



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

FACULTAD DE FARMACIA

## TESIS

“Desarrollo de un polvo seco inhalable de nanoplexos de atorvastatina-chitosán con potencial uso en la hipercolesterolemia”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA  
**JUAN RODRIGO TORRES MOJICA**

DIRECTOR DE TESIS  
DR. SERGIO ALCALÁ ALCALÁ

Cuernavaca, Morelos 2022



## 1. ÍNDICE GENERAL

1.	ÍNDICE GENERAL .....	i
2.	ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	iv
3.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
4.	ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
5.	RESUMEN .....	ix
6.	ABSTRACT.....	xi
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Hipercolesterolemia.....	4
2.2	Dislipidemias.....	6
2.3	Tratamientos de las dislipidemias .....	7
2.4	Estatinas.....	8
2.5	Atorvastatina.....	9
2.6	Conjugado de polímero-fármaco como estrategia de mejora de solubilidad para ATV .....	10
2.7	Chitosán .....	11
2.8	Aplicaciones farmacéuticas del chitosán .....	12
2.9	Nanoplexos .....	13
2.9.1	Mecanismo de formación .....	13
2.10	Nanoplexos de CHI-ATV, y su impacto en la disolución.....	14
2.11	Administración pulmonar de medicamentos .....	15
2.12	Potencial de inhalación de ATV .....	16
2.13	Factores que influyen en el depósito del fármaco en la vía aérea.....	16
2.14	Dispositivos para la administración de fármacos a través de la vía pulmonar.....	18
3.	JUSTIFICACIÓN.....	23
4.	HIPOTESIS.....	24
5.	OBJETIVO GENERAL .....	25
6.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
7.	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS .....	26
8.	METODOLOGÍAS.....	28
8.1	Metodología general.....	28
8.2	Reproducción de nanoplexos CHI-ATV .....	29
8.3	Escalamiento en tamaño de partícula y de lote .....	29

8.3.1	Elaboración de nanoplexos CHI-ATV escalados y optimización del tamaño .....	30
8.4	Liofilización de los nanoplexos CHI-ATV óptimos; elección del agente crioprotector .....	31
8.5	Caracterización física de los nanoplexos CHI-ATV .....	32
8.5.1	Determinación de tamaño de partícula y potencial Z.....	32
8.5.2	Validación del método analítico.....	33
8.5.3	Determinación de la longitud de onda de máxima de absorción de ATV .....	33
8.5.4	Linealidad .....	33
8.5.5	Precisión por repetibilidad .....	33
8.5.6	Exactitud .....	34
8.5.7	Límite de detección .....	34
8.5.8	Límite de cuantificación.....	34
8.6	Eficiencia de complejación (%EC) .....	34
8.7	Rendimiento del proceso de manufactura .....	35
8.8	Eficiencia de carga (%ECr).....	35
8.9	Interacción de los componentes por espectroscopía Infrarroja .....	35
8.10	Morfología por SEM .....	36
8.11	Evaluación de la eficacia <i>in vitro</i> .....	36
8.11.1	Estudios de mucoadhesión .....	36
8.11.2	Estudios de liberación de fármaco.....	36
8.12	Formulación de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco para inhalación (DPI) y caracterización física .....	37
8.13	Pruebas reológicas.....	38
8.14	Evaluación de propiedades aerodinámicas (Deposición de polvo seco <i>in vitro</i> )..	39
9.	Resultados y discusión .....	40
9.1	Reproducción inicial de nanoplexos CHI-ATV .....	40
9.2	Escalado de los nanoplexos CHI-ATV.....	41
9.3	Optimización de los nanoplexos CHI-ATV .....	43
9.4	Microscopía óptica .....	45
9.5	Desarrollo de la metodología analítica .....	46
9.6	Obtención de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco por liofilización .....	48
9.7	Caracterización de los nanoplexos CHI-ATV optimizados como polvo seco .....	49
9.7.1	Potencial Zeta .....	49
9.7.2	Espectros infrarroja (FTIR).....	50
9.7.3	Eficiencia de complejación .....	53

9.7.4	Rendimiento del proceso.....	53
9.7.5	Morfología por SEM de nanoplexos CHI-ATV .....	54
9.7.6	Difracción de Rayos-X de polvos .....	56
9.8	Pruebas de eficacia <i>in vitro</i> .....	57
9.8.1	Pruebas de mucoadhesión.....	57
9.8.2	Perfiles de liberación.....	58
9.9	Estudios de Formulación de nanoplexos CHI-ATV como DPI .....	59
9.9.1	Morfología por SEM de nanoplexos CHI-ATV como DPI.....	61
9.9.2	Propiedades aerodinámicas (MMAD).....	61
10.	CONCLUSIÓN GENERAL .....	63
11.	PERSPECTIVAS .....	64
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	65
13.	ANEXOS .....	70
13.1	Linealidad del método analítico a pH 5.3.....	70
13.2	Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 5.3.....	70
13.3	Linealidad del método analítico a pH 7.4.....	72
13.4	Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 7.4.....	73
13.5	Porcentaje de ATV liberado en pH 7.4 .....	76

## 2. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

$\lambda$	Longitud de onda de absorción
AA	Ácido Acético
ATV	Atorvastatina
BALF	Lavado broncoalveolar. Siglas en inglés (bronchoalveolar lavage fluid)
CHI	Chitosán
cLDL	Colesterol de Lipoproteínas de Baja Densidad
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DPI	Polvo seco para inhalación
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EC	Eficiencia de Complejación
EDC	Acrónimo para 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FTIR	Espectroscopía Infrarrojo transformada de Fourier
GSD	Desviación estándar geométrica
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
IR	Infrarrojo
ICm	Intervalo de confianza de la pendiente
ICb	Intervalo de confianza del intercepto
IC	Intervalo de confianza
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
Log P	Logaritmo negativo del coeficiente de partición
min	Minutos
MMAD	Diámetro de masa media aerodinámica, siglas en inglés de Mass Median Aerodynamic Diameter.
mV	Milivoltios
nm	Nanómetros
NPP	Nanopartículas Poliméricas

<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PDI</b>	Índice de polidispersión
<b>PE</b>	Polielectrolito
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno.
<b>pKa</b>	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>% p/v</b>	Porcentaje peso/volumen
<b>PXRD</b>	Patrón de difracción de rayos X de polvos
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SCB</b>	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
<b>SEM</b>	Microscopia Electrónica de Barrido
<b>T<sub>máx</sub></b>	Tiempo donde se alcanza la concentración máxima
<b>µm</b>	Micrómetros



