



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“Desarrollo de un proceso hálo para obtener nanocristales de
fármacos insolubles al agua usando Aerosil® 200 como
estabilizante”**

T E S I S

Para obtener el Título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A:
Melody Yazmín Salgado Durán

ASESOR: Dr. David Quintanar Guerrero

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi hija: Luna Gisell Muñoz Salgado

Por ser el impulso más grande en mi vida y mil disculpas por sacrificar esos momentos que no pude estar contigo, siempre serás mi princesita hermosa. Te amo.

A mi esposo: León Mauricio Muñoz Miranda

Por tu paciencia, apoyo y cariño incondicional que siempre me has dado y por compartir todos estos momentos y los que faltan. Gracias por creer en mí. Te amo, Te amo, Te amo...

A mis mamás: Zeferina Sánchez Cuevas, Angélica Durán Sánchez

Por todo el apoyo y cariño que me han brindado siempre sin los cuales no lo hubiese logrado. Gracias

A mi tío: Cesar Durán Sánchez

Por todo el apoyo brindado.

A mi hermano: Juan Carlos

Por ese lazo que nos une y nada es imposible.

A mis suegros: León y Martha

Por el apoyo brindado, por creer en mí y ese impulso día a día.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. David Quintanar Guerrero

Mil gracias por todo su apoyo, paciencia, presencia y conocimientos transmitidos además de dejarme realizar este proyecto con usted, pero sobre todo por ese impulso y gusto que me transmitió hacia la investigación. Es imposible tener un mejor asesor que usted.

Mi casa Académica UNAM y FES-C

Por haberme dado la oportunidad de escalar no uno si no varios peldaños en el campo del conocimiento, pero sobre todo por enseñarme una gran calidad humana. Siempre portare el nombre UNAM en alto.

A mis amigas:

Chicas por esa amistad que fue creciendo y esos momentos tan divertidos e irrepetibles...

ÍNDICE GENERAL

	A. Lista de abreviaturas.....	vii
	B. Índice de figuras.....	viii
	C. Índice de tablas.....	ix
	D. Índice de anexo	x
I.	Introducción.....	11
II.	Marco Teórico.....	14
	1. Nanocristales.....	14
	1.1. Definición.....	14
	1.2. Propiedades de los nanocristales.....	15
	1.2.1. Talla de Partícula.....	15
	1.2.2. Carga de fármaco.....	15
	2. Principios activos en nanocristales.....	16
	3. Materiales para elaborar nanocristales.....	20
	4. Solventes.....	21
	4.1. Clasificación ICH de solventes.....	21
	4.1.1. Clase I.....	22
	4.1.2. Clase II.....	22
	4.1.3. Clase III.....	22
	5. Métodos de elaboración de nanocristales.....	23
	5.1. Molino de bolas.....	23
	5.2. Homogenización de alta presión.....	24
	5.3. Irradiación de microondas y ultrasonificación.....	25
	5.4. Dispersión de polímeros preformados.....	26
	5.5. Emulsificación- Evaporación.....	26
	5.6. Salting-out.....	26
	5.7. Nanocristalización o desplazamiento de solvente.....	27
	6. Mecanismo de formación de los nanocristales.....	28
	6.1. Nucleación.....	29
	6.1.1. Nucleación primaria.....	30
	6.1.2. Nucleación secundaria.....	30
	6.2. Crecimiento de cristales.....	30
	7. Estabilización hálica.....	31
	8. Estabilizantes.....	32
	9. Dióxido de silicio.....	33
	10. Liberación del fármaco.....	35
	11. Caracterización de los nanocristales.....	36
	11.1. Calorimetría Diferencial de Barrido.....	36
	11.2. Microscopia Electrónica de Barrido.....	37
III.	Objetivos.....	39
IV.	Material y equipo.....	40
V.	Metodología.....	42
	1. Selección del fármaco.....	43
	1.1. Caracterización del fármaco seleccionado.....	43

1.1.1. Análisis físico.....	43
1.1.2. Determinación del punto de fusión.....	43
1.1.3. Talla de partícula.....	44
2. Preparación de los nanocristales.....	44
2.1. Determinación de la concentración adecuada del fármaco y estabilizador.....	44
2.2. Procedimiento general para la preparación de nanocristales mediante el método de desplazamiento de solvente.....	44
2.3. Procedimiento general para la preparación de nanocristales mediante el método propuesto.....	45
3. Evaluación y caracterización de los nanocristales.....	45
3.1. Talla de partícula.....	45
3.2. Estabilidad de los nanocristales.....	45
3.3. Morfología.....	45
3.4. Propuesta de morfología.....	46
3.5. Resuspendibilidad del liofilizado.....	46
3.6. Calorimetría Diferencial de Barrido.....	46
3.7. Prueba de velocidad de disolución.....	46
VI. Resultados y discusión.....	48
1. Selección del fármaco.....	48
1.1. Caracterización del fármaco seleccionado.....	48
2. Obtención de nanocristales de Ciclosporina A.....	49
2.1. Determinación de la concentración adecuada de fármaco y estabilizador.....	49
2.2. Talla de partícula.....	50
2.3. Morfología.....	51
2.4. Estabilidad de nanocristales y talla de partícula a diferentes ángulos.....	55
2.5. Propuesta de morfología de los nanocristales.....	56
2.6. Determinación de pH.....	57
2.7. Resuspendibilidad del liofilizado.....	58
2.8. Calorimetría diferencial de barrido.....	59
2.9. Prueba de velocidad de disolución.....	61
VII. Conclusiones.....	64
VIII. Perspectivas.....	65
IX. Referencias.....	66
X. Anexos.....	78

A. INDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
BCS	Clasificación Biofarmacéutica
DNP	Dato no proporcionado
HPH	Homogenización de alta presión
IV	Intravenosa
NE	No especificado
VA	Vía de administración
FDA	Food and Drug Administration
CsA	Ciclosporina A
TPP	Tamaño de partícula promedio
NC's	Nanocristales
NP's	Nanopartículas

B. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de un molino de bolas.	24
Figura 2.	Representación esquemática de un homogeneizador de alta presión.	25
Figura 3.	Esquema de la formación de nano partículas por el método de desplazamiento de solvente.	28
Figura 4.	Posibles mecanismos de nucleación.	29
Figura 5.	Apariencia física del Aerosil®200.	33
Figura 6.	Distribución de talla de partícula del Aerosil®200.	34
Figura 7.	Termograma de sacarosa.	37
Figura 8.	Diagrama de la metodología experimental seguida en el proceso.	42
Figura 9.	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).	43
Figura 10.	Gráfica de talla de partícula en función de la concentración de Aerosil®200 y CsA.	50
Figura 11.	Gráfica de talla de partícula en función del Aerosil®200 1% y CsA 3%.	50
Figura 12.	Microfotografías de CsA (materia prima).	51
Figura 13.	Microfotografías de NP's de CsA estabilizadas con Tween®80 al 10%.	53
Figura 14.	Microfotografías de NC's de CsA estabilizadas con Aerosil®200 0.1%.	54
Figura 15.	Estabilidad de NC's al día 1, 2, 5 y 11.	56
Figura 16.	Propuesta de morfología de los NC's en los diferentes ángulos	57
Figura 17.	Gráfico de regiones de estabilidad en función del potencial Z y pH	58
Figura 18.	Gráfico de talla de partícula de los NC's antes del liofilizado.	59
Figura 19.	Gráfico de talla de partícula de los NC's después del liofilizado.	59
Figura 20.	Caracterización fisicoquímica de la CsA.	60
Figura 21.	Termograma de CsA (materia prima).	60
Figura 22.	Termograma de NC's de CsA.	61
Figura 23.	Grafica comparativa de las pruebas de disolución de CsA.	62

C. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principios activos en nanocristales.	16
Tabla 2.	Ejemplos de solventes clase I empleados en la industria farmacéutica.	22
Tabla 3.	Ejemplos de solventes clase II empleados en la industria farmacéutica.	22
Tabla 4.	Ejemplos de solventes clase III empleados en la industria farmacéutica.	23
Tabla 5.	Estabilizantes y coestabilizantes utilizados para elaborar NC's.	32
Tabla 6.	Generalidades del dióxido de silicio.	33
Tabla 7.	Usos del dióxido de silicio.	34
Tabla 8.	Características típicas del Aerosil [®] 200.	35
Tabla 9.	Comportamientos térmicos observados por el DSC.	37
Tabla 10.	Concentraciones propuestas.	44
Tabla 11.	Formulaciones para la elaboración de tabletas.	46
Tabla 12.	Características de Ciclosporina A	48
Tabla 13.	Concentraciones propuestas y talla de partícula promedio.	49
Tabla 14.	Determinación del pH en los sistemas.	57
Tabla 15.	Resuspendibilidad del liofilizado.	58
Tabla 16.	Tabletas (500mg).	61

D. ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I.	Ciclosporina A.	78
Anexo II.	Estearato de Magnesio.	78
Anexo III.	Avicel [®] PH 101.	79
Anexo IV.	Sistemas para determinar la morfología de CsA en NC's y materia prima.	80
Anexo V.	ANOVA talla de partícula Vs A-200 y CsA.	80
Anexo VI.	ANOVA's talla de partícula día 1, 2, 5 y 11.	81
Anexo VII.	Curva de calibración CsA.	82

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha sido más evidente que el desarrollo de nuevos fármacos no es suficiente para el tratamiento de las enfermedades, dado que existen muchos factores para que una terapia no llegue a tener la eficiencia esperada. Dentro de las razones que existen para que una terapia falle se encuentran:

- a) Una pobre solubilidad de los fármacos.
- b) Una concentración insuficiente debido a una pobre absorción, un rápido metabolismo o una rápida eliminación del principio activo.
- c) Una amplia distribución del fármaco en otros tejidos lo que podría ocasionar efectos secundarios no deseados.
- d) Una alta fluctuación de los niveles plasmáticos del fármaco lo que limita su acción.

Debido a esto, en un principio se desarrollaron sistemas de liberación que ayudaran a mejorar las terapias existentes; las funciones de los sistemas de liberación pueden clasificarse generalmente en dos categorías: la primera es para mejorar la eficacia al tener un control sobre la liberación, y la segunda es para disminuir la toxicidad del fármaco al proporcionar especificidad [M.Breunig,2008].

Y dentro de las finalidades que se persiguen al desarrollar nuevos sistemas de liberación se encuentran:

- a) Proteger al fármaco tanto de su degradación tanto física como química.
- b) Incrementar la absorción del fármaco facilitando su difusión a través de los epitelios.

- c) Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.
- d) Incrementar la penetración y distribución intracelular cuando el sitio de acción del fármaco se encuentra en el interior de la célula [J.L. Vila-Jato, 2007].

Por lo anterior se ha dado una mayor importancia al desarrollo de sistemas transportadores o acarreadores del fármaco, los cuales son capaces de controlar la liberación del fármaco y de dirigirlo a su lugar de acción. El destino del fármaco *in vivo* depende de las propiedades del fármaco lo que provoca una deficiente distribución de este o que no se encuentre en concentraciones adecuadas en el sitio de acción, pero un sistema acarreador requiere llevar a cabo una liberación en un sitio específico lo que garantiza la acción del fármaco evitando efectos secundarios.

El tamaño de los acarreadores depende de la vía de administración, pero se ha demostrado que el uso de acarreadores con tallas submicrónicas pueden dar las características adecuadas para controlar la liberación de los fármacos y de dirigir esta liberación a un sitio específico [W. Mehnert, 2001].

Por esta razón se han desarrollado actualmente nuevos sistemas de administración y liberación de fármacos a base de acarreadores coloidales los cuales incluyen liposomas, nanoemulsiones, micelas, macropartículas y nanopartículas. Los sistemas acarreadores a base de materiales sólidos (polímeros y/o lípidos) como lo son las nanopartículas las cuales presentan mayores ventajas que los liposomas en cuanto a estabilidad y reproducibilidad, además de favorecer la penetración de los fármacos en zonas corporales de difícil acceso [D. Ramos, 2000].

La finalidad de este trabajo es proponer una metodología que pueda tener un uso industrial potencial, que permita la elaboración de nanocristales de un principio

activo clase IV de BCS utilizando como estabilizante Dióxido de Silicio por medio de una estabilización halo.

El Dióxido de Silicio se utiliza ampliamente en productos farmacéuticos como lo son comprimidos [CF. Lerk, 1977]; [S. Jonat, 2005], polvos para cápsulas, mejora las propiedades de flujo de polvos secos [P. York, 1975]. También se utiliza para estabilizar emulsiones y como un espesante tixotrópico, agente de suspensión en geles y preparaciones semisólidas [R. Daniels, 1986]. Otras de sus aplicaciones son: como desintégrate de tabletas, agente absorbente para dispersar líquidos en sólidos [M. Sherriff, 1979] frecuentemente se añaden a formulaciones de supositorios que contiene excipientes lipofílicos para incrementar la viscosidad, prevenir sedimentación durante el moldeo, y disminuir la velocidad de liberación de fármaco [JJ. Tukker. 1984]. El Dióxido de Silicio se utiliza como adsorbente durante la preparación de microesferas de cera [M. Mani, 2004], como agente espesante para preparaciones tópicas [SJ. Gallagher, 2003], como ayuda de secado por congelación de nanocápsulas y suspensiones nanoesfericas [SR. Schaffazick, 2003].

II. MARCO TEÓRICO

1. Nanocristales

Los nanocristales han sido usados como potenciales sistemas de liberación de fármacos debido a su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos, mejorando su biodisponibilidad y protegiéndolos de la degradación biológica, física o química; además de poder ser dirigidos alrededor de un órgano en particular y, debido a su tamaño, atravesar la barrera biológica [A. Date, 2007].

1.1. Definición

Las nanocristales con propósitos farmacéuticos son definidas por Kreuter en 1983 y esta definición fue adoptada por la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica la cual nos dice que estas son partículas sólidas que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000 nm (1 μ m) las cuales pueden ser usadas terapéuticamente [J. Kreuter, 2007].

Los mayores logros que poseen las nanocristales como sistemas de liberación son el control del tamaño de partícula, las propiedades de superficie y la liberación de agentes farmacológicamente activos para alcanzar la dosis terapéutica óptima en un sitio específico de acción.

Las ventajas de usar nanocristales en sistemas de liberación de fármacos son:

- a) El tamaño de partícula y las características de la superficie son fácilmente manipulables.
- b) El control sobre la liberación del fármaco durante la transportación hasta llegar al sitio específico de acción, logrando una mayor eficacia del fármaco y la reducción de los efectos adversos.
- c) La liberación controlada y las características de degradación de las partículas pueden ser modificadas por cambios en los constituyentes de la matriz.

- d) La localización en un sitio específico puede ser alterada mediante la unión de ligando en la superficie de las partículas o usando guías magnéticas.
- e) El sistema puede ser usado para varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc.
- f) La posibilidad de solubilizar activos hidrofóbicos.

1.2. Propiedades de los nanocristales

La reducción de tamaño de partícula incrementa el área superficial y en consecuencia la velocidad de disolución. Sin embargo, el paso de micropartículas a nanocristales del fármaco no solo incrementa la velocidad de disolución si no también la solubilidad de saturación.

La solubilidad de saturación la cual es descrita en la literatura como una constante dependiente de la temperatura también depende del tamaño de partícula. En el ámbito farmacéutico los principios activos deben de estar por debajo de 1-2 μm para que se logre este efecto.

1.2.1. Talla de partícula

El tamaño de la partícula y la distribución del tamaño de partículas son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, además de influenciar en la carga de fármaco y en la estabilidad de los nanocristales. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de partículas de mayor tamaño las cuales poseen un mayor núcleo por lo que la difusión del fármaco será lenta. Debido a su tamaño, los nanocristales tienen un alto riesgo de agregación durante su almacenamiento y transportación [V.J. Mohanraj, 2006].

1.2.2. Carga de Fármaco

Idealmente, un buen sistema nanoparticulado debe poseer una alta capacidad de carga, con lo que se reduce la cantidad de material que forma la matriz en la

administración. La carga y la eficiencia de entrapamiento del fármaco dependen de la solubilidad en el estado sólido de este en la matriz, el cual se relaciona con la composición de polímero o lípido, el peso molecular y la interacción fármaco-matriz.

La carga del fármaco puede llevarse a cabo por dos métodos:

- Incorporación durante la elaboración de los nanocristales (método de incorporación).
- Absorción del fármaco después de la formación de las nanocristales por incubación con una solución concentrada del fármaco (método de adsorción/ absorción).

2. Principios Activos en nanocristales

La tabla 1 resume algunos principios activos en forma de nanocristales preparados por diferentes métodos.

Tabla 1. Principios Activos en nanocristales.

Principio Activo (Familia)	Método de preparación	Estabilizante	Talla de Partícula	Estabilidad	V.A	Referencia
Oridonin (Anticancerígeno)	HPH	PVP K25, Brij 78, SDS, Pluronic ®F68, Lecitina	220 nm	DNP	NE	[L.Gao, 2007]
Oridonin (Anticancerígeno)	HPH	Pluronic ®F68, Lecitina	103 nm	DNP	IV	[L.Gao, 2008]
Budesonida (Glucocorticoide)	HPH	Lecitina, Span 85, Tiloxapol, Alcohol Cetílico	500-600 nm	DNP	Inhalación	[C. Jacobs, 2002]

Cont. Tabla 1. Principios Activos en nanocristales.

