sustituye por un igual volumen de medio de disolución. Posteriormente, se analizaron utilizando un espectrofotómetro UV a 276 nm.

3.3.3.7. EVALUACIÓN IN VIVO: La respuesta inflamatoria fue inducida por la inyección de carragenina (0,05 mL; 3% en solución salina normal), vía subplantar, en las patas derechas de los animales (5 animales por grupo). Previa a la aplicación in vivo las microcapsulas fueron esterilizadas en un frasco hermético en baño de ultrasonido. Todos los tratamientos descritos en la tabla 2, fueron administrados vía intraperitoneal media hora antes de la administración de la carragenina. El volumen de las patas fue medido en un pletismómetro manual, a las 1, 3, 5, 9, 15 y 24 horas después de la administración de la carragenina.

Tabla 2:

Esquema de administración de los tratamientos.

Grupo	Tratamiento	Dosis. Dic. Sod. mg/Kg.
Control	SSN.	0
I	DIC. SOD.	10
II	MCDIC. SOD.10.	10
III	MCDIC. SOD.5.	5

Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C. 2012.

Dónde:

SSN. = solución salina normal.

DIC. SOD. = diclofenaco sódico libre.

MCDIC. SOD.10. = microcapsulas de PLGA que contiene diclofenaco sódico.

MC DIC. SOD.5. = microcapsulas de PLGA que contiene diclofenaco sódico.

I, II, III. = los tratamientos se administraran suspendidos en SSN.

El porcentaje de inhibición de la inflamación será calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% I = 100 - \left(\frac{\Delta Vt}{\Delta Vc} \right) \times 100$$

Dónde:

ΔVt = delta de volumen de las patas de cada animal tratados con DIC SOD. (Libre o microencapsulado).

ΔVc = delta promedio del volumen de las patas del grupo control (vehículo).

3.3.3.7.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN DE LA EVALUACIÓN IN VIVO.

La presente investigación es de tipo **cuasi experimental**, donde se realizó una comparación cuantitativa de la actividad antiinflamatoria de las micropartículas que contiene principio activo diclofenaco sódico en edema plantar experimental inducido por carragenina en ratas albinas machos, que fue comparado la actividad con un patrón de diclofenaco sódico libre. Tomando en cuenta la referencia del trabajo realizado por Dina M, Aragón N. et, al. En el 2010. ⁽³⁷⁾ Donde usaron microcápsulas de naproxeno que consideró dosis de 5 y 10 mg/Kg, así mismo el fármaco patrón fue de 10 mg/Kg.

El presente trabajo de investigación se realizó en un estudio a simple ciego, en el cual el responsable del análisis de las muestras que se obtuvo del procedimiento experimental no supo a qué grupo de estudio pertenecía el control, patrón y problema.

3.3.3.7.2. TIPO DE HIPOTESIS

Hipótesis correlacional.

3.3.3.7.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

G₁	O₁	--O₂	--O₃	--O₄	--O₅	--O₆	--O₇
G₂	O₈	X₁O₉	X₁O₁₀	X₁O₁₁	X₁O₁₂	X₁O₁₃	X₁O₁₄
G₃	O₁₅	X₂O₁₆	X₂O₁₇	X₂O₁₈	X₂O₁₉	X₂O₂₀	X₂O₂₁
G₄	O₂₂	X₃O₂₃	X₃O₂₄	X₃O₂₅	X₃O₂₆	X₃O₂₇	X₃O₂₈

SIMBOLOGÍA:

G1: Grupo control de ratas que recibieron solución fisiológica.

G2: Grupo de ratas que recibieron una dosis de diclofenaco sódico microencapsulado 10 mg/Kg.

G3: Grupo de ratas que recibieron una dosis de diclofenaco sódico microencapsulado 5 mg/Kg.

G4: Grupo patrón de ratas que recibieron una dosis de diclofenaco sódico libre 10 mg/Kg.

X1: Administración de dosis de microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico 10 mg/Kg de peso.

X2: Administración de dosis de microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico 5 mg/Kg peso.

X3: Administración de dosis de diclofenaco sódico libre 10 mg/Kg peso.

O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17,

O18, O19, O20, O21, O22, O23, O24, O25, O26, O27, O28: Medida del nivel de inflamación en equipo pletismómetro.

Tabla 3:

Distribución Aleatoria de los Grupos de Animales.

Grupos	Nº animales.	Tratamiento.	Dosis. (mg/Kg)	Vía de Administración.
G1 Control.	05	Sol. fisiológica	--	Intraperitoneal.
G2 Microcapsulas	05	Microcapsulas de dic.sod.	10	Intraperitoneal.
G3 Microcapsulas.	05	Microcapsulas de dic. Sod.	5	Intraperitoneal.
G4 Patrón.	05	Dic. Sod. Libre.	10	Intraperitoneal.

Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C. 2012.

3.3.3.7.4. VARIABLES

I. VARIABLES IMPLICADAS

C. VARIABLE INDEPENDIENTE

- Dosis de las microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico para evaluar el efecto antiinflamatorio.

D. VARIABLES DEPENDIENTES

- Efecto antiinflamatorio de las microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico en edema plantar inducido por carragenina en ratas albinas machos.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

- ❖ **Dosis de microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico para evaluar el efecto antiinflamatorio.**

C. DEFINICIÓN CONCEPTUAL:

Dosis.- es la cantidad en miligramos (mg) de las microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico disuelto en solución fisiológica administrado por vía intraperitoneal dosificado por kilogramo de peso del animal de experimentación para producir el efecto antiinflamatorio.

D. DEFINICION OPERACIONAL:

Tipo de variable: variable independiente.

Naturaleza: cuantitativa.

Forma de medición: directa.

Escala de medición: razón.

Instrumento de medición: balanza analítica.

Expresión final de la variable: mg/Kg.

Procedimiento: para expresar la cantidad de microcapsulas de diclofenaco sódico, se pesa en miligramos equivalente a una dosis de 10 mg y 5 mg por kilogramo de peso de los animales de experimentación, que se debe administrar por vía intraperitoneal para producir el efecto antiinflamatorio.

- ❖ ***Efecto antiinflamatorio de microcápsulas conteniendo diclofenaco sódico en edema plantar experimental inducido por carragenina en ratas albinas machos.***

C. DEFINICIÓN CONCEPTUAL:

Efecto antiinflamatorio.- Es la disminución o eliminación de los signos y síntomas de la inflamación, por un proceso de inhibición de la síntesis de prostaglandinas en los tejidos inflamados, afectando la actividad bioquímica del ácido araquidónico en sus diversas formas.

D. DEFINICIÓN OPERACIONAL:

Tipo de variable: variable dependiente.

Naturaleza: cuantitativa.

Forma de medición: indirecta.

Escala de medición: razón.

Instrumento de medición: pletismómetro.

Expresión final de la variable: mililitros desplazados.

Procedimiento: Para expresar el efecto antiinflamatorio, se mide el edema plantar experimental producido por carragenina antes y después de la administración de las microcápsulas de diclofenaco sódico, y se determina por el método de sumersión de la pata inflamada en el pletismometro que medirá el volumen inicial y final.

II. VARIABLES NO IMPLICADAS

B. VARIABLES INTERVINIENTES:

➤ Con respecto a las microcapsulas.

❖ *Forma y tamaño de partícula:* Se determinó el tamaño y forma de partícula usando un microscopio electrónico de barrido para determinar si el tamaño es adecuado para la administración parenteral.

➤ Con respecto a las ratas albinas.

❖ *Edad de las ratas.-* Los animales que se usaron tuvieron entre dos meses a dos meses y medio de edad, que fueron certificadas por el instituto nacional de salud.

❖ *Peso.-* El peso osciló entre 240 – 250 gramos, que fueron pesados en una balanza analítica.

3.3.3.7.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

DE LAS MICROCAPSULAS.

▪ **Criterio de inclusión**

Se usaron en el edema plantar experimental inducida por carragenina en ratas machos, aquellas microcapsulas caracterizadas que tienen mejor rendimiento, tamaño adecuado para inyección intraperitoneal y mejor eficacia de encapsulación.

▪ **Criterio de exclusión**

Se excluyeron aquellas microcápsulas que no tuvieron buen rendimiento, tamaño inadecuado y baja eficacia de encapsulación.

DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

▪ **Criterio de inclusión**

Se trabajaron con ratas macho de la especie *rattus norvegicus* con pesos que oscilen entre 240 – 250 gramos y con dos a dos meses y medio de edad.

- **Criterio de exclusión**

Se excluyeron ratas machos de la especie *rattus norvegicus* de bajo peso, (menores a 240 gr) y los de peso elevado (mayores 250 gr), aquellos que pudieron presentar alguna alteración fisiológica (heridas en las patas) previo control de auscultación, también se excluyeron ratas hembras.

3.3.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de cada ensayo de caracterización fueron expresados como la media aritmética de los valores \pm la desviación estándar. Para la evaluación del efecto de algunas variables en el proceso de microencapsulación, se utilizó la prueba "t" de Student. Los resultados obtenidos para las diferentes formulaciones fueron sometidos al análisis de varianza simple (ANOVA), seguido del análisis de comparaciones múltiples (Test de Tunkey), empleando el programa estadístico (MINITAB) versión 16. Mediante este programa también se calculó el parámetro "Área bajo la curva", para analizar el efecto antiinflamatorio a lo largo del tiempo.

Tabla: 4
Diseño tipo Plakett-Burman (aleatorizada).

Corrida	Blq	A	B	C	D	E	F	G
1	1	-	-	+	+	+	-	+
2	1	-	-	-	+	+	+	-
3	1	+	+	-	+	+	-	+
4	1	-	+	+	+	-	+	+
5	1	+	+	-	+	-	-	-
6	1	+	-	+	-	-	-	+
7	1	-	-	-	-	-	-	-
8	1	+	-	-	-	+	+	+
9	1	+	+	+	-	+	+	-
10	1	-	+	-	-	-	+	+
11	1	-	+	+	-	+	-	-
12	1	+	-	+	+	-	+	-

Fuente: programa estadístico MINITAB 16.

Dónde:

A: concentración de biopolímero.

B: concentración de principio activo.

C: cantidad de fase acuosa.

D: cantidad de PVA en %.

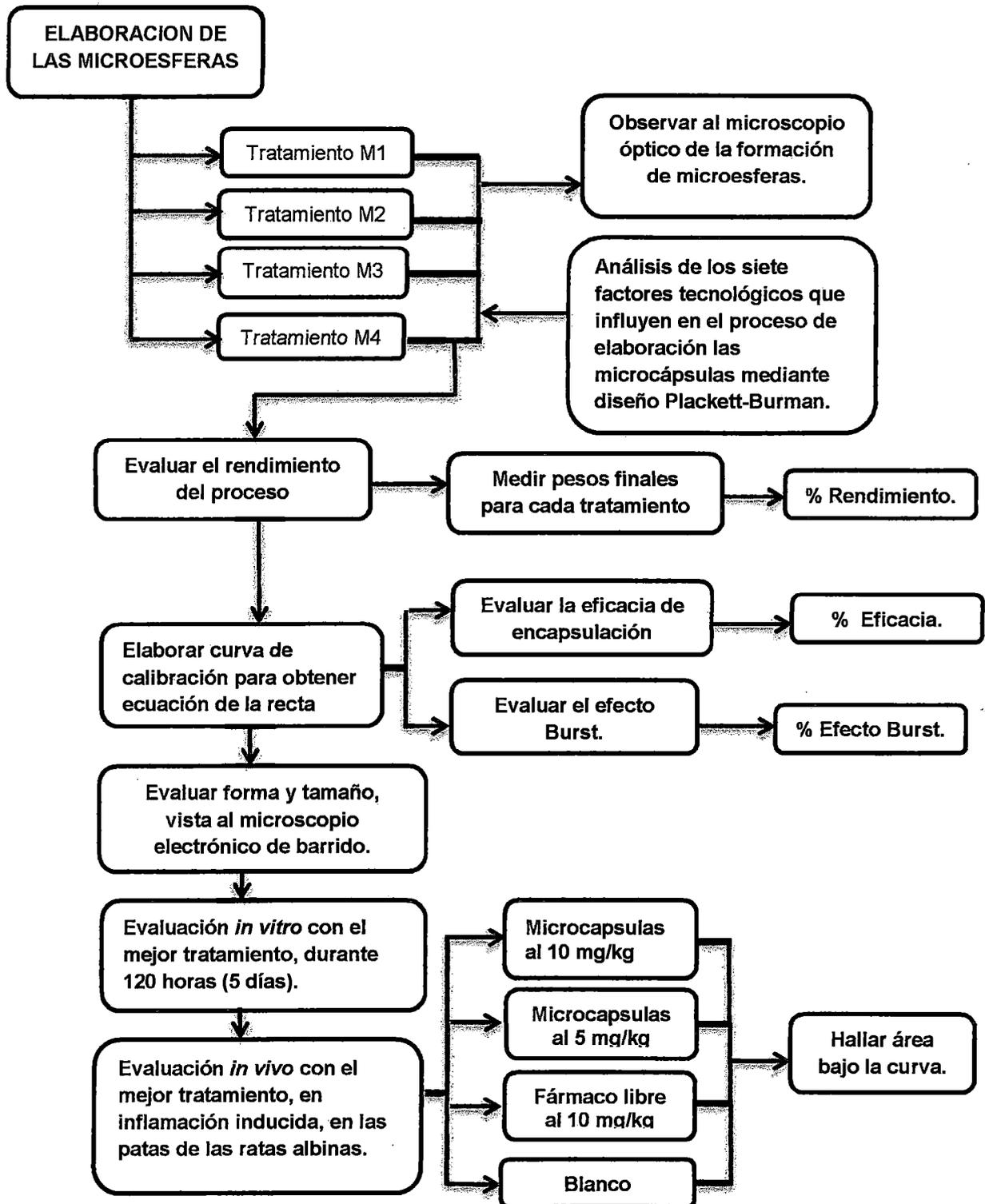
E: cantidad de 2-propanol 2%.

F: velocidad de homogenización.

G: tiempo de homogeniza

3.3.5. PROCEDIMIENTOS

Flujograma del proceso de investigación.



Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DE LA ELABORACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE PLGA, CARGADAS CON DICLOFENACO SODICO.

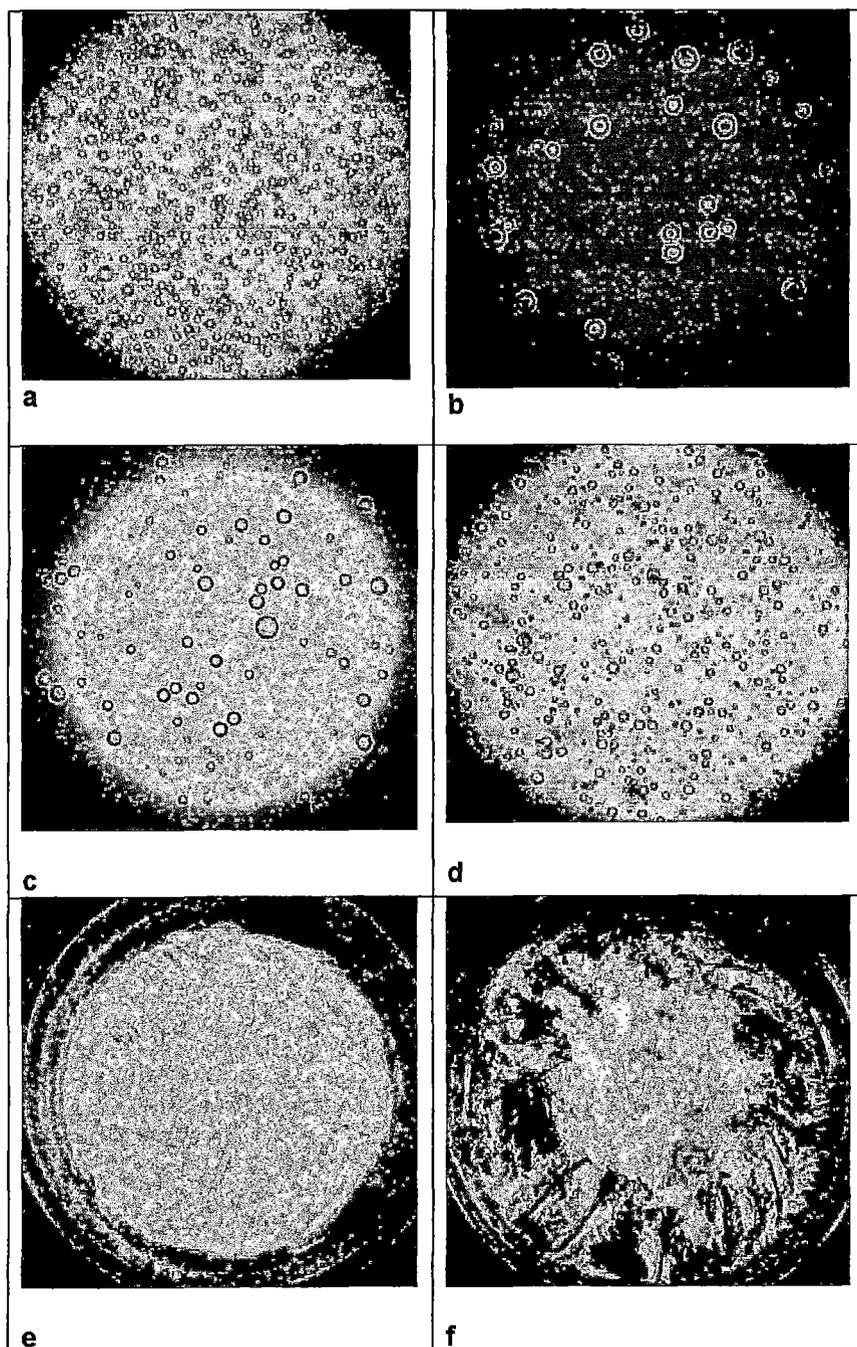


Figura 10: a, b, c, d, vista al microscopio óptico de las microsferas para cada tratamiento a 20X. Figura e y f vista de las microsferas en el proceso final (polvo liofilizado).

Fuente: Pastor Chambi E.W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y discusión:

En la figura 10, se resume las características de las microesferas obtenidas al finalizar el proceso para ver si se formaron o no las microesferas; En la figura 10a del primer tratamiento M1, se aprecia la imagen obtenida por microscopía óptica, donde se muestran microesferas de tamaños pequeños y relativamente uniformes así mismo con una saturación elevada; la figura 10b del segundo tratamiento M2, nos muestra microesferas de tamaños variados con un predominio de tamaño relativamente más grande, mucho más disperso, menos saturado, también se puede observar alrededor de cada micropartícula un halo definido; en la figura 10c, del tercer tratamiento M3, observamos un tamaño y presencia de halo similar a la figura 10b, disperso con una saturación más densa que la antes mencionada; la figura 10d del cuarto tratamiento M4, nos muestra un tamaño más pequeño similar a la figura 10a, con una menor saturación; la figura 10e y 10f nos muestra el proceso final de la obtención de microesferas, un polvo blanco de tamaños muy pequeños.