### 3. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la captura de LDL por los receptores específicos ....	6
<b>Figura 2.</b> Sitio en el que la estatina actúa inhibiendo a la enzima HMG-CoA reductasa para impedir la formación de mevalonato.....	8
<b>Figura 3.</b> Estructura de la ATV .....	9
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático para la preparación de nanoconjugados de chitosán-atorvastatina.....	11
<b>Figura 5.</b> Estructura química de quitina , chitosán y chitosán comercial .....	12
<b>Figura 6.</b> Formación de nanoplexos amorfos a través del autoensamblaje para producir complejos de fármaco-PE .....	14
<b>Figura 7.</b> Solubilidad de ATV pura y en nanoplexos, realizada en condiciones no <i>sink</i> .....	15
<b>Figura 8.</b> Una vista simplificada del efecto del tamaño de las partículas de aerosol en el sitio de depósito preferencial en las vías respiratorias.....	17
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de depósito del aerosol en la vía aérea.....	17
<b>Figura 10.</b> Descripción del cartucho presurizado .....	19
<b>Figura 11.</b> Esquema de DPI dosis unitaria .....	21
<b>Figura 12.</b> Esquema de DPI multidosis .....	22
<b>Figura 13.</b> Equipo de liofilización para elección del agente crioprotector.....	32
<b>Figura 14.</b> Sistema para los estudios de liberación <i>in vitro</i> .....	37
<b>Figura 15.</b> Impactador de cascada de Andersen.....	40
<b>Figura 16.</b> Gráfico de intensidad para el tamaño promedio de los nanoplexos CHI-ATV por dispersión dinámica de luz.....	41
<b>Figura 17.</b> Diagrama de efectos de Pareto para el tamaño promedio. ....	43
<b>Figura 18.</b> Superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio .....	44
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica del tamaño de talla promedio de nanoplexos CHI-ATV escalados, cuantificada por dispersión dinámica de luz .....	44
<b>Figura 20.</b> Ejemplo de nanoplexos CHI-ATV observados a 100x en cámara de Neubauer .....	46
<b>Figura 21.</b> Potencial Zeta de nanoplexos CHI-ATV escalados bajo condiciones óptimas. ....	49
<b>Figura 22.</b> Espectros IR de CHI, ATV, nanoplexos CHI-ATV y mezcla física.....	51
<b>Figura 23.</b> Micrográficas de A) Atorvastatina, B) Chitosán, C y D) Nanoplexos CHI-ATV por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	55
<b>Figura 24.</b> Patrón de difracción de Rayos X (DRX).....	56

**Figura 25.** Tamaño promedio y potencial Z de nanoplexos CHI-ATV al interactuar con mucinas.  
57

**Figura 26.** Perfil de liberación de ATV y nanoplexos CHI-ATV ..... 59

**Figura 27.** Micrografías de Nanoplexos CHI-ATV como DPI. A) Campo de visión de 82.1µm. B) Campo de visión de 5.54µm. .... 61

**Figura 28.** Espectro de absorción de la ATV en el rango de 100 a 600 nm. .... 74

**Figura 29.** Espectros de absorción UV de los materiales en la formulación de los nanoplexos... 75

#### 4. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Valores de colesterol .....	4
<b>Tabla 2.</b>	Clasificación de Fredrickson de las dislipidemias. ....	7
<b>Tabla 3.</b>	Ventajas y limitaciones de los DPI. ....	20
<b>Tabla 4.</b>	Matriz de diseño para el escalamiento de los nanoplexos CHI-ATV .....	30
<b>Tabla 5.</b>	Tipo de polvo y D50 de lactosa a ev .....	38
<b>Tabla 7.</b>	Niveles optimizados para escalar el proceso .....	45
<b>Tabla 9.</b>	Tamaño de partícula y PDI con crioprotectores.....	48
<b>Tabla 10.</b>	Bandas características presentadas en los espectros IR. ....	52
<b>Tabla 11.</b>	Eficiencia de complejación de Nanoplexos (CHI-ATV).....	53
<b>Tabla 12.</b>	Evaluación de lactosas para formulación de polvos secos para inhalar .....	59
<b>Tabla 13.</b>	Diámetro de masa media aerodinámica (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD) para los DPIs obtenidos .....	62

## 5. RESUMEN

En este proyecto se reprodujeron nanoplexos de quitosán cargados con atorvastatina (CHI-ATV), los cuales se escalaron a un tamaño para administración pulmonar y con mayor masa en el tamaño del lote; en un estudio previo en el grupo de trabajo se demostró que estos plexos presentan una mejor solubilidad acuosa del fármaco y una liberación prolongada. Debido a que el fármaco puro está clasificado como clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad) y presenta baja biodisponibilidad por vía oral, en este trabajo, se planteó generar una formulación de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco para inhalar, como alternativa para administrar ATV.

La producción inicial de los nanoplexos obtenidos presentaron una baja recuperación en masa, con un total de 35 mg de nanoplexos por lote y un tamaño de partícula pequeño (369.1 nm), lo que generó un problema para llevar el proceso a una formulación como polvo seco para inhalar a gran escala. Por ello se generó un diseño de experimentos para escalar el proceso a un tamaño de partícula promedio objetivo de entre 800 y 1000 nm y una recuperación de masa entre 500 y 1000 mg total de nanoplexos. Una vez escalado y optimizado el proceso, los nanoplexos se generaron disolviendo 398.75 mg de ATV en 5 ml de metanol (Solución A). Por otro lado, se agregaron 398.75 mg de quitosán y 502.97 mg de kolliphor-188 en una solución que consiste en 30 ml de *buffer* de acetatos pH 5.3, 20 ml de ácido acético al 1% y 10 ml de agua destilada (Solucion B). La solución "A" se agregó gota por gota a la solución "B" bajo homogenización a 15,000 rpm durante 10 minutos, generándose una suspensión acuosa de nanoplexos CHI-ATV. Los nanoplexos se recuperaron mediante centrifugación a 11,000 rpm durante 1 hora y se liofilizaron a -85 °C, utilizando manitol al 5% como crioprotector. Se caracterizaron determinando tamaño de partícula promedio, morfología, eficiencia de complejación, interacción de componentes y perfil de liberación *in vitro* a pH 7.4. Los resultados fueron concordantes con la predicción del diseño en el cual se esperaba un tamaño de partícula promedio de 1000 nm; los nanoplexos optimizados presentaron un tamaño promedio de 980.3 nm, con una eficiencia de complejación del 94.45% y un rendimiento de 82.55%. En este proyecto se generó también una formulación de los nanoplexos CHI-ATV como polvo seco para inhalar a partir de estudios de formulación realizados con dos lactosas de grado inhalable, caracterizando la densidad compactada y aparente, índice de Carr y Hausner, diámetro de masa media

aerodinámica (MMAD), cohesividad y compresibilidad. Los polvos presentaron densidad aparente de 0.25 g/mL y compactada de 0.34 g/mL, con un MMAD de 1.56  $\mu$ m. Con base en estos resultados, se determinó que la formulación de polvo seco para inhalar la cual fue de raspitose ML001 y ATV en una relación 1:1. Las pruebas de liberación de los nanoplexos escalados en pH 7.4 presentaron un sistema de liberación prolongada liberando un 80.25% de ATV en 24 horas, pudiendo sustituir las altas y repetidas dosificaciones que dan por la vía oral para este fármaco.

Se logró reproducir y escalar nanoplexos (CHI-ATV) con propiedades tecnológicas para presentar un sistema de liberación controlada. Con ellos se generó una formulación de polvo seco para inhalar la cual podría ajustar o reducir las dosis y la frecuencia de administración de la ATV para el tratamiento de la hipercolesterolemia.



## 6. ABSTRACT

In this project, atorvastatin-loaded chitosan nanoplexes (CHI-ATV) were reproduced, which were scaled to size for pulmonary administration and with higher mass in batch size; in a previous study in the working group, it was shown that these plexuses have a better aqueous solubility of the drug and a prolonged release. Due to the fact that the pure drug is classified as class II (low solubility and high permeability) and has low bioavailability by the oral route, in this work, it was proposed to generate a formulation of CHI-ATV nanoplexes as a dry powder to inhale, as an alternative to administer atorvastatin.