Buparvacuona (Antiparasitario)	HPH	Pluronic® F68 y PVA	5000nm	DNP	Inhalación	[N. Hernández- Trejo, 2005]
Buparvacuona (Antiparasitario)	HPH	Pluronic® F68 y lecitina	600 nm	DNP	Oral	[R.H. Müller, 2002]
Diclofenaco (Antiinflamatorio)	HPH	Pluronic® F68	633 nm	DNP	Oral	[F. Lai, 2009]
Azitromicina (Antibiótico)	HPH	Lecitina, Pluronic®F68, Tween 80	400nm	DNP	Oral	[D. Zhang, 2007]
Rutina (Antihelmíntico)	HPH	SDS	721 nm	DNP	Oral	[R. Mauludin, 2009]
Rutina (Antihelmíntico)	HPH	SDS, Tween 80, Pluronic®F68, PVA	100 nm	DNP	Oral	[R. Mauludin, 2009]
Tarazepida (Antiespasmodico -Anticolinérgico)	HPH	Tween 80, Pluronic® F68	347-517 nm	1 año	IV	[C. Jacobs, 2000]
Omeprazol (Antiulceroso)	HPH	Pluronic® F68	598-506 nm	2 años	IV	[J. Moschwitzer, 2004]
Anfotericina B (Antibiótico- Antifúngico)	HPH	Tween 80, Pluronic® F68	528 nm	DNP	Oral	[O. Kayser, 2003]
Nimodipino (Antivasoconstrictor)	HPH	Pluronic®F68, Ácido cólico de sodio y manitol	300-700 nm	DNP	IV	[R. Xiong, 2008]
Hesperidina (Antioxidante)	HPH	Pluronic® F68, SP1 Inutec, Tween®80 Plantacare 2000	347 nm	2 años	Dérmico	[P.R. Mishra, 2009]

Cont. Tabla 1. Principios Activos en nanocristales.

Hidrocortisona, Prednisona, Dexametasona (Glucocorticoide)	HPH	Pluronic ® F68	247 nm	DNP	Oftálmico	[M.A. Kassem, 2007]
Palmitato de Ascorbilo (Antioxidante)	HPH	SDS, Tween® 80	365 nm, 348 nm	3 meses	NE	[V. Teeranachaidee kul, 2008]
Nifedipino (Antivasoconstrictor)	HPH	HPMC	300 nm	DNP	NE	[J. Hecq, 2005]
Hidroxicamptotecia (Anticancerígeno)	HPH	Lipoide S75, Pluronic ®F68, Solutol ® HS 15	365 nm, 345 nm, Floculos	3 meses	NE	[YX. Zhao, 2010]
Asulacrine (Inhibidor de topoisomerasa)	HPH	Pluronic ® F68	133 +/- 20 nm	3 meses minimo	IV	[S. Ganta, 2009]
Tarazepida (Antiespasmodico- Anticolinergico)	HPH	Pluronic ® F68, Tween 80, glicerol	347-517 nm	3 meses	IV	[C. Jacobs, 2000]
Naproxeno (Antiinflamatorio)	Molienda húmeda	HPC, el Clorhidrato de arginina	300-600 nm	1 mes	NE	[A. Ain-Ai, 2008]
Rilpivirina (Antirretroviral)	Molienda húmeda	Pluronic®F108 TPGS 1000	200, 400 y 800 nm	6 meses	Parenteral	[L. Baert, 2009]
Naproxeno (Antiinflamatorio)	Molienda húmeda	Copolímeros de aminoácidos	200-300 nm	1 mes	NE	[J. Lee, 2005]
Dihidroartemisinina (Esquizotónicas)	Molino de ruedas	PVP K30, desoxicolato de sodio	80-200 nm	1 mes	NE	[J. Chingunpitak, 2008]
Probucof (Antihiperlipidemia)	Molino de ruedas	PVP, SDS	100 nm	DNP	NE	[A. Pongpeerapat, 2008]

Cont. Tabla 1. Principios Activos en nanocristales.

Ibuprofeno (Antiinflamatorio)	Precipitación Micro fluidización	SLS, PVP K30 Pluronic®F68, F127, Tween® 80, HPMC	1600, 600, 1000, 1800, 2000, 800 nm	DNP	NE	[S. Verma, 2009]
Hidrocortisona (Glucocorticoide)	Precipitación Micro fluidización	PVP, HPMC, SLS	80-450 nm	3 meses	NE	[H.S. Ali, 2009]
Ibuprofeno (Antiinflamatorio)	Desplazamien to de solvente	PVA, PVP K25 Pluronic®F68, Tween® 80,	317 nm	DNP	NE	[P. Kocbek, 2006]
Alendronato galio, alendronato gadolinio (Bifosfonatos)	Precipitación	Ninguno	150-250 nm	DNP	NE	[H. Epstein, 2007]
Felodipino (Calcio-antagonista)	Desplazamien to de solvente – Molienda humeda	HPMC 606 / PVPPF17	140 nm	DNP	NE	[L. Lindfors, 2007]
Naproxeno (Antiinflamatorio)	Desplazamien to de solvente	PVP K15, Pluronic® F127	300 nm	DNP	Oral	[X. Chen, 2009]
Carbamazepina (Antiepileptico- analgesico)	Desplazamien to de solvente	HPMC, PVP K 17	20-30 nm	5 meses	NE	[D. Douroumis, 2007]
Ciclosporina A (Inmunosupresor)	Desplazamien to de solvente	Tween® 80	100 nm	5 meses	Inhalación	[J.M. Tam, 2008]
Ácido retinoico (Vitamina)	Desplazamien to de solvente	Ninguno	155 nm	6 meses	NE	[X. Zhang, 2006]
Nitrendipino (Calcio-antagonista)	Precipitación- Ultrasonificaci ón	PVA	209 nm	6 meses	Oral	[D. Xia, 2010]

Cont. Tabla 1. Principios Activos en nanocristales.

Indometacina (Antiinflamatorio)	Emulsión de difusión	Ciclodextrinas	300-500 nm	DNP	NE	[A. Makhlof, 2008]
Insulina (Hormona)	Emulsificación liofilización	Citral, Cineol	100 nm	DNP	Inhalación	[B.K. Nyambura, 2009]
Sulfato de salbutamol (Agonista B2 Adrenergico)	Micro Emulsificación - Liofilización	Lecitina, Docusato de sodio	300 nm	DNP	Inhalación	[P.A. Dickinson, 2001]
Diclofenaco (Antiinflamatorio)	Emulsificación -Liofilización	Miristato de Isopropilo	14. 4 nm	DNP	Transdémi co	[H. Piao, 2007]
Cefuroxima Acetil (Antibiotico)	Desplazamient o de solvente	Ninguno	340 nm	DNP	NE	[J.Y. Zhang, 2006]
Itraconazol (Antigungico)	HPH	<i>N</i> -trimetil quitosano, y polietilenimina	300 nm	DNP	NE	[W. Sun, 2011]

3. Materiales para elaborar nanocristales

Las nanocristales se pueden obtenerse a partir de diversos materiales como: polímeros, lípidos, proteínas, polisacáridos, entre otros. La selección de la matriz depende de muchos factores incluyendo:

- a) Tamaño de partícula
- b) Propiedades inherentes del fármaco (solubilidad, estabilidad, etc.)
- c) Características de superficie como carga y permeabilidad.
- d) Grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad.
- e) Perfil de liberación del fármaco requerido.
- f) Antigenicidad del producto final [V.J. Monhanraj, 2006].

La elaboración de nanocristales con fines farmacéuticos principalmente es a base de polímeros y lípidos debido a las características que le confieren estos materiales al sistema acarreador.

Otros materiales importantes para lograr elaborar nanocristales por los diferentes métodos son los solventes y los estabilizadores; ya que de su óptima selección y proporción en que se empleen, dependen las características de los nanocristales en cuanto a su tamaño y a la facilidad de formación; esto va a elegirse según el método de elaboración y el material con el que se forme la matriz.

Otros materiales importantes para la elaboración de nanocristales por los diferentes métodos son los solventes y estabilizadores: ya que su óptima selección y proporción en que se empleen van a depender las características de los nanocristales en cuanto a su tamaño y a la facilidad de su formación: estos van a elegirse según el método de elaboración y el material con el que se forme la matriz.

4. Solventes

El empleo de solventes va a depender del método para la elaboración de nanocristales; ya que en algunos métodos es necesario emplear solventes miscibles en agua; además de que su uso está limitado a aquellos solventes que no presenten algún nivel tóxico elevado para su uso en humanos.

4.1. Clasificación ICH de solventes

Los residuos de solventes en la industria farmacéutica son definidos como químicos orgánicos volátiles que son usados o producidos en la manufactura de fármacos o excipientes y en la preparación de productos farmacéuticos. Los solventes empleados son removidos pero no son completamente eliminados.

Los solventes han sido clasificados con base a su toxicidad en tres clases.

4.1.1. Clase I.

Solventes conocidos como agentes cancerígenos en humanos y peligrosos para el medio ambiente por lo que serán evitados en la producción de fármacos y excipientes se muestran algunos ejemplos en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de solventes Clase I empleados en la industria farmacéutica

Solvente	Concentración límite	
	(ppm)	Riesgo
Benceno	2	Carcinogénico
Tetracloruro de Carbono	4	Tóxico y peligro ambiental
1,2-dicloroetano	5	Tóxico
1,1,1-tricloroetano	1500	Peligro ambiental

4.1.2. Clase II.

En esta clase se encuentran solventes que son agentes carcinogénicos o posibles causantes de una toxicidad irreversible como neurotoxicidad o teratotoxicidad siendo también solventes sospechosos de otras toxicidades significativas pero reversibles. Se elimina el uso de estos solventes y se cuantifican al final del proceso de manufactura para determinar si los residuos se encuentran dentro de los límites establecidos para cada uno de ellos en la tabla 3 se encuentran algunos ejemplos de solventes clase II.

Tabla 3. Ejemplos de solventes Clase II empleados en la industria farmacéutica

Solvente	PDE (mg/día)	Concentración límite (ppm)
Acetonitrilo	4.1	410
Clorobenceno	3.6	360
Cloroformo	0.6	60
Diclorometano	6.0	600
Etilenglicol	6.2	620
Hexano	2.9	290
Metanol	30.0	3000
Metil butil cetona	0.5	50
Piridina	2.0	200
Tolueno	8.9	890

4.1.3. Clase III.

En esta clase se encuentran los solventes con baja toxicidad para los humanos; no hay límites de exposición necesaria. Los solventes de clase III tiene una exposición diaria permitida (PDE) de 50 mg por día o más, se muestran algunos ejemplos en la tabla 4. [ICH Impurities, 2005].

Tabla 4. Ejemplos de solventes Clase III empleados en la industria farmacéutica

Solvente		
Ácido acético	Ácido fórmico	Metiletilcetona
Acetona	Heptano	Metilisobutilcetona
Butanol	Acetato de isobutilo	Pentano
Etanol	Acetato de isopropilo	Propanol
Acetato de etilo	Acetato de metilo	Tetrahidrofurano

5. Métodos de elaboración de nanocristales

La polimerización fue el primer método empleado para la elaboración de nanopartículas el cual fue desarrollado por Birrenbach y Speiser en 1976. En el cual el monómero es dispersado bajo agitación en una fase continua en la cual es inmisible. La polimerización comienza por reacción de los iniciadores con las moléculas del monómero para comenzar a formar la cadena del polímero hasta que esta sea insoluble debido a su peso molecular, cuando la reacción se ha completado, las partículas formadas contienen un gran número de cadenas poliméricas y el tamaño de las partículas puede ser controlado por la concentración del estabilizador presente [J. Kreuter, 1994].

5.1. Molino de bolas

Una alternativa para obtener nanopartículas es el uso de técnicas eficientes de molienda para reducir el tamaño de partícula. Las dispersiones nanocrystalinas pueden ser preparadas utilizando un proceso de molienda de alta energía (ej. homogeneizadores, molinos coloidales, sistemas rotor estator, ultrasonido, etc).

El molino de bolas es una opción muy interesante para preparar nanocristales de sustancias activas sólidas. La cámara de molienda es cargada con agentes de golpeo, que por lo general son perlas de vidrio o dióxido de zirconio con agua, fármaco y estabilizante (Figura 1). Las perlas se mueven mediante agitación, la alta energía generada por las fuerzas de corte y/o las fuerzas generadas durante la impactación del medio de molienda con el fármaco, generan la fractura de los cristales del fármaco, de esta manera las micropartículas de fármacos son reducidas hasta nanopartículas.

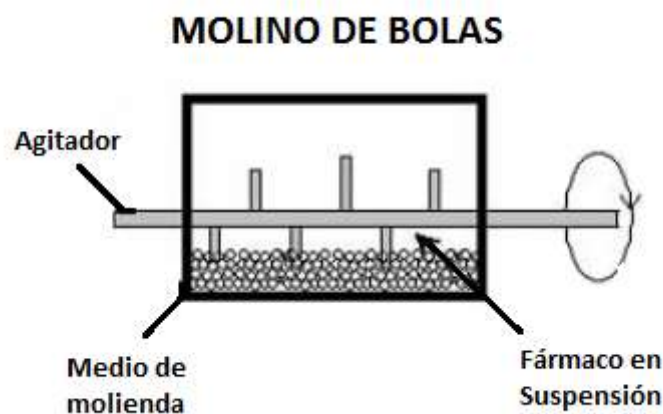


Figura 1. Representación esquemática de un molino de bolas.

Este método tiene varias desventajas, por ejemplo, puede ocurrir la erosión de las perlas provocando contaminación del producto. Desde el punto de vista químico la erosión de las perlas puede ser considerada como un proceso “no toxico” y, dependiendo de la dureza de las partículas, los tiempos de molienda pueden durar desde 4 horas hasta varios días.

5.2. Homogeneización de alta presión

El tamaño inicial de los cristales del fármaco debe ser, de preferencia lo más pequeño posible, el fármaco en suspensión es impulsado a través de un pequeño hueco en un rango de tamaño de partícula alrededor de 25 μm . El diámetro del cilindro que contiene la suspensión del fármaco es de 3.0 cm, esto quiere decir

que la suspensión es vertida de un cilindro de 3.0 cm hasta un hueco de 25 μm a una velocidad muy alta. De acuerdo a la ecuación de Bernoulli, la fuerza de implosión es suficientemente alta para desintegrar las macropartículas de fármaco hasta nanopartículas, adicionalmente existen los efectos de desintegración, una alta fuerza de corte y colisión entre partículas en el hueco de 25 μm . Ambos efectos de colisión son, por lo general, suficientes para homogeneizar suspensiones altamente concentradas (Figura 2).

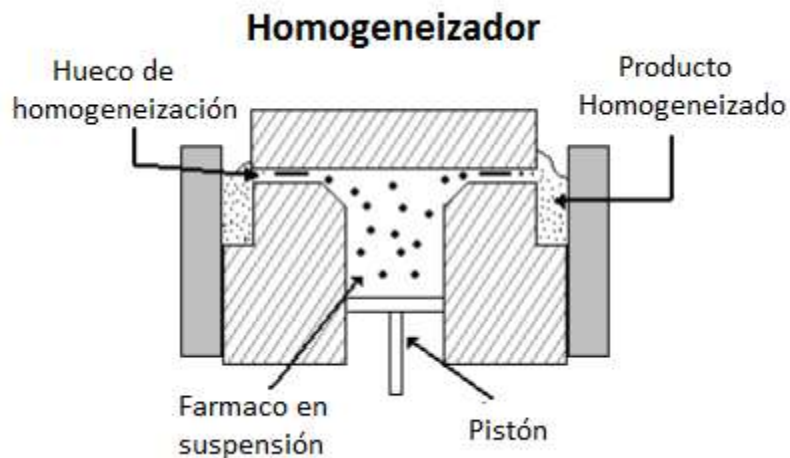


Figura 2. Representación esquemática de un homogeneizador de alta presión.

Los cristales del fármaco son dispersados en una solución de surfactante mediante agitación de alta velocidad, posteriormente la premezcla es “prehomogeneizada” utilizando un homogeneizador de alta presión, aplicando presiones de 150 hasta 500 bars en por lo menos dos ciclos y, finalmente se aplican hasta 20 ciclos a 1500 bars.

La concentración de sólido frecuentemente utilizada en suspensiones preparadas por este método es del 10% aunque el límite de concentración de sólidos que pueden ser procesados es del 30%.

5.3. Irradiación de microondas y ultrasonicación

La irradiación ultrasónica se ha vuelto una importante herramienta ya que provee de un mecanismo inusual para generar alta energía química con una temperatura

local y presión extremadamente alta. Las nanopartículas se forman a partir de una suspensión o microemulsión del fármaco que es sometido a irradiación ultrasónica, la reducción del tamaño de partícula está dada principalmente por cavitación acústica, es decir la formación, crecimiento y colapso implosivo de burbujas en líquido. Cuando las dispersiones son expuestas a una fuerte irradiación ultrasónica, las burbujas son implosivamente colapsadas mediante campos acústicos dentro de la dispersión, los campos de alta temperatura y alta presión son producidos en el centro de las burbujas.

5.4. Dispersión de polímeros preformados

Existen varias limitantes en el proceso de polimerización, para la elaboración de nanocristales debido a que algunos de los polímeros empleados no son biodegradables, además de que los productos residuales de reacción como monómeros, oligómeros y catalizadores no son biocompatibles o pueden ser tóxicos: otra desventaja importante de esta técnica es el empleo de solventes tóxicos.