- La variación en el tamaño se debe a las velocidades y tiempo de homogenización y concentración de PVA aplicadas para cada tratamiento, las figuras 10a y 10d tienen tamaños pequeños y relativamente iguales debido a las máximas velocidades aplicadas y el tiempo más largo de homogenización, se utilizó las máximas concentraciones de PVA al 3% para ambos tratamientos, motivo por el cual las partículas tienen una concentración más densa vista al microscopio, mientras que en las figuras 10b y 10c los tamaños más grandes se deben a que se aplicó menores velocidades y menores tiempos de homogenización, también las concentraciones mínimas de PVA al 1%, algunos autores refieren que el tamaño de partícula se puede definir por la concentración de PVA, a mayor concentración menor tamaño. En cuanto al halo que se observa en ambos tratamientos se debe a la segunda emulsión, una capa fina del emulsificante PVA.

Las figuras 10e y 10f, son el proceso final de las microesferas obtenido después de la liofilización, son sustancias higroscópicas que necesitan ser almacenadas en un frasco de vidrio hermético de color, por lo fotosensible del principio activo usado

4.2. DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:

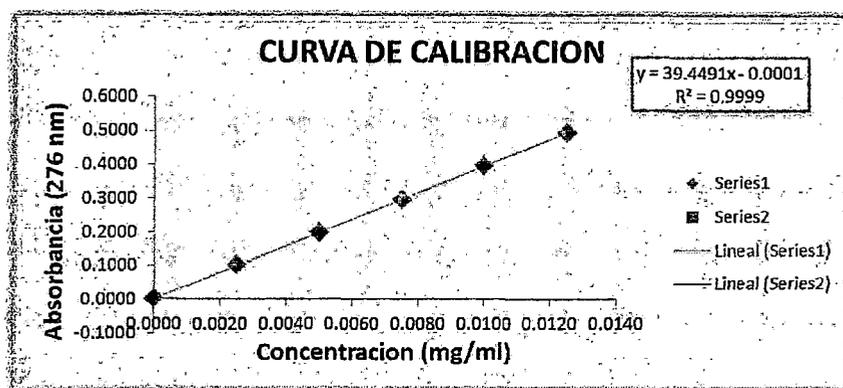


Gráfico 1: Curva de Calibración para Diclofenaco sódico.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Linealidad:

En la Tabla 5, se presentan los valores individuales, los valores medios y los coeficientes de variación, expresados en absorbancia, de cada una de las muestras analizadas para determinar la linealidad del método, así mismo, se indica también la ecuación de la recta, obtenida mediante el ajuste de los cuadrados mínimos.

Tabla 5: Resultados de cada una de las concentraciones empleadas para estudiar la linealidad del método espectrofotométrico.

DATOS PARA CURVA DE CALIBRACION						
CONCENTRACION mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	PROMEDIO Abs.	Desviación Estándar	Coefficiente de Varianza
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0025	0.100	0.100	0.101	0.1003	0.00057735	0.57%
0.0050	0.196	0.195	0.196	0.1957	0.00057735	0.29%
0.0075	0.294	0.294	0.294	0.294	0.00000000	0.00%
0.0100	0.395	0.394	0.394	0.3943	0.00057735	0.14%
0.0125	0.495	0.494	0.494	0.4943	0.00057735	0.11%

$$R^2 = 0,99990811, m = 39,4491 \quad b = -0,0001 <$$

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

$$Y = mx + b$$

$$\text{Abs} = 39.4491 (\text{mg/ml}) - 0.0001$$

4.3. DE LA INFLUENCIA DE LOS POSIBLES FACTORES EN LA FORMULACIÓN.

4.3.1. Ajuste factorial: RENDIMIENTO vs. BIOPOLIMERO, PRINCIPIO ACTIVO, FASE ACUOSA, PVA, ISOPROPANOL, VELOCIDAD Y TIEMPO.

Tabla 6:

Efectos y coeficientes estimados para RENDIMIENTO (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef	T	P
Constante		81.326	52.61	0.000
BIOPOLIMERO (mg)	3.854	1.927	1.25	0.281
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	1.625	0.812	0.53	0.627
FASE ACUOSA (ml)	-3.315	-1.657	-1.07	0.344
PAV (%)	3.024	1.512	0.98	0.383
ISOPROPANOL 2% (ml)	3.190	1.595	1.03	0.360
VELOCIDAD (rpm)	-2.954	-1.477	-0.96	0.393
TIEMPO (min)	-3.019	-1.510	-0.98	0.384

S = 5.35470 PRESS = 1032.22, R-cuad. = 63.20% R-cuad. (pred.) = 0.00% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Tabla: 7

Análisis de varianza para RENDIMIENTO (unidades codificadas)

Fuente	GL	SC sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F
Efectos principales	7	196.938	196.938	28.134	0.98
BIOPOLIMERO (mg)	1	44.568	44.568	44.568	1.55
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	1	7.919	7.919	7.919	0.28
FASE ACUOSA (ml)	1	32.961	32.961	32.961	1.15
PVA %	1	27.440	27.440	27.440	0.96
ISOPROPANOL 2% (ml)	1	30.523	30.523	30.523	1.06
VELOCIDAD (rpm)	1	26.180	26.180	26.180	0.91
TIEMPO (min)	1	27.347	27.347	27.347	0.95
Error residual	4	114.691	114.691	28.673	
total	11	311.629			

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 201

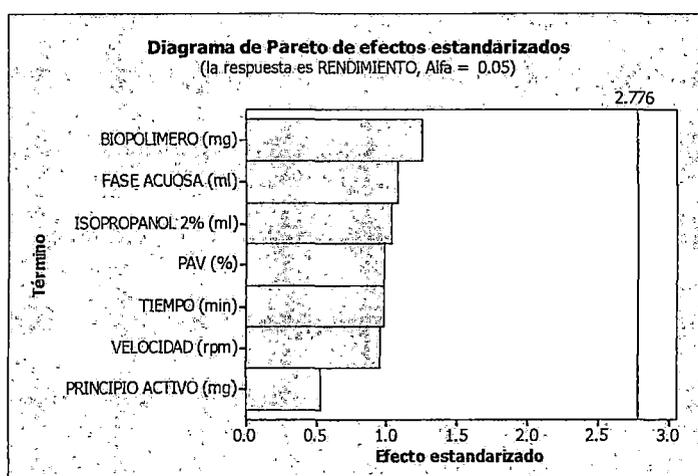


Gráfico 2: Diagrama de Pareto para el rendimiento.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y Discusión:

En la tabla 6, observamos los efectos y coeficientes estimados para el rendimiento, en cuanto a los efectos vemos que existen valores negativos y positivos para las siete variables independientes, estos valores nos indican la magnitud con la que intervienen y cuáles de las variables actúan de manera favorable o desfavorable en el proceso de elaboración de las microcápsulas cuando las variables independientes son usadas con los valores mínimos o máximos para cada tratamiento (ver tabla 1), se observa que influyen de manera negativa la fase acuosa, la velocidad y el tiempo de homogenización mientras el resto de las variables influyen de manera positiva todos estos para el rendimiento. En la tabla 7, observamos para el análisis de varianza, los valores para la prueba F, que nos permite ver la relación entre el cuadrado medio del factor y el cuadrado medio del error, por consiguiente nos sirve de apoyo para rechazar la hipótesis nula, de acuerdo a estos datos nuestros valores para las medias entre tratamientos no son iguales por consiguiente nos indica que nuestros datos son significativos. En cuanto al gráfico 2 (Pareto) se observa que todas las variables actúan con magnitudes relativamente iguales, esto quiere decir que en el proceso de rendimiento ninguno de estas variables influye de manera significativa y que casi todos actúan por igual, se observa que la variable biopolímero es quien influye un poco más con respecto a las demás, y el principio activo es quien influye con menos significancia, se debe resaltar que este gráfico nos permite medir las magnitudes con las que actúan cada variable, independientemente de la influencia negativa o positiva que puedan tener durante el proceso de elaboración de las microcápsulas.

Todos resultados fueron obtenidos a partir de los datos de la siguiente tabla 8:

Tabla: 8

Dato de los pesos finales de las microsferas obtenidas, para cada tratamiento.

MUESTRA	RENDIMIENTO DEL PROCESO					
	PESO FINAL			PROMEDIO PESOS (mg)	Desviación Estándar	Coeficiente de Varianza.
	PESO 1 (mg)	PESO 2 (mg)	PESO 3 (mg)			
M1	338.5	337.9	339.7	338.7	0.916515139	0.27%
M2	181.1	180.2	182.9	181.4	1.374772708	0.75%
M3	399.7	398.8	399.1	399.2	0.458257569	0.11%
M4	187.4	188.0	187.2	187.5	0.4163332	0.22%

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

4.3.2. Ajuste factorial: EFICACIA vs. BIOPOLIMERO, PRINCIPIO ACTIVO, FASE ACUOSA, PVA, ISOPROPANOL, VELOCIDAD Y TIEMPO.

Tabla: 9

Efectos y coeficientes estimados para EFICACIA (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef	T	P
Constante		44.582	10.97	0.000
BIOPOLIMERO (mg)	34.299	17.149	4.22	0.013
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	45.114	22.557	5.55	0.005
FASE ACUOSA (ml)	-8.203	-4.102	-1.01	0.370
PAV (%)	8.287	4.144	1.02	0.366
ISOPROPANOL 2% (ml)	8.454	4.227	1.04	0.357
VELOCIDAD (rpm)	-7.978	-3.989	-0.98	0.382
TIEMPO (min)	-7.891	-3.946	-0.97	0.387

S = 14.0779 PRESS = 7134.78 R-cuad. = 93.06% R-cuad. (pred.) = 37.57% R-cuad.(ajustado) = 80.92%

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

Tabla: 10

Análisis de varianza para EFICACIA (unidades codificadas)

Fuente	GL	SC sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F
Efectos principales	7	10635.1	10635.1	1519.3	7.67
BIOPOLIMERO (mg)	1	3529.2	3529.2	3529.2	17.81
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	1	6105.9	6105.9	6105.9	30.81
FASE ACUOSA (ml)	1	6105.9	201.9	201.9	1.02
PVA %	1	201.9	206.0	206.0	1.04
ISOPROPANOL 2% (ml)	1	206.0	214.4	206.0	1.08
VELOCIDAD (rpm)	1	214.4	190.9	190.9	0.96
TIEMPO (min)	1	190.9	186.8	186.8	0.94
Error residual	4	186.8	792.8	198.2	
total	11	11427.9			

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

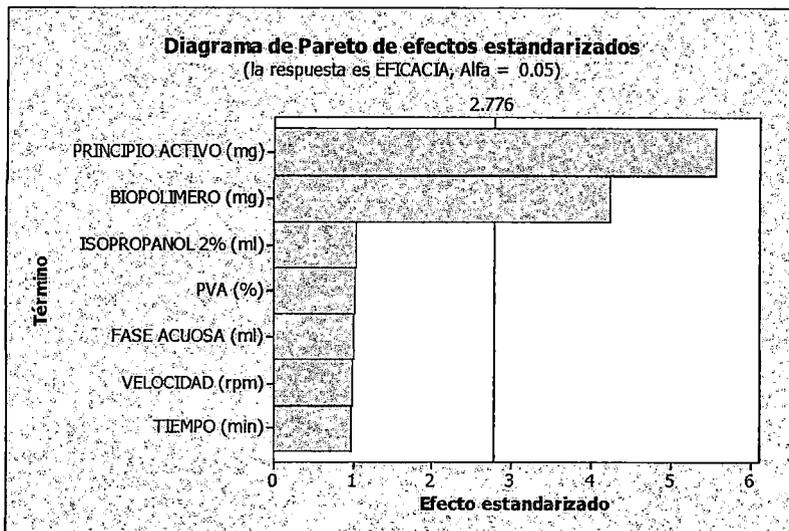


Gráfico 3: Diagrama de Pareto para la eficacia.

Fuente: Pastor Chambi .E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y Discusión:

En la tabla 9, observamos los efectos y coeficientes estimados para la eficacia, en cuanto a los efectos vemos que existen valores negativos y positivos para las siete variables independientes, estos valores nos indican la magnitud con la que intervienen y cuáles de las variables actúan de manera favorable o desfavorable en el proceso de elaboración de las microcápsulas cuando las variables independientes son usadas con los valores mínimos o máximos para cada tratamiento (ver tabla 1), se observa que influyen de manera negativa la fase acuosa, la velocidad y el tiempo de homogenización mientras el resto de las variables influyen de manera positiva al igual que para el rendimiento. En la tabla 10, observamos para el análisis de varianza, los valores para la prueba F, que nos permite ver la relación entre el cuadrado medio del factor y el cuadrado medio del error, por consiguiente nos sirve de apoyo para rechazar la hipótesis nula, de acuerdo a estos datos nuestros valores para las medias entre tratamientos no son iguales por consiguiente nos indica que nuestros datos son significativos. En cuanto al gráfico 3 de (Pareto) se observa que las variables principio activo y biopolímero son quienes influyen con mayor significancia con respecto a las demás, el principio activo es quien influye de manera preponderante seguido por el biopolímero, Se observa que todas las demás variables actúan con magnitudes relativamente iguales y muy bajas, esto quiere decir que en el proceso de la

eficacia ninguno de estas variables influye de manera significativa y que casi todos actúan por igual, a excepción de las dos variables antes mencionadas. Se debe resaltar que este grafico nos permite medir las magnitudes con las que actúan cada variable, independientemente de la influencia negativa o positiva que puedan tener durante el proceso de elaboración de las microcápsulas.

Todos resultados fueron obtenidos a partir de los datos de la siguiente tabla:

Tabla 11:

Datos de absorbancia para cada tratamiento para obtener la eficacia de encapsulación, mediante la ecuación de la recta. (Abs = 39.4491 (mg/ml) – 0.0001)

MUESTRA	Abs 1	Abs 2	Abs 3	PROMEDIO Abs.	Desviación Estándar.	Coefficiente de Varianza.
M1	0.047	0.047	0.047	0.0470	0.000	0.000
M2	0.246	0.246	0.247	0.2463	0.00057735	0.23%
M3	0.286	0.287	0.286	0.2863	0.00057735	0.20%
M4	0.055	0.055	0.055	0.0550	0.000	0.000

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

4.3.3. Ajuste factorial: EFECTO BURST vs. BIOPOLIMERO, PRINCIPIO ACTIVO, FASE ACUOSA, PVA, ISOPROPANOL, VELOCIDAD Y TIEMPO.

Tabla: 12

Efectos y coeficientes estimados para EFECTO BURST (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef	SE Coef	T	P
Constante		7.218	1.216	5.93	0.004
BIOPOLIMERO (mg)	-9.984	-4.992	1.216	-4.10	0.015
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	-9.321	-4.661	1.216	-3.83	0.019
FASE ACUOSA (ml)	-3.242	-1.621	1.216	-1.33	0.253
PAV (%)	2.542	1.271	1.216	1.04	0.355
ISOPROPANOL 2% (ml)	3.253	1.626	1.216	1.34	0.252
VELOCIDAD (rpm)	-1.942	-0.971	1.216	-0.80	0.469
TIEMPO (min)	-2.538	-1.269	1.216	-1.04	0.356

S = 4.21380, PRESS = 639.220 R-cuad. = 90.45% R-cuad. (pred.) = 14.08% R-cuad. (Ajustado) = 73.75%

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Tabla: 13

Análisis de varianza para EFECTO BURST (unidades codificadas)

Fuente	GL	SC sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F
Efectos principales	7	672.97	672.97	96.14	5.41
BIOPOLIMERO (mg)	1	299.02	299.02	299.02	16.84
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	1	260.65	260.65	260.65	14.68
FASE ACUOSA (ml)	1	31.54	31.54	31.54	1.78
PVA %	1	19.38	19.38	19.38	1.09
ISOPROPANOL 2% (ml)	1	31.74	31.74	31.74	1.79
VELOCIDAD (rpm)	1	11.31	11.31	11.31	0.64
TIEMPO (min)	1	19.32	19.32	19.32	1.09
Error residual	4	71.02	71.02	17.76	
total	11	743.99			

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

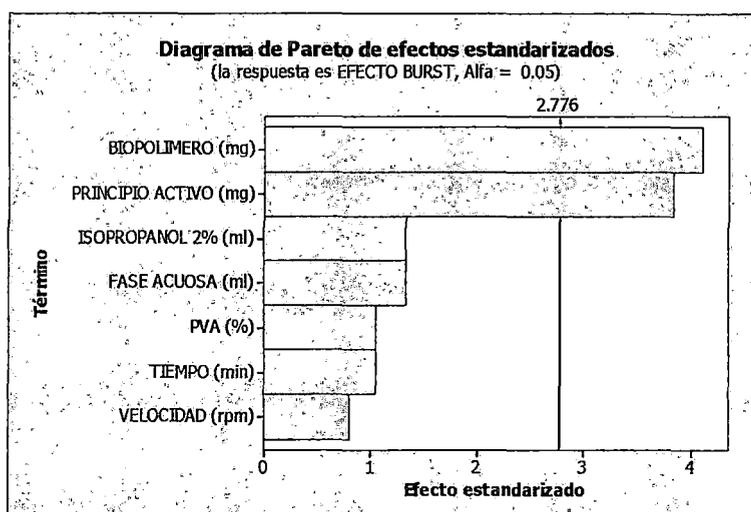


Gráfico 4: Diagrama de Pareto para el Efecto Burst.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y Discusión:

En la tabla 12, observamos los efectos y coeficientes estimados para el efecto burst, en cuanto a los efectos vemos que existen valores negativos y positivos para las siete variables independientes, estos valores nos indican la magnitud con la que intervienen y cuáles de las variables actúan de manera favorable o desfavorable en el proceso de liberación del principio activo adsorbido a las 2 horas desde las microesferas cuando las variables independientes son usadas con los valores mínimos o máximos para cada tratamiento (ver tabla 1), se observar que influyen de manera negativa el biopolímero, principio activo, la velocidad y el tiempo de homogenización, mientras que las variables concentración de PVA y cantidad de isopropanol al 2% influyen de manera positiva para el efecto burst, la influencia

positiva de estas dos variables es lógica, porque del PVA dependerá la dureza y forma de la superficie de las microesferas, y del isopropanol la posible porosidad que se formaran en las microesferas. En la tabla 13, observamos para el análisis de varianza, los valores para la prueba F, que nos permite ver la relación entre el cuadrado medio del factor y el cuadrado medio del error, por consiguiente nos sirve de apoyo para rechazar la hipótesis nula, de acuerdo a estos datos nuestros valores para las medias entre tratamientos no son iguales por consiguiente nos indica que nuestros datos son significativos. En cuanto al gráfico 4 (Pareto) se observa que las variables principio activo y biopolímero son quienes influyen con mayor significancia con respecto a las demás, en este caso el biopolímero es quien influye de manera preponderante seguido por el principio activo en contraste a lo que ocurre para la eficacia, Se observa que el isopropanol al 2% y la fase acuosa actúan de manera similar, la concentración de PVA y el tiempo de homogenización también son casi similares y finalmente quien actúa con menor magnitud es la velocidad de homogenización, esto quiere decir que para el efecto burst ninguno de estas variables influye de manera significativa y que casi todos actúan por igual, a excepción de las dos variables antes mencionadas. Se debe resaltar que este gráfico nos permite medir las magnitudes con las que actúan cada variable, independientemente de la influencia negativa o positiva que puedan tener durante el proceso de liberación del fármaco adsorbido a las 2 horas.