The initial production of the obtained nanoplexes presented a low mass recovery, with a total of 35 mg of nanoplexes per batch and a small particle size (369.1 nm), which generated a problem to take the process to a dry powder formulation to inhale on a large scale. Therefore, a design of experiments was generated to scale the process to a target average particle size of between 800 and 1000 nm and a mass recovery of between 500 and 1000 mg total nanoplexes. Once the process was scaled up and optimized, the nanoplexes were generated by dissolving 398.75 mg of atorvastatin in 5 ml of methanol (Solution A). On the other hand, 398.75 mg of chitosan and 502.97 mg of kolliphor-188 were added in a solution consisting of 30 ml of acetate *buffer* pH 5.3, 20 ml of 1% acetic acid and 10 ml of distilled water (Solution B). Solution "A" was added drop by drop to solution "B" under homogenization at 15,000 rpm for 10 minutes, generating an aqueous suspension of CHI-ATV nanoplexes. The nanoplexes were recovered by centrifugation at 11,000 rpm for 1 hour and lyophilized at -85 °C, using 5% mannitol as cryoprotectant. They were characterized by determining average particle size, morphology, complexation efficiency, component interaction (IR) and in vitro release profile at pH 7.4. The results were consistent with the prediction of the design in which an average particle size of 1000 nm was expected; the optimized nanoplexes presented an average size of 980.3 nm, with a complexation efficiency of 94.45% and a yield of 82.55%. In this project, a formulation of the CHI-ATV nanoplexes was also generated as a dry powder to inhale from formulation studies carried out with two inhalable-grade lactoses, characterizing the compacted and apparent density, Carr and Hausner index, mean mass diameter aerodynamics (MMAD), cohesiveness and compressibility. The powders presented an apparent density of 0.25 g/mL and a compacted density of 0.34 g/mL, with a MMAD of 1.56  $\mu\text{m}$ . Based on these

results, it was determined that the dry powder formulation for inhalation was raspitose ML001 and atorvastatin in a 1:1 ratio. The release tests of the scaled nanoplexes at pH 7.4 presented a prolonged release system releasing 80.25% of atorvastatin in 24 hours, being able to replace the high and repeated dosages given orally for this drug.

It was possible to reproduce and scale nanoplexes (CHI-ATV) with technological properties to present a controlled release system. With them, a dry powder formulation for inhalation was generated which could adjust or reduce the doses and frequency of administration of atorvastatin for the treatment of hypercholester

## 1. INTRODUCCIÓN

Entre los nuevos fármacos desarrollados y los medicamentos aprobados por la FDA, el 75% y el 90% de estos presentan una solubilidad deficiente o dependiente del pH junto con una alta degradación del tracto gastrointestinal y un aclaramiento presistémico, que se debe a una baja biodisponibilidad (IFA's de clase II / IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica). El mayor desafío para un farmacéutico de formulación es desarrollar una forma de dosificación simple con una mejor solubilidad o disolución del medicamento que pueda ayudar tanto a mejorar la biodisponibilidad como a minimizar los efectos adversos (Kurakula, 2015).

Atorvastatina (ATV) es un fármaco, miembro del grupo conocido como estatinas, que se utiliza para reducir los niveles de colesterol en sangre. La ATV es un fármaco que es convencionalmente administrado por vía oral, utilizado para el tratamiento del elevado colesterol, altos niveles de lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos, y para elevar el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad, pero que por esta vía posee una escasa biodisponibilidad oral (12%) (Mohammed A, 2011). Esta baja biodisponibilidad se atribuye a la baja solubilidad de este fármaco en agua, su naturaleza cristalina y el alto metabolismo hepático de primer paso. Hay muchos factores existentes que limitan el uso exitoso de la ATV administrada por vía oral, incluidos los problemas con la formulación del fármaco debido a la escasa solubilidad en agua y, lo que es más importante, la biodisponibilidad insuficiente y fluctuante obtenida después de la administración oral (Kim et al., 2008). Diferentes estrategias se han desarrollado para abatir estos problemas en los fármacos, una de ellas ha sido la aplicación de la micro- y nanotecnología.

La nanotecnología es una ciencia emergente que se ha aplicado para proporcionar nuevos materiales, sistemas y dispositivos inteligentes para mejorar las actuales aplicaciones farmacéuticas, en entre ellos se han propuesto las nanopartículas (NPs). Las NPs se

definen como dispersiones particuladas o partículas sólidas coloidales con un tamaño en el intervalo de 10-100 nm, sin embargo, las NPs farmacéuticas tiene tamaños menores a 1000 nm. Los fármacos se disuelven, atrapan, encapsulan o adhieren a matrices de nanopartículas (Kasar, 2018). Por su parte, un nanoplexos es un complejo nanoparticulado de fármacos ácidos o bases débiles con un polielectrolito de carga opuesta.

Los fármacos candidatos más prometedores para obtener nanoplexos son que presentan una baja solubilidad acuosa, los cuales como resultado generan una dosificación frecuente, lo que impone alto consumo de medicamentos y una carga financiera a los pacientes. Se han reportado, entre otras, tres principales formas para mejorar la biodisponibilidad de un fármaco cuando se administra en formas sólidas: (1) transformación del IFA en su forma de sal altamente soluble, (2) produciendo nanopartículas cristalinas de IFA y (3) entregando IFA en su forma amorfa (Kadam, 2015). Aunado a lo anterior, otras estrategias como el uso de vías de administración alternas han potenciado el uso farmacológico de los fármacos, entre ellas la ruta pulmonar.

El uso de la administración pulmonar de fármacos para tratar enfermedades pulmonares se está expandiendo rápidamente porque la administración pulmonar puede tener un mayor potencial para mejorar el efecto terapéutico de un fármaco en comparación con la administración oral y parenteral. Se espera una rápida expansión debido a la necesidad de tratamientos locales de las vías respiratorias y enfermedades sistémicas. Los pulmones son un objetivo ideal tanto para las enfermedades respiratorias como para las enfermedades sistémicas. En general, las formulaciones de administración pulmonar permite administrar dosis más altas, muestra un inicio rápido del efecto terapéutico, evitan el metabolismo de primer paso y favorecen el apego del paciente al tratamiento debido a la reducción de los efectos no deseados (Kadota, 2020). Diferentes formulaciones pulmonares hay en el mercado, que en general se enfocan al desarrollo de aerosoles líquidos o sólidos. Los aerosoles sólidos, formulados para uso en inhaladores de polvo seco, han llamado la atención debido a su estabilidad y la ausencia de propelente.

Los inhaladores de polvo seco (DPI) han proporcionado tratamientos efectivos para pacientes en todo el mundo durante más de 60 años. A lo largo de este período, los principios fundamentales de la formulación de DPI han permanecido sin cambios. Un fármaco se formula en forma de polvo en el que las partículas de fármaco son lo suficientemente pequeñas para la deposición en los pulmones. El polvo debe ser homogéneo en una escala acorde con la dosis y debe preservarse la homogeneidad durante la fabricación, envío y uso (Jeffrey G, 2015)

Es por ello que en este trabajo se desarrollaron y evaluaron nanoplexos CHI-ATV como polvos secos para inhalar como un posible uso para el tratamiento del hipercolesterolemia, ya que esta enfermedad está relacionada con ataques cardíacos los cuales son la principal causa de muerte en el mundo (OMS, 2020). Esta formulación de nanoplexos CHI-ATV como DPI, permitirá mejorar la solubilidad, biodisponibilidad y disminuir la dosis empleada por la vía oral, así como los efectos secundarios que se presentan.

## 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

### 2.1 Hipercolesterolemia

Más del 50 por ciento de las muertes y discapacidades por enfermedades cardíacas y accidentes cerebrovasculares, que en conjunto matan a más de 12 millones de personas en todo el mundo cada año, pueden reducirse mediante una combinación de esfuerzos nacionales simples y rentables y acciones individuales para reducir los principales factores de riesgo como como presión arterial alta, colesterol alto, obesidad y tabaquismo, dice la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002).