5.5. Emulsificación- Evaporación

Este método fue patentado por J.W. Vanderhoff en 1979, originalmente fue implementado para la preparación de pseudolátex. En este método el polímero preformado y el fármaco hidrofóbico es disuelto en un solvente orgánico inmiscible en agua el cual es emulsificado en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante para formar una emulsión O/W. Después de la formación de emulsión el solvente orgánico es evaporado bajo presión reducida con agitación continua, resultando una dispersión de nanocristales. El paso de Emulsificación es determinante para obtener partículas de talla nanométrica [D. Quintanar-Guerrero, 1998].

5.6. Salting-out

En este método los nanocristales son preparados empleando un fase acuosa saturada con un electrolito (agente *salting out*); saturando la fase acuosa se

reduce la miscibilidad del solvente en el agua por el efecto *salting out* y permite la formación de una emulsión O/W a partir de las fases que de otra manera serían miscibles.

El polímero y el fármaco son disueltos en un solvente miscible en agua y esta solución es emulsificada bajo vigorosa agitación mecánica con una fase acuosa que contiene el agente *salting out* y un estabilizador coloidal. Posteriormente la emulsión formada se diluye con un volumen suficiente de solución acuosa para que el solvente difunda en la fase acuosa y así inducir la formación de nanocristales. El solvente y el agente *salting out* son eliminados por filtración de flujo cruzado.

Los agentes *salting out* empleados son electrolitos como cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y acetato de magnesio; y electrolitos como la sacarosa.

5.7. Nanocrystalización o desplazamiento de solvente

En este proceso el polímero, el fármaco y el estabilizador son disueltos en un solvente semipolar miscible en agua. Esta solución es inyectada en una solución acuosa que contiene un estabilizador bajo agitación magnética. Las nanopartículas son formadas instantáneamente por una difusión rápida del solvente para después ser eliminado bajo presión reducida.

Esta técnica fue descrita y patentada por Fessi en 1987, elucidando el mecanismo de formación al preparar nanocápsulas de Ácido Láctico; donde explica que este fenómeno se debe a la turbulencia interfacial entre dos fases líquidas en desequilibrio, generada durante la difusión del solvente, lo que ocasiona remolinos que favorecen la formación de gotas de tamaño nanométrico, las cuales son estabilizadas por acción del estabilizante, seguida de una difusión del solvente con lo que ocurre la agregación del polímero como se observa en la Figura 3 [H. Fessi, 1989]; [D. Quintanar-Guerrero, 1998].

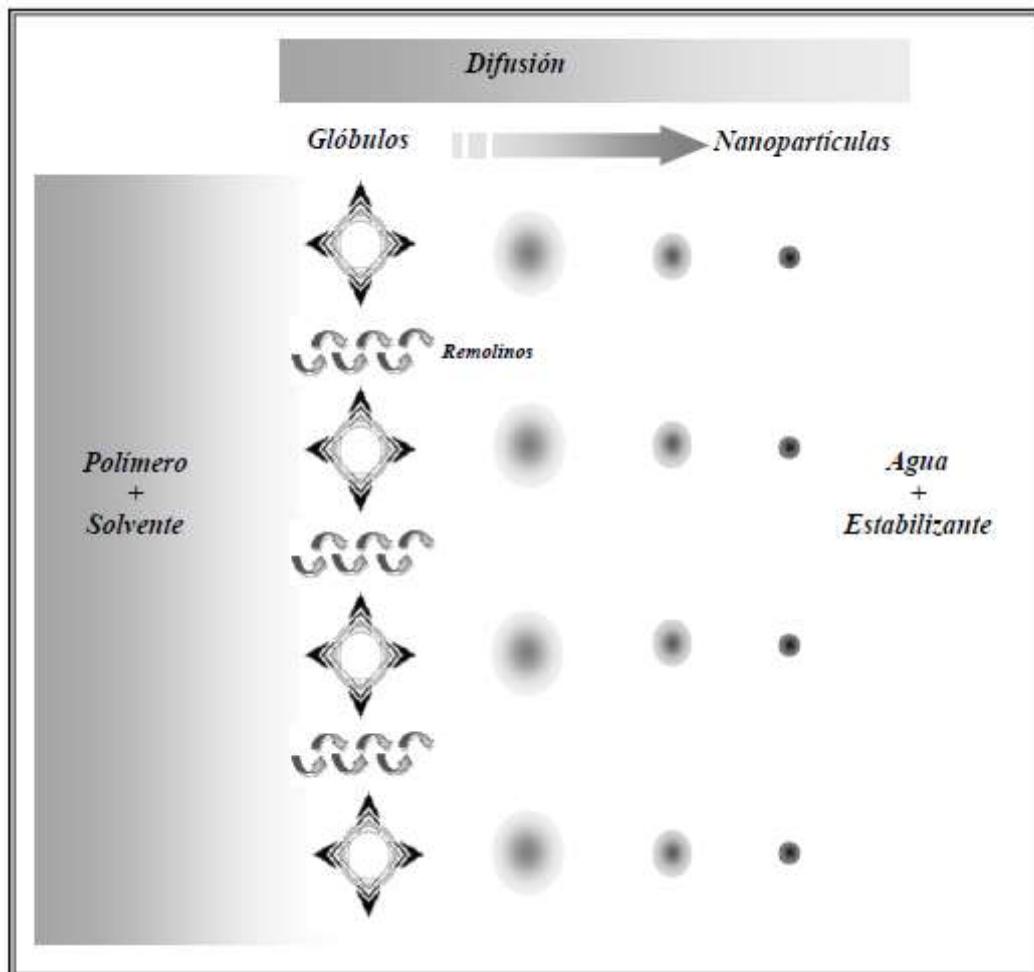


Figura 3. Esquema de la formación de nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente. [D. Quintanar-Guerrero, 1998].

6. Mecanismo de formación de los nanocristales

La cristalización es un proceso en el que se realiza un cambio de fase, pasando de un sistema en estado de desequilibrio a un sistema en equilibrio. En este proceso, el sistema incrementa el orden ya que pasa de un sistema relativamente desordenado a un sistema mucho más ordenado. La teoría actual sobre la formación de cristales admite que estos se forman a través de dos etapas claramente diferenciadas: la nucleación y el crecimiento cristalino.

6.1. Nucleación

La nucleación es la formación de amontonamientos de átomos, moléculas o iones que constituyen el paso de una fase cristalina en pequeñas zonas separadas en el interior de una fase líquida. Estos amontonamientos constituidos por distintas cantidades de partículas se denominan *clusters*. Posteriormente, algunos de los *clusters* formados pueden crecer y aumentar su volumen, mientras que otros se desmoronan. Cuando un *cluster* alcanza una determinada dimensión crítica, entonces, inevitablemente aumenta su volumen en un sistema sobresaturado, y con el tiempo alcanza una dimensión macroscópica. Puesto que solo una parte de los *clusters* alcanza una dimensión macroscópica, la velocidad del cambio de fase depende del número de *clusters* capaces de crecer macroscópicamente que se forman por unidad de volumen y de tiempo. Esta magnitud se llama velocidad de nucleación. La finalidad de la teoría de la nucleación es encontrar una relación que exprese la velocidad de la cristalización en función del tiempo, de las propiedades del sistema en cuestión y de las condiciones bajo las cuales ocurre el cambio de fase.

En la Figura 4 se observa la descripción teórica de la nucleación donde se observa que depende del mecanismo, el cual se puede dividir en primaria y secundaria. A su vez la primaria se subdivide en homogénea y heterogénea y la secundaria en falsa y verdadera.

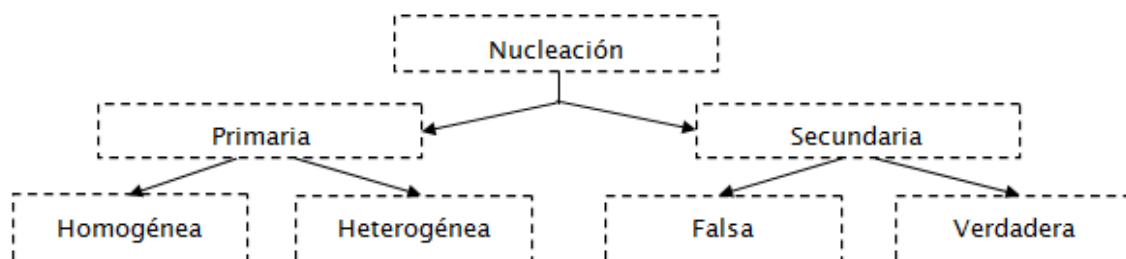


Figura 4. Posibles mecanismos de la nucleación.

6.1.1. Nucleación primaria

La nucleación primaria es aquella en la que el origen de la nueva fase sólida no está condicionada ni influida, por la presencia de la fase sólida que se origina. Se trata de la nucleación de una fase sólida con una disolución completamente limpia, esto es, una disolución libre de cualquier clase de partículas, o bien en una disolución que contenga únicamente partículas extrañas a la fase que se forma. De acuerdo con esto, dependiendo si las partículas extrañas a la fase sólida influyen o no, se distinguen dos mecanismos de nucleación primaria: la homogénea en la que no influyen las partículas de la fase en donde se lleva a cabo la nucleación y la heterogénea en donde dichas partículas juegan un papel fundamental al actuar como catalizadores.

Según el modelo de Farkas (1927), Becker y Döring (1935), y Volmer (1939), y perfeccionado por Zeldovich (1943) [E. Merisko-Liversidge, 2003], en una disolución sobresaturada se forman espontáneamente *clusters* de distintos tamaños y el amontonamiento de átomos o moléculas de la nueva fase (*cluster*) se producen a través de choques graduales de los correspondientes átomos o moléculas individuales, primero entre ellos y más tarde con los clusters ya formados. La unión y desunión de cada uno de los átomos ocurre como un proceso casual.

6.1.2. Nucleación secundaria

La nucleación secundaria designa aquel proceso de formación de cristales de la nueva fase que está condicionado por la presencia de partículas de la misma fase en el sistema sobresaturado y por cuya causa ocurre.

6.2. Crecimiento de cristales

Los *clusters* con dimensiones críticas, originados en el sistema por medio de la nucleación, son demasiado pequeños para poder ser detectados por métodos experimentales. Sin embargo, debido a que estas partículas se encuentran en un sistema sobresaturado, se pueden unir a ellas otras unidades constructivas, y con

ello aumentan su volumen (crecimiento). Como consecuencia del crecimiento de los *clusters*, aparecen pequeños cristales en el sistema.

Los cristales más grandes que están en contacto con la disolución sobresaturada se comportan de forma similar. Las unidades constructivas que se unen al cristal aumentan el volumen de éste, salvo que el proceso se vea impedido por razones específicas como la presencia de impurezas. Así, un cristal en contacto con una fase sobresaturada crece. Los cristales están formados por un medio periódico, esto es, los iones, átomos o moléculas que los constituyen se encuentran en posiciones del espacio exactamente definidas y se repiten periódicamente.

7. Estabilización hálica

El mecanismo halo es un proceso para regular la estabilidad de partículas con alta eficiencia en comparación con métodos convencionales. Hasta ahora pocos artículos han sido publicados con este nuevo mecanismo de estabilización.

Este mecanismo se denominó originalmente “haloing”, fue propuesto por primera vez por Thover. [V. Tohver, 2001] para explicar la estabilización en sistemas dispersos en presencia de nanopartículas. En este mecanismo las partículas cargadas segregan en las regiones circundantes a las partículas dispersas especialmente en sistemas de tamaño micrométricos con diferencia de carga.

Este tipo de proceso de autoorganización, puede ser conducido únicamente por las interacciones de repulsión entre dichas especies en una solución. Este proceso puede ser reforzado por una atracción débil entre las microesferas y nanopartículas, como las fuerzas de Van der Waals y localmente inducido por interacciones electrostáticas [S. J. Miklavic, 1994].

Las nanopartículas *haloing* están reguladas por dos procesos opuestos derivados de la repulsión coulombica cuando se agregan las partículas entre las nanopartículas y cuando se agregan en la región halo [V. Tohver, 2001].

8. Estabilizantes

El estabilizante nos ayuda a la formación de las nanopartículas, al actuar como un agente activo casi de superficie, y a su estabilización al evitar que se formen agregados en el momento de su creación o durante el proceso de la eliminación del solvente. Los estabilizantes pueden actuar por protección estérica o por repulsión electrostática dependiendo de la naturaleza de este [S.J. Miklavic, 1994].

El tipo de estabilizante y su concentración son de gran impacto en la calidad de la dispersión al realizar varios experimentos se encontró que altas concentraciones de estabilizante reducen la tensión superficial y facilitan la partición de las partículas durante la homogenización y el tipo de estabilizante va a depender de la naturaleza del material a emplear para la elaboración de las nanopartículas; algunos ejemplos de estabilizantes y coestabilizantes empleados en el desarrollo de nanocristales se enlistan en la tabla 5 [W. Mehner, 2001].

Tabla 5. Estabilizantes y coestabilizantes utilizados para elaborar NC's.

Estabilizante	Coestabilizante
Poloxámero 188	Ácido taurocólico, sal sódica
Poloxámero 182	Ácido taurodeoxicólico, sal sódica
Poloxámero 407	Butanol
Lecitina de soya	Acido butírico
Lecitina	Diocil sulfosuccinato de sodio
Fosfatidilcolina	Ácido monoocil fosfórico de sodio
Poloxamina 908	
Tyloxapol	
Polisorbato 20	
Polisorbato 60	
Polisorbato 80	
Alcohol polivinílico	

Un estabilizante muy utilizado en la fabricación de nanopartículas es el alcohol polivinílico (PVA), el cual funciona como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanopartículas. Las moléculas de PVA se encuentran adsorbidas formando una capa estable en la superficie de las nanopartículas lo cual permite una fácil redispersión cuando las partículas han sido liofilizadas.

9. Dióxido de Silicio (Aerosil® 200)

Es un polvo con una tamaño de partícula de 15 nm aproximadamente, muy ligero, color blanco azulado, inodoro, insípido y amorfo (Figura 5).

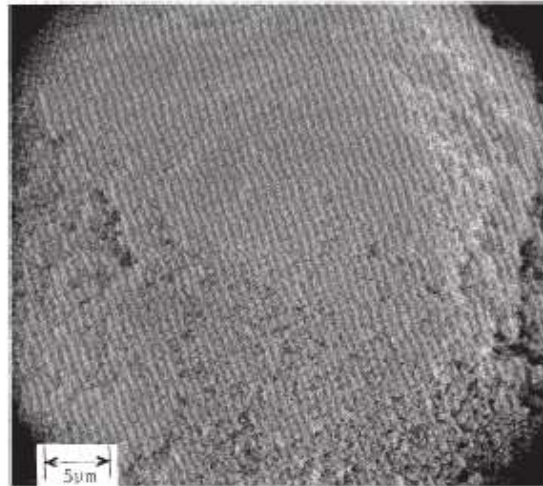


Figura 5. Apariencia física Aerosil® 200.

Foto de Handbook of pharmaceutical excipients 6 th ed.

En la tabla 6 se muestran algunas generalidades del dióxido de silicio

Tabla 6. Generalidades Dióxido de Silicio.

Formula empírica:	SiO ₂
Peso molecular:	60.08
Categoría funcional:	Adsorbente Antiaglutinante Estabilizador Deslizante Viscosante

Algunos nombres como también se le conoce son: sílice coloidal, sílice de pirolisis, dióxido de silicio ahumado, sol de sílice, sílice anhídrido, dióxido de silicio de pirolisis, dióxido de silicio, dióxido de sílice o sílice amorfa sintética.

El dióxido de silicio es ampliamente utilizado en productos farmacéuticos, cosméticos y productos alimenticios como se observa en la tabla 7. Su pequeño tamaño de partícula que oscila entre los 7-16 nm (Figura 6) y su gran área superficial, le confieren características favorables de flujo cuando se utiliza en formulaciones de polvos ya sea para comprimidos o relleno de cápsulas, también se utiliza para estabilizar emulsiones o como espesante tixotrópico, agente de suspensión en geles y preparaciones semisólidas.

Tabla 7. Usos Dióxido de Sílicio

Uso	Concentración (%)
Aerosoles	0.5-2.0
Estabilizante en emulsión	1.0-5.0
Deslizante	0.1-1.0
Agente viscosante	2.0-10.0

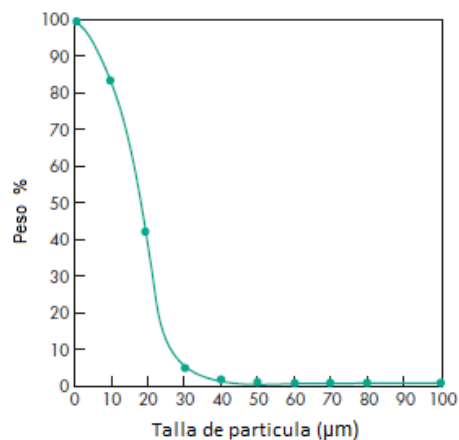


Figura 6. Distribución de talla de partícula Aerosil® 200

En los aerosoles el dióxido de silicio se utiliza para promover la suspensión eliminando los problemas de sedimentación y obstrucción de boquillas.