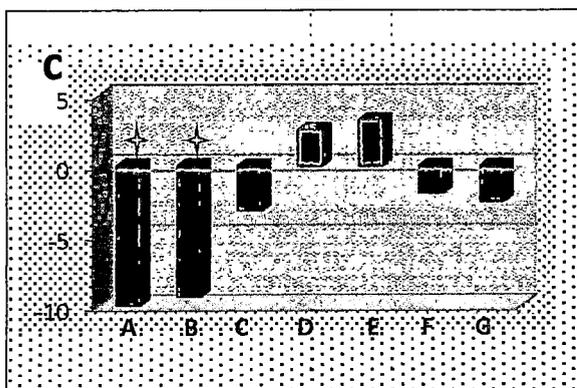
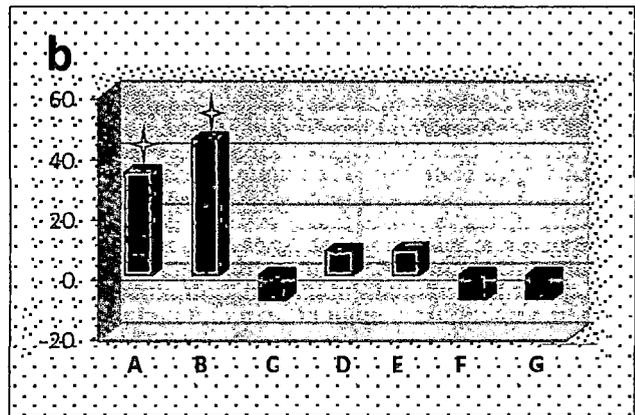
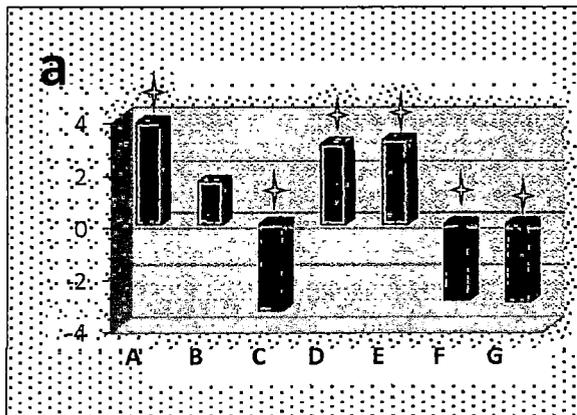
Todos resultados fueron obtenidos a partir de los datos de la siguiente tabla:

Tabla: 14

Datos de Absorbancia para cada tratamiento para obtener el efecto Burst, mediante la ecuación de la recta. (Abs = 39.4491 (mg/ml) – 0.0001).

MUESTRA	Abs 1	Abs 2	Abs 3	PROMEDIO Abs.	Desviación Standar.	Coefficiente de Varianza.
M1	0.001	0.001	0.002	0.0013	0.00057735	42.29%
M2	0.009	0.009	0.009	0.0090	0.000	0.000
M3	0.004	0.004	0.004	0.0040	0.000	0.000
M4	0.011	0.012	0.011	0.0113	0.00057735	5.093%

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.



FACTORES TECNOLÓGICOS (VARIABLES)		Nivel Máximo +	Nivel Mínimo -
A	Concentración de biopolímero	420 mg	210 mg.
B	Relación de fármaco	2	1
C	Volumen de fase acuosa	5 ml	2.5 ml
D	Proporción de PVA	3%	1%
E	Cantidad de isopropanol 2%	10 ml	5 ml
F	Velocidad de agitación	1700 rpm.	800 rpm.
G	Tiempo de agitación	60 min.	30 min.

Gráfico 5. Efecto de las variables en estudio sobre a) Rendimiento del proceso; b) Eficiencia de encapsulación, c) Efecto Burst, en la elaboración de micropartículas de DIC. SOD. “t” de Student, * $p < 0,05$.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y discusión:

De manera más detallada explicamos el efecto de cada variable que influyó en el presente trabajo.

En este estudio elaboramos microesferas de PLGA (50:50) cargadas con Diclofenaco sódico, un antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Con el fin de identificar algunas variables críticas en el proceso de microencapsulación de DIC. SOD. con el polímero de PLGA utilizado, se empleó un diseño experimental de tipo Plakett-Burman, el cual permite evaluar el efecto de una gran cantidad de variables mediante la realización de pocos ensayos experimentales ($n+1$). Como se mencionó en la metodología, se evaluó la influencia de siete variables a dos niveles, sobre tres variables respuesta, como son: rendimiento del proceso, eficacia

de encapsulación y fármaco liberado después de 2 horas en un tampón pH 6,8 (efecto Burst). En el Gráfico 5, se muestra el efecto medio de las variables en estudio, sobre las características de las micropartículas obtenidas.

Un proceso de microencapsulación óptimo debe permitir la obtención de micropartículas con bajo efecto Burst y una elevada eficiencia de encapsulación y rendimiento.

- De manera detallada, las barras sin asterisco indican que la variable no afecta de manera significativa la respuesta evaluada; las barras con valores positivos (barra color verde) sugieren que la presencia de dicha variable en el nivel mayor de los dos evaluados (con y sin asterisco) **augmenta** la magnitud de la respuesta evaluada; y las barras de valores negativos (barras de color azul), que dicha variable en el nivel mayor **disminuye** la magnitud de la respuesta evaluada. El tamaño de las barras es reflejo de la magnitud del efecto presentado. Adicionalmente se observa que, en los dos niveles estudiados, la variable A (cantidad de polímero) afecta significativamente en las tres respuestas evaluadas, Esto indica que el efecto de esta variable en el nivel mayor favorece el rendimiento y la eficacia, mas no así en el efecto Burst. También observamos que la variable B en el nivel superior favorece el rendimiento, pero de manera más significativa en la eficacia. Al mismo tiempo que disminuyen la cantidad de DIC. SOD, liberado a las 2 horas (Gráfico 5c). En cuanto a las variables C, F, G, podemos observar que un cambio al nivel mayo afectaría de manera negativa en las tres respuestas. Respecto a las variables D, E, los resultados indican que la utilización de éstas en el nivel superior aumenta la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del proceso (Gráficos 5a y 5b), también influyen de manera positiva en el efecto burst (Gráfico 5c), pues de estas variables dependerá la porosidad y superficie de las microesferas.

M. Igartua. et. al. En el 1997. Realizaron un estudio sobre optimización del proceso de encapsulación para la preparación de microesferas de PLGA, que contenía albumina bovina para administración oral, por la técnica de doble emulsión evaporación se solvente. Concluyeron que tiene lugar una disminución del rendimiento del proceso de encapsulación, expresado como el cociente entre la

carga real y teórica del fármaco microencapsulado, y un aumento de la proteína adsorbida en la superficie, a medida que se reduce el porcentaje de polímero. También observaron que a medida que se aumentaba la concentración de emulsificante PVA de 1% a 8% disminuía el tamaño de las microesferas.

J.E. Rosas. et. al. En el 2001. Observó algunos resultados para el efecto Burst. Es importante aclarar que la cantidad de fármaco liberado después de 2 horas es un reflejo de la cantidad de DIC.SOD adsorbida en la superficie de la partícula y cuya liberación no depende de la degradación del polímero, pues no hace parte del complejo matricial formado. Esta cantidad liberada de manera inmediata puede constituirse en una dosis de carga y es denominada en inglés como efecto Burst (liberación rápida o explosiva). Esta cantidad adsorbida o efecto Burst puede ser deseable mientras no supere el 20% de la cantidad total del fármaco encapsulado. De lo contrario la liberación no sería controlada. En muchos casos se busca que el efecto Burst sea nulo, pues la dosis de carga puede ser suministrada de otra manera, por ejemplo, con fármaco libre, con partículas de menor tamaño, o con polímeros diferentes o de menor masa molar que se degraden más rápido. En el presente caso se consideró como deseable que el Efecto Burst fuera el menor posible.

4.4. DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO OBTENIDAS. (TAMAÑO Y FORMA DE PARTICULA)

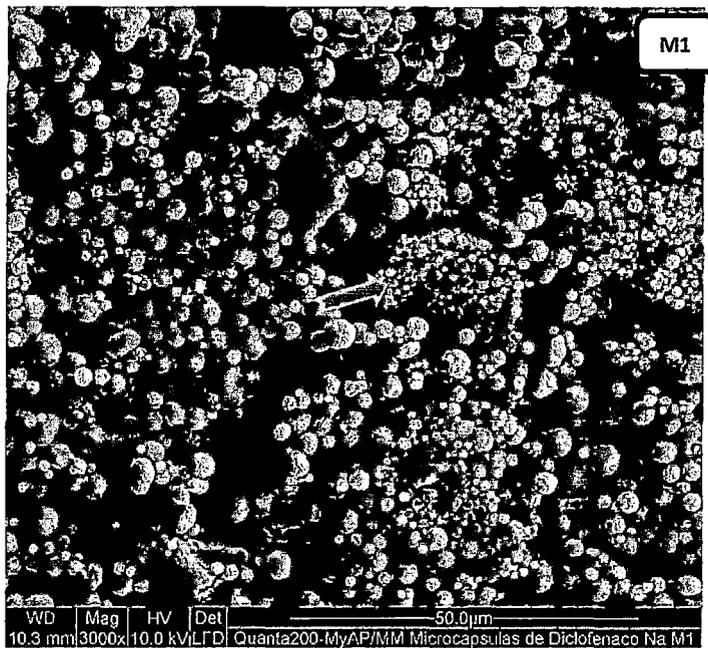


Figura 11. Fotografía al Microscopio Electrónico de barrido (SEM) a 3000X, del tratamiento M1 de las microesferas de diclofenaco sódico.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

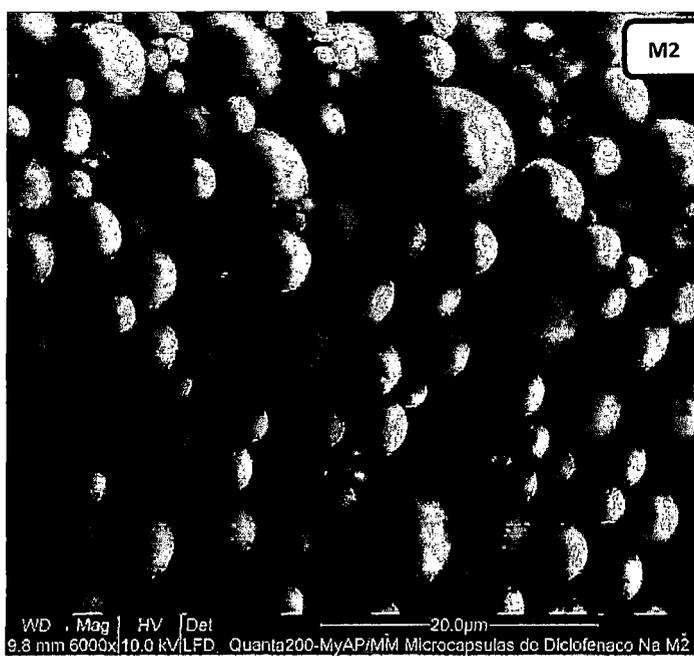


Figura 12. Fotografía al Microscopio Electrónico de barrido (SEM) a 6000X, del tratamiento M2 de las microesferas de diclofenaco sódico.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

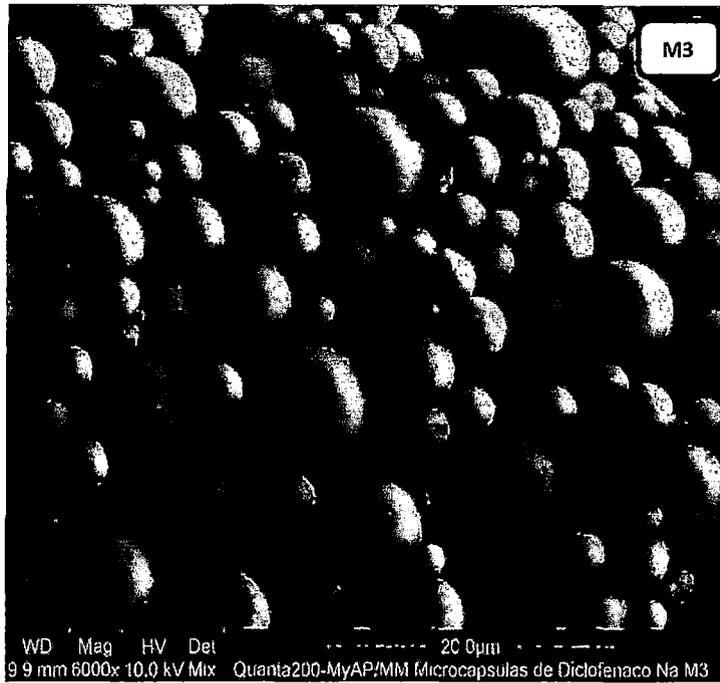


Figura 13. Fotografía al Microscopio Electrónico de barrido (SEM) a 6000X, del tratamiento M3 de las microesferas de diclofenaco sódico.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

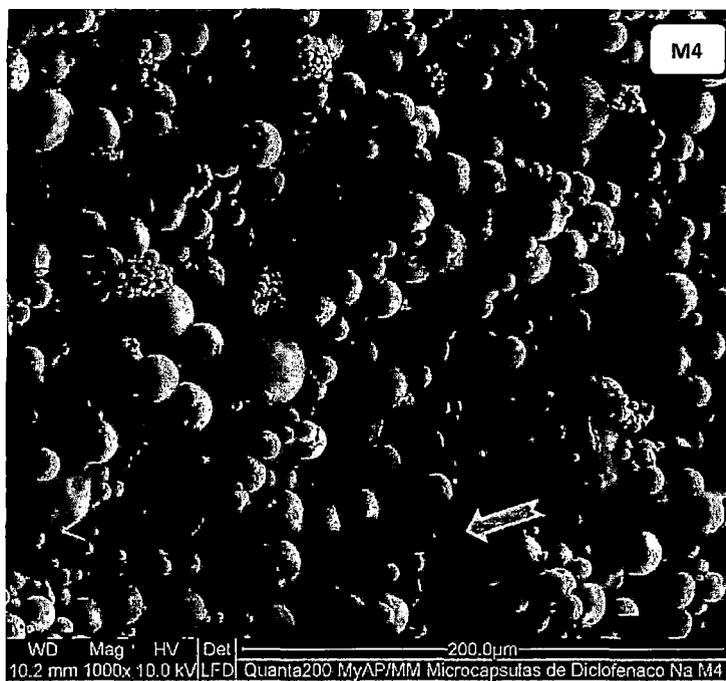


Figura 14. Fotografía al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) a 1000X, del tratamiento M4 de las microesferas de diclofenaco sódico.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y discusión:

Los resultados de las imágenes obtenidos al microscopio electrónico de barrido (SEM), se observan en las Figuras 11, 12, 13 y 14. El aspecto de estas microesferas, muestran homogeneidad en la forma, tamaños pequeños, medianos y grandes, casi todas presentan superficies lisas con pocas porosidades, se observan gran cantidad de micropartículas por campo óptico. De las imágenes obtenidas en el SEM para la figura 11 del tratamiento M1, las microesferas tiene tamaños muy pequeños como muestra la flecha en la figura, estos podrían ser menores a 1 μm de tamaño también se observa partes donde están agregadas unas a otras. En la figura 12 del tratamiento M2, se evidencia partículas mucho más grandes que la anterior que podrían alcanzar tamaños desde 1 μm hasta los 10 μm aproximadamente. La figura 13 del tratamiento M3, nos muestra tamaños muy similares a la figura 12, se muestran dispersas y no agregadas. Finalmente observamos la figura 14 del tratamiento M4, en el cual se evidencia partículas de diversos tamaños desde menores a un 1 μm hasta los 10 μm de tamaño aproximadamente de acuerdo a la escala que se observan en las figura, con algunas agregaciones de las partículas más pequeñas, también podemos observar una microesfera fragmentada en dos partes como indica la flecha en la cual se puede ver pequeños poros las que podrían contener al principio activo.

- Estos resultados nos demuestran que existen variaciones en el tamaño de las microesferas obtenidas debido a las velocidades y tiempos de homogenización y concentración de PVA, los tratamientos M1 y M4 tienen tamaños muy pequeños, en ellos las velocidades de homogenización para la primera emulsión fueron de 24 000 r.p.m. durante 5 min. Y para la segunda emulsión de 1 700 r.p.m. por 60 minutos, estas variables influyen en el tamaño de partícula. Las agregaciones que presentan al momento de hidratarlos podrían obstruir las agujas de inyección. En los tratamientos M2 y M3, observamos partículas mucho más grandes; la velocidad de homogenización para la primera emulsión fue de 15 000 r.p.m. por 3 min. y para la segunda emulsión fue de 800 r.p.m. durante 30 min. Por los tamaños que presentan estas partículas (1 μm - 10 μm) y la no agregación entre ellas hace que tenga una fácil hidratación, por lo tanto son favorables para uso parenteral. La poca

porosidad que presentan en la superficie hace que el fármaco se libere de manera más sostenida durante tiempos más prolongados.

De acuerdo a estos resultados podemos proponer que la principal función del tensioactivo presente en la fase externa acuosa es estabilizar las interfaces de la emulsión durante la extracción del solvente del polímero, reduciendo la tensión superficial entre las diferentes fases y originando un menor tamaño de partícula a medida que aumenta su concentración.

Jeyanthi et al. 1992, 1996. En estudios de microscopía electrónica de barrido indicó morfologías y superficie diferentes de las microesferas dependiendo del peso molecular del polímero utilizado en los estudios de preparación, lo que podría ser aceptado como una prueba importante por la influencia del peso molecular y también la cantidad de co-disolvente de la porosidad.