El colesterol es una grasa que circula en el torrente sanguíneo y está presente en los tejidos. Procede en parte, de los alimentos y en parte, de la fabricación por parte del organismo, principalmente en el hígado. Es una sustancia cética, útil y necesaria en muchas funciones del cuerpo humano, pero que si alcanza valores elevados (ver **Tabla 1**), puede acumularse en las paredes de las arterias y causar aterosclerosis. Estas lipoproteínas están formadas por una capa superficial, soluble en agua, y un núcleo interno insoluble. La parte exterior está compuesta de fosfolípidos, proteínas y colesterol y la parte interna contiene triglicéridos y ésteres de colesterol, en función del contenido de proteínas y del tipo de grasas que las componen (*Marián, C.C, 2008*).

**Tabla 1.** Valores de colesterol (*Marián, C.C, 2008*).

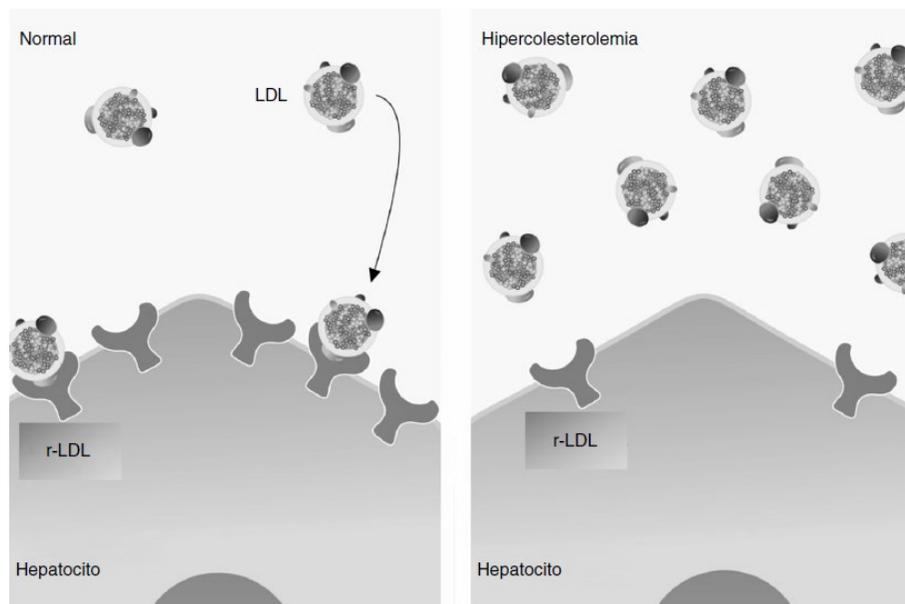
	Colesterol total (mg/dl)	cLDL (mg/dl)
Valores deseables	< 200	<135
Hipercolesterolemia leve	200-250	135-175
Hipercolesterolemia moderado	250-300	175-215
Hipercolesterolemia grave	> 300	> 215

Colesterol de Lipoproteínas de Baja Densidad (cLDL).

Se tienen principalmente de dos tipos:

- a) Lipoproteínas LDL (de baja densidad): compuestas por colesterol y una proteína llamada apoB, transportan colesterol desde el hígado hasta los tejidos. Es el popularmente conocido como «colesterol malo», relacionado con la formación de ateromas en la pared de las arterias (*Marián, C.C, 2008*).
- b) Lipoproteínas HDL (de alta densidad): compuestas por colesterol y una proteína llamada apoA. Transportan el exceso de colesterol desde los tejidos, las células y la pared arterial de nuevo al hígado. Es el llamado «colesterol bueno» que recoge el exceso de colesterol (*Marián, C.C, 2008*).

Estas lipoproteínas se acoplan a los 2 tipos de receptores específicos r-LDL y r-HDL que se encuentran en la membrana de los hepatocitos en donde son metabolizados. HDL, conocido genéricamente como «colesterol bueno» contribuye a la formación de las sales biliares; en contraste, LDL conocido como «colesterol malo» es transportado por el r-LDL al interior de la célula (ver **Figura 1**). Este receptor captura e internaliza LDL en donde es hidrolizado por los lisosomas para degradar al colesterol, entonces r-LDL se recicla para repetir su función a partir de la membrana del hepatocito (*Marián, C.C, 2008*).



**Figura 1.** Representación esquemática de la captura de LDL por los receptores específicos (Zárate, 2015)

## 2.2 Dislipidemias

Las dislipidemias son un conjunto de enfermedades asintomáticas causadas por concentraciones anormales de las lipoproteínas sanguíneas. Se clasifican por síndromes que engloban diversas etiologías y distintos riesgos cardiovasculares. Se debe establecer su etiología y la probabilidad de que causen un evento cardiovascular (Canalizo-Miranda, 2013).

Las dislipidemias, por su elevada prevalencia, aumenta el riesgo de morbilidad y muerte por diversas enfermedades y el carácter tratable de sus afecciones, y se convierten en un problema de salud en el mundo y en nuestro país por los graves daños que provoca en los pacientes afectados. La clásica clasificación de Fredrickson divide a las hiperlipidemias en seis grupos según los patrones de aumento de lípidos y de lipoproteínas: I, IIa, IIb, III, IV y V (**Tabla 2**). Una clasificación más práctica distribuye las dislipidemias en dos grupos,

primarias o secundarias. Las dislipidemias primarias responden a mutaciones genéticas (cambios en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN) y se sospechan cuando se producen signos de dislipidemia en niños, en enfermedades ateroscleróticas prematuras (en menores de 60 años) y con niveles de colesterol en sangre por encima de 6,2 mmol/L (Soca & Enrique, 2009).

**Tabla 2.** Clasificación de Fredrickson de las dislipidemias (Soca & Enrique, 2009).

Tipo	Lipoproteína aumentada	Lípidos aumentados
I	Quilomicrones	Triglicéridos
II a	LDL	Colesterol
II b	LDL Y VLDL	Colesterol y triglicéridos
III	VLDL y residuos de quilomicrones	Triglicéridos y colesterol
IV	VLDL	Triglicéridos
V	Quilomicrones y VLDL	Triglicéridos y colesterol

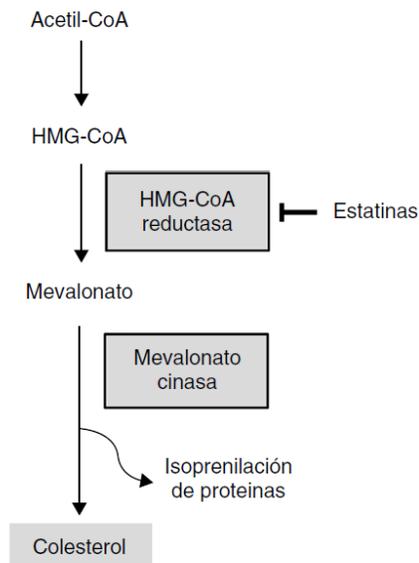
### 2.3 Tratamientos de las dislipidemias

Existen seis grupos de medicamentos: inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (estatinas), inhibidores de la absorción del colesterol (ezetimiba), secuestradores de ácidos biliares, derivados del ácido nicotínico niacina, derivados del ácido fibríco (fibratos) y ácidos grasos omega-3. Las estatinas son los medicamentos más estudiados en la prevención de la enfermedad cardiovascular. Un gran número de estudios han demostrado que disminuyen el riesgo de morbimortalidad cardiovascular, tanto en la prevención primaria como en la secundaria; también se ha demostrado que disminuyen la progresión de la aterosclerosis coronaria ya que reducen la síntesis de colesterol a nivel hepático por inhibición de la competitividad de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa. La reducción de las concentraciones a nivel intracelular del colesterol induce la expresión del receptor de LDL en la superficie del hepatocito, lo cual resulta en un aumento

de la extracción del colesterol-LDL de la sangre y secundariamente disminuye las concentraciones del colesterol-LDL circulante y apoB, incluyendo partículas de triglicéridos (Canalizo-Miranda, 2013).