Otro de sus usos es como desintegrante de comprimidos; a menudo se añade a formulaciones semisólidas como son los supositorios para aumentar la viscosidad y evitar la sedimentación en el moldeo, y disminuir la velocidad de liberación.

El dióxido de silicio está incluido en la base de datos de la FDA como excipiente en comprimidos, cápsulas, suspensiones, supositorios, inyectables, óvulos y preparaciones vaginales también se aprobó en la FDA como aditivo alimenticio. En la tabla 8 se observan las características típicas del Aerosil® 200.

Densidad	0.029-0.042 g/cm ³
Punto de fusión	1600 °C
Talla de partícula	7-16 nm
Talla de aglomerados	10-200 mm
Solubilidad	Ácido fluorhídrico Soluciones alcalinas calientes
Solubilidad en agua	150 /L a 25°C

10. Liberación de fármaco

Mecanismo de liberación de principio activo a partir de nanocristales puede verse en tres etapas:

- Liberación inicial de fármaco enlazado a la superficie de los nanocristales; seguida de
- Una liberación disfuncional a través de la matriz de los nanocristales y a través de los poros durante la degradación de la matriz; y por último,

- c. Una liberación erosional debido a la desintegración de la matriz y disolución después que la matriz pierde su integridad y es degradada a un tamaño suficiente para ser solubilizada [D. Ramos, 2000].

Si bien el mecanismo de liberación sigue las etapas antes mencionadas, también va a depender de varios factores entre ellos se encuentra:

- a) La solubilidad del fármaco.
- b) Desorción del fármaco unido a la superficie y del absorbido.
- c) Difusión del fármaco desde la matriz de la nanopartícula.
- d) Difusión (en el caso de nanocápsulas) a través de la pared de la nanocristales.
- e) La erosión/degradación de la matriz.
- f) Combinación del proceso de erosión/degradación.

El proceso de liberación de los fármacos a partir de nanocristales está influenciado por el mecanismo de liberación, la solubilidad, el coeficiente de difusión y la velocidad de degradación de los materiales que conforman la matriz, pero también depende en gran parte de la distribución del principio activo el cual puede estar distribuido homogéneamente o heterogéneamente [V.J. Mohanraj, 2006].

11. Caracterización de los nanocristales

11.1. Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido es una técnica analítica térmica que mide el flujo de calor intercambiado en una muestra al variar su temperatura con lo que se puede caracterizar las propiedades físicas y energéticas de una sustancia; y por medio de esta, es posible obtener información cuantitativa acerca de los cambios exotérmicos, endotérmicos y la capacidad calorífica en función de la temperatura y del tiempo.

Los componentes simples pueden exhibir los siguientes comportamientos térmicos: fusión, cristalización, ebullición, sublimación, transiciones vítreas y

transiciones polimórficas, las cuales pueden ser exotérmicas o endotérmicas. (Tabla 9) [S.D. Clas, 1999].

Tabla 9. Comportamientos térmicos observados por DSC

Endotérmicos	Exotérmicos
Fusión	Cristalización
Vaporización	Condensación
Sublimación	Solidificación
Degradación	Oxidación
Transición vítrea	Descomposición

En la Figura 7 se observa un termograma de sacarosa en donde se puede observar los principales comportamientos térmicos como lo son transición vítrea, cristalización, fusión y degradación.

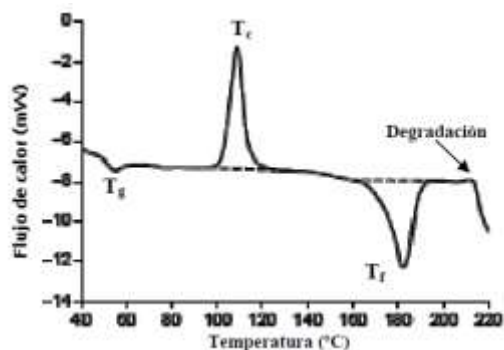


Figura 7. Termograma de sacarosa en donde se observan la temperatura de transición vítrea (T_g), el proceso exotérmico de recristalización (T_c), y los procesos endotérmicos de fusión (T_f) y degradación.

11.2. Microscopía Electrónica de Barrido

La Microscopía Electrónica de Barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales, proporcionando información morfológica del material analizado.

En la MEB la muestra es recubierta con una capa de metal delgado y después se hace incidir un haz delgado de electrones acelerados enviados desde un cañón. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que se realiza un barrido de esta; la señal emitida por los electrones y radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se amplifica. Este microscopio tiene una resolución de 3 y 20 nm y un rango de aumento que varía desde 10 hasta 200 000 con una distancia focal de 35 mm.

Las principales ventajas del MEB son la alta resolución, la gran profundidad de campo que le da la apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras [M. Grageda, 2007].

III. OBJETIVOS

a) Objetivo general

Desarrollar un método basado en el desplazamiento de solvente para obtener nanocristales por estabilización *halo* con dióxido de silicio de un principio activo modelo de clase IV en la Clasificación Biofarmacéutica.

b) Objetivos específicos

- a. Seleccionar el fármaco con las características propuestas: baja permeabilidad y baja solubilidad, para poder evaluar el método propuesto. Caracterizando al fármaco y al Aerosil® 200 por su talla de partícula, solubilidad, punto de fusión y calorimetría diferencial de barrido como controles iniciales del proceso.
- b. Encontrar las condiciones óptimas de preparación del nanocristal por el método *halo* propuesto.
- c. Evaluar los nanocristales obtenidos por medio de su estabilidad, su resuspendibilidad, microscopia y su velocidad de disolución. Confirmando con ello su formación y reproducibilidad del proceso.

IV. MATERIAL Y EQUIPO

Principio activo

Ciclosporina A, Moléculas Finas de México.

Estabilizantes y Surfactantes

Dióxido de Sílice, Aerosil[®] 200, Evonik Degussa, México.

Lauril Sulfato de Sodio, Droguería Cosmopolita SA de CV, México.

Tween[®]80, ICI Surfactants, USA

Estearato de Magnesio, Droguería Cosmopolita SA de CV, México.

Avicel[®]10, FMC Biopolymer, USA

Solventes

Agua desionizada GA; Milli-Q[®], Francia.

Metanol GA; Fermont, México.

Equipos e instrumentos

Aparato Fisher-Johns, Electrothermal[®], USA

Balanza Analítica; Boeco[®] BBC32, Alemania.

Calorímetro diferencial de barrido MTDSC Q10; TA Instruments[®], Canadá

Contador submicrónico de partículas; Nanosizer[®] N4 Plus, Coulter, USA.

Espectrofotómetro UV/Vis; Cary® UV 500, Varian, Australia.

Hexadisolutor model DL, Optimal® Control, USA

Liofilizador, Labconco®, USA.

Microscopio Electrónico de Barrido JSM-7600 F, JEOL®, USA

Parrilla Eléctrica con Agitación Magnética; Cimarec®, *Thermolite, USA*

Tableteadora Carver®, Wabash, IN

Ultra-Turrax® T-25, IKA, Alemania

Ultrasonicador; Bransonic® Branson 3200, USA

V. METODOLOGÍA

La figura 8 resume la experimentación realizada para el desarrollo del método de preparación de nanocristales.

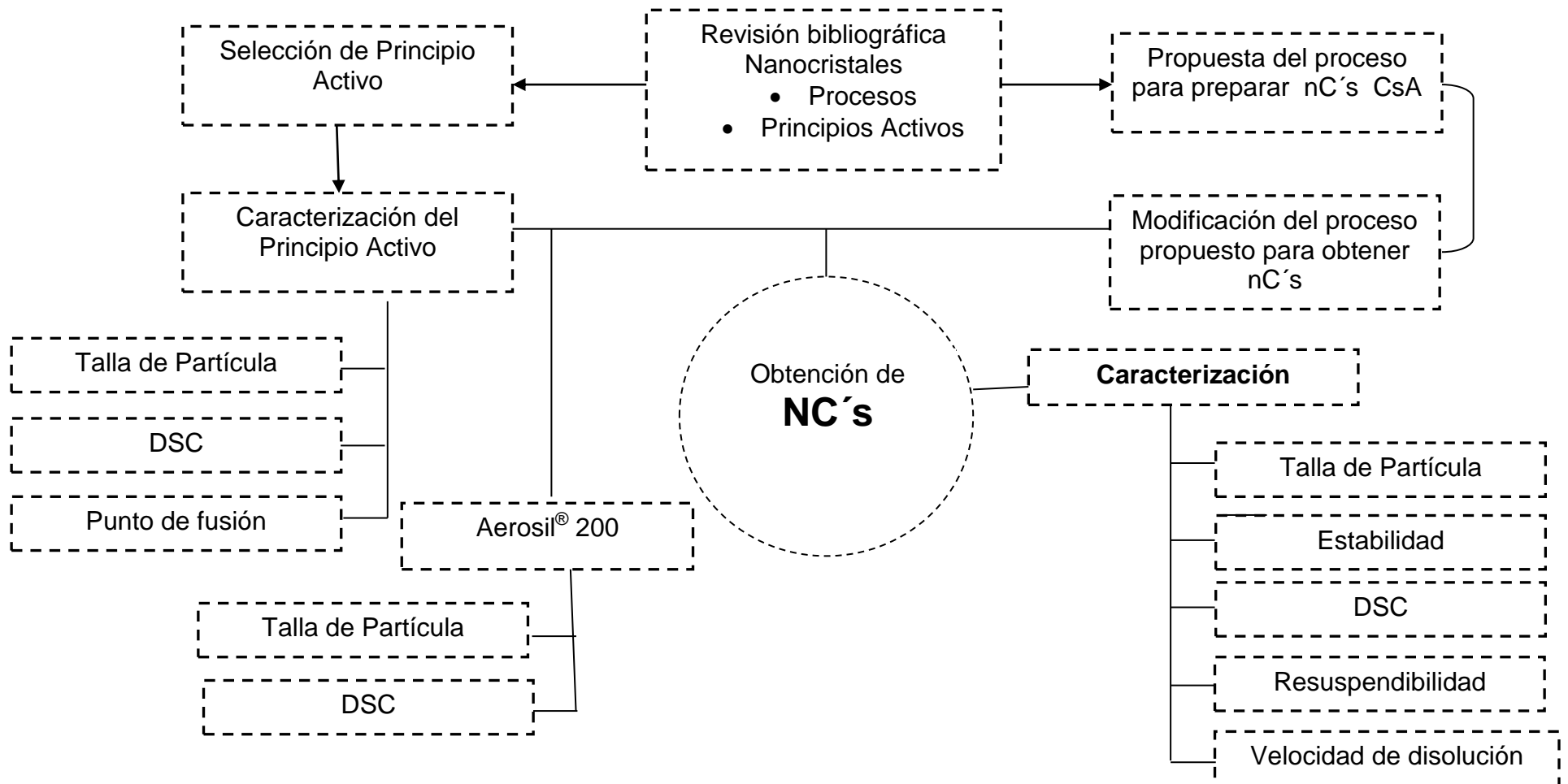
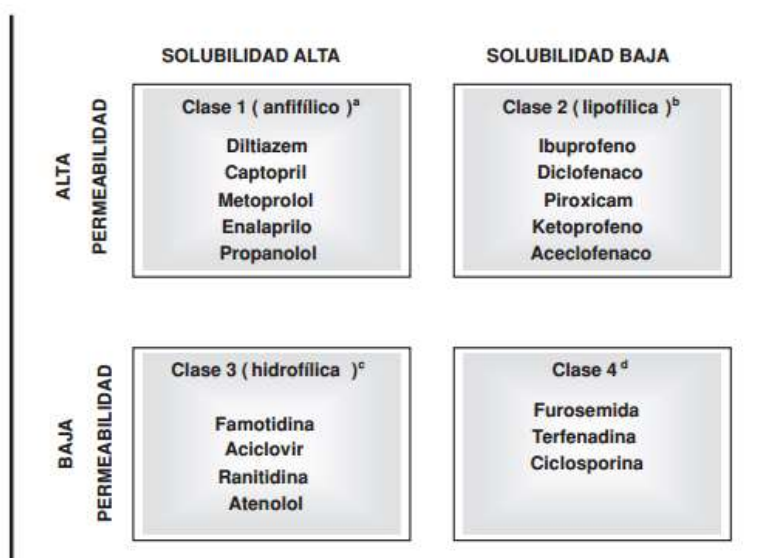


Figura 8. Diagrama de la metodología experimental seguida en el proceso.

1. Selección del fármaco

Se realizó una investigación bibliográfica donde se seleccionó un principio activo modelo para llevar a cabo este trabajo tomando en cuenta que se encontrara en el grupo IV de la Clasificación Biofarmacéutica, en la Figura 9 se muestra una representación del BCS incluyendo algunos ejemplos representativos como la furosemida, terfenadina y ciclosporina.



a: la velocidad de disolución limita la absorción in vivo

b: la solubilidad limita el flujo de absorción

c: la permeabilidad controla la velocidad de absorción

d: falta de correlación in vitro -in vivo

Figura 9 . Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

1.1. Caracterización del fármaco seleccionado

1.1.1. Análisis físico

Se observó la apariencia física del principio activo para corroborar que coinciden con las especificaciones.

1.1.2. Determinación de punto de fusión.

Se determinó el punto de fusión de fármaco seleccionado en un aparato Fisher-Johns el consta de una platina calentada mediante una resistencia eléctrica, en la que se colocó la muestra entre dos cubre-objetos redondos (unos cuantos

cristales en el centro del cubre-objetos). La velocidad de calentamiento se controló con un reóstato integrado al aparato y la temperatura de fusión de la sustancia se leyó en el termómetro adosado a dicha platina. Se realizó por triplicado.

1.1.3. Talla de partícula

Se realizaron observaciones en un microscopio electrónico y se realizó un conteo de partículas de los diferentes rangos de diámetros. Esta determinación se realizó por triplicado.

2. Preparación de los nanocristales

2.1. Determinación de concentración adecuada del fármaco y estabilizador

Se propuso la tabla 10 para realizar varios ensayos y poder determinar la concentración adecuada de trabajo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 10. Concentraciones propuestas

CsA/ A [®] 200 (%)	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
1.0					
2.0					
3.0					
4.0					
5.0					
6.0					

2.2. Procedimiento para la preparación de nanocristales mediante el método de desplazamiento de solvente.

Los nanocristales de CsA se prepararon por el método de desplazamiento de solvente, donde se realizó una disolución al 10% de Tween[®] 80 en agua, posteriormente se preparó una disolución al 3% de CsA en Metanol.

Se colocó la disolución de Tween[®] 80 en una parrilla eléctrica con agitación, después se inyectó a flujo constante la disolución de CsA. Se dejó en reposo para la evaporación del solvente.

2.3. Procedimiento general para la preparación de nanocristales mediante el método propuesto

Los nanocristales de CsA se prepararon por la técnica propuesta donde se disolvió Aerosil® 200 en 100 mL de agua, posteriormente se agitó en el ultraturrax a 16000 rpm por 30 minutos, se colocó 10 minutos en el ultrasonicador; se preparó 10 mL de una solución de CsA en metanol la cual se inyecta a flujo constante a la solución de Aerosil® 200 bajo agitación en el ultraturrax a 11000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se deja en reposo para que se evapore el solvente.

3. Evaluación y caracterización de los nanocristales

3.1. Talla de Partícula

El tamaño de los NC's se determinó empleando un contador submicrónico de dispersión de rayos laser (PCS, Photon Correlation Spectroscopy) Nanosizer®N4Plus a un ángulo de 11.1, 15.7, 23.0, 30.1, 62.6 y 90. Todas las medidas se hicieron por triplicado para calcular el Tamaño de Partícula Promedio (TPP) y el índice de polidispersidad.

3.2. Estabilidad de los nanocristales

Se evaluó la estabilidad de los nanocristales. Se determinó elaborando 3 lotes de nanocristales a los cuales se les monitoreó la talla de partícula al día 1, 2, 5 y 11. La talla de partícula se determinó en el Nanosizer®N4Plus.

3.3. Morfología

Se realizaron observaciones en un Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-7600 F) de Ciclosporina A como materia prima, nanopartículas de CsA estabilizadas con Tween® 80 y nanocristales de CsA estabilizadas con Aerosil®200.

3.4. Propuesta de morfología

Se determinó la talla de partícula a los ángulos 11.1°, 15.7°, 23.0°, 30.1°, 62.6° y 90°. Posteriormente se propuso un diseño elaborado en un software. La talla de partícula se determinó en el Nanosizer®N4Plus.

3.5. Resuspendibilidad del Liofilizado

Se evaluó la resuspendibilidad en función de la TP. Se liofilizaron 5 mL de la dispersión de NC's usando Aerosil® 200 al 0.5% y 1.0%. El liofilizado obtenido se reconstituyó con 5 mL de agua destilada con agitación magnética moderada durante 5 minutos y posteriormente se determinó la TP.

3.6. Calorimetría Diferencial de Barrido

Se determinó el comportamiento térmico de las partículas y sus constituyentes mediante un DSC. Primero se realizó una calibración con un estándar de Indio y después cada una de las muestras liofilizadas se pesaron entre 1 y 3 mg directamente en charolas de aluminio no herméticas y se escanearon de 0°C a 300°C con un calentamiento de 10°C/min y un flujo de nitrógeno a 50 mL/min en DSC MTDSC Q10; TA Instruments®, Canadá.