Tunçay, M. et. al. en el 2000, describió como el peso molecular del polímero aumenta, la viscosidad de la solución de polímero aumentará y, en consecuencia, la extracción del disolvente resulta antes de la formación de gotitas que crea menos microesferas porosas. Cuando se utiliza metanol como un co-disolvente, observó que el cloruro de metileno se extrae lentamente y poco a poco, durante la formación de gotitas. Este fenómeno también resultó en microesferas porosas. Desde que se utiliza metanol como un co-disolvente en combinación con cloruro de metileno, esto podría ser otro factor importante en la formación de poros en la superficie de las microesferas, junto con el efecto del peso molecular.

J.L. PERAZ et. al. en 1997, realizaron estudios de optimización sobre el proceso de encapsulación para la preparación de microesferas de PLGA, que contenía albumina bovina (BSA), observaron al microscopio electrónico de barrido microesferas de superficie lisa, con un tamaño de partícula medio comprendida entre 23,46 μm y 1.53 μm para los distintos lotes que elaboraron.

4.4.1. DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO OBTENIDAS. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO, EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN Y EFECTO BURST.

Tabla: 15

TRATAMIENTOS	RENDIMIENTO %	EFICACIA %	EFECTO BURST %	VALORACIÓN
M1	77.802 ± 0.118	26.956 ± 0.071	3.024 ± 1.226	NO ADECUADO
M2	75.573 ± 0.556	37.771 ± 0.372	3.686 ± 0.010	NO ADECUADO
M3	88.705 ± 0.091	96.507 ± 0.222	1.430 ± 0.003	ADECUADO
M4	83.225 ± 0.366	17.095 ± 0.656	20.734 ± 1.047	NO ADECUADO

Resultados de los porcentajes de rendimiento, eficacia y efecto Burst para cada tratamiento

“t” de Student, $p < 0,05$.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y discusión:

Los resultados obtenidos en la determinación del rendimiento, eficacia de encapsulación y efecto Burst, se muestran en la Tabla 15. Los valores obtenidos para el rendimiento fueron altos, lo cual es un factor positivo para la aplicación industrial, varía desde 77.802 % hasta un 88.705%. Para la eficacia observamos variaciones desde 17.095% hasta 96.507%, en cuanto al efecto Burst se observa un valor mínimo de 1.430% y máximo de 20.734%.

- Nuestros resultados del porcentaje de rendimiento: para cada tratamiento varían como se observa en la tabla 15, el rendimiento en orden decreciente para cada uno de los tratamiento es: M3, M4, M1, M2 respectivamente, las variaciones entre uno y otro se deben a las siete variables independientes como vimos anteriormente, algunos influyen de manera positiva y otros de manera negativa. Dichos valores no tiene que ver con la cantidad inicial de biopolímero y principio activo añadidos, porque todos están representados en valores porcentuales. Como observamos para M3 se usaron las cantidades máximas de biopolímero y principio activo, contrariamente se usó las cantidades mínimas para M4, sin embargo es el que tiene el segundo mejor rendimiento, como se muestran las cantidades usadas para cada tratamiento en la tabla 1.

Tunçay, M. et. al en el 2000. Elaboraron microesferas poliméricas de diclofenaco sódico para uso intra articular con PLGA 50.50 de pesos moleculares 34,000 y 88,000 Da. Como fase acuosa usaron metanol y fase orgánica cloruro de metileno, emulsificante PVA:SO (4:1); obteniendo un rendimiento de 70% y 68% respectivamente, no encontraron diferencias significativa entre las dos formulaciones fabricadas, por lo tanto, obtuvieron porcentajes menores a nuestros rendimientos.

Diana M. Aragón N. et.al. En el 2010. Elaboraron microcapsulas de naproxeno por una emulsión simple, O/W. obteniendo un rendimiento de 83,7%, que es menor al obtenido en nuestro estudio que fue de 88.705%.

Se puede observar que existen diferencias entre cada uno de los resultados. Esto se debería a los diferentes métodos usados en la elaboración, proporciones de biopolímero y principio activo, diferencia de aditivos usados etc.

Bautista Ch. en el 2010. Elaboró microcapsulas utilizando varios biopolímeros para caracterizarlos, ver cuál de ellos era el más óptimo para microencapsular principios activos hidrosolubles, para el PLGA 50:50, obtuvo un rendimiento de 84.77%, este resultado no se aleja del obtenido por nosotros, pues utilizamos la técnica que ella uso con algunas variantes.

- En cuanto a la eficiencia de encapsulación: los valores obtenidos fueron bajos, lo cual es un factor negativo para la aplicación industrial de microencapsulación. A excepción del tratamiento M3 en el cual se obtuvo una buena eficacia como se muestra en la tabla 15, las variaciones entre cada uno de estos tratamientos se debe a las variables independientes antes mencionadas, cabe destacar que todo los valores son representados en porcentaje y los resultados no se deben exclusivamente a las cantidades de principio activo usado.

Fernandez-Carbellido et. al. En el 2003. Elaboraron microesferas de PLGA con labrafil cargadas de ibuprofeno para uso intra articular, por emulsión simple O/W, obteniendo como eficacia rangos desde un mínimo de 30.06% hasta un máxima 84.46%, nuestro tratamiento M2 obtuvo una eficacia de 37.771% que estaría dentro de este rango de resultados, mientras que nuestro resultado de eficacia para M3 es el que supera estos resultados con 96.5%.

U. Bilati et.al en el 2004. Elaboraron microparticulas de PLGA cargadas con proteína usando el método de doble emulsión, comparando con el método de sonicación. Obtuvieron rendimientos hasta de 98% en la doble emulsión y un 90% por sonicación, estos resultados se acercan a nuestro tratamiento M3.

J.E. Rosas et. al. En el 2000. Elaboraron microesferas biodegradables PLGA como un sistema de entrega péptido sintético spf66 de la malaria. Obteniendo como eficacia de encapsulación un 85%.

Tunçay, M. et. al en el 2000. Obtuvieron una eficacia de encapsulación relativamente baja de 16.1% en comparación con el que obtuvimos nosotros (96.507%), a pesar de usar la misma cantidad y el mismo principio activo (diclofenaco sódico).

- En la tabla 15 también, se logra apreciar la variación del efecto Burst: que existe entre cada tratamiento, observamos que el tratamiento M4 es quien tiene una mayor tasa de liberación a las 2 horas, significa que el principio activo adsorbido en la superficie es liberado de manera muy rápida, es un factor de liberación que no resulta conveniente pues no favorece en la liberación controlada, mientras observamos que para los tratamientos M1, M2, tienen un efecto burst relativamente bajo, junto con el tratamiento M3 que es el más bajo y posiblemente el más óptimo, pero de acuerdo al índice de confianza del $95\% \pm 0.05$ los tratamientos M3 y M2 no tendrían una diferencia significativa. Lo que se desea es que este efecto sea menor al 20% del fármaco englobado, o el más bajo posible para que libere lentamente el principio activo a lo largo del tiempo, algunos autores indican que también es preferible que este efecto sea nulo, pues la dosis de inicio se podría sustituirse con fármaco libre ⁽¹¹³⁾. Cabe destacar que este efecto es independiente de la cantidad de fármaco englobado pues solo se está liberando el que se encuentra en la superficie de las microesferas, este fenómeno dependerá de la porosidad de la superficie.

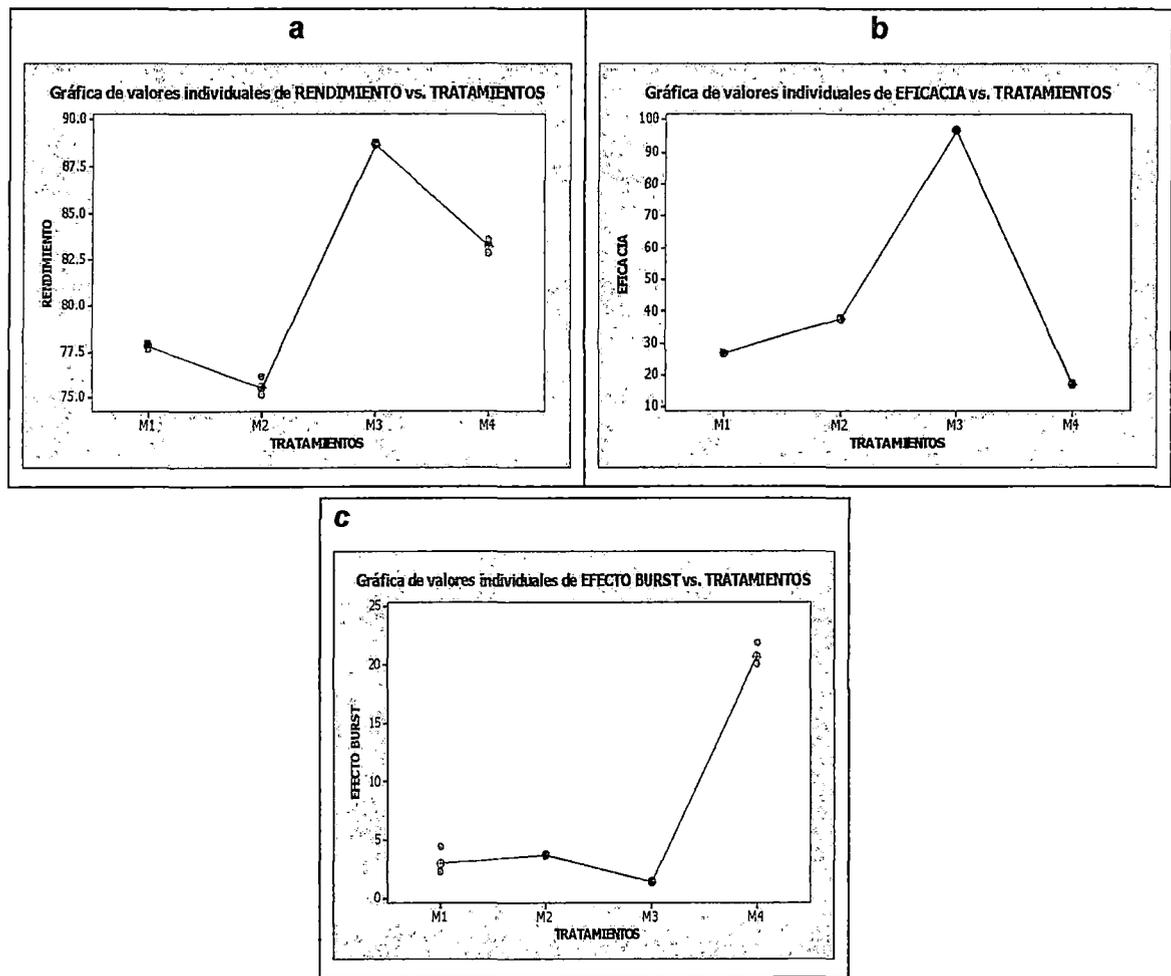


Gráfico 6. Valores individuales para; a) Rendimiento, b) Eficacia de Encapsulación, c) Efecto Burst.
Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

En el gráfico 6, se muestran los gráficos a, b, c, estos nos muestran las diferencias que existen entre cada tratamiento con respecto al rendimiento, eficacia de encapsulación y efecto burst. El de mayor rendimiento es M3 y menor rendimiento M2. En cuanto a la eficacia observamos que M3 es el de mayor eficacia y M4 el que tiene menor eficacia, para el efecto burst, vemos que M3 es quien resulta ser el más óptimo porque se requiere que este efecto sea el más mínimo posible. También los gráficos nos muestran la desviación estándar para cada tratamiento representado por los puntos rojos que nos indican cuan homogéneo o disperso son nuestros datos obtenidos como podemos comparar en la tabla 15.

Agrupación de información utilizando el método de Tukey para el Rendimiento, Eficacia y Efecto Burst.

TRATAMIENTOS				TRATAMIENTOS			
Rendimiento	N	Media%	Agrupación	Eficacia	N	Media%	Agrupación
M3	3	88.705	A	M3	3	96.507	A
M4	3	83.225	B	M2	3	37.771	B
M1	3	77.802	C	M1	3	26.956	C
M2	3	75.573	D	M4	3	17.095	D

TRATAMIENTOS				
Efec. Burst	N	Media	Agrupación	
M4	3	20.734	A	
M2	3	3.686	B	
M1	3	3.024	B C	
M3	3	1.430	C	

Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Observamos que nuestro índice de confianza, especifica que todo el conjunto de comparaciones tiene una tasa de error por familia de 0.05 (equivalente a un nivel de confianza conjunto de 95%).

De acuerdo con estos datos podemos observar, que el rendimiento y la eficacia tienen una diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos. Mientras en el efecto burst, vemos que solo existe diferencia significativa con el tratamiento M4, los datos para los valores M2, M1, son relativamente similares, lo mismo ocurre con los datos de M1 y M3, a pesar de que se observa que las medias de ambos son diferentes, es porque agrupando los datos por el método de tukey ofrece estimados casi precisos del parámetro de los tratamientos, con un límite máximo de 5% de la probabilidad de que uno o más intervalos de confianza no contengan una verdadera diferencia, esto nos sugiere que dichos datos son pequeños que se acercan a cero, por eso los índices de confianza son similares entre los tratamientos mencionados.

4.5. OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA PRONOSTICA DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACION POR AJUSTE DE VARIABLES.

Tabla: 16

Maximización del Rendimiento por ajuste de variables con el nivel máximo o mínimo.

parámetro	meta	inferior	objetivo	superior	ponderación	importancia
RENDIMIENTO	máximo	1	100	150	1	1
BIOPOLIMERO (mg)	420					
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	30					
FASE ACUOSA (ml)	2.5					
PVA (%)	3					
ISOPROPANOL 2% (ml)	10					
VELOCIDAD (rpm)	800					
	30					

Respuestas pronosticadas: RENDIMIENTO = 91.8176, deseabilidad = 0.917349

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

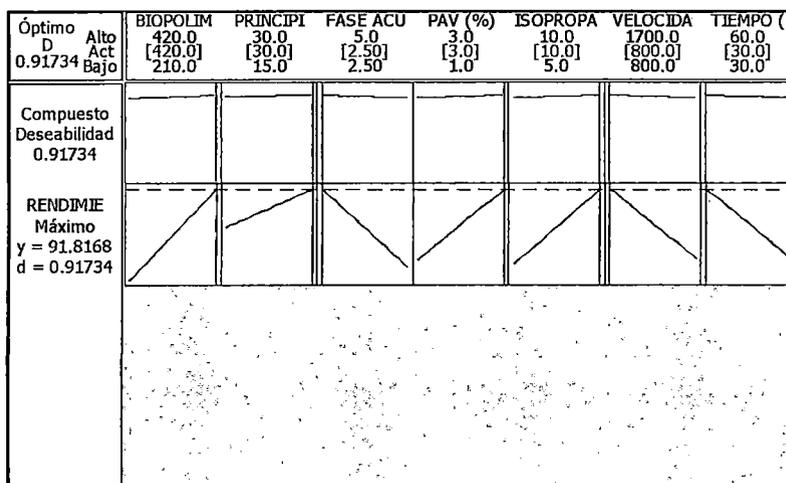


Figura 15. Respuesta pronosticada optimizada del proceso de rendimiento por ajuste de variables.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Tabla: 17

Maximización de la Eficacia de encapsulación por ajuste de variables con el nivel máximo o mínimo.

parámetro	meta	inferior	objetivo	superior	ponderación	importancia
EFICACIA	objetivo	1	100	150	1	1
BIOPOLIMERO (mg)	420					
PRINCIPIO ACTIVO (mg)	30					
FASE ACUOSA (ml)	2.5					
PVA (%)	3					
ISOPROPANOL 2% (ml)	10					
VELOCIDAD (rpm)	800					
TIEMPO (min)	47.878					

Respuestas pronosticadas: EFICACIA = 99.9928, deseabilidad = 0.999928

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

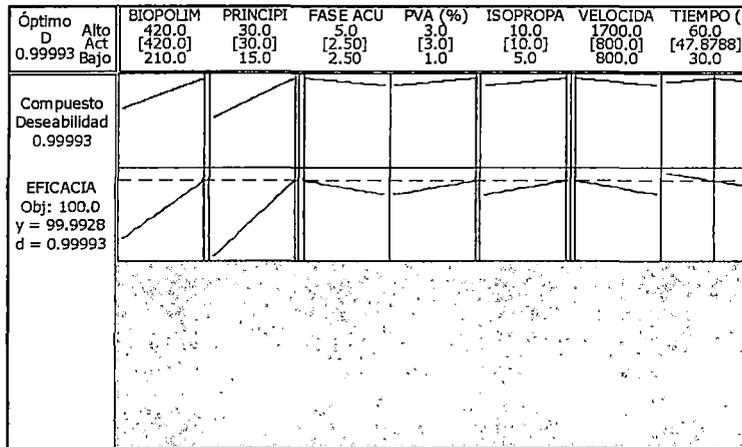


Figura 16. Respuesta pronosticada optimizada del proceso de eficacia por ajuste de variables.
Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Tabla: 18
Minimización del Efecto Burst por ajuste de variables con el nivel máximo o mínimo.

parámetro	EFECTO BURST	meta	inferior	objetivo	superior	ponderación	importancia
		Mínimo	1	2	20	1	1
BIOPOLIMERO (mg)		420					
PRINCIPIO ACTIVO (mg)		30					
FASE ACUOSA (ml)		5					
PVA (%)		1					
ISOPROPANOL 2% (ml)		5					
VELOCIDAD (rpm)		1700					
TIEMPO (min)		60					

Respuestas pronosticadas: EFECTO BURST = -9.19245, deseabilidad = 1.000000
Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

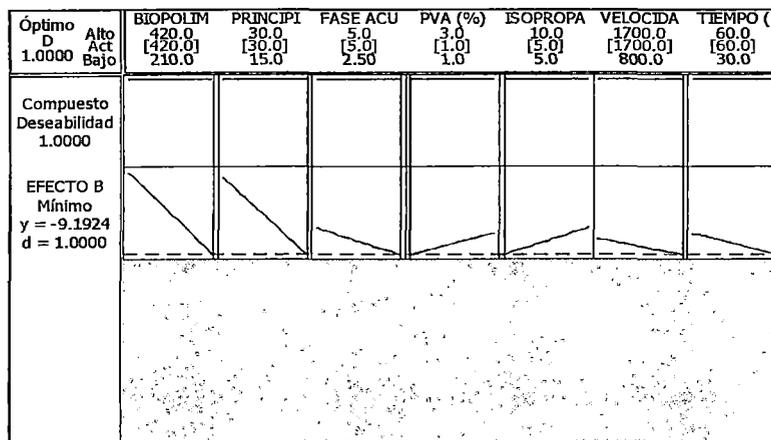


Figura 17. Respuesta pronosticada optimizada del proceso de efecto burst por ajuste de variables.
Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

De acuerdo a la gráfica 15, se encontró que para el proceso de microencapsulación de DIC. SOD era favorable la utilización de las variables D, E en el nivel superior, estos aumentan el rendimiento y la eficiencia de encapsulación. Para obtener un mejor rendimiento se sugiere la utilización de PVA al 3% e isopropanol al 2%, 10 ml como se muestra en las tabla 16 y figura 15. Así el rendimiento aumentaría a un 91.8176 % frente al 88.705 % que obtuvimos del mejor tratamiento M3. Para aumentar la eficacia de microencapsulación también se sugiere ajustar el parámetro G hasta un determinado tiempo para obtener una eficacia de 99.9928 %, tabla 17 y figura 16, frente al 96.507 % obtenido del mejor tratamiento M3, en cuanto a los parámetros para minimizar el efecto Burst no se recomienda hacer ningún tipo de ajustes pues se tendría que cambiar las variables C, D, E, F, y G con los niveles mínimos tabla 18, figura 17. Estos ajustes para el efecto burst afectarían el rendimiento del proceso y la eficacia de encapsulación de manera negativa. Todos estos ajustes de respuesta pronostica fueron realizados por el software del MINITAB 16.