## 2.4 Estatinas

Las estatinas son un grupo de fármacos que se utilizan en el tratamiento de las dislipidemias porque inhiben la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la síntesis de colesterol (**Figura 2**). Las estatinas han revolucionado la terapia de las dislipidemias, debido a que tienen un mejor perfil de eficacia y tolerabilidad que los restantes tipos de fármacos anteriormente usados para tal fin.



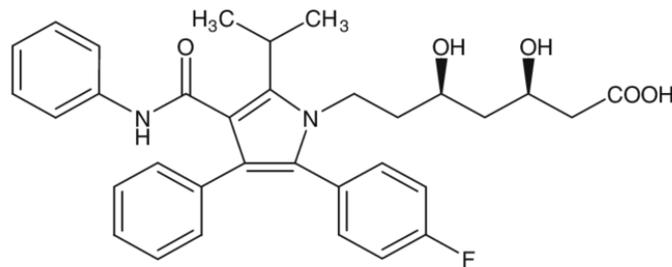
**Figura 2.** Sitio en el que la estatina actúa inhibiendo a la enzima HMG-CoA reductasa para impedir la formación de mevalonato (Zárate, 2015).

En la actualidad, se usan varios tipos de estatinas en la práctica clínica: lovastatina, pravastatina y simvastatina son derivados del metabolismo fúngico; fluvastatina y ATV, considerados de segunda generación, son sintéticos y estructuralmente distintos. Entre ellos la ATV ha destacado por ser la más selectiva para actuar a nivel hepático y, además, produce la inhibición más prolongada sobre la HMG-CoA reductasa, se cree que esta propiedad es responsable de su mayor efecto sobre los niveles sanguíneos de colesterol

LDL y de triglicéridos (Arguedas Quesada, 2002).

## 2.5 Atorvastatina

La ATV es químicamente diferente al resto de estatinas, siendo un único estereoisómero de un derivado pirrólico, es un polvo cristalino de color blanco a transparente, prácticamente insoluble en soluciones acuosas con un pH 4 o menor, muy poco soluble en agua destilada, en *buffer* de fosfato de pH 7.4 y acetonitrilo, levemente soluble en etanol y soluble en metanol. Su fórmula empírica es  $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2Ca \cdot 3H_2O$ , su estructura se muestra en la **Figura 3** y su peso molecular es de 1.209,42 g (González, C. M, 2013).



**Figura 3.** Estructura de la ATV (Arayne, Mohammed, 2010).

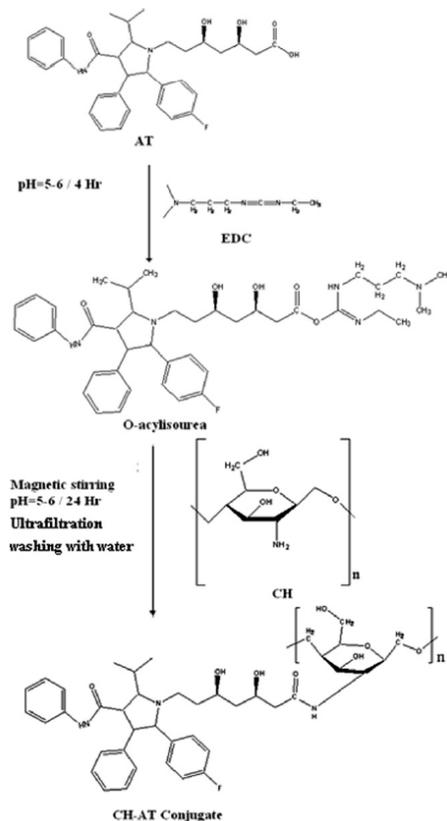
Las concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{max}$ ) se alcanzan al cabo de 1 a 2 horas, La semivida de la ATV es de 20 h aproximadamente, la ATV tiene una semivida prolongada, lo cual permite administrar dicha estatina a cualquier hora del día. La dosis inicial es de 10 mg, y la máxima, de 80 mg/día. En cambio su biodisponibilidad se sitúa en torno a un 12% debido al aclaramiento presistémico en la mucosa digestiva y al metabolismo de primer paso en el hígado (Bruton, L. 2015).

Lograr los efectos terapéuticos es posible si administramos una mayor dosis de fármaco, pero dan lugar a efectos adversos indeseables relacionados con la dosis. Principalmente, la miotoxicidad y la hepatotoxicidad se observan como efectos secundarios adversos, que se manifiestan como miopatía, rabdomiolosis,

cardiomiopatía, sensibilidad muscular, miositis, pruebas de función hepática elevada e histopatología desordenada del hígado tratado (Mathur & Devi Vemula, 2018).

## **2.6 Conjugado de polímero-fármaco como estrategia de mejora de solubilidad para ATV**

Los conjugados polímero-fármaco como un tipo especial de sistema de administración de fármacos han atraído una atención considerable debido a sus propiedades terapéuticas particulares, como la vida media prolongada y una biodisponibilidad mejorada. Los conjugados fármacos/polímero a menudo tienen como objetivo aumentar el área de superficie, la solubilidad y la humectabilidad de las partículas de polvo y, por lo tanto, se centran en la reducción del tamaño de las partículas o la generación de estados amorfos. El conjugado CHI-AT se desarrolló previamente en el grupo de trabajo, se preparó utilizando una reacción de acoplamiento amida entre la amina del chitosán y el grupo carboxilo de la ATV. Se activó una solución al 10% (p/v) de ATV en metanol (5 ml) mediante tratamiento con EDC (125 mM, 1 ml) durante 4 h a temperatura ambiente para producir una forma éster de AT (**Figura 4**). Por separado, se preparó una solución acuosa de CHI al 1% (p/v) después de hidratar el CHI con HCl 1 N (5 ml). A continuación, se añadió gota a gota la solución metanólica de AT a la solución acuosa ácida de CHI con agitación magnética continua (Mohammed A, 2011).