3.7. Prueba de velocidad de disolución.

La velocidad de disolución se evaluó empleando un disolutor, utilizando como medio de disolución 900 mL de Lauril Sulfato de Sodio al 0.5% y cada muestra se leyó en un Espectrofotómetro a 200 nm. Cada muestra se trabajó por triplicado. Las tabletas se elaboraron en una tableteadora Carver® a 1MT durante 5 segundos de acuerdo a la tabla 11.

Tabla 11. Formulaciones para la elaboración de tabletas

Formulación	CsA (mg)	NC's CsA (mg)	Aerosil® 200 (mg)	Estearato de Magnesio	Avicel® 101 (mg)
Materia Prima	100	-	-	-	-
Mezcla Física 0.5%	100	-	164	5	231
Mezcla Física 1.0%	100	-	329	6	231

Cont. Tabla 11. Formulaciones para la elaboración de tabletas

Mezcla Física 0.5%	100	-	-	5	231
Mezcla Física 1.0%	100		-	6	231
Tratamiento 0.5%	-	264	-	5	231
Tratamiento 1.0%	-	329	-	6	231

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Selección del fármaco

Se seleccionó un fármaco del grupo IV de la Clasificación Biofarmacéutica la cual agrupa los fármacos en función de su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal cuando se combina con la información de disolución *in vitro*, el BCS toma en consideración, por tanto, tres factores considerables: solubilidad, permeabilidad y velocidad de disolución factores que controlan la velocidad y extensión de la absorción de fármacos incorporados a formulaciones de liberación controlada.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó un fármaco modelo el cual fue Ciclosporina A es cual es un fármaco muy representativo del grupo IV con baja solubilidad y baja permeabilidad.

1.1. Caracterización del fármaco seleccionado.

En la tabla 12 se observan los resultados de apariencia física, punto de fusión y talla de partícula de CsA empleada en este proyecto.

Tabla 12. Caracterización de Ciclosporina A	
Polvo blanco	
Punto de fusión	140-145°C
Talla de partícula	15470 nm

Se compararon los resultados obtenidos con los especificados en la FEUM (Anexo I), y podemos concluir que de acuerdo a las características fisicoquímicas y punto de fusión el material con el que se llevó a cabo este proyecto es Ciclosporina A.

En la caracterización de la materia prima se puede observar que la Ciclosporina A tiene una talla de partícula por arriba de los 1000 nm.

2. Obtención de nanocristales de Ciclosporina A

Se obtuvieron nanocristales de CsA, partiendo de CsA, como materia prima. Por el método propuesto donde los cristales de CsA, se encontraron en una talla menor a 500 nm y de acuerdo a la definición de J. Kreuther en 1983, la cual nos dice que los nanocristales son partículas sólidas que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000 nm.

2.1. Determinación de la concentración adecuada de fármaco y estabilizador

Se llevaron a cabo los ensayos propuestos para determinar la concentración adecuada de trabajo y donde la talla de partícula fuera constante en función de la concentración de Aerosil® 200.

El tamaño de partícula fue analizado en un equipo contador submicrónico de partículas (Nanosizer®N4Plus) el cual se basa en el principio de dispersión de luz.

En la tabla 13 podemos observar los resultados de talla de partícula obtenidos en los ensayos. Donde podemos observar que a partir de la concentración al 1% de Aerosil®200 la talla de partícula se encuentra en el rango nanométrico y es constante. Aunque cabe mencionar que a concentraciones de 0.5% de Aerosil®200 se obtiene tallas de partícula nanométricas, pero con la limitante de trabajar a concentraciones menores al 3% de CsA.

Tabla 13. Concentraciones propuestas y talla de partícula (nm) promedio

CsA (%)	Aerosil® 200 (%)				
	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
1.0	436.1	294.7	272.1	231.8	218.8
2.0	357.9	229.2	271.2	310.6	232.5
3.0	3191.9	227.2	315.0	272.9	249.3
4.0	24215.6	2564.8	227.4	263.2	252.6
5.0	17051.3	1861.0	232.5	243.3	238.7
6.0	17543.6	1611.0	305.6	258.8	306.2

Ahora en la figura 10 se confirma que a partir de la concentración de 1% de Aerosil®200 no hay diferencia significativa ya que la talla de partícula se mantiene constante a las diferentes concentraciones de CsA por lo cual no es relevante si aumentamos la concentración de Aerosil® 200 en los sistemas. En este proyecto se trabajó con la concentración al 1% de Aerosil® 200 y 3% de CsA.

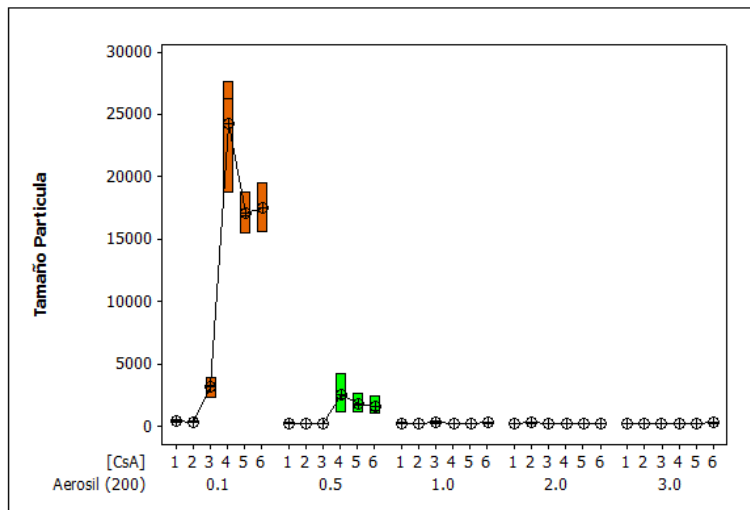


Figura 10. Gráfica de talla de partícula en función de la concentración de Aerosil®200 y CsA

2.2. Talla de partícula

Se determinó la talla de partícula a la concentración 1% de Aerosil®200 y 3% de CsA. En la Figura 11 podemos observar los resultados obtenidos.

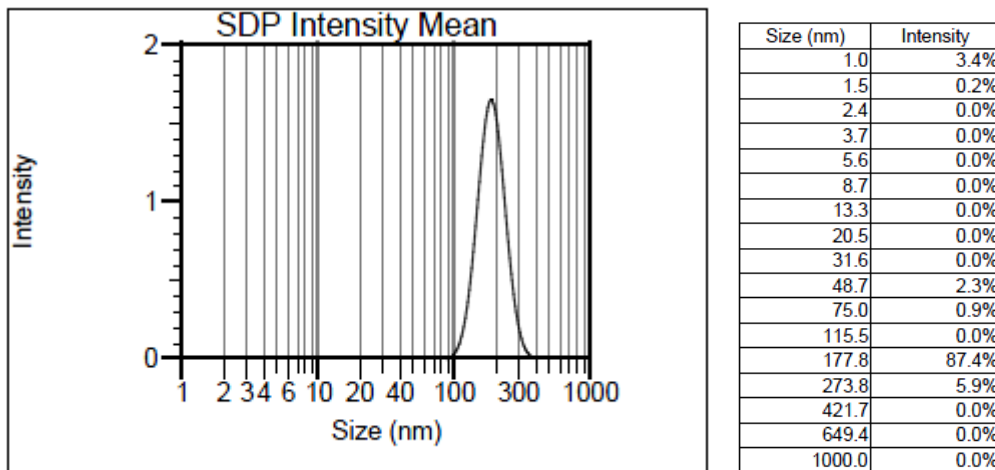


Figura 11. Gráfica de talla de partícula en función del Aerosil®200 1% y CsA 3%

Podemos observar que las partículas obtenidas se encuentran en su mayoría entre los 180 nm por lo cual podemos determinar que este proceso es efectivo para obtener nanocristales de CsA estabilizados con partículas de Aerosil®200 (estabilización halo), recordemos que la talla de partícula influye directamente en la velocidad de disolución por lo cual es un parámetro muy importante para formulaciones de liberación controlada.

2.3. Morfología

Para determinar la morfología se realizaron observaciones en un microscopio electrónico de barrido (JSM-7600 F).

En la figura 12 se observan microfotografías a diferentes resoluciones de la estructura de los cristales de CsA como materia prima, los cuales tienen una morfología tipo aguja y la talla es superior a una micra.

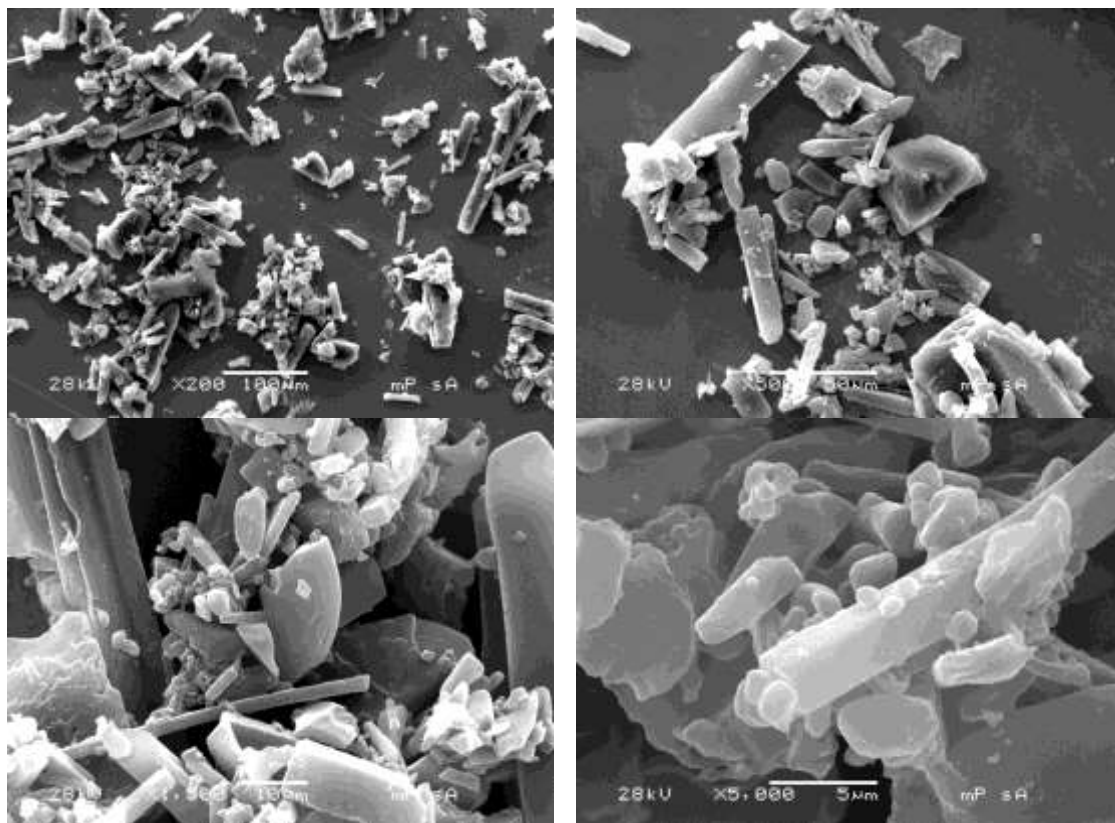
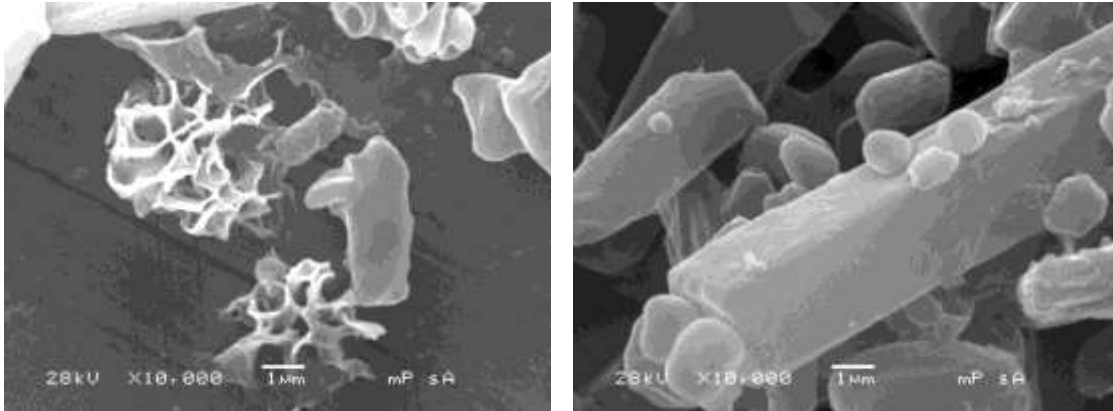


Figura 12. Microfotografías de CsA (materia prima)



Cont. Figura 12. Microfotografías de CsA (materia prima)

En la figura 13 se observa a diferentes resoluciones nanocristales de CsA, estabilizados con Tween[®] 80 los cuales se obtuvieron por el método de desplazamiento de disolvente.

El método de desplazamiento de disolvente requiere dos fases: la fase de disolvente y la fase de no disolvente. La fase de disolvente consiste esencialmente en una solución del fármaco. La fase de no disolvente es una mezcla del no disolvente y el estabilizador [H. Fessi, 2011]. En este caso la fase del disolvente fue una solución de CsA/Metanol y la fase de no disolvente fue una solución de Tween[®] 80/ Agua.

En las microfotografías se observa que las nanopartículas obtenidas tienen una morfología esférica y una película, la cual pueden ser residuo de surfactante. Los nanocristales se obtuvieron a una concentración del 3% de CsA y 10% de Tween[®] 80. Podemos concluir que por este método se obtienen partículas de talla manométrica y esférica donde efectivamente se forma la película la cual es residuo del estabilizador (Tween[®] 80).

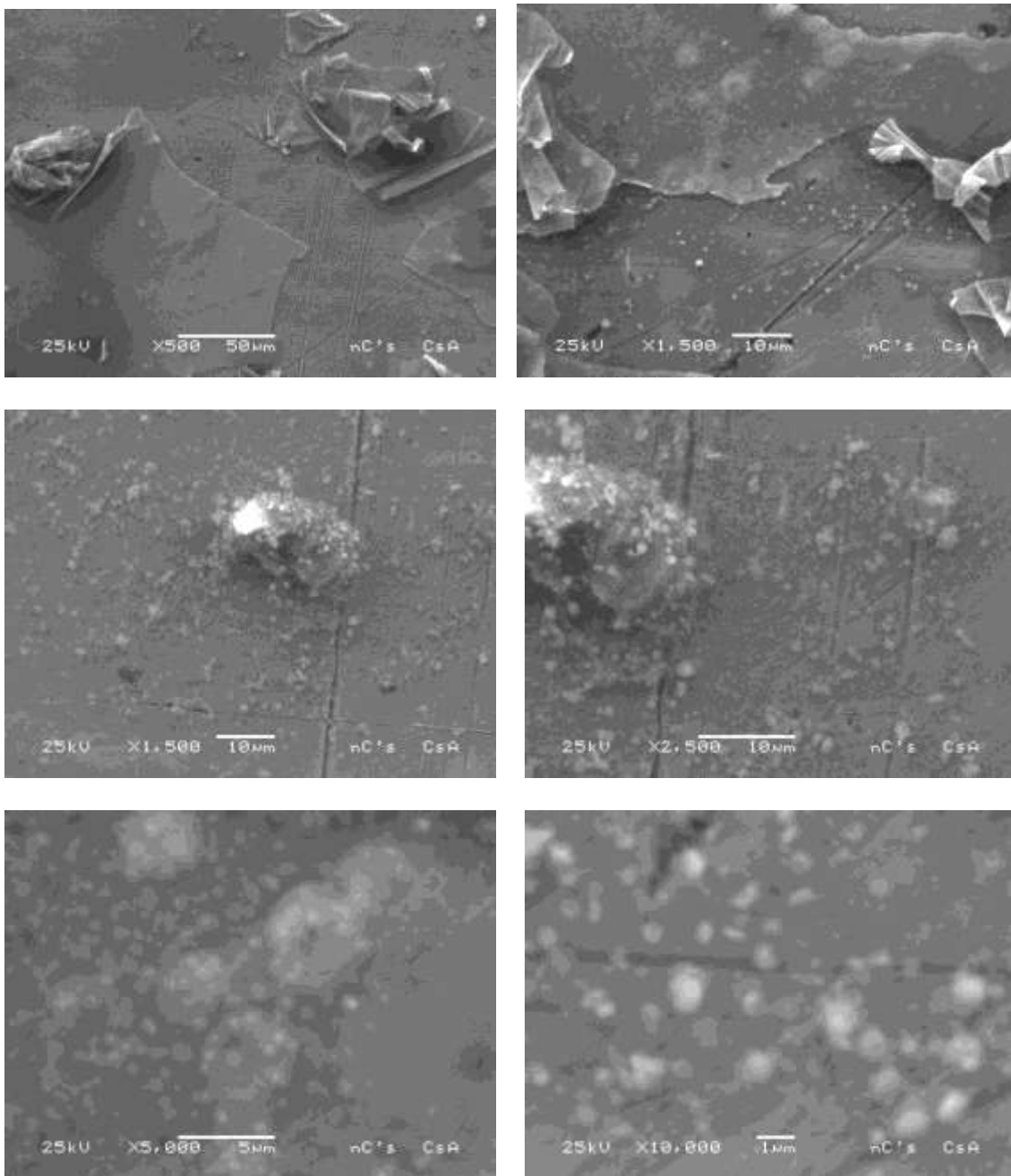


Figura 13. Microfotografías de NP's de CsA estabilizadas con Tween®80 al 10%

En la figura 14 se observan diferentes microfotografías a diferentes resoluciones de los nanocristales estabilizados con Aerosil®200. Observamos que los nanocristales obtenidos por este proceso tiene una forma de *hojuelas* nos podemos referir como *nanohojuelas*

De acuerdo a las diferentes definiciones de nanotecnología, se consideran nanopartículas a las partículas sólidas que por lo menos en una de sus dimensiones tengan una dimensión de 1 a 1000 nm. Y las partículas estabilizadas con Aerosil®200 se encuentran entre el rango mencionado.