4.6. DE LA EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS MICROESFERAS OBTENIDAS CON MEJOR CARACTERIZACIÓN.

Tabla 19:

Porcentaje de liberación in vitro de las microcapsulas del tratamiento M3 en 2 dosis en un determinado tiempo.

TIEMPO (horas)	MP. DIC.SOD. 10 mg. (%)	MP. DIC.SOD. 5 mg. (%)
0	0.00	0.00
2	0.004 ± 0.0007	0.004 ± 0.0006
4	0.011 ± 0.0005	0.008 ± 0.0006
8	0.018 ± 0.0006	0.011 ± 0.0005
16	0.020 ± 0.0006	0.015 ± 0.0006
24	0.021 ± 0.0005	0.017 ± 0.0005
48	0.023 ± 0.0007	0.018 ± 0.0007
72	0.025 ± 0.0005	0.016 ± 0.0006
96	0.026 ± 0.0006	0.017 ± 0.0007
120	0.025 ± 0.0007	0.018 ± 0.0005

“t” de Student, $p < 0,05$.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Tabla 20:

Análisis de Varianza para el efecto in vitro.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	0.000129784	1	0.000129784	3.299860027	0.088066765
Dentro de los grupos	0.000629284	16	3.93302 x10 ⁻⁵		
Total	0.000759068	17			

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

No existe diferencia significativa entre los tratamientos (P = 0.088).

Al comparar los tratamientos se observó que no hubo diferencias significativas dentro de cada grupo (p>0.05) Lo cual se observa en la tabla 20 y prueba de Tukey tabla 21.

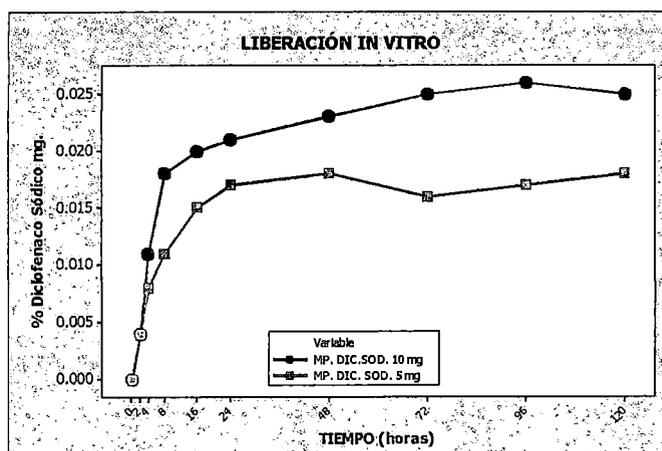
Tabla 21:

Agrupación de información utilizando el método de tukey.

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
MP. DIC.SOD. 10 mg	9	0.019259	A
MP. DIC.SOD. 5 mg	9	0.013889	A

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

En la tabla 21, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Observamos que nuestro índice de confianza, especifica que todo el conjunto de comparaciones tiene una tasa de error por familia de 0.05 (equivalente a un nivel de confianza conjunto de 95%).



Gráfica 7. Liberación in vitro a lo largo del tiempo para el tratamiento M3 a dosis de 10 mg y 5 mg.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y discusión:

Los resultados obtenidos para la determinación *in vitro* con el mejor tratamiento obtenido M3, se muestran en la Tabla 19. Al respecto, Los estudios de liberación *in vitro* reveló que la formulación M3, comparada en dos dosis de 10 mg y 5 mg. Tiene una liberación relativamente lenta estudiada hasta las 120 horas, en el gráfico 7, observamos que a las 2 horas liberan la misma cantidad de fármaco, la dosis de 10 mg, va liberando de manera creciente el fármaco hasta las 96 horas alcanzando una concentración superior a 0.025%, a partir de allí descende como se muestra en el gráfico en mención, mientras que la dosis de 5 mg, alcanza una dosis de liberación sostenida a las 24 horas 0.017%, aproximadamente, a partir de ese momento la liberación es relativamente casi uniforme hasta las 120 horas.

- La diferencia entre ambas curvas de acuerdo al gráfico 7, es debido a la dosis de microesferas utilizadas. Se demuestra que a las 2 horas ambas tienen una liberación igual o similar al 0.004%, esto se debe a que el principio activo se encuentra adsorbido en la superficie de las microesferas (Efecto Burst). La liberación lenta a lo largo del tiempo se debería, a que la superficie de las microesferas aparentemente no son tan porosas, por lo tanto la liberación del principio activo se debe a que el biopolímero se va degradando lentamente mientras libera el fármaco, podemos decir que tiene una liberación bifásica, esto significa que hasta las 24 horas la liberación aumenta de manera creciente y a partir de allí trata de mantener una liberación del fármaco de manera casi constante.

Tunçay, M. et. al en el 2000. Elaboraron microesferas poliméricas de diclofenaco sódico para uso intra articular con PLGA 50.50. Observaron que para la formulación **A** Mw (34 000 Da), en la que la superficie de las microesferas parecía ser poroso, libera el fármaco más rápido que la formulación **B** (peso molecular 88 000 Da), mientras que la superficie parecía ser no porosa. En una formulación, la liberación *in vitro* de la sustancia activa era casi completa en 84 horas, mientras que la formulación **B** liberado sólo 69,06% del fármaco en el mismo período. La duración de la liberación completa fue de 96 h para la formulación **B**. Por lo tanto, en cierta medida el peso molecular del polímero afecta a la duración de liberación.

J.E. Rosas et. al. En el 2000. Elaboraron microesferas biodegradables PLGA como un sistema de entrega péptido sintético spf66 de la malaria.

La liberación de SPf66 de microesferas mostró un perfil trifásico. Microesferas de SF mostró una explosión inicial del 9%, mientras que este valor fue del 19% para el PHF. Tras la explosión de liberación inicial, hubo una fase de latencia de la liberación del péptido de un período de 29 días, seguido de un aumento de la liberación del péptido durante 15 días y luego observaron una tasa de liberación casi constante. Finalmente, después de 65 días, alrededor del 60% (PHF) (Modified pH formulation) y el 50% (SF) (Standard formulation) del péptido fue puesto en libertad.

4.7. DE LA EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LAS MICROESFERAS OBTENIDAS CON MEJOR CARACTERIZACIÓN.

Tabla 22:

Efecto de diclofenaco sódico libre y diclofenaco sódico microencapsulado sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratas.

	CONTROL Δ vol. (mLx100)	DIC.SOD. 10 mg/Kg (Patron)		MP. DIC. SOD. 10 mg/Kg		MP.DIC.SOD. 5 mg/Kg	
		Δ vol. (mLx100)	% Inhib.	Δ vol. (mLx100)	% Inhib.	Δ vol. (mLx100)	% Inhib.
Hora 0	39 \pm 5	40 \pm 7*	0.0 \pm 0.0	40 \pm 8*	0.0 \pm 0.0	41 \pm 3*	0.0 \pm 0.0
Hora 1	58 \pm 6	48 \pm 9*	14 \pm 14	50 \pm 7*	12 \pm 8.8	55 \pm 9*	17 \pm 10
Hora 3	90 \pm 6	67 \pm 3*	26 \pm 7	71 \pm 11*	22 \pm 10	77 \pm 12*	17 \pm 13
Hora 5	123 \pm 13	84 \pm 9*	31 \pm 12	91 \pm 15*	26 \pm 9	95 \pm 11*	22 \pm 15
Hora 9	134 \pm 6	102 \pm 11*	24 \pm 7	108 \pm 16*	19 \pm 12	111 \pm 10*	16 \pm 9
Hora 15	140 \pm 6	114 \pm 13*	19 \pm 10	115 \pm 16*	19 \pm 10	120 \pm 9*	15 \pm 7
Hora 24	103 \pm 9	85 \pm 10*	17 \pm 11	82 \pm 9*	20 \pm 11	86 \pm 14*	17 \pm 14
ABC (mLh ⁻¹)	2849 \pm 44	2241 \pm 92*		2294 \pm 73*†		2401 \pm 24*†	

Cada valor está dado como la media \pm D.E. de las observaciones (n=5 animales por grupo), *p<0,05 comparado con el grupo control, ABC área bajo la curva, † p<0,05 comparado con el grupo DIC.SOD. 10 mg/Kg.

Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

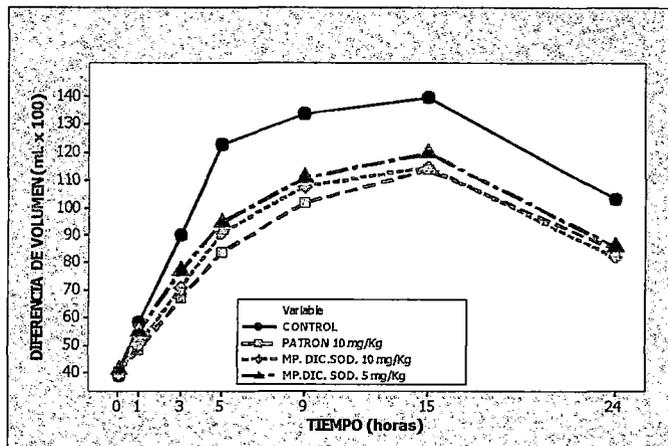


Gráfico 8. Evolución del % de inflamación sobre el edema plantar inducido por carragenina, en ratas *Rattus norvegicus*, durante el tratamiento con diclofenaco sodico libre y microencapsulado con PLGA. Cada valor está dado como la media \pm D.E. de las observaciones. $n = 5$ animales por grupo. Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

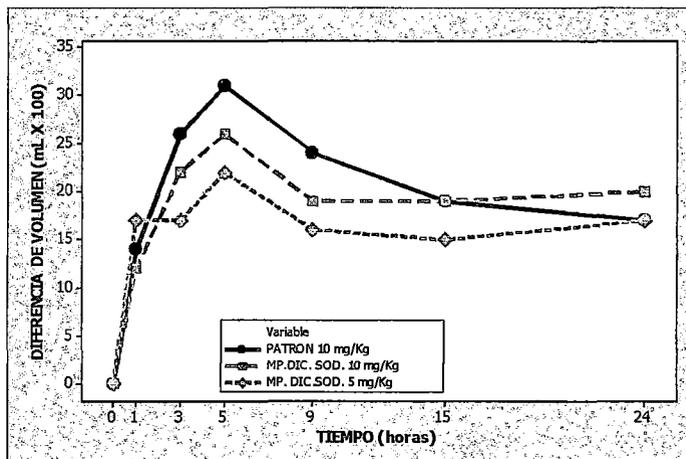


Gráfico 9. Evolución del % de inhibición de la inflamación sobre el edema plantar inducido por carragenina, en ratas *Rattus norvegicus*, del efecto de diclofenaco sódico libre y microencapsulado con PLGA. Cada valor está dado como la media \pm D.E. de las observaciones. $n = 5$ animales por grupo. Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012.

Análisis y discusión:

En lo que se refiere a los resultados del ensayo *in vivo*, es posible observar en el gráfico 8, que entre las hora 5 y la hora 15 los animales del grupo control (SSN) desarrollan el máximo grado de inflamación, como es usual en este modelo experimental de inflamación aguda. El gráfico 9, muestra el comportamiento de las microcápsulas a dosis de 10 mg/Kg y 5 mg/Kg, puede observarse que ambas dosis

ejercen un efecto antiinflamatorio significativo al acercarse al control positivo (fármaco patrón), Como era de esperarse, ya que el diclofenaco sódico es un fármaco antiinflamatorio reconocido, todos los tratamientos (DIC.SOD. Libre y encapsulado) presentan efecto antiinflamatorio significativo durante las primeras nueve horas del proceso, con mayor intensidad alrededor de las horas 3 y 5, como lo sugieren los resultados detallados en la tabla 22. Es importante destacar que en todos los puntos de observación los grupos tratados con diclofenaco sódico libre (patrón) hasta la hora 15 presenta mejor inhibición de la inflamación en comparación con las microesferas de (DIC.SOD.X10), a partir de este punto el (patrón) desciende de manera significativa, mientras que (MP. DIC.SOD. X10) desde las 9 horas mantiene una constante de inhibición creciente como se observa en la tabla 22 y gráfico 9. Se observa que (MP.DIC.SOD. X5) a la primera hora inhibe la inflamación en mayor proporción, este efecto podría deberse al fármaco adsorbido en la superficie de las microcapsulas (Efecto Burst), también podemos observar de acuerdo a el gráfico 9 y tabla 22, la inhibición de manera proporcional de las 3 a 9 horas con respecto al patrón y MP.DIC.SOD X10. Se observar que a partir de las 15 horas tiene una inhibición en aumento, a las 24 horas tiene una inhibición de la inflamación muy similar al patrón. Los tres tratamientos presentan menores deltas de inflamación, tabla 22 y gráfico 8. Es decir, mayor inhibición de la inflamación, que el grupo control. ($p < 0,05$).

- Estos resultados evidencian la influencia de este tipo de sistemas de entrega de fármacos sobre el efecto farmacológico de DIC.SOD, lo que está de acuerdo con lo informado por algunos autores sobre otros tipos de fármacos. Como se sabe, la forma y el tamaño de las micropartículas permiten no sólo la administración más homogénea de la dosis correspondiente, sino también una mayor velocidad de disolución *in vivo*, con la consecuente mayor absorción del fármaco, es decir, una mayor biodisponibilidad. ⁽²⁾ Con respecto a los dos niveles de dosis de MP.DIC.SOD, evaluadas (5 y 10 mg/Kg), es posible observar que en todos los casos, desde la hora 1 hasta la hora 24, se obtienen respuestas antiinflamatorias de magnitud similar. Este efecto también se ve reflejado en los valores del parámetro ABC (área bajo la curva) que en este caso representa el

volumen de inflamación durante el tiempo del experimento. Este parámetro, a diferencia de los resultados en las horas puntuales de observación, permite comparar la evolución de la inflamación de manera global.

En este caso, gracias al ABC, tabla 22 es posible determinar que MP.DIC.SOD. X10 y MP.DIC.SOD. X5, presentan diferencias estadísticas respecto a DIC.SOD. Libre, pero no entre ellas, es decir, que las MP.DIC.SOD en dosis de 5 mg/ Kg, de manera global, logran disminuir los niveles de inflamación en proporción al DIC.SOD libre en dosis de 10 mg/Kg, lo que indica que este sistema de entrega de fármacos permite obtener efectos antiinflamatorios significativos en dosis de 5 mg/kg a 10 mg/kg de diclofenaco sódico.

Diana M. ARAGÓN N. et. al. en el 2010. En el modelo de edema plantar inducido por carragenina, observaron que las micropartículas de naproxeno en dosis de 10 mg/Kg presenta un efecto antiinflamatorio de mayor magnitud que el de Naproxeno libre en la misma dosis. Según los resultados obtenidos del análisis del parámetro área bajo la curva (ABC), es posible sugerir que las micropartículas de Naproxeno en dosis de 5 mg/ Kg presenta un efecto antiinflamatorio mayor al de Naproxeno libre en dosis de 10 mg/Kg.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1.** Se han obtenido microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 conteniendo como principio activo diclofenaco sódico por doble emulsión, con alto rendimiento y eficiencias de encapsulación, lo cual hace posible la utilización de esta técnica en la industria farmacéutica.
- 2.** Se evaluaron los factores tecnológicos que influyeron durante el proceso de formulación de las microesferas biodegradables de diclofenaco sódico, la concentración de polímero, cantidad de principio activo, proporción de PVA y cantidad de isopropanol, usados en proporciones adecuadas son factores que favorecen positivamente en el rendimiento y la eficacia de microencapsulación, mientras que la fase acuosa, velocidad de agitación y tiempo de agitación son factores que se debe tener muy en cuenta, una variación del nivel mínimo al máximo afectaría de manera negativa en el proceso. La adsorción en la superficie no fue muy significativa en el mejor de los casos, siendo un parámetro positivo para la liberación del principio activo a largo plazo.
- 3.** Se demostró que se puede obtener microesferas con buena morfología esférica y tamaño adecuado de hasta 10 μm para una administración parenteral, con un buen rendimiento de hasta 88%. Y una excelente eficacia de hasta 96%. Valores que favorecen su utilización en la industria farmacéutica con un efecto Burst mínimo, adecuado para la aplicación del fármaco con una liberación y efecto prolongado.
- 4.** Antes de los ensayos in vivo, se pudo realizar las pruebas in vitro durante 120 horas (5 días) con la muestra que se obtuvo del mejor tratamiento (M3), con las dosis que fueron aplicadas in vivo. Demostrándose que hay liberación prolongada con pequeñas diferencias significativas entre ambas dosis, observándose a que a partir de las 24 horas alcanzan casi un nivel constante de liberación del principio activo y que después de 120 horas siguen liberando casi con la misma constante.

5. De los cuatro tratamientos que se realizó en el proceso, solo uno de ellos obtuvo las mejores características de buen rendimiento, buena eficacia de microencapsulación y mínimo efecto Burts. El tratamiento M3, en dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg se usó, y fue seleccionada para realizar los ensayos in vivo. Demostrándose que ambas dosis cumplen con el efecto antiinflamatorio con respecto al grupo control (SSN), también se observa que ambas dosis a partir de las 15 horas inhiben de mejor manera la inflamación con respecto al diclofenaco sódico libre (patrón), este efecto puede deberse a la liberación sostenida del principio activo, la comparación entre ambas dosis de la inhibición de la inflamación es significativamente pequeña y que ambas dosis son útiles para este efecto.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

A las autoridades:

1. Realizar la implementación de laboratorios universitarios destinados exclusivamente a la investigación científica, promover la apertura de líneas de investigación en microencapsulación de todo tipo de principios activos e incluyendo los productos naturales, y destinar los recursos de infraestructura e incentivos económicos necesarios para la sostenibilidad de estos laboratorios.