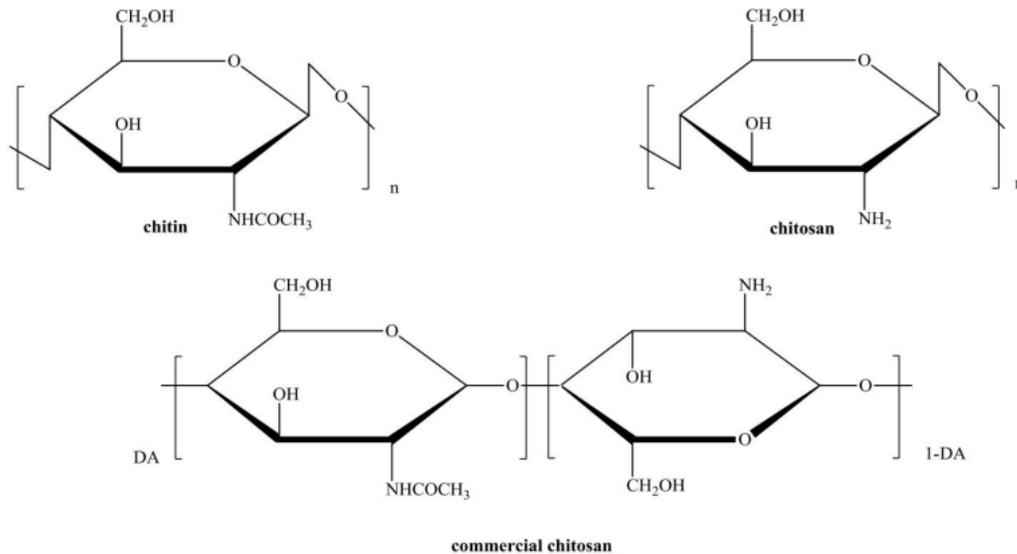


**Figura 4.** Diagrama esquemático para la preparación de nanoconjugados de chitosán-atorvastatina (Mohammed A, 2011).

## 2.7 Chitosán

El CHI es un producto desacetilado del polímero conocido como quitina es un carbohidrato que forma parte de las paredes celulares de los hongos, del resistente exoesqueleto de los artrópodos y algunos órganos de otros animales como las quetas de anélidos o los perisarcos de cnidarios (McGavin, 2000). Es un polímero de carga catiónica es biodegradable, biocompatible, no inmunogénico y no tóxico, lo que ayuda a su uso en sistemas de administración de fármacos por vía oral u otras. Su estructura química se muestra en la **Figura 5**. Con un pKa de 6.5, es ligeramente soluble en medio ácido pero insoluble en medio neutro o alcalino. Dependiendo del grado de

despolimerización está disponible como de bajo peso molecular, medio y alto, con diferentes densidades de carga catiónica y viscosidades. La diferencia en las densidades de carga catiónica y las concentraciones de estabilizador puede tener un efecto significativo en la fabricación de nanopartículas, la estabilidad y su desempeño *in vivo* (Kurakula et al., 2015).



**Figura 5.** Estructura química de quitina , chitosán y chitosán comercial (Morin-Crini et al., 2019).

## 2.8 Aplicaciones farmacéuticas del chitosán

Las principales propiedades utilizadas en el campo farmacéutico son: liberación controlada del fármaco, por ejemplo, el naproxeno antiinflamatorio, también es utilizado por sus propiedades mucoadhesivas y gelificantes *in situ*, propiedades potenciadoras de la transfección (el ácido desoxirribonucleico y los fármacos a base de ácido ribonucleico de interferencia pequeña forman complejos estables con CHI) y potenciadoras de la permeación (Morin-Crini et al., 2019).

El CHI se ha mostrado prometedor para su uso en diferentes aplicaciones biomédicas debido a su alta área de superficie específica y alta porosidad. Por ejemplo, el CHI se ha utilizado en suturas quirúrgicas, implantes dentales, piel artificial renovable, reconstrucción

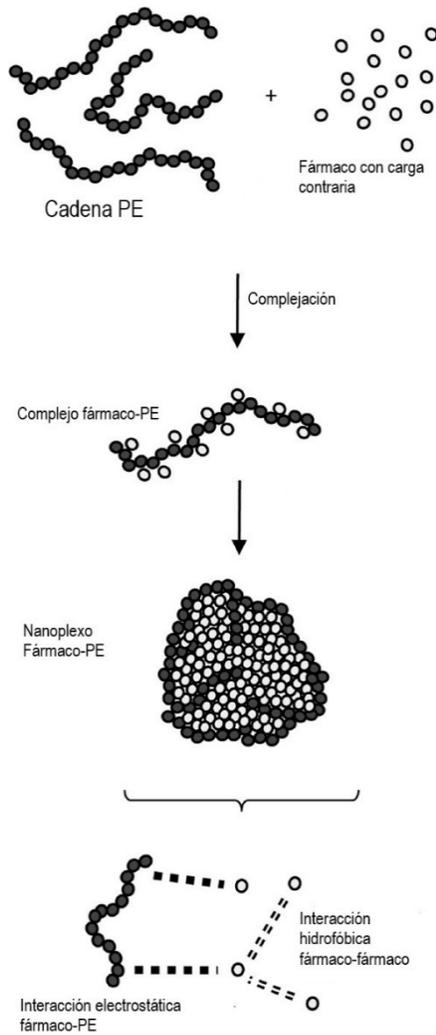
ósea, lentes de contacto, liberación controlada de fármacos para animales y humanos, y como material de encapsulación (Badwan et al., 2015).

## **2.9 Nanoplexos**

Un nanoplexos es un complejo de nanopartículas de fármacos con un polielectrolito de carga opuesta. Se hace que un fármaco catiónico o aniónico interactúe con un polielectrolito de carga opuesta para formar un nanoplexos. Los candidatos más prometedores son fármacos que presentan una baja solubilidad en saturación en la fase acuosa. Hacer estos fármacos más solubles es el objetivo de la investigación en la actualidad porque estos fármacos presentan una baja biodisponibilidad oral (Kadam et al., 2015).

### **2.9.1 Mecanismo de formación**

El fármaco insoluble en agua se disuelve primero en un medio ácido o básico para formar un soluto de fármaco aniónico o catiónico. Posteriormente, la solución de fármaco ionizado se mezcla con una solución de polielectrolito con carga opuesta, que inicia la interacción electrostática fármaco-polielectrolito y simultáneamente la neutralización de la carga. El soluto del fármaco se transforma de nuevo a su forma escasamente soluble tras la neutralización de la carga, lo que lleva a una pérdida de solubilidad y, por tanto, se produce una rápida precipitación y formación del complejo fármaco-polielectrolito a nanoescala. La combinación de precipitación rápida y fuertes interacciones electrostáticas entre el fármaco y el polielectrolito evita que las moléculas del fármaco se ensamblen en estructuras cristalinas ordenadas. Como resultado, se forma un complejo amorfo de nanopartículas de fármaco-polielectrolito (**Figura 6**) (Kadam et al., 2015).



**Figura 6.** Formación de nanoplexos amorfos a través del autoensamblaje para producir complejos de fármaco-PE (Cheow & Hadinoto, 2012).

## 2.10 Nanoplexos de CHI-ATV, y su impacto en la disolución

Los nanoplexos podrían mejorar de manera significativa la solubilidad de fármacos en medios acuosos, aumentando su biodisponibilidad en el organismo y disminuyendo las reacciones adversas ocasionadas por las fluctuaciones debido a la administración de dosis

constantes durante el día. Como podemos observar en la gráfica (**Figura 7**) la ATV presentó una solubilidad de 27.04 µg/ml, mientras que los nanoplexos de ATV presentaron una solubilidad de 137.18 µg/ml, es decir una solubilidad cinco veces mayor a la de la ATV en su estado puro (Arquieta J, 2019).



**Figura 7.** Solubilidad de ATV pura y en nanoplexos, realizada en condiciones no *sink*.(Arquieta, 2019)

Este incremento en el valor de la solubilidad podría explicarse por un fenómeno en el que el CHI inhiba la precipitación de ATV en el equilibrio, este fenómeno lo han descrito algunos autores como efecto resorte-paracaídas, el cual consiste en mantener un estado de saturación en el medio mediante el uso de inhibidores de la precipitación como lo son algunos polímeros (Arquieta J, 2019).