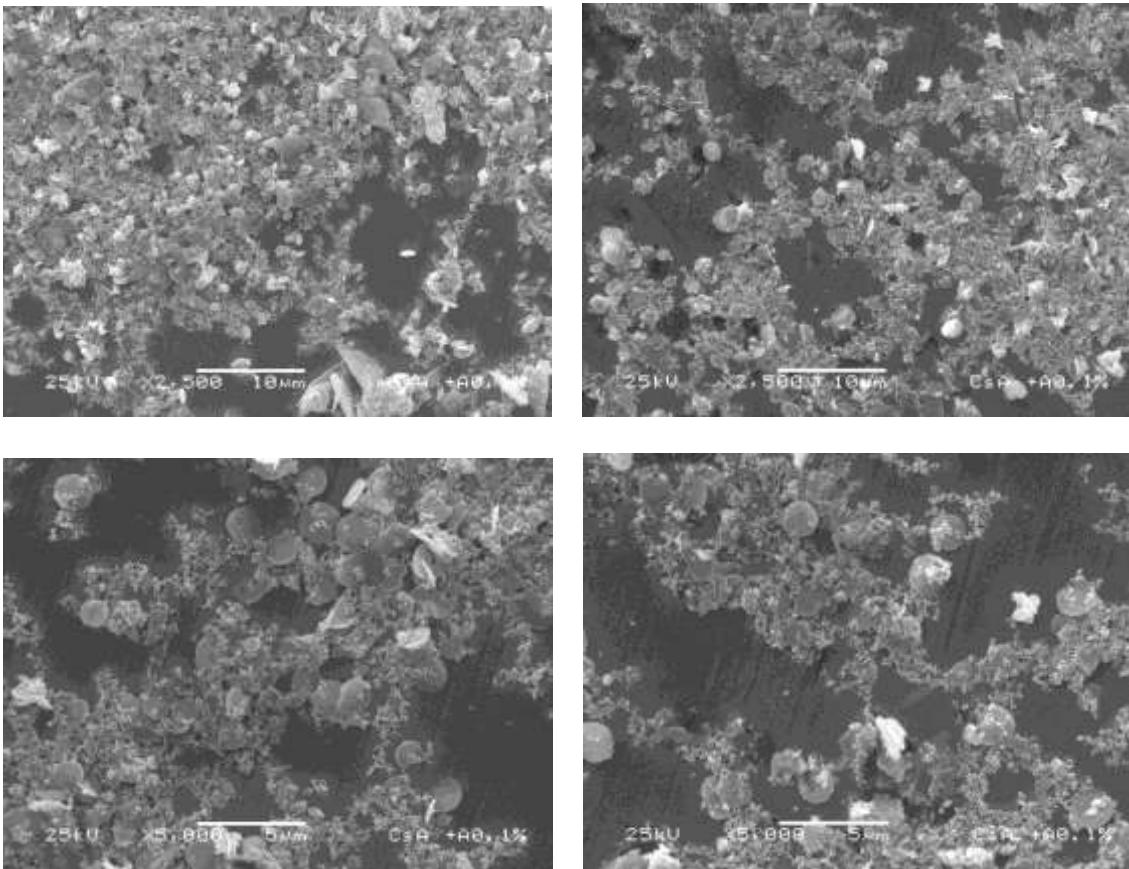
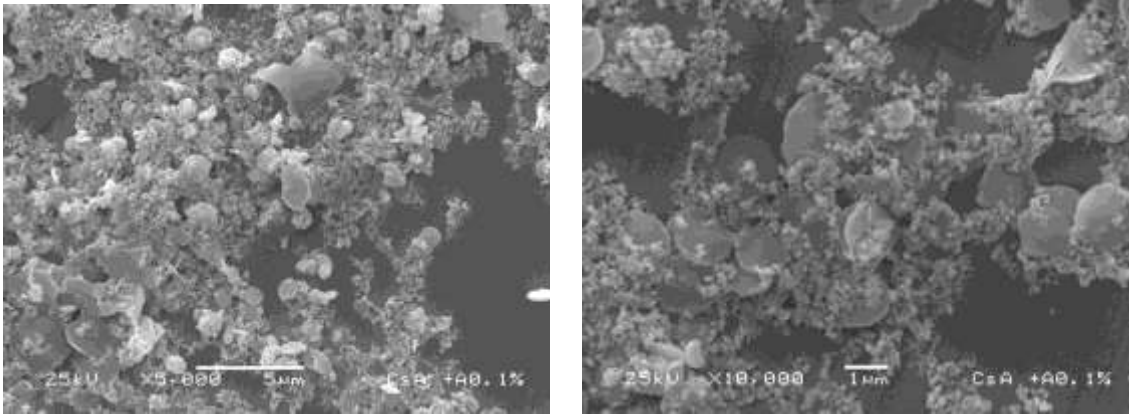


Figura 14. Microfotografías de NC's de CsA estabilizadas con Aerosil®200 0.1%



Cont. Figura 14. Microfotografías de NC's de CsA estabilizadas con Aerosil®200 0.1%

2.4. Estabilidad de nanocristales y talla a diferentes ángulos.

Se realizaron ensayos para determinar la estabilidad de la talla de partícula de los nanocristales, se monitorearon durante 11 días teniendo lecturas en el día 1, 2, 5 y 11. En la figura 15 se observan los gráficos de cada día, en el día 1; si observamos el ángulo de 90° las partículas se encuentran en la talla de 200 a 300 nm, en la gráfica del día 2 las partículas se encuentra en el rango de 200 a 400 nm, esto implica un aumento en la talla de partícula, pero en la tabla del día 5 las partículas se encuentran alrededor de los 300 nm, la diferencia entre la gráfica del día 2 y del día 5 puede ser una diferencia en la agitación de la dispersión, pero aun así se encuentran en el rango de los nanómetros, en el grafico del día 11 las partículas se encuentran en el rango de los 300 nm.

En los ángulos de 11.1° , 15.7° , 23.0° , 30.1° , 62.26° y 90.0° ; se observa que la talla de partícula no es constante, pero recordemos que estas medidas corresponden a la medida en diferentes ángulos, pero aun así se encuentran por debajo de los 1000 nm y de acuerdo a la definición de nanopartículas, los cristales obtenidos se encuentran en el rango nanométrico.

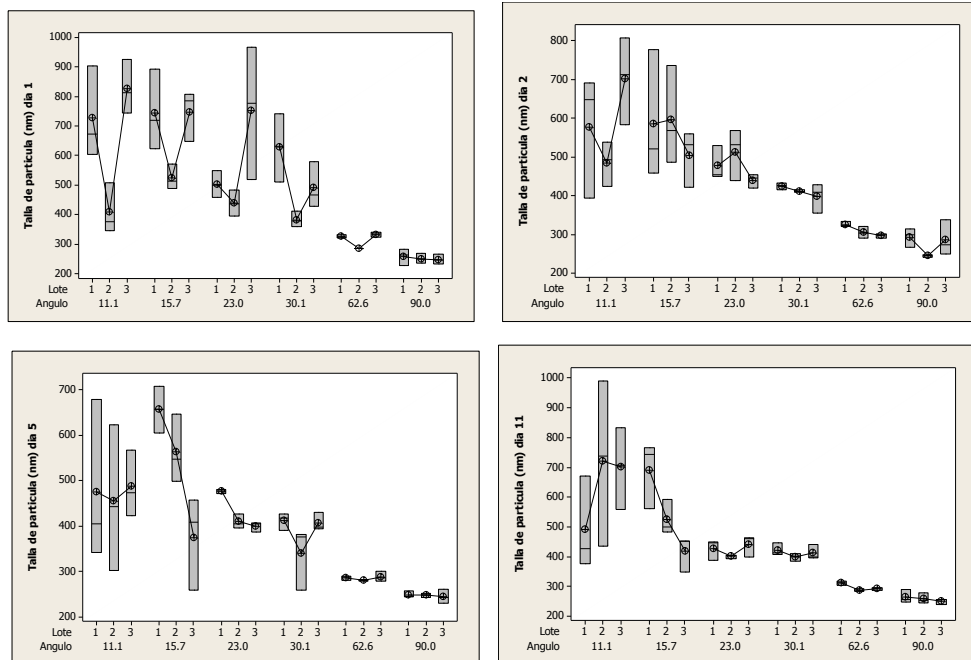


Figura 15. Estabilidad de NC's al día 1, 2, 5 y 11.

Podemos concluir que la talla de partícula se mantiene constante y no tiene un crecimiento considerable así que podemos decir que las nanopartículas obtenidas por el método propuesto son estables.

2.5. Propuesta de morfología de los nanocrisales.

Se propone un modelo de cómo se observan los nanocrisales a diferentes ángulos de acuerdo las tallas de partícula que se determinaron en el Nanosizer[®]N4Plus y como se observa en la figura 16 y en el análisis de morfología los nanocrisales obtenido tienen una forma de *nanohojuelas*.

Tenemos la propuesta de morfología de los NC's a los 11°, 15.7°, 23.0°, 30.1°, 62.6° y 90.0°C. Para plantear esta propuesta nos basamos en las microfotografías obtenidas en la MEB y en los promedios de las tallas de partícula obtenidas a diferentes ángulos en el Nanosizer[®]N4Plus.

Esta propuesta es solo para tener un modelo de los nanocristales obtenidos por el método propuesto.

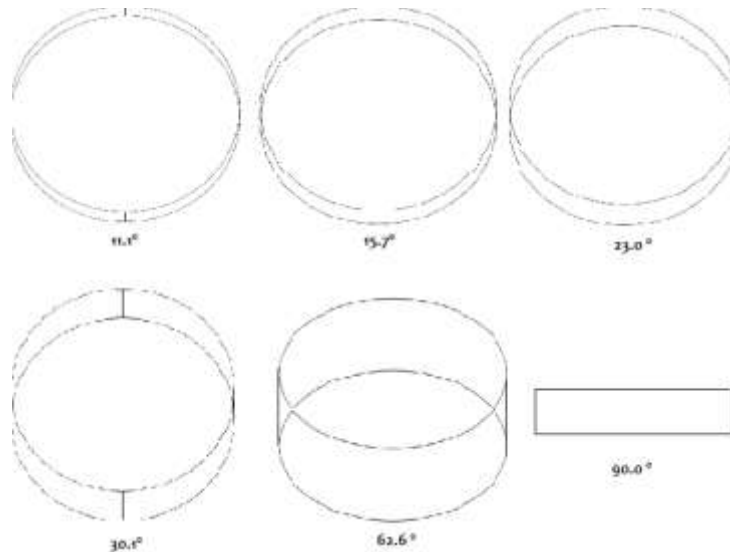


Figura 16. Propuesta de morfología de los NC's en los diferentes ángulos.

2.6. Determinación de pH

En la tabla 14 se observan los datos del análisis de pH en los sistemas donde se replicaron tres lotes por triplicado y se observa que tenemos un pH ácido.

Tabla 14. Determinación del pH en los sistemas

Lote	Tiras pH	pH metro
1	4.0	4.2
2	4.0	4.3
3	4.0	4.0

Se han encontrado datos en la literatura donde especifica que las partículas estabilizadas con Aerosil[®]200 son estables a un pH menor de 4; a pH entre 4 y 8 pierden su estabilidad, la estabilidad se debe a que se tiene un alto potencial Z ya sea positivo o negativo [B. P. Binks, 1999].

En la Figura 17, se observa un gráfico con las regiones de estabilidad en función del Potencial Z y pH, donde se confirma que de acuerdo al pH nuestras partículas obtenidas por el método propuesto son estables.

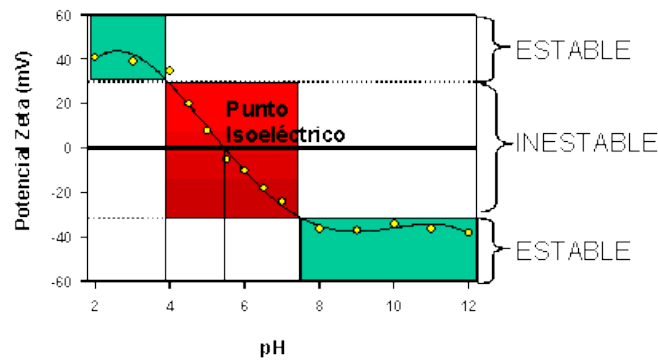


Figura 17. Gráfico de regiones de estabilidad en función del Potencias Z y pH

2.7. Resuspendibilidad del Liofilizado

Se evaluó la resuspendibilidad del liofilizando de nanopartículas con la finalidad de evaluar la capacidad del material para ser resuspendido obteniéndose los resultados observado en la tabla 15.

Tabla 15. Resuspendibilidad del liofilizado

Sistema	Talla de partícula
Antes de liofilizar	164 nm
Después del liofilizado	180 nm

Observamos que no hay diferencia significativa al momento de resuspender los nanocristales lo cual indica que los nanocristales mantienen sus propiedades

nanométrica después de liofilizar. En la figura 18 y 19 se observa la distribución de la talla de partícula.

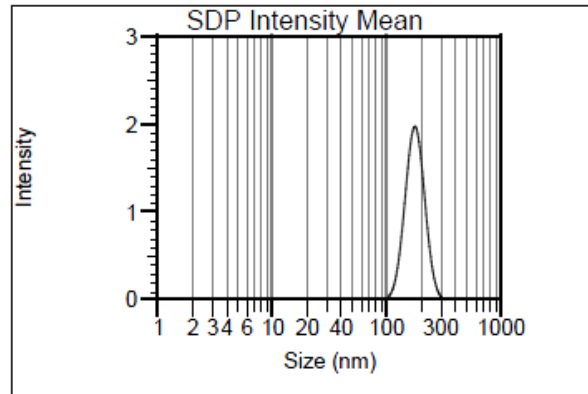


Figura 18. Gráfico de talla de partícula de los NC's antes del liofilizado

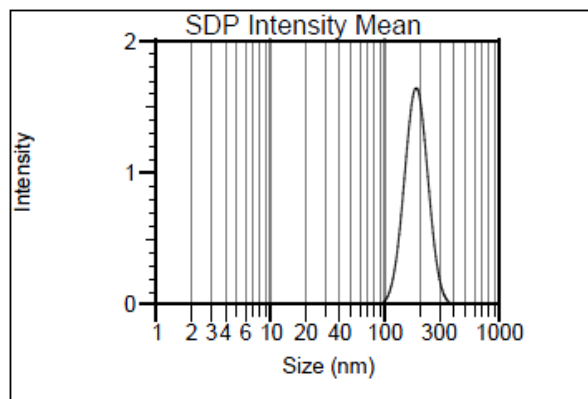


Figura 19. Gráfico de talla de partícula de los NC's después del liofilizado

2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido

Se realizó la caracterización por Calorimetría diferencial de barrido de la CsA como materia prima y nanocristales obtenidos por el proceso propuesto, para verificar que el fármaco no ha cambiado su estado cristalino en este proyecto se trabajó con Ciclosporina A en su estado cristalino.

En la figura 20 se observa el comportamiento de la CsA en otro trabajo. [Onoune et al, 2009], si observamos el termograma podemos observar que su punto de fusión se encuentra alrededor de los 120°C.

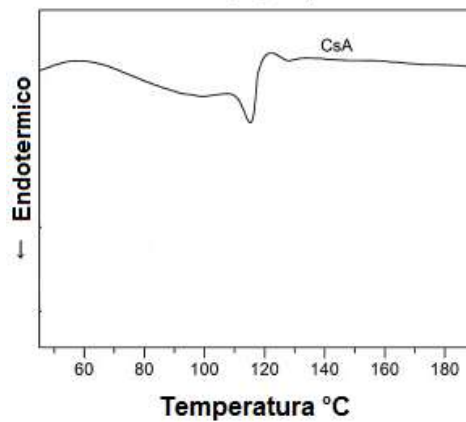


Figura 20. Caracterización fisicoquímica de la CsA [Onoune et al, 2009]

En la figura 21 podemos observar el comportamiento de la CsA empleada en este trabajo.