A los docentes:

2. Buscar convenios con Institutos, Universidades y Centros de Investigación dedicados a la investigación en Diseño y obtención de nuevos fármacos y en estudios farmacológicos.

3. Procurar la creación de un Instituto de Investigación para el estudio exclusivo de formulaciones con nuevas tecnologías farmacéuticas dentro de la carrera de Farmacia y Bioquímica.

4. Solicitar la implementación de laboratorios destinados a la industria farmacéutica.

5. Motivar a los estudiantes a realizar más trabajos de investigación en microencapsulación, ya que existe una gran variedad de biopolímeros naturales con los que se puede trabajar, pues aún este tipo de trabajos es materia de investigación en la actualidad.

A los investigadores:

6. Realizar más pruebas de los factores tecnológicos y estandarizar un método para optimizar las formulaciones y así obtener mejores rendimientos y eficacia de microencapsulación.

7. Realizar estudios in vitro por más tiempo, para ver hasta cuanto tiempo se libera el principio activo desde las microsferas.

8. Realizar estudios in vivo, para ver la Biodisponibilidad del principio activo liberado en sangre a lo largo del tiempo y determinar la dosis efectiva media.

9. Realizar los estudios toxicológicos, para ver posibles residuos de los solventes Diclorometano e Isopropanol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Bautista Chávez L. Elaboración y caracterización de micropartículas parenterales por el método A1/O/A2- evaporación del solvente optimizado (tesis de Químico Farmacéutico). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
- 2) Tunçay, M., Calis, S., Kas, H.S., Ercan, M.T., Peksoy, I., Hincal, A.A. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulations considerations and in vitro/in vivo evaluation. *Int. J. Pharm* 2000. 17, 179–188.
- 3) Cohen, S., Cannon, G.W., Schiff, M., Weaver, A., Fox, R., Olsen, N., Furst, D., Sharp, J., Moreland, L., Caldwell, J., Kaine, J., Strand, V., 2001. Two-year, blinded, randomized, controlled trial of treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with methotrexate. *Arthritis Rheum.* 44, 1984–1992.
- 4) Fubini, S.L., Todhunter, R.J., Burton-Wurster, N., Venier Singer, M. Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. *J. Orthop* 2001. Res. 19, 688–695.
- 5) Karsh, J., Yang, W.H., An anaphylactic reaction to intraarticular triamcinolone: a case report and review of the literature. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2003, 90, 254–258.
- 6) Steinmeyer, J., Pharmacotherapy of osteoarthritis. *Orthopade* 30, 856–865. 2001.
- 7) Jalil, R., Nixon, J.R., Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). Part IV: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics. *J. Microencapsul.* 7, 375–383. 1990.
- 8) Spenlehauer G. Spenlehauer-Bonthonneau CF. This C Biodegradable microparticles for delivery of polypeptides and proteins. En: Butterfield DA, ed. *Progress in clinical and biological research.* New York: Alan R. Liss, 1989:283-1.
- 9) Kent JS, Sanders LM, Lewis DH, Tice TR. Microencapsulation of water soluble polypeptides. *Eur Patent Appl* 1982 (52):510.
- 10) Visscher GE, Robinson RL, Maulding HV, Fong JW, Pearson JE, Argentieri GJ. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res Part A* (1985); 19:349-65.
- 11) Mallard, C., Coudane, J., Rault, I., Vert, M., In vitro delivery of a sparingly water soluble compound from PLA 50 microparticles. *J. Microencapsul.* 2000a. 17, 13–28.

- 12)** Mallard, C., Coudane, J., Rault, I., Vert, M., The use of additives to modulate the release of sparingly water soluble, 2000b.
- 13)** Urata, T., Arimori, K., Nakano, H., Modification of release rates of cyclosporin a from poly(L-lactic acid) microspheres by fatty acid esters and in-vivo evaluation of the microspheres. *J. Control Release* 1999. 58, 133–141.
- 14)** Insel PA. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 9 ed. New York: McGraw-Hill; 1996.
- 15)** Wallace JL, Cirino G. The development of gastrointestinal sparing non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; 15:405-409.
- 16)** Roberts LJ, Morrow JD. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editores. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10ª ed. New York: McGraw-Hill & Co; 2001. p. 703-705.
- 17)** Rosenstein-Ster E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 31ª ed. Bogotá: Thompson PLM, S.A; 2003. p. 751-753.
- 18)** Dressman J, Reppas C. In-vitro in-vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2000; 11(2): S73-S80.
- 19)** Román J. Polímeros biodegradables de interés en cirugía (II). Comportamiento biodegradativo y aplicaciones biomédicas. *Revista de plásticos modernos*, 414, diciembre (1990).
- 20)** Valero J, Egea MA, Alsina MA, García ML. Sistemas poliméricos de administración de fármacos. 1985; (sept-oct):93-100.
- 21)** Fundación Teófilo Hernando: Actualidad en farmacología y terapéutica. pto. de Farmacología y Terapéutica Facultad de Medicina, UAM. AFT. Vol.5 N°1 Marzo 2007 revista trimestral. p. 25.
- 22)** Goodman y Gilman's. The Pharmacological basis of therapeutics. 8° ed. Pergamon Press, Inc; 1990. p. 669.
- 23)** Carreño, P., V. Sánchez & A. Aceituno *Acta Farm. Bonaerense* 17: 229-33. (1998)
- 24)** Liu, C.; H. Ho, M. Hsieh, T. Sokoloski & M. Sheu 1. *Pbarm. Pbarmacol.* 47: 365-72. (1995)
- 25)** Edman P. Solid microspheres as drug delivery systems. En: Sartoreli AC, ed. *Methods of drug delivery.* New York: Pergamon Press; 1985:23.

- 26)** Alonso MJ, Blanco J, Vila Jato LL. En: Las nanopartículas como sistemas de liberación de medicamentos. A. E. H.IX 1985 (4): p. 205-18.
- 27)** Benoit JP, Couveur P, Devissaguet JP, Fessi H, Puisieux F, Roblot-Treup L. Les forms vectorisées ou a distribution modulée, nouveaux systèmesd' administration medicaments. J Pharm Belg 1986; 41(5):319-29.
- 28)** Beck LR, Pope VZ. Controlled-release delivery systems for hormones. A review of their properties and current therapeutic. Drugs 1984; (27):528.
- 29)** Nihant N, S chugens Ch, Grandfils C, Jerome R, Teyssie. Polylactide microparticles prepared by doble emulsion-evaporation II, J. Colloid & Interface Sci. 1995. 173, 55.
- 30)** Álvarez C, Herrero-Vanrell, R Negro, S Molina, IT Hernández, MT Pastoriza, et al. Dexametasona microspheres for intravitreal administration. 3 ed. Spanish Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, 83 (1998).
- 31)** Lin, S.Y., Chen, K.S., Teng, H.H., Li, M.J., In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters. J. Microencapsul. 17, 557-586. 2000.
- 32)** Herrero-Vanrell, R., Ramirez, L., Fernández-Carballido, A. y Refojo M.F. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro reléase profiles, and sterilization process. Pharm. Res 2000. 17: 1323-1328.
- 33)** Yan Yang Y, Shung Chung T, Ping Ng N. "Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method", Biomaterials, 22(3), 231 (2001).
- 34)** Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Wenxue Ma, Chakravarthi SS, Amidon GL, Levy RJ, Labhasetwar V. "Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,Llactide-co-glycolide) nano-and micropaticles", J. Controlled Release 2003; 92 (1-2), 173.
- 35)** Fernández G, Herrero R, Molina IT, Pastoriza P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA "microspheres for intraarticular administration. Effect of Labrafil addition on release in vitro".Int J Pharm. 2004; 279 (1): 33-41.
- 36)** Chiappetta D, Legaspi MJ, Niselman V, Pasquali R, Gergic E, Rodríguez Llimós AC, Bregni C. "Microesferas biodegradables de poli (D,L-láctico) conteniendo progesterona".Ars Pharm 2005; 46 (4): 383-398.

- 37)** Diana M. Aragón N, Nadezdha E. VERGEL B, Luis F. Ospina G, Fleming Martínez , Jaiver E. Rosas P. "effect of microencapsulated naproxen into poly(lactide-co-glycolide) microspheres on carrageenin paw edema in rats" *Vitae, Res.*, 2010 (17) 59-65.
- 38)** Finch, C.A. Polymers for microcapsule wall. *Chem. Ind.*, 22: 752-756 (1985).
- 39)** Chu, C.C. Degradation phenomena of two linear aliphatic polyester fibres used in medicine and surgery. *Polimerization*, 26: 591-594 (1985).
- 40)** Shah, S.S., Cha, Y. y Pitt, C.G. Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?. *J. Control. Release*, 18: 261-270 (1992).
- 41)** Menei, P., Daniel, V., Montero-Menei, C., Brouillard, M., Pouplard-Barthelaix, A. y Benoit, J.P. Biodegradation and brain tissue reaction to poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials*, 14: 470- 478 (1993).
- 42)** Sansdrap P, y Möes, A.J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release*, 43: 47-58 (1997).
- 43)** Jesús Flores, Juan Antonio Armijo, África Mediavilla. *Farmacología Humana* 3° ed. MASSON, S.A. Ronda General Mitre, 149 - 08022 Barcelona, Impresión: EDIM, S.C.C.L. - Badajoz, 145-147 - Barcelona 1998, cap.22, p. 377.
- 44)** Real Farmacopea Española. Madrid: Ministerio de sanidad y consumo. 2° ed. 1° reimpresión, corregida octubre del 2003. p. 1188.
- 45)** Adeyeye C.M, Li P.K. En: *Analytical profiles of Drug substances. Diclofenac sodium*. Vol. 19: Academic Press. San Diego: 1990.p.123 -144.
- 46)** Skoutakis V.A., Carter C.A., Micele T.R., Smith V.A. , Arkin C.R. y COL. Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Inpharma*. 10-12, 12, 1988.
- 47)** Ministerio de Sanidad y Consumo.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Ficha de transparencia. 1987.
- 48)** Martindale. Diclofenac sodiun. Royal Pharm. Society of Great Britain. 1989.
- 49)** RACZ 1. Drug formulation. Ed. J. Wiley, 1989; p.165-166.

- 50) United States Pharmacopeia Convention. USP 34. NF 29. Vol 1; the United States Pharmacopeial. The National Formulary. Rockville: 2011; p.2763.
- 51) Aftabrouhad C, Doelker E. Méthodes de préparation des microparticules biodegradables chargées en principes actifs hydrosolubles. STP Pharm Sci. 1992; 2(5):365-80.
- 52) Valero J, Egea MA, Alsina MA, García ML. Sistemas poliméricos de administración de fármacos. Nanoesferas y nanocápsulas. PharmInd. 1993; sept/oct: 93-101.
- 53) Mantovani M. Nanoesferas e a liberacao controlada de fármacos. [en línea] 2002 Disponible en: http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_monografias_marcelo_nanoesferas.pdf. acceso 4 setiembre 2011.
- 54) Ré MI. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. Ciência Hoje. 2000; 27:162, 25-9.
- 55) Sáez V, López L, Katime I. Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. Rev. Iberoamericana de Polímeros. 2003; 4:3, 69-88.
- 56) Ike O, Shimizu Y, Ikada Y. Degradation and antitumor effect of adriamycin containing poly (L lactic acid) microspheres. Biomaterials 1991; (12):757-62.
- 57) Sánchez BA, Tobio BM, Alonso MJ. Los copolímeros del ácido láctico y glicólico. Características y aplicaciones en la liberación de macromoléculas. Ind. Farm. 1995(1):69-6.
- 58) Hermann J, Bodmeier R. Peptide containing biodegradable microspheres prepared by modified solvent evaporation methods. Proceed. Intern. Symp. Control Rel. Bioact Mater 1993 (20): 258-9.
- 59) Ike O, Shimizu Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Controlled cisplatin delivery system using poly (DL-lacticacid). Biomaterials 1992(13):230-4.
- 60) Tice TR, Gilley RM. Preparation of injectable controlled release microcapsules by a solvent evaporation process. En: Advances in Drug Delivery Systems. New York: Ed Elsevier Science Publishers BV; 1986:343.
- 61) http://depa.fquim.unam.mx/amyd/.../liberacionmodificada_11437.pdf. Acceso el 8 de agosto 2012.

- 62)** Remuñán C, Alonso MJ. Microencapsulación de medicamentos. En: Vilá-Jato JL. Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid: Ed. Síntesis, SA; 1997:577-609.
- 63)** Rivera R, Alvarado G, Aldaba S, Flores C, Hernández A. Esteroides microencapsulados como una alternativa en anticoncepción de acción prolongada. En: Pérez Palacios G, ed. Avances recientes en la regulación de la fertilidad. México, DF: Piensa; 1987:149-70.
- 64)** Gilding PAR, Reed AM. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/polylactic homo and copolymers 2. *in vitro* Degradation. *Polymer* 1981; 22:467-79.
- 65)** Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* (2005); 57:357-76.
- 66)** Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmaceuticas. Artículo de revisión Vol. 36 (2), 2007.p. 134-153. Vista en: www.farmacia.unal.edu.co (acceso 4 setiembre 2011)
- 67)** Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* (1996); 17:103-14.
- 68)** Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* (1996); 17:93-102.
- 69)** Visscher GE, Robinson RL, Maulding HV, Fong JW, Pearson JE, Argentieri GJ. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res Part A* (1985); 19:349-65.
- 70)** Eppley BL. Use of resorbable plates and screws in pediatric facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg* (2005); 63:385-91.
- 71)** Whateley TL. Biodegradable microspheres for controlled delivery, En: Whateley TL, ed. Encapsulation and controlled release, Reino Unido: Harwood. Acad, 1993:57.
- 72)** Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, García ML, Egea MA. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *Int J Pharm* 1999 (179):37-8.

- 73)** Wu XS. Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. En: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER, eds. Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. New York: Marcel Dekker, 1995:1151-60.
- 74)** Gömer T, Gref R, Michenot D, Sommer F, Tran MN, Dellacheire E. Lidocaine-loaded biodegradable nonospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. *J Controlled Rel* 1999(57):259-8.
- 75)** Revista Cubana De Farmacia. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ciudad de La Habana, Cuba. 2001; 35 (2). p. 126-35.
- 76)** Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT. The preparation and characterization of poly (lactide-coglycolide) microparticles. II The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion evaporation technique. *Pharm Res* 1993 (10):362-8.
- 77)** Okada H. One –and tree– month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprolerin acetate. *Adv Drug Del Rev* 1997(28):43-70.
- 78)** Lee Larassama N, Howard SA, Malanga CJ, Cuzzi LA, Hogan TF, et al. Kinetic of drug release from polylactic acid-hydrocortisone microcapsules. *J Microencapsulation* 1986 (3):171.
- 79)** Tsai DC, Howard SA, Hogan TF, Malangu CJ, Ma JK. Preparation and in vitro evaluation of polylactic acid-mitomycin C microcapsules. *J Microencapsulation* 1986 (3):181-3.
- 80)** Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactic-coglycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsulation* 1990(7):297.
- 81)** Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly (L-lactic acid). IV. Release properties of microcapsule containing phenobarbitone. *J Microencapsulation* 1990(7):53-6.
- 82)** Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly (L-lactic acid). III. Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *Microencapsulation* 1990(7):41-52.
- 83)** Bodmeier R, Mc Ginity W. Solvent selection in the preparation of poly (DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Intern J Pharm* 1988(43):179-6.

- 84)** Rafler G, Johmann M. Controlled release systems of biodegradable polymers. Part 5: microparticles preparation by a salting-out process. *Pharm Ind Germany* 1997 (59):622-4.
- 85)** Kawashima Y, Yamamoto H, Takeushi H, Hino T, Niwa T. Properties of a peptide containing D, L- lactide- glycolyde copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm* 1998 (45):41-8.
- 86)** Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation in vitro of poly (lactic acid) microspheres containing local anesthetics. *Chem Pharm Bull* 1981 (29):3363-68.
- 87)** Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH. Systemic and local delivery of contraceptive steroids using biodegradable microcapsules. En: Hafez ESE. *Progress in contraceptive delivery systems*. Lancaster: MTP Press, 1980:63-81.
- 88)** Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Flanagan DR, Schmitt E. Controlled release of protein and vaccines from poly (ester) microspheres in vitro. En: Gebelein CD et al, eds. *Cosmetic and pharmaceutical applications of polymers*. New York: Plenum, 1991:239-53.
- 89)** Arshady R. Biodegradable microcapsular drug delivery systems: Manufacturing methodology, release control and targeting prospect. *J Bioact Compatible Polym* 1990 (5):315-34.
- 90)** Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chem Pharm Bull* 1982 (30):3719-27.
- 91)** Bodmeier R, Mc Ginity JW. Poly (lactic acid) microcapsules containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by solvent evaporation technique. *J Microencapsulation* 1987(4):279-88.
- 92)** Bodmeier R, Mc Ginity JW. Poly (lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by solvent evaporation technique. II. Some process parameter influencing the preparation and properties of microspheres. *J Microencapsulation* 1987(4):289-97.
- 93)** Spenlehauer G, Benoit JP, Veillard M. Formation and characterization of poly (DL-lactide) microspheres for chemoemobilization. *J Pharm Sci* 1986(75):750-55.

- 94)** Bodmeier R, Mc Ginity JW. The preparation and evaluation of drug-containing poly (DL-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation. *Pharm Res* 1987(4):465-71.
- 95)** Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.P., Chabot, F., Veillard, M., Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morphology and release characteristics. *J. Control Release* 7, 217–229, 1988.
- 96)** Fong JW. Microencapsulation by solvent evaporation and organic phase separation processes. En: Hsieh D, ed. *Controlled release systems: fabrication technology*; Boca Raton: CRC Press, 1988; vol 1:81-108.
- 97)** Kempen DHR, Lu L, Zhu X, Kim C, Jabbari E, Dhert WJA, et al. Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. I. Preparation and characterization. *J Biomed Mater Res Part A.* (2004); 70A:283-92.
- 98)** Tice TR, Meyers WE, Lewis DH, Cowsar DR. Controlled release of ampicillin and gentamicin from biodegradable microcapsules. *Proceeding Intern Symp Control RelBioact Mater* 1981(8):108-11.
- 99)** Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Glanagan DR, Echmitt E. Degradation of poly (ester) microspheres. *Biomaterials* 1990(11):679-85.
- 100)** Fong JW. Process for preparation of microspheres; US Patent; 1979; (4):166-800.
- 101)** Soriano Torres I, Evora CM, Llabrés M. Liberación de insulina desde microesferas de DL-PLA. I Congreso Hispano-Luso de Liberación Controlada. Santiago de Compostela, España, Proceedings, 1995:60.
- 102)** Shen Wu X. Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. En: Wise LM, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz, eds. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. New York: Marcel Dekker; 1995:1151-200.
- 103)** Sun SW, Jeong YI, Jung SW, Kim SH. Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres and its release characteristics. *J Microencapsul* (2003); 20:479 88.
- 104)** A. Galelli, B. Charlot, E. Deriaud, C. Leclerc, B-Cells do not present antigen covalently linked to microspheres, *Immunol*, 79, 69 (1993).