## 2.11 Administración pulmonar de medicamentos

La vía pulmonar constituye una ruta muy interesante tanto para el tratamiento local de enfermedades de las vías aéreas como para la administración sistémica de fármacos, sobre todo para aquellos que son poco solubles en medio acuoso o que muestren escasa biodisponibilidad por otras vías, como la oral. Son muchas las ventajas que ofrece el pulmón como lugar de aplicación. Por ejemplo, su elevada área superficial, el fino epitelio alveolar, la facilidad que tienen los fármacos para atravesar la membrana pulmonar y su extenso flujo. Todo ello permite la absorción elevada y rápida de muchos fármacos. Además, la tasa de degradación de los fármacos es baja debido a la escasa actividad enzimática intra y extracelular. Esto permite que aquellos compuestos con baja magnitud

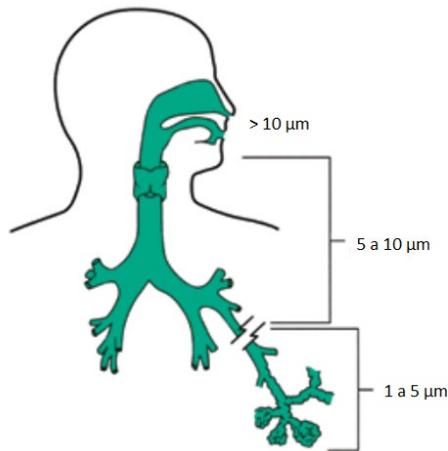
de absorción puedan ser absorbidos con relativa eficacia tras la administración pulmonar (Guerra-Morillo et al, 2020).

## **2.12 Potencial de inhalación de ATV**

Para evitar desafíos relacionados con la administración oral de ATV, una alternativa es la administración por inhalación, directamente en los pulmones, lo que proporcionará una alta concentración pulmonar local y un efecto sistémico, disminuyendo los efectos secundarios sistémicos, evitan el metabolismo de primer paso en comparación con las estatinas orales y, al mismo tiempo, mejoran la biodisponibilidad de ATV. Un estudio en animales después del enfisema inducido por elastasa encontró que 10 min de administración inhalada de ATV (1, 5 y 20 mg) disminuyeron significativamente los niveles de leucocitos en BALF en todos los grupos tratados con ATV, macrófagos en solo el grupo A20 mg y neutrófilos tisulares en los grupos de A5 mg y A20 mg (Tulbah, 2020).

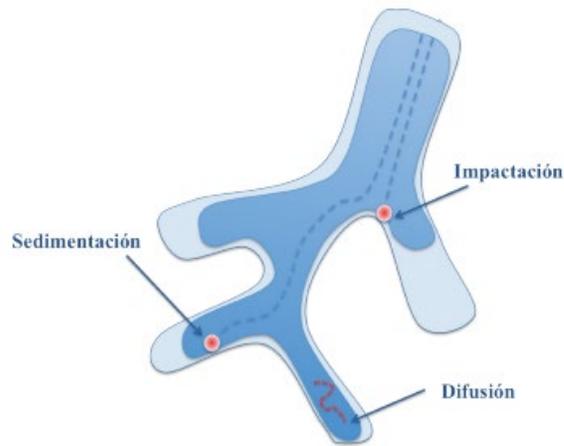
## **2.13 Factores que influyen en el depósito del fármaco en la vía aérea**

En los aerosoles coexisten partículas de distinto tamaño. Las partículas se clasifican y se miden en función del diámetro de la masa media aerodinámica (MMAD) el cual es el término que se utiliza para caracterizar a los aerosoles en función de su diámetro, y se define como el diámetro de partículas alrededor del cual la masa total del aerosol está igualmente distribuida. Por ejemplo un aerosol con MMAD de 2.5  $\mu\text{m}$  contiene 50% de la masa por debajo de 2.5  $\mu\text{m}$  y el otro 50% por arriba de ese diámetro.(Martínez-Martínez & Salgado-Aguilar, 2003) El tamaño de las partículas aerosolizadas es muy importante, ya que para que se depositen de forma adecuada en la pequeña vía aérea y en los alveolos, deben tener tamaños entre 0.5 y 5 micras (**Figura 8**).



**Figura 8.** Una vista simplificada del efecto del tamaño de las partículas de aerosol en el sitio de depósito preferencial en las vías respiratorias (Douglas S, 2017).

Las de mayor tamaño impactan en orofaringe y en las grandes vías respiratorias. Tamaños inferiores a 0.5 micras se exhalan con la espiración, no se sedimentan y no parecen tener implicación terapéutica (Casanueva et al, 2019). En la **Figura 9** se representan los diferentes mecanismos.



**Figura 9.** Mecanismos de depósito del aerosol en la vía aérea (Casanueva et al, 2019).

**Impactación.** Este mecanismo se observa generalmente para inhaladores de polvo seco (IPS) e inhaladores de dosis medidas (MDI) con tamaños de partícula de masa media de diámetro aerodinámico (MMAD) mayores a  $5\ \mu\text{m}$ , en donde las partículas de aerosol pasan a través de la orofaringe a alta velocidad y con suficiente impulso que, cuando entra a las vías respiratorias se mantiene su trayectoria sin importar como vaya cambiando la dirección de la corriente de aire, chocando así con la pared respiratoria y depositándose en las regiones de la orofaringe (Paranjpe & Müller-Goymann, 2014).

**Sedimentación.** En este mecanismo la fuerza gravitacional es la responsable de la deposición de las partículas, ya que va a depender de las maniobras de respiración del paciente para que las partículas tengan mayor tiempo para sedimentarse, por ejemplo conteniendo la respiración, esto ocurre principalmente en la región de los bronquiolos, aunque algunas veces también pueden llegar hasta los alvéolos, se da principalmente con partículas con tamaños entre  $0.5$  y  $5\ \mu\text{m}$  (Paranjpe & Müller-Goymann, 2014).

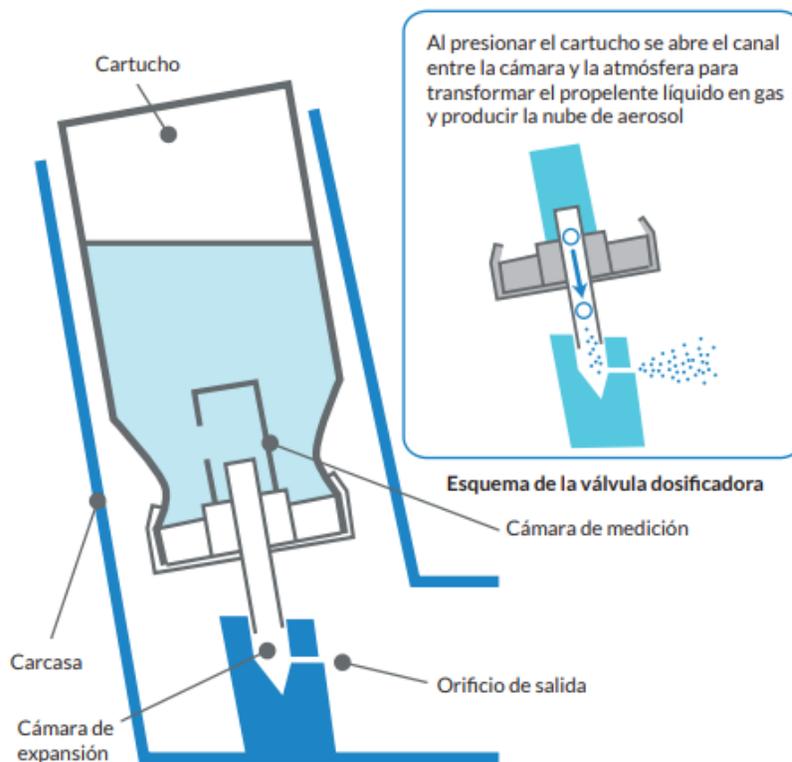
**Difusión.** En este mecanismo los movimientos brownianos son los responsables de la deposición de las partículas. Las moléculas que están en el tensoactivo pulmonar acuoso provocan un movimiento aleatorio de las partículas cuando entran en contacto con dichas moléculas (Paranjpe & Müller-Goymann, 2014).