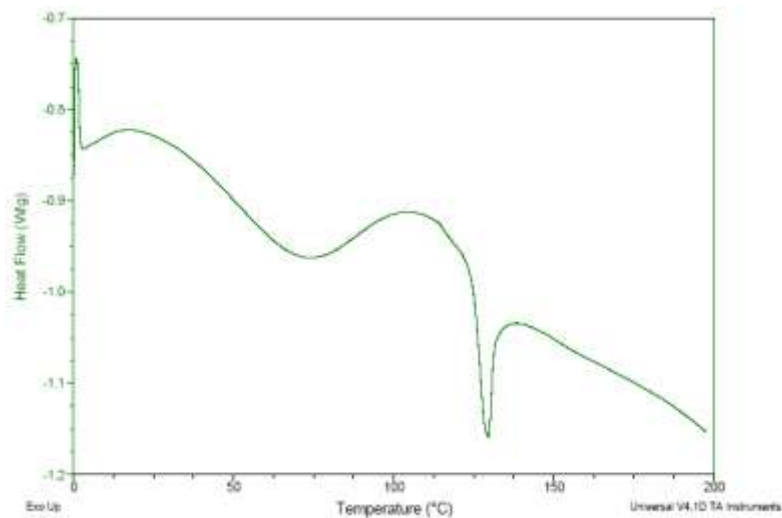


Figura 21. Termograma de CsA (materia prima)

En la figura 22 observamos el comportamiento de nanocristales de CsA, no se observa una diferencia significativa y/o cambio en el comportamiento ya que siguen el mismo patrón. El punto de fusión en ambos se observa en los 120°C, la cual se encuentra en su estado cristalino.

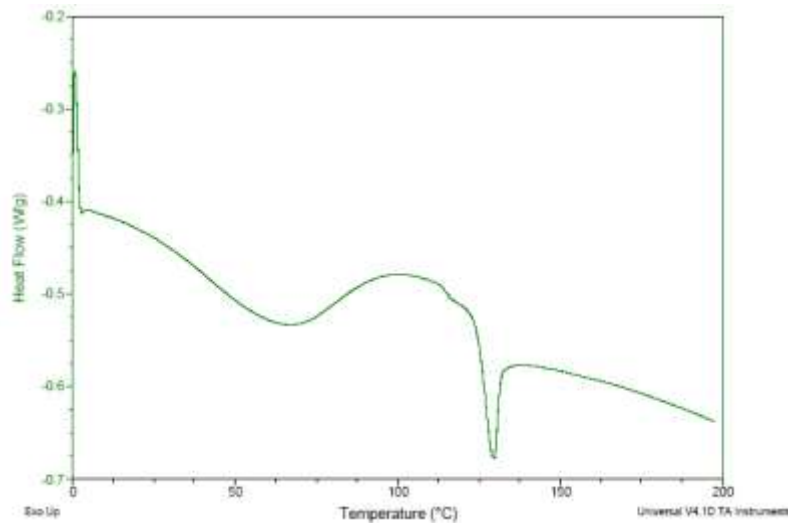


Figura 22. Termograma de NC's de CsA

Así que podemos concluir que los nanocristales obtenidos en el proceso propuesto conservan su estado cristalino a pesar de exponerse al proceso para disminuir la talla de partícula.

2.9. Prueba de velocidad de disolución.

La absorción de la CsA es limitada por su carácter poco soluble en agua, atribuible a su alto peso molecular y muy alta lipofilia (El Tayar et al, 1993) por lo que muestra una pobre biodisponibilidad y una alta variabilidad. Por eso la importancia de realizar la evaluación de disolución.

Se realizaron pruebas de disolución con las tabletas elaboradas, cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 16. Tabletas (500mg)

CsA
Mezcla Física 0.5%
Mezcla Física 1.0%
Mezcla Física 0.5%
Mezcla Física 1.0%
Tratamiento 0.5%
Tratamiento 1.0%

Todas las muestras se evaluaron en condiciones *sink*. Los denominados métodos o condiciones *sink* se presentan cuando el volumen del medio de disolución es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para preparar una solución saturada $C < 0.15 C_s$ o $C \ll C_s$

En la gráfica 23 se observa el comportamiento de los diferentes ensayos realizados en este trabajo.

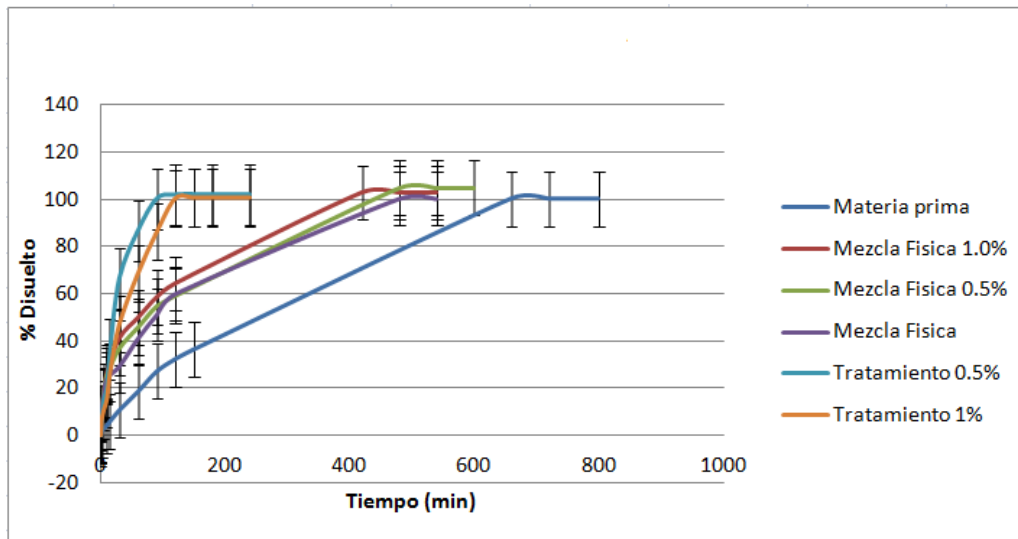


Figura 23. Gráfica comparativa de las pruebas de disolución de CsA

La tableta de CsA como materia prima tarda en disolverse aproximadamente 800 minutos lo cual se atribuye a su alto peso molecular y alta lipófila, la segunda formulación que tardo más en esta evaluación fue la mezcla física sin Aerosil® 200 (línea morada), posteriormente la mezcla física 0.5%, seguida por la mezcla física al 1.0%, este efecto se puede atribuir a la presencia de Avicel® PH 101 el cual favorece la disolución por sus propiedades de “superdesintegrante” a pesar de la presencia de Estearato de Magnesio el cual disminuye la velocidad de disolución. El tiempo de disolución de las mezclas físicas está alrededor de los 500 minutos.

En los tratamientos podemos observar que el tratamiento al 0.5 % se disuelve aproximadamente a los 90 min a diferencial del tratamiento al 1.0% donde tarda aproximadamente 20 minutos más. Esto se puede atribuir a la presencia de

Aerosil® 200 ya que al tener mayor concentración de dióxido de silicio este impide el mojado de la tableta por sus propiedades hidrofóbicas.

En esta evaluación podemos concluir que por el proceso propuesto se obtienen partículas nanométrica con las cuales podemos mejorar la velocidad de disolución de Ciclosporina A.

VII. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró desarrollar un método por desplazamiento de solvente para obtener nanocristales de Ciclosporina A por medio de una estabilización halo con dióxido de silicio. El fármaco seleccionado para el desarrollo de este proyecto fue la Ciclosporina A, estabilizada con Aerosil[®] 200 el cual se caracterizó por su talla de partícula, solubilidad, punto de fusión y DSC.
- ✓ Se encontraron las condiciones óptimas para el proceso y obtener nanocristales por el método halo:
 1. Realizar una dispersión de Aerosil[®] 200 al 1%.
 2. Agitar en el Ultraturrax a 16000 rpm durante 30 min.
 3. Colocar la dispersión durante 10 min en el Ultrasonicador.
 4. Preparar una solución al 3% de CsA en Metanol
 5. Inyectar a flujo lento y constante la solución de CSA en la dispersión de Aerosil[®] 200 mientras se agita en el Ultraturrax a 11000 rpm durante 5 min.
 6. Dejar en reposo hasta que se evapore el solvente.
- ✓ Los nanocristales obtenidos se lograron evaluar con resultados favorables, se obtienen partículas de talla nanométrica de 200-400 nm estables, con la capacidad de resuspenderse y una velocidad de disolución menor comparada con la materia prima.

VIII. PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas de este trabajo se encuentran el evaluar diferentes principios activos del grupo IV, determinar el grado hidrofóbico del dióxido de silicio y verificar si con este proceso utilizando sílice hidrofóbico se pueden obtener nanocristales por desplazamiento de solvente.

El emplear los nanocristales obtenidos por este proceso para formular una forma farmacéutica y potencializar su uso.

Aclarar más del mecanismo de estabilización *halo* con la idea de poder predecir las variables preparativas y un proceso susceptible de escalamiento.

VIII. REFERENCIAS

1. **[M. Breunig, 2008]** M. Breuning S. Bauer. A. Goepferich. *Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting?*. European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics 68, (2008) 112-128.
2. **[J.L. Vila-Jato, 2007]** J.L. Vila-Jato. *Nuevos aspectos biofarmacéuticos en nanotecnología farmacéutica*. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia 73 (4), (2007) 813-832.
3. **[W. Mehnert, 2001]** W. Mehnert, K. Mader. *Solid lipid nanoparticles. Production characterization and application*. Advance Drugs Delivery 47, (2001) 165-196.
4. **[D. Ramos, 2000]** D. Ramos, M. Gomez, D. Fernandez y L. Nuñez. *Microesferas biodegradables de liberación controlada para la administración parenteral*. Revista. Cuabana de Farmacia 34 (1), (2000) 70-77.
5. **[CF. Lerk, 1977]**. CF. Lerk, GK. Bolhuis, SS. Smedema. *Interaction of lubricants and colloidal silica during mixing with excipients I: its effect on tableting*. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 52(3), (1977) 33–39.
6. **[CF. Lerk, 1977]**. CF. Lerk, GK. Bolhuis. *Interaction of lubricants and colloidal silica during mixing with excipients II: its effect on wettability and dissolution velocity*. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 52 (3), (1977) 39–44.
7. **[S. Jonat, 2005]** S. Jonat, S. Hasenzahl, A. Gray and P. C. Schmidt. *Influence of compacted hydrophobic and hydrophilic colloidal silicon dioxide on tableting properties of pharmaceutical excipients*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 31(7) (2005) 687–696.

8. **[P. York, 1975]** P. York. *Application of powder failure testing equipment in assessing effect on glidants on flowability of cohesive pharmaceutical powders*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 64(7) (1975) 1216- 1237.
9. **[R. Daniels, 1986]** R. Daniels, B. Kerstiens, H. Tischinger-Wagner and H. Rupprecht. *The Stability of Drug Adsorbates on Silica*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 12 (11-13), (1986) 2127–2156.
10. **[M. Sherriff, 1979]** M. Sherriff, RP. Enever. *Rheological and drug release properties of oil gels containing colloidal silicon dioxide*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 68(7), (1979) 842– 845.
11. **[JJ. Tukker, 1984]** JJ. Tukker, CJ. Blaey. *The addition of colloidal silicon dioxide to suspension suppositories II. The impact on in vitro release and bioavailability*. Acta Pharmaceutica Technologica. 30 (1984)155–160.
12. **[M Mani, 2004]** M Mani, HR. Suh, HW. Jun HW. *Microencapsulation of a hydrophilic drug into a hydrophobic matrix using a salting-out procedure. II. Effects of adsorbents on microsphere properties*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 30(1) (2004) 83–93.
13. **[SJ. Gallagher, 2003]** SJ. Gallagher, L. Trottet, TP.Carter, CM. Heard. *Effects of membrane type and liquid/liquid phase boundary on in vitro release of ketoprofen from gel formulations*. Journal of Drug Targeting. 11(6) (2003) 373–379.
14. **[SR. Schaffazick, 2003]** SR. Schaffazick, AR. Pohlmann, T. Dalla-Costa, SS. Guterres. *Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules*,

- nanospheres and nanodispersion A comparative study*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 56(3) (2003) 501–505.
15. **[A. Date, 2007]** A. Date, Medha D. Joshi, V.B. Patravale. *Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles*. Advance Drug Delivery Reviews 59(6) (2007) 505-521.
16. **[J. Kreuter, 2007]** J. Kreuter. *Nanoparticles – a historical perspective*. International Journal of Pharmaceutics 331(1) (2007) 1-10.
17. **[V.J. Mohanraj, 2006]** V.J. Mohanraj, Y. Chen. *Nanoparticles*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 5 (1) (2006) 561-573.
18. **[L.Gao, 2007]** L.Gao, D. Zhang, M. Chen, T. Zheng and S. Wang. Preparation and characterization of an oridonin nanosuspension for solubility and dissolution velocity enhancement. Drug Development and Industrial Pharmacy. 33 (12) (2007) 1332–1339.
19. **[L. Gao, 2008]** L. Gao, D. Zhang, M. Chen, C. Duan, W. Dai, L. Jia and W. Zhao. *Studies on pharmacokinetics and tissue distribution of oridonin nanosuspensions*. International Journal of Pharmaceutics. 355 (2008) 321–327.
20. **[C. Jacobs, 2002]** C. Jacobs and R.H. Müller. *Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration*. Pharmaceutical Research. 19 (2) (2002) 189–194.
21. **[N. Hernández-Trejo, 2005]** N. Hernández-Trejo, O. Kayser, H. Steckel and R.H. Muller. *Characterization of nebulized buparvaquone nanosuspensions — effect of nebulization technology*. Journal of Drug Targeting. 13 (8–9) (2005) 499–507.

22. **[R.H. Müller, 2002]** R.H. Müller and C. Jacobs. *Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability*. International Journal of Pharmaceutics. 237(1-2) (2002) 151–16.
23. **[F. Lai, 2009]** F. Lai, C. Sinico, G. Ennas, F. Marongiu, G. Marongiu and A.M. Fadd. *Diclofenac nanosuspensions influence of preparation procedure and crystal form on drug dissolution behavior*. International Journal of Pharmaceutics. 373(1-2) (2009) 124–132.
24. **[D. Zhang, 2007]** D. Zhang, T. Tan, L. Gao, W. Zhao and P. Wang, *Preparation of azithromycin nanosuspensions by high pressure homogenization and its physicochemical characteristics studies*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 33 (5) (2007) 569–575.
25. **[R. Mauludin, 2009]** R. Mauludin, R.H. Muller and C.M. Keck. *Development of an oral rutin nanocrystals formulation*. International Journal of Pharmaceutics 370 (1-2) (2009) 202–209.
26. **[R. Mauludin, 2009]** R. Mauludin, R.H. Muller and C.M. Keck. *Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 36 (4-5) (2009), 502–510.
27. **[C. Jacobs, 2000]** C. Jacobs, O. Kayser and R.H. Muller. *Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide*. International Journal of Pharmaceutics. 196(2) (2000) 161–164.
28. **[J. Moschwitzter, 2004]** J. Moschwitzter, G. Achleitner, H. Pomper and R.H. Muller. *Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology*.

- European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 58 (3) (2004) 615–619.
29. **[O. Kayser, 2003]** O. Kayser, C. Olbrich, V. Yardley, A.F. Kiderlen and S.L. Croft. *Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration*. International Journal of Pharmaceutics. 254(1) (2003) 73–75.
30. **[R. Xiong, 2008]** R. Xiong, W. Lu, J. Li, P. Wang, R. Xu and T. Chen, *Preparation and characterization of intravenously injectable nimodipine nanosuspension*. International Journal of Pharmaceutics. 350 (1-2) (2008) 338–343.
31. **[P.R. Mishra, 2009]** P.R. Mishra, L.A. Shaal, R.H. Müller and C.M. Keck. *Production and characterization of Hesperetinnanosuspensions for dermal delivery*. International Journal of Pharmaceutics. 371 (1-2) (2009) 182–189.
32. **[M.A. Kassem, 2007]** M.A. Kassem, A.A.A. Rahman, M.M. Ghorab, M.B. Ahmeda and R.M. Khalil. *Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drug*. International Journal of Pharmaceutics. 340 (1-2) (2007) 126–133.
33. **[V. Teeranachaideekul, 2008]** V. Teeranachaideekul, V.B. Junyaprasert, E.B. Souto and R.H. Muller. *Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology*. International Journal of Pharmaceutics. 354 (1-2) (2008) 227–234.
34. **[J. Hecq, 2005]** J. Hecq, M. Deleers, D. Fanara, H. Vranckx and K. Amighi. *Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine*. International Journal of Pharmaceutics. 299 (1-2) (2005) 167–177.