- 105)** M. Kanke, E. Porlier, R. Geissler, D. Powell, A. Kaplan, P. DeLuca, Interaction of microspheres with blood constituents. II. Uptake of biodegradable particles by macrophages, *J Parent SciTechnol*, 40, 114 (1986).
- 106)** D. T. O'Hagan, H. Jeffery, S. S. Davis, Long-Term Antibody responses in Mice Following Subcutaneous Immunization with Ovalbumin Entrapped in biodegradable microparticles, *Vaccine*, 11, 965 (1993c).
- 107)** J. H. Eldridge, J. K. Staas, J. A. Meulbroek, T. R. Tice, R. M. Gilley, Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glicolide) microspheres as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies, *Infect Immun*, 59, 2978 (1991b).
- 108)** Gander B, Wehrli E, Alder R, Merkle P. Quality improvement of spray-dried, protein loaded D, L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *J Microencapsul* 1995; 12:83-97.
- 109)** Kim HK, Park TG. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly (Llactic acid) and amorphous poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. *J Control Release* (2004); 98:115-25.
- 110)** Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levin N, Cleland JL. Sustained release of recombinant human insulin like growth factor-I for treatment of diabetes. *J Control Release* (2000); 67:281-92.
- 111)** Péan JM, F. Boury MCV-J, Menei P, Proust JE, Benoit JP. Why does PEG 400 coencapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? *Pharm Res* (1999); 16:1294-9.
- 112)** Weert MV, Hof RV, Weerd JV, Heeren RMA, Posthuma G, Hennink WE, et al. Lysozyme distribution and conformation in a biodegradable polymer matrix as determined by FTIR techniques. *J Control Release* (2000); 68:31-40.
- 113)** Rahman NA, Mathiowitz E. Localization of bovine serum albumin in double-walled microspheres. *J Control Release* (2004); 94:163-75.
- 114)** Bitz C, Doelker E. Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *Int J Pharm* (1996); 131:171-81.
- 115)** Meng FT, Ma GH, Qiu W, Su ZG. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *J Control Release* (2003); 91:407-16.

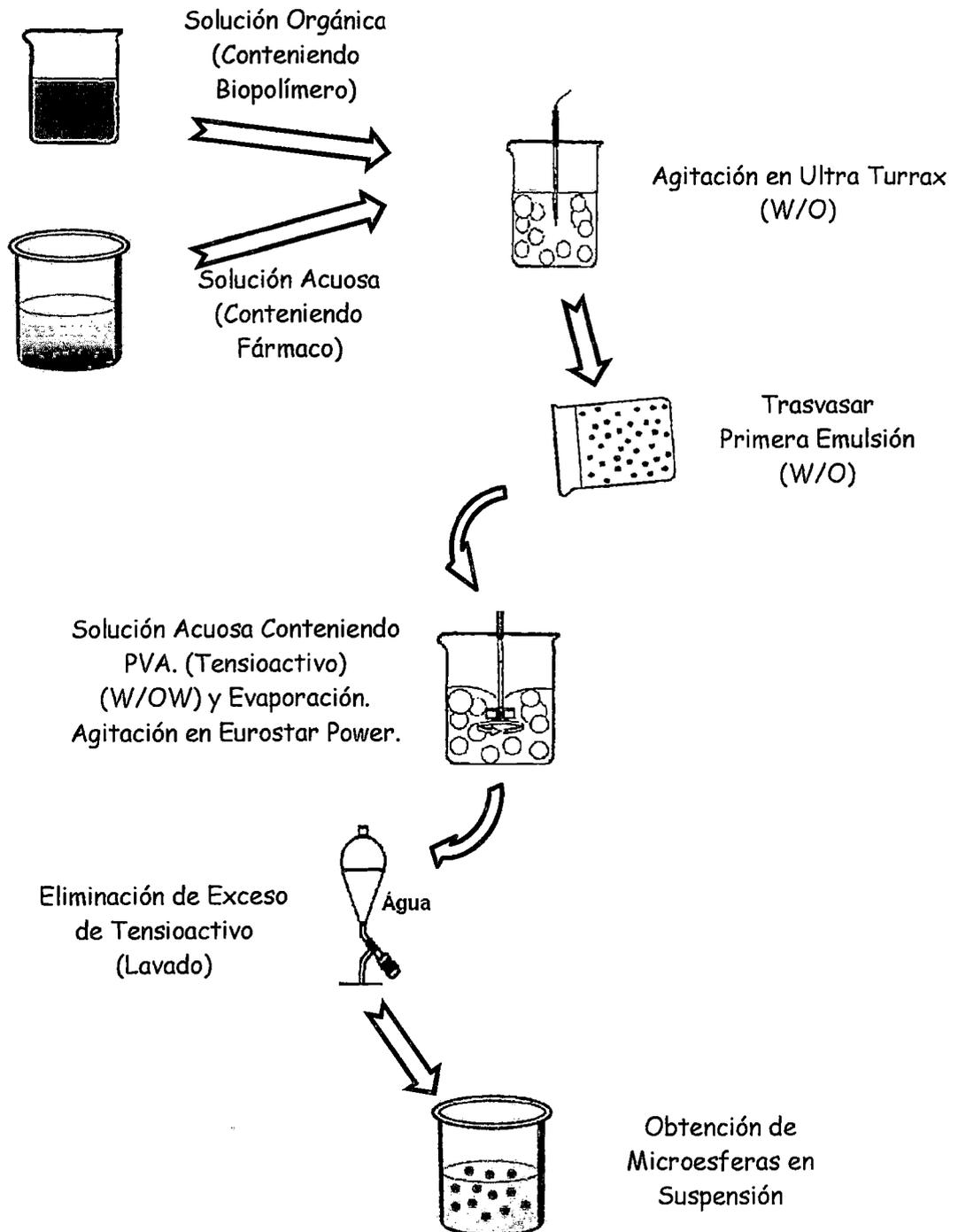
- 116)** Pistel KF, Kissel T. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique. *J Microencapsul* (2000); 17:467-83.
- 117)** Bernstein H, Mathiowitz E, Morrel E, Brickner A, inventors; Alkermes Inc. assignee. Erythropoietin drug delivery system. WO Patent 9 325 221. 1993.
- 118)** Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. Biodegradable microspheres controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* (1994); 12:299-312.
- 119)** Haznedar S, Dortunc B. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *Int J Pharm* (2004); 269:131-40.
- 120)** Cheng YH, Illum L, Davis SS. A poly (d,l-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *J Control Release* (1998); 55:203-12.
- 121)** Péan JM, Venier-Julienne MC, Filmon R, Sergent M, Phan-Tan-Luu R, Benoit JP. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. *Int J Pharm* (1998); 166:105-15.
- 122)** Dinarvand R, Moghadam SH, Mohammadyari-Fard L, Atyabi F. Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone. *AAPS Pharm SciTech* [serial online] 2003; 4:E34. Se consigue en en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.
- 123)** Lee SC, Oh JT, Jang MH, Chung SI. Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evapo-ration method: effect of particle size and PVA concentration. *J Control Release* (1999); 59:123-32.
- 124)** Burgess DJ, Crommelin DJA, Hussain AS, Chen M, EUFEPS. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS Pharm Sci* [serial online] (2004); 6: artículo 11. Se consigue en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.
- 125)** Sánchez A, Villamayor B, Guo Y, McIver J, Alonso MJ. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* (1999); 185:255-66.
- 126)** Cleland JL. Solvent evaporation processes for the production of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines. *Biotechnol Prog* (1998); 14:102-7.

- 127)** Srinivasan C, Katare YK, Muthukumaran T, Panda AK. Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles. *J Microencapsul* (2005); 22:127-38.
- 128)** Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* (2003); 90:261-80.
- 129)** Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 2004; 282:1-18.
- 130)** Blanco-Prieto J, Besseghir K, Orsolini P, Heimgartner F, Deuschel C, Merkle HP, et al. Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* (1999); 184:243-50.
- 131)** Yang J, Cleland JL. Factors affecting the in vitro release of recombinant human interferon - γ (rhIFN- γ) from PLGA microspheres. *J Pharm Sci* (1997); 86:908-14.
- 132)** Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical Experimental Design*. New York: Marcel Dekker; 1999. p. 85-90.
- 133)** Rosas JE, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Guzmán F, Patarroyo ME, et al. Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. *Vaccine*. 2001; 19 (31): 4445-4451.

ANEXO

ANEXO 1.

FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN



Fuente: Pastor Chambi E. W; Mormontoy Marcavillaca C. 2012

ANEXO 2.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE ÁCIDO POLI(LACTICO-CO-GLICOLICO)

SIGMA-ALDRICH

ALDRICH

Riedstrasse 2, D-69126 Steinheim/Germany
Tel: +49 73 2997 2550 Fax: +49 73 2997 2557

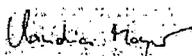
Certificate of Analysis

Product Name: POLY(D,L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE)
acid terminated, (50:50), M_w 7,000-17,000
Product Number: 719897
Product Brand: Aldrich
Molecular Formula:
Molecular Mass:
CAS Number: 26780-50-7

TEST	SPECIFICATION	LOT STBC1497V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	SOLID	POWDER
ASSAY (GC WEIGHT %)	MAX. 0.5 % D,L-LACTIDE MAX. 0.5 % GLYCOLIDE	0.05 % < 0.05 %
MOLECULAR NUMBER	REPORT RESULT	6400 G/MOL
MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION	REPORT RESULT	11300 G/MOL
WATER	MAX. 0.5 %	0.15 %
SULFATED ASH	MAX. 0.1 %	CONFORMS
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
ASSAY (H-NMR)	D,L-LACTIDE: 48 - 52 MOLE% GLYCOLIDE: 48 - 52 MOLE%	50 MOLE% 50 MOLE%
ODOUR	NEARLY ODOURLESS	CONFORMS
VISCOSITY	INHERENT VISCOSITY: 0.16 - 0.24 DL/G (0.1% IN CHCL3 AT 25 DEG C)	0.21 DL/G
HEAVY METALS	MAX. 10 PPM	CONFORMS
MISCELLANEOUS TESTS	REPORT MW/MN RATIO	1.8
ACID VALUE	MIN. 6 MG KOH/G	9.6 MG KOH/G

Certificate of Analysis

TIN (ICP)	MAX. 200 PPM	171 PPM
RESIDUAL SOLVENTS (GLC-HS)	MAX. 890 PPM TOLUENE	34 PPM
	MAX. 0.1 % ACETONE	< 0.01 %
	MAX. 0.1 % TOTAL	< 0.01 %
VENDOR INFORMATION	EVONIK ROEHM SPECIFICATION	EVONIK DATA
QC RELEASE DATE	10/MAY/11	



Claudia Mayer, Manager
Quality Control
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

ANEXO 3.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ALCOHOL POLI-VINÍLICO

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Poly(vinyl alcohol) - average Mw 31,000-50,000, 87-89% hydrolyzed

Product Number:

363073

Lot Number:

MKBH7633V

Brand:

ALDRICH

CAS Number:

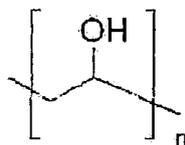
9002-89-5

MDL Number:

MFCD00081922

Quality Release Date:

08 AUG 2011



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Conforms to Requirements	Crystals
Powder, Crystalline Powder, Crystals or Granules		
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Assay	87.0 - 89.0 %	88.9 %
Loss on Drying	≤ 5.0 %	2.4 %
Residue on Ignition (Ash)	≤ 0.7 %	0.5 %
Viscosity	5.2 - 6.2 cps	5.9 cps
C = 4%, H ₂ O		
pH	4.5 - 6.5	5.5
C = 4%, H ₂ O		

Remarks:

Reviewing Chemist :

Jamie Gleason, Manager

Quality Control

Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXO 4

CERTIFICADO DE ANALISIS DE DICLOROMETANO.

Certificate of Analysis



1.06050.1000 Dichloromethane for analysis EMSURE®
ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch K42408350

	Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.8	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Titration acid	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Density (d 20 °C/ 4 °C)	1.324 - 1.326	
Boiling point	39 - 42	°C
Free chlorine (as Cl)	≤ 0.00002	%
Chloride (Cl)	≤ 0.0001	%
Matter discoloured by H ₂ SO ₄	≤ 100	Hazen
Chloroform (GC)	≤ 0.005	%
Ethanol (GC)	≤ 0.02	%
Methanol (GC)	≤ 0.1	%
Carbon tetrachloride (GC)	≤ 0.005	%
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	≤ 0.002	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Mo (Molybdenum)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.01	%

Stabilized with about 50ppm 2-Methyl-2-butene.

Date of release (DD.MM.YYYY): 16.06.2011
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 30.06.2016

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

ANEXO 5.

CERTIFICADO DE ANALISIS DE 2-PROPANOL.

Certificate of Analysis



1.09634.2500 2-Propanol for analysis EMSURE®
ACS,ISO,Reag. Ph.Eur.
Batch K42243434

	Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.8	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Solubility in water	conforms	
Acidity	≤ 0.0001	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0001	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.784 - 0.787	
Boiling point	81 - 83	°C
Chloride (Cl)	≤ 300	ppb
Nitrate (NO ₃)	≤ 300	ppb
Phosphate (PO ₄)	≤ 500	ppb
Sulphate (SO ₄)	≤ 1000	ppb
Substances reducing potassium permanganate (as O)	≤ 2	ppm
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.002	%
Matter discoloured by H ₂ SO ₄	≤ 10	Hazen
Acetone (GC)	≤ 0.01	%
Ethanol (GC)	≤ 0.01	%
Isopropylether (GC)	≤ 0.01	%
Methanol (GC)	≤ 0.01	%
1-Propylalcohol (GC)	≤ 0.1	%
Ag (Silver)	≤ 0.000002	%
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
As (Arsenic)	≤ 0.000002	%
Au (Gold)	≤ 0.000002	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Be (Beryllium)	≤ 0.000002	%
Bi (Bismuth)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Ga (Gallium)	≤ 0.000002	%
In (Indium)	≤ 0.000002	%
Li (Lithium)	≤ 0.000005	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Mo (Molybdenum)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Pt (Platinum)	≤ 0.000002	%
Sb (Antimony)	≤ 0.000002	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Ti (Titanium)	≤ 0.000002	%
Tl (Thallium)	≤ 0.000002	%

Certificate of Analysis

1.09634.2500 2-Propanol for analysis EMSURE®
ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Batch K42243434

Batch Values

V (Vanadium)	≤ 0.000002	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Zr (Zirconium)	≤ 0.000002	%
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.05	%

ACS, ISO reagent. Ph Eur-reagent

Date of release (DD.MM.YYYY): 20.04.2011
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 30.04.2016

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

ANEXO 6.

CERTIFICADO DE ANALISIS DE DICLOFENACO SODICO

2012-01-03
Dresden

HENAN DONGTAI PHARM CO., LTD.

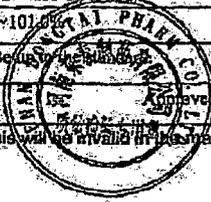
Address: East Changhong Road, Tangyin, Henan, China.
TEL:0086-372-6201622

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: Diclofenac Sodium (bromine free)	According to: USP32	
Batch No.: 110903-5	Mfg. Date: Sep.03,2011	Exp. Date: Sep.02,2015
Quantity: 250kg	Packing: 25kg/fibre drum	

ITEMS	SPECIFICATION	RESULTS
Characteristics	A white or slightly yellowish Crystalline powder	White crystalline powder
Identification:	A. IR	ACCORD
	B. HPLC	ACCORD
	C. Test of sodium salt	CONFORM
Appearance of solution:	5.0% of methanol solution 440nm, NMT 0.05	0.011
Clarity of solution:	Equal to methanol	PASS
PH	7.0~8.5	7.02
Related substances	Any Specified Impurity: NMT 0.2%	Not detected
	Any unspecified Impurity: NMT 0.1%	Not detected
	Total impurities: NMT 0.3%	Not detected
Heavy metals	NMT 10 PPM	PASS
Loss on drying:	NMT 0.5% (1g, 100°C ~ 105°C, 3 hrs)	0.19%
Assay	99.0% ~ 101.0%	99.81%
Conclusion: It accords with USP32. Be used in the market of EU.		
Tested by: Liu Wenying		Approved by: Wang Haizhou

Caution! This Certificate of Analysis will be invalid in the market of EU.