35. **[YX. Zhao, 2010]** YX. Zhao, H.Y. Hua, M. Chang, W.J. Li, Y. Zhao and H.M. Liu. *Preparation and cytotoxic activity of hydroxycamptothecin nanosuspensions*. International Journal of Pharmaceutics. 392 (1-2) (2010) 64–71.
36. **[S. Ganta, 2009]** S. Ganta, J. Paxton, B.C. Baguley and S. Garg, *Formulation and pharmacokinetic evaluation of anasulacrine nanocrystalline suspension for intravenous delivery*. International Journal of Pharmaceutics. 367(1-2) (2009) 179–186.
37. **[C. Jacobs, 2000]** C. Jacobs, O. Kayser and R.H. Muller. *Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide*. International Journal of Pharmaceutics. 196 (2) (2000) 161–164.
38. **[A. Ain-Ai, 2008]** A. Ain-Ai and P.K. Gupta. *Effect of arginine hydrochloride and hydroxypropyl cellulose as stabilizers on the physical stability of high drug loading nanosuspensions of a poorly soluble compound*. International Journal of Pharmaceutics. 351(1-2) (2008) 282–288.
39. **[L. Baert, 2009]** L. Baert, G. Klooster, W. Dries, M. François, A. Wouters, E. Basstanie, K. Iterbeke, F. Stappers, P. Stevens, L. Schueller, P. Van Remoortere, G. Kraus, P. Wigerinck, J. Rosier. *Development of a long-acting injectable formulation with nanoparticles of rilpivirine (TMC278) for HIV treatment*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 72 (3) (2009) 502–508.
40. **[J. Lee, 2005]** J. Lee, S.-J. Lee, J.-Y. Choi, J.Y. Yooa and C.-H. Ahn. *Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of*

- nanocrystals dispersion*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 24 (5) (2005) 441–449.
41. **[J. Chingunpitak, 2008]** J. Chingunpitak, S. Puttipipatkachorn, P. Chavalitshewinkoon-Petmitr, Y. Tozuka, K. Moribe and K. Yamamoto. *Formation, physical stability and in vitro antimalarial activity of dihydroartemisinin nanosuspensions obtained by co-grinding method*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 34(3) (2008) 314–322.
42. **[A. Pongpeerapat, 2008]** A. Pongpeerapat, C. Wanawongthai, Y. Tozuka, K. Moribe and K. Yamamoto. *Formation mechanism of colloidal nanoparticles obtained from probucol/PVP/SDS ternary ground mixture*. International Journal of Pharmaceutics. 352(1-2) (2008) 309–316.
43. **[S. Verma, 2009]** S. Verma, R. Gokhale and D.J. Burgessa. *A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions*. International Journal of Pharmaceutics. 380 (1-2) (2009) 216–222.
44. **[H.S. Ali, 2009]** H.S. Ali, P. York and N. Blagden. *Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors*. International Journal of Pharmaceutics. 375 (1-2) (2009) 107–113.
45. **[P. Kocbek, 2006]** P. Kocbek, S. Baumgartner and J. Kristl. *Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drug*. International Journal of Pharmaceutics. 312 (1-2) (2006) 179–186.
46. **[H. Epstein, 2007]** H. Epstein, V. Berger, I. Levi, G. Eisenberg, N. Koroukhov, J. Gao and G. Golomb. *Nanosuspensions of alendronate with*

- gallium or gadolinium attenuate neointimal hyperplasia in rats*. Journal of Controlled Release. 117(3) (2007) 322–332.
47. **[L. Lindfors, 2007]** L. Lindfors, P. Skantze, U. Skantze, J. Westergren and U. Olsson. *Amorphous drug nanosuspensions. 3. Particle dissolution and crystal growth*. Langmuir 23 (19) (2007) 9866–9874.
48. **[X. Chen, 2009]** X. Chen, M.E. Matteucci, C.Y. Lo, K.P. Johnston and R.O. Williams III. *Flocculation of polymer stabilized nanocrystals suspensions to produce redispersible powders*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 35(3) (2009) 283–296.
49. **[D. Douroumis, 2007]** D. Douroumis and A. Fahr. *Stable carbamazepine colloidal systems using the cosolvent technique*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 30(5) (2007) 367–374.
50. **[J.M. Tam, 2008]** J.M. Tam, J.T. Mcconville, R.O. Williams III and K.P. Johnston. *Amorphous cyclosporin nanodispersions for enhanced pulmonary deposition and dissolution*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 97 (11) (2008) 4915–4933.
51. **[X. Zhang, 2006]** X. Zhang, Q. Xia and N. Gu. *Preparation of all-trans retinoic acid nanosuspensions using a modified precipitation method*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 32(7) (2006) 857–863.
52. **[D. Xia, 2010]** D. Xia, P. Quan, H. Piao, H. Piao, S. Sun, Y. Yin and F. Cui. *Preparation of stable nitrendipinenanosuspensions using the precipitation–ultrasonication method for enhancement of dissolution and oral bioavailability*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 40(4) (2010) 325–334.

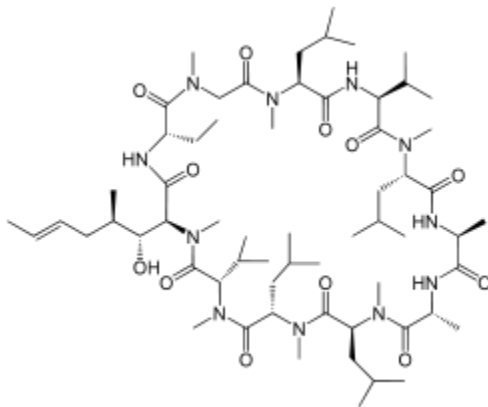
53. **[A. Makhlof, 2008]** A. Makhlof, Y. Miyazaki, Y. Tozuka and H. Takeuchi, *Cyclodextrins as stabilizers for the preparation of drug nanocrystals by the emulsion solvent diffusion method*. International Journal of Pharmaceutics. 357(1-2) (2008) 280–285.
54. **[B.K. Nyambura, 2009]** B.K. Nyambura, I. Kellaway and K.M.G. Taylor. *Insulin nanoparticles stability and aerosolization from pressurized metered dose inhalers*. Int. J. Pharm. 375(1-2) (2009) 114–122.
55. **[P.A. Dickinson, 2001]** P.A. Dickinson, S.W. Howells and J.W. Kellaway. *Novel nanoparticles for pulmonary drug administration*. Journal of Drug Targeting. 9 (4) (2001) 295–302.
56. **[H. Piao, 2007]** H. Piao, N. Kamiya, A. Hirata, T. Fujii and M. Goto. *A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium*. Pharmaceutical Research. 25 (4) (2007) 896–90.
57. **[J.Y. Zhang, 2006]** J.Y. Zhang, Z.G. Shen, J. Zhong, T.T. Hu, J.F. Chen, Z.Q. Ma and J. Yun. *Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants*. International Journal of Pharmaceutics. 323(1-2) (2006) 153–160.
58. **[W. Sun, 2011]** W. Sun, W. Tian, Y. Zhang, J. He, S. Mao, L.Fang. *Effect of novel stabilizers—cationic polymers on the particle size and physical stability of poorly soluble drug nanocrystals*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 8(4) (2011) 460-467.
59. **[V.J. Monhanraj, 2006]** V.J. Monhanraj and Y. Chen. *Nanoparticles*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 5 (1) (2006) 561-573.
60. ICH Impurities: Guideline for residual solvents Q3C (R3), November (2005).

61. **[J. Kreuter, 1994]** J. Kreuter. *Nanoparticles in: Colloidal Drugs Delivery Systems*. Marcel- Dekker, New York. (1994).
62. **[E. Fattal, 2002]** E. Fattal and C. Vauthier. *Naoparticles as drug delivery systems*. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel-Dekker. New York (2002).
63. **[D. Quintanar-Guerrero, 1998]** D. Quintanar-Guerrero, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker. *Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 24 (12) (1998) 1113-1128.
64. **[H. Fessi, 1989]** H. Fessi, F. Puisieux, J. Ph Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. International Journal of Pharmaceutics. 55(1) (1989) R1-R4.
65. **[E. Merisko-Liversidge, 2003]** E. Merisko-Liversidge, GG. Liversidge, ER. Cooper. *Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 18(2) (2003) 113-20.
66. **[V. Tohver, 2001]** V. Tohver, J.E. Smay, A. Braem, P.V. Braun, and J.A. Lewis. *Nanoparticle halos: A new colloid stabilization mechanism*. PNA. 98 (16) (2001) 8950-8954.
67. **[S. J. Miklavic, 1994]** S. J. Miklavic , D. Y. C. Chan , L. R. White , T. W. Healy. *Double Layer Forces between Heterogeneous Charged Surfaces*. The Journal of Physical Chemistry. 98(36) (1994) 9022-9032.

68. **[V. Mosqueria, 2000]** V. Mosqueria, P. Legrand, H. Pinto-Alphandary, F. Puisieux, G. Barratt. *Poly (D,L-Lactide) nanocapsules prepared by solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 89 (5) (2000) 614-626.
69. **[W. Mehner, 2001]** W. Mehner, K. Mader. *Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews 47 (2-3) (2001) 165-196.
70. **[D. Ramos, 2000]** D. Ramos, M. Gomez, D. Fernandez, L. Nuñez. *Microesferas biodegradables de liberación controlada para la administración parenteral*. Revista Cubana Farmacéutica 34 (1) (2000) 70-77.
71. **[V.J. Mohanraj, 2006]** V.J. Mohanraj and Y. Chen. *Nanoparticles- A Review*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 5(1) (2006) 561-573.
72. **[S.D. Clas, 1999]** S.D. Clas, C.R. Dalton and B.C. Hancock. *Differential Scanning Calorimetry: Applications in Drug Development*. Pharmaceutical Science & Technology Today. 2 (8) (1999) 311-320.
73. **[M. Grageda, 2007]** M. Grageda, S. Montesinos. *Aplicaciones de microscopia electrónica de barrido (SEM) y análisis de fractura de una aleación de Cu-10 Al*. Revista Ciencia Abierta 28 (2007) 1-10.
74. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 8ª edición Vol.1 2004.

75. **[S. Onoue, 2009]** S. Onoue, H. Sato, Y. Kawabata. *In vitro and in vivo characterization on amorphous solid dispersion of cyclosporine A for inhalation therapy*. Journal of Controlled Release 138(1) (2009) 16–23.
76. **[H. Fessi, 2009]** H. Fessi, CE Mora-Huertas, A. Elaissari. *Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification – diffusion methods: Critical comparison*. Advances in Colloid and Interface Science 163 (2) (2009) 90-122.
77. **[N. Tayar, 1993]** N. Tayar, A.E. Mark, P. Vallat, R.M. Brunne, B. Testa, W.F. Gunsteren. *Solvent-dependent conformation and hydrogen-bonding capacity of cyclosporin A: evidence from partition coefficients and molecular dynamics simulations*. Journal of Medicinal Chemistry 36 (24) (1993) 3757–3764
78. **[B. P. Binks, 1999]** B. P. Binks and S. O. Lumsdon. *Stability of oil-in-water emulsions stabilised by silica particles*. Physical Chemistry Chemical Physics. 1 (1999) 3007-3016

ANEXOS

Anexo I. Ciclosporina A

Polvo blanco o casi blanco

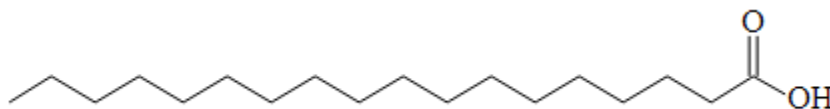
$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$

Peso molecular: 1202.63 g/mol

Temperatura de Fusión: 148-151°C

Solubilidad: Metanol, etanol, acetona, éter, cloroformo, cloruro de metileno.

Insoluble en agua

Anexo II. Estearato de Magnesio

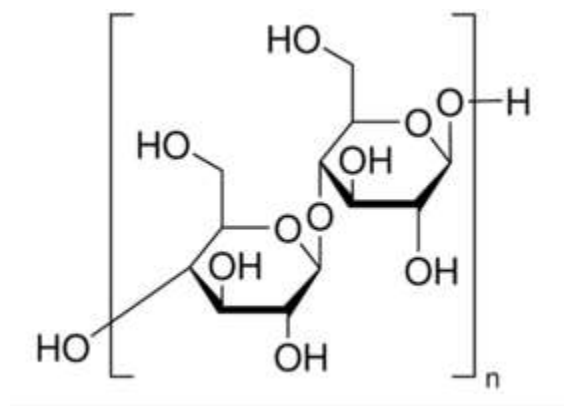
Polvo blanco o ligeramente amarillento con sabor y olor característico a sebo

$C_{18}H_{36}O_2$

Peso molecular: 284,48 g/mol

Lubricante

Anexo III. Avicel® PH 101



Celulosa microcristalina

Superdesintegrante

Anexo IV. Sistemas para determinar la morfología de CsA en NC's y materia prima

Sistemas	
Materia prima	Dispersión de CsA en agua 3%
NC's CsA, Tween 80	3% CsA 10% Tween 80
NC's CsA, 0.1%	3% CsA 0.1 % Aerosil®200
NC's CsA 1.0 %	3% CsA 1.0 % Aerosil®200

Anexo V. ANOVA talla de partícula Vs A-200 y CsA

ANOVA de dos factores: Tamaño Particula vs. Aerosil (200), [CsA]

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Aerosil (200)	4	1446579198	361644800	322.83	0.000
[CsA]	5	387720998	77544200	69.22	0.000
Interacción	20	1242359132	62117957	55.45	0.000
Error	60	67214906	1120248		
Total	89	3143874233			

S = 1058 R-cuad. = 97.86% R-cuad. (ajustado) = 96.83%

Anexo VI. ANOVA's talla de partícula día 1, 2, 5 y 11

ANOVA de dos factores: Talla de partícula (nm) día 1 vs. Angulo, Lote

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Angulo	5	1385996	277199	34.43	0.000
Lote	2	348133	174067	21.62	0.000
Interacción	10	300181	30018	3.73	0.002
Error	36	289826	8051		
Total	53	2324136			

S = 89.73 R-cuad. = 87.53% R-cuad.(ajustado) = 81.64%

ANOVA de dos factores: Talla de partícula (nm) día 2 vs. Angulo, Lote

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Angulo	5	752790	150558	26.13	0.000
Lote	2	4192	2096	0.36	0.698
Interacción	10	96249	9625	1.67	0.126
Error	36	207393	5761		
Total	53	1060624			

S = 75.90 R-cuad. = 80.45% R-cuad.(ajustado) = 71.21%

ANOVA de dos factores: Talla de partícula (nm) día 5 vs. Angulo, Lote

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Angulo	5	539918	107984	21.98	0.000
Lote	2	33335	16667	3.39	0.045
Interacción	10	112071	11207	2.28	0.034
Error	36	176870	4913		
Total	53	862194			

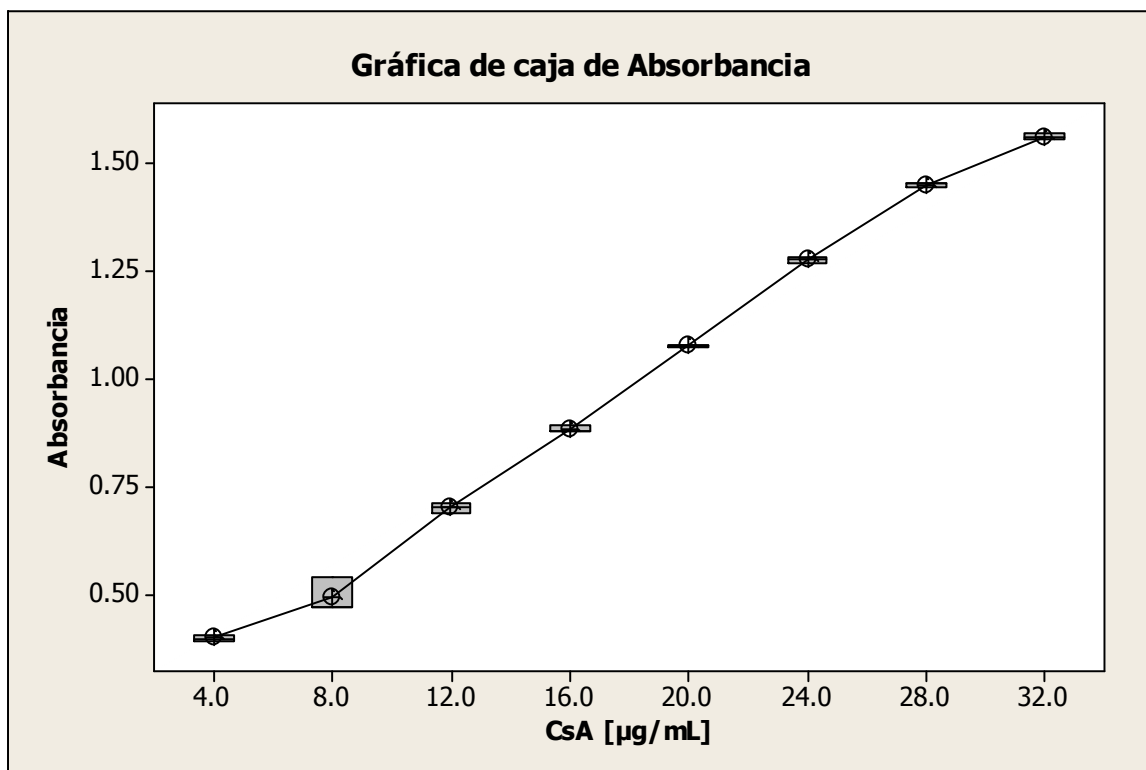
S = 70.09 R-cuad. = 79.49% R-cuad.(ajustado) = 69.80%

ANOVA de dos factores: Talla de partícula (nm) día 11 vs. Angulo, Lote

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Angulo	5	937425	187485	23.07	0.000
Lote	2	2514	1257	0.15	0.857
Interacción	10	212246	21225	2.61	0.017
Error	36	292574	8127		
Total	53	1444759			

S = 90.15 R-cuad. = 79.75% R-cuad.(ajustado) = 70.19%

Anexo VII. Curva de calibración CsA

**ANOVA unidireccional: Absorbancia vs. CsA [µg/mL]**

Fuente	GL	SC	MC	F	P
CsA [µg/mL]	7	3.961737	0.565962	2272.08	0.000
Error	16	0.003986	0.000249		
Total	23	3.965722			

S = 0.01578 R-cuad. = 99.90% R-cuad. (ajustado) = 99.86%