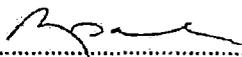


**DISTRIBUIDO POR:
DRESDEN LAB. S.A.C.**

**DISTRIBUIDO POR:
DRESDEN LAB. S.A.C.**

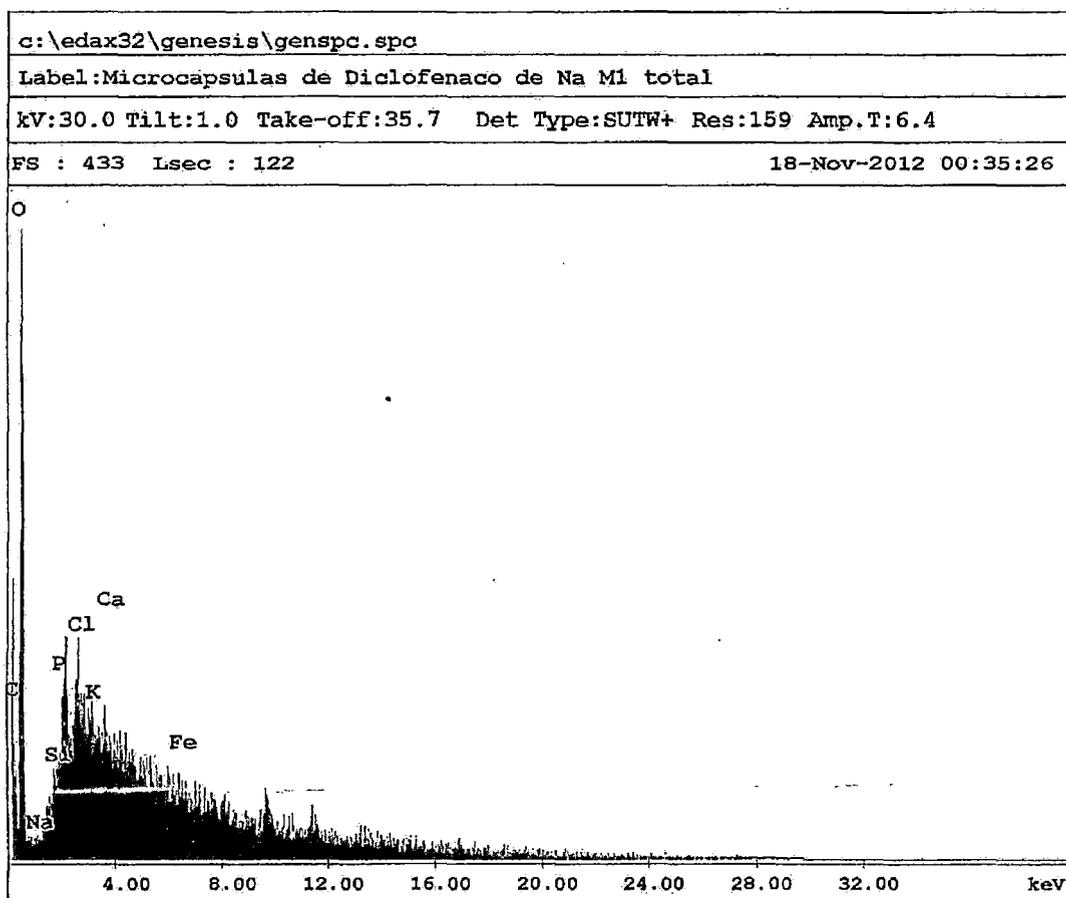
ANEXO 7.

CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

		INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO	
CERTIFICADO SANITARIO Nº		295-2012	
Producto	: Rata Albina	Lote Nº	: R - 10 - 2012
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 28
Cepa	: Holtzman	Edad	: 2 meses ½
Peso	: 240 a 250 gr.	Sexo	: Machos
Guía de Remisión	: 026565	Destino	: Mormontoy Marcavillaca, Carmelin Univ. San Antonio Abad del Cusco
Lima	: 10-10-2012		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p>			
Chorrillos, 31 de Noviembre del 2012 (Fecha de emisión del certificado)			
<p>NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>		 M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586	

ANEXO 8.

ESPECTRO DE LA COMPOSICIÓN DE ALGUNOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO, ANALIZADAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.



Element	Wt %
C K	27.26
O K	67.63
NaK	0.37
SiK	0.25
P K	0.58
ClK	1.60
K K	0.55
CaK	0.70
FeK	1.06
Total	100.00

Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012

ANEXO 9.

RESUMEN DE FOTOS.

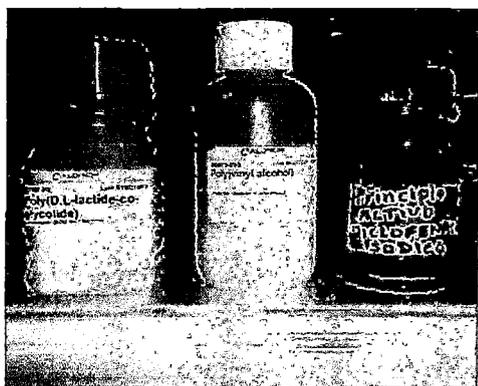


FOTO N° 1. Insumos para la elaboración de las microcápsulas, a la izquierda se observa el biopolímero PLGA, al centro el alcohol polivinílico PVA, a la derecha el principio activo diclofenaco sódico (materia prima). **Fuente propia.**



FOTO N° 2. Reactivos para la elaboración de las microcápsulas, a la izquierda se observa el frasco de 2-propanol, a la derecha se observa el diclorometano. **Fuente propia.**

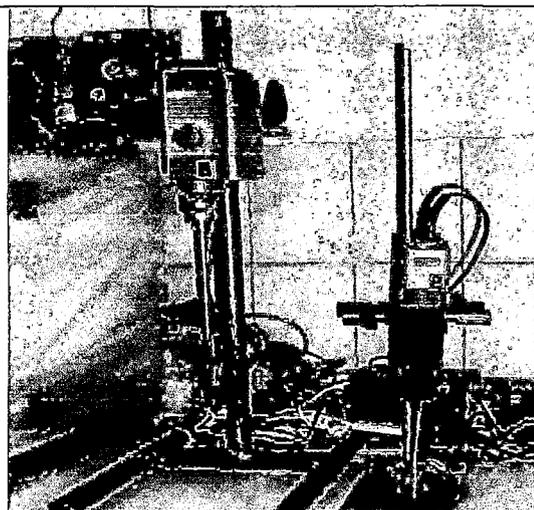


FOTO N° 3. Equipos para la elaboración de las microesferas, al lado izquierdo se observa el homogenizador (Eurostar power) usado para la obtención de la segunda emulsión, a la derecha se observa el dispersor (T-25 Ultra Turrax) usado para obtener la primera emulsión. **Fuente propia.**

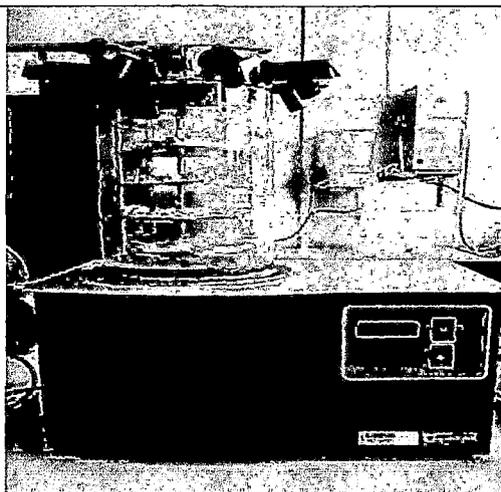


FOTO N°4. Equipo liofilizador, se uso para liofilizar las microesferas obtenidas después del proceso de elaboración. **Fuente propia.**

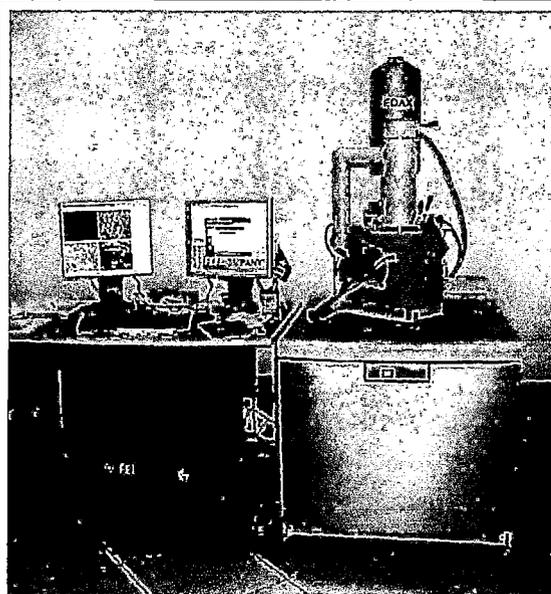


FOTO N° 5. Microscopio electrónico de barrido (SEM) fue usado para observar la morfología externa y el tamaño de las microesferas después del proceso de liofilización. **Fuente propia.**



FOTO N° 6. Balanza digital de precisión de cinco dígitos, fue usada para pesar los insumos y reactivos para la elaboración de las microcápsulas y otros. **Fuente propia.**

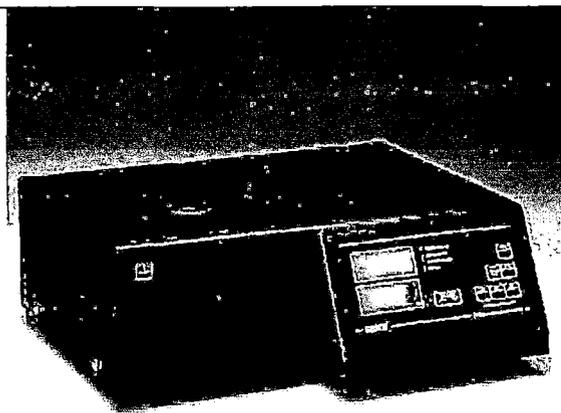


FOTO N° 7. Espectrofotómetro Uv. Fue usado para cuantificar el principio activo, para la curva de calibración y para ver la eficacia y el efecto Busrt de las microesferas. **Fuente propia.**



FOTO N° 8. Baño de ultrasonido, fue usado para facilitar la solubilidad de algunos insumos y para esterilizar las microesferas antes de la aplicación in vivo. **Fuente propia.**

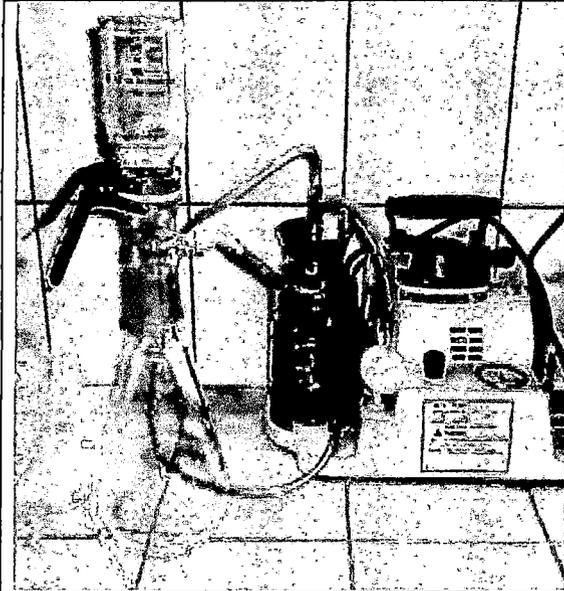


FOTO N° 9. Equipo de bomba al vacío, fue usado para filtrar la impureza de algunos insumos. *Fuente propia.*



FOTO N° 10. Proceso de elaboración de las microcápsulas, se está trabajando en el equipo T-25 Ultra Turrax para obtener la primera emulsión. *Fuente propia.*

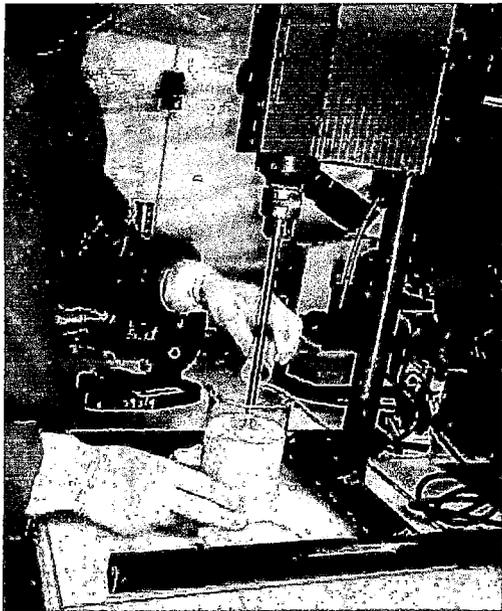


FOTO N° 11. Proceso de elaboración de las microesferas, se está trabajando en el equipo Eurostar Power para obtener la segunda emulsión. *Fuente propia.*



FOTO N° 12. Proceso de liofilización, se observa en las bandejas del equipo las microesferas obtenidas que se están liofilizando. *Fuente propia.*

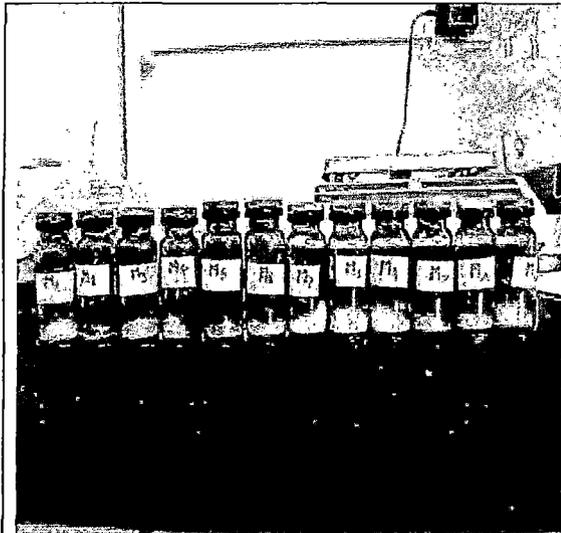


FOTO N° 13. Frascos viales de color ambar, donde se encuentran las dose muestras de las microesfras liofilizadas protejjads de la luz y humedad. **Fuente propia.**

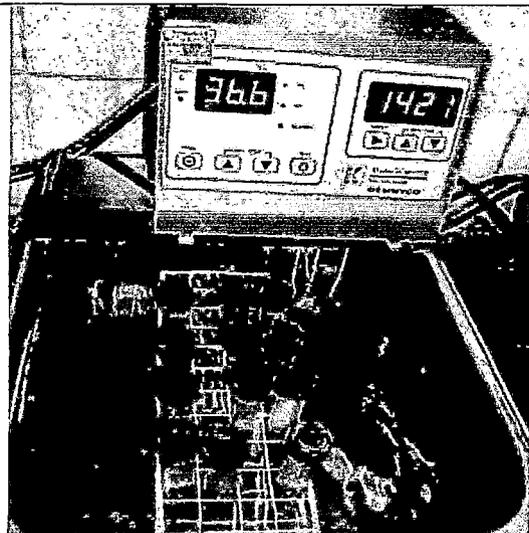


FOTO N° 14. Las muestras de las microesfras se encuentran en un baño María con agitación a temperatura constante, mediante este proceso se vera el efecto Burst, también la eficacia de encapsulación. **Fuente propia.**

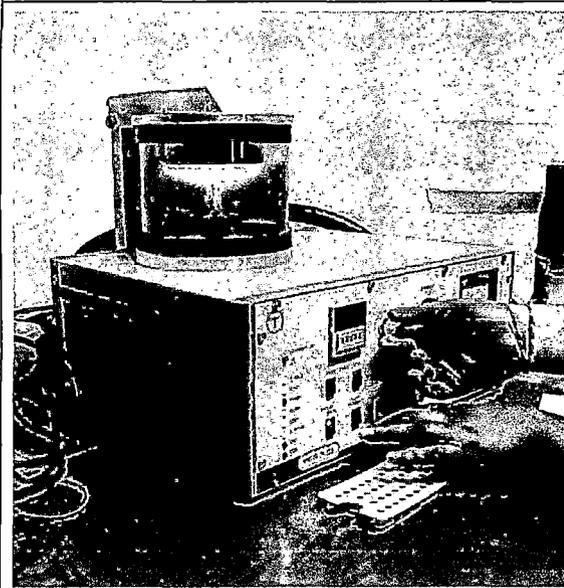


FOTO N° 15. En la imagen se observa el proceso de recubrimiento de las microesfras liofilizadas, con paladio en el equipo Emitech, antes de ser llevado al SEM. **Fuente propia.**



FOTO N° 16. En la imagen se observa el proceso de analisis de las muestras recubiertas con paladio, al microscopio electronico de barrido (SEM). **Fuente propia.**

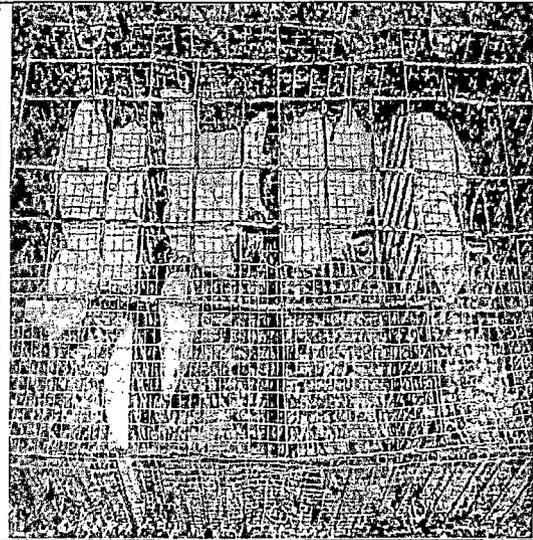


FOTO N° 17. Se observan los animales de experimentación, ratas de la especie *Rattus norvegicus*, cinco animales por grupo formados aleatoriamente. **Fuente propia.**



FOTO N° 18. En la imagen se observa el proceso donde se induce la inflamación con la carragenina en la pata derecha del animal de experimentación. **Fuente propia.**



FOTO N° 19. En la imagen se observa el momento donde se le aplica las microesferas por vía intraperitoneal al animal de experimentación. **Fuente propia.**



FOTO N° 20. La imagen muestra el proceso donde se mide el volumen de la pata inflamada del animal de experimentación en el equipo de pletismómetro manual. **Fuente propia.**

ANEXO 10.

DATOS DE LA MEDIDA DE INFLAMACIÓN A LO LARGO DEL TIEMPO PARA CADA TRATAMIENTO.

		TIEMPO (horas)						
		h0	h1	h3	h5	h9	h15	h24
MEDIDA DEL VOLUMEN DE INFLAMACION EN LA PATA DE LAS RATAS PARA CADA TRATAMIENTO (5 animales por grupo)	Control SSN.	1.4	2.3	2.9	3.4	3.4	3.5	3.0
		1.5	2.4	2.8	3.3	3.5	3.6	2.9
		1.5	2.4	3.0	3.3	3.4	3.6	3.1
		1.5	2.3	2.9	3.4	3.5	3.5	2.9
		1.6	2.4	3.0	3.3	3.7	3.8	3.3
	Patrón DIC.SOD 10 mg/kg libre.	1.5	2.3	2.5	2.7	3.1	3.2	2.9
		1.4	2.2	2.4	2.8	3.0	3.3	2.8
		1.6	2.2	2.6	2.8	3.0	3.2	2.9
		1.5	2.3	2.5	2.7	2.9	3.1	2.8
		1.5	2.1	2.5	2.8	3.1	3.2	2.9
	MP.DIC.SOD 10 mg/kg	1.4	2.2	2.4	2.9	3.1	3.2	2.6
		1.6	2.3	2.5	2.7	3.0	3.1	2.7
		1.4	2.2	2.5	2.8	3.1	3.2	2.6
		1.4	2.1	2.6	2.8	3.0	3.1	2.7
		1.6	2.3	2.6	2.9	3.1	3.2	2.8
	MP.DIC.SOD 5 mg/kg	1.5	2.2	2.5	2.8	3.2	3.2	2.7
		1.4	2.3	2.6	2.9	3.0	3.1	2.7
		1.4	2.1	2.5	2.8	3.0	3.2	2.8
		1.6	2.4	2.6	2.9	3.1	3.3	2.6
		1.4	2.3	2.7	2.8	3.1	3.2	2.7

Fuente: Pastor Chambi E W; Mormontoy Marcavillaca C, 2012