## **2.14 Dispositivos para la administración de fármacos a través de la vía pulmonar.**

Los dispositivos de inhalación administran el fármaco terapéutico por vía tópica a las vías respiratorias. El fármaco puede estar en forma de polvo de partículas de fármaco micronizadas, una solución o una suspensión. Los inhaladores varían en cuanto a la eficacia de administración del fármaco en las vías respiratorias inferiores según la forma del dispositivo, la resistencia interna de los inhaladores de polvo seco (DPI), la formulación del medicamento, el tamaño de las partículas, la velocidad de la columna de aerosol

producida de la dosis media presurizada (pMDI) y facilidad de uso. Por lo tanto, cada tipo de dispositivo de inhalación tiene sus ventajas y desventajas (Nelson, 2016).

**Inhaladores de cartucho presurizado (pMDI).** Los pMDI constan de un cartucho presurizado, metálico, en el que el fármaco se encuentra almacenado en fase líquida a presión, disuelto en el propelente como una solución, o también puede hallarse como una suspensión, en la que las partículas del principio activo se encuentran en fase sólida suspendidas en el propelente líquido (**Figura 10**). Al ser presionado el dispositivo por el paciente expone el interior de la válvula del cartucho a la presión atmosférica, transformando el líquido en gas, como microgotas que contienen el principio activo (GEMA, 2020).



**Figura 10.** Descripción del cartucho presurizado (GEMA, 2020).

**Inhaladores de polvo seco (DPI).** Son una alternativa a los pMDI cuando existen problemas de coordinación entre la activación del dispositivo y la inhalación. Contienen el principio activo en forma de polvo que se libera tras la inspiración activa del paciente. El aerosol que se genera es de tipo heterodisperso y el tamaño de las partículas respirables que se originan depende del flujo inspiratorio del paciente y de la técnica inhalatoria. Son dispositivos accionados por el flujo inspiratorio del paciente. No contienen propelentes y proporcionan un buen depósito pulmonar (GEMA, 2020).

El flujo inspiratorio genera una caída de presión entre la entrada del dispositivo y la boquilla lo que produce el arrastre del polvo desde el reservorio del fármaco (blíster o cápsula). El esfuerzo inspiratorio del paciente también disgrega el polvo en partículas finas (Rubio, C. 2016). En la **Tabla 3** se muestran algunas ventajas y limitaciones de los DPI.

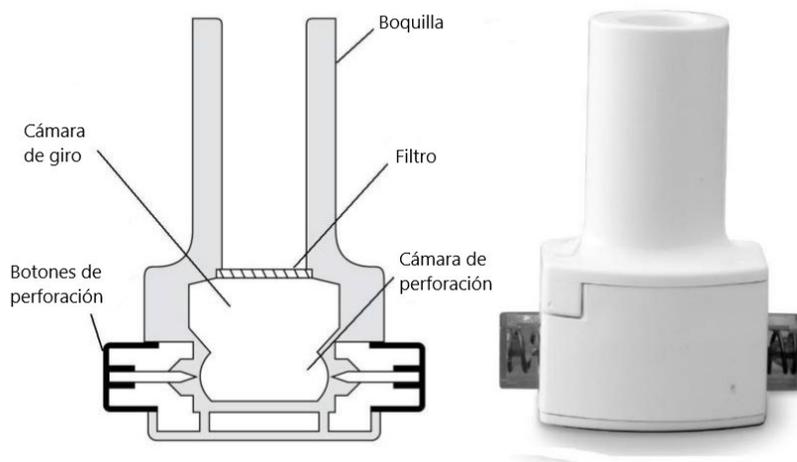
**Tabla 3.** Ventajas y limitaciones de los DPI (GEMA, 2020).

<b>Ventajas de los inhaladores de polvo seco en general</b>	<b>Limitaciones de los inhaladores de polvo seco en general</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficacia clínica igual o superior a los pMDI convencionales.</li> <li>• Son pequeños, de fácil manejo y discretos.</li> <li>• Fácil coordinación entre la pulsación y la inhalación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precisan de una inspiración voluntaria y con flujos más altos que los pMDI. Flujo inspiratorio de 30- 60 L/min, según el dispositivo.</li> <li>• En algunos casos, si se sopla dentro del dispositivo, se pierde la dosis preparada.</li> <li>• En espacios con humedad el fármaco, puede apelmazarse con el vehiculizante y ser ineficaz, motivo por el cual deben conservarse en lugar seco</li> </ul>

- 
- No utilizan gases propulentes contaminantes
  - Tienen un indicador de dosis.
  - La dosis liberada del fármaco es uniforme
  - No se pueden utilizar en pacientes con ventilación mecánica.
  - Son más caros que los pMDI.
- 

- **Sistemas unidosis**

Fueron los primeros que se desarrollaron. Se trata de cápsulas con una sola dosis del fármaco que son perforadas por agujas al accionar el dispositivo y quedan preparadas para la inhalación (Casanueva et al, 2019) (**Figura 11**). Necesitan mayor flujo inspiratorio que los sistemas multidosis( De la Hija Díaz MB, 2007).

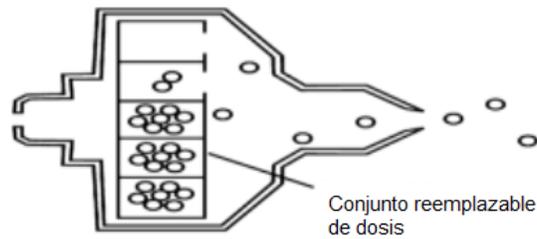


**Figura 11.** Esquema de DPI dosis unitaria (Kendre, 2016).

- **Multidosis**

Son los que se empezaron a conocer como de “segunda generación” y surgieron para

facilitar el empleo de los dispositivos anteriores. Presentan las dosis separadas (**Figura 12**) (predosificados, contenidas en blíster en el interior del dispositivo, como son Accuhaler®, Spiromax®, Nexthaler®). También pueden presentar la dosis en un depósito reservorio de fármaco que libera una dosis cada vez que se requiere por parte del paciente (Rubio, C. 2016).



**Figura 12.** Esquema de DPI multidosis (Kendre, 2016)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a la baja biodisponibilidad de la ATV por vía oral generada por su poca solubilidad en agua y al metabolismo hepático de primer paso, el uso de este fármaco provoca una administración de dosis muy alta generando efectos adversos indeseables relacionados con la dosis, como anomalías hepáticas, rabdomiólisis e insuficiencia renal.

Debido a los problemas que presenta la administración oral de ATV y siendo esta vía la única vía empleada hasta el momento, el presente trabajo de investigación propone una formulación de nanoplexos previamente desarrollados de ATV como polvo seco para inhalación el cual sea reproducible y cuente con características específicas para que pueda ser administrado por vía inhalatoria.

#### **4. HIPOTESIS**

Es posible reproducir, escalar y caracterizar nanoplexos CHI-ATV y formularlos como polvos secos con mezclado directo, los cuales presentarán propiedades tecnológicas aerolizables y bioadhesivas adecuadas para ser administrado por vía pulmonar, con una liberación prolongada que permita ofrecer una potencial alternativa para tratar la hipercolesterolemia.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un polvo seco inhalable de nanoplexos CHI-ATV con potencial uso en el hipercolesterolemia.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Reproducir y caracterizar nanoplexos CHI-ATV mediante el método de nanoprecipitación para generar la materia prima de los estudios siguientes
- Escalar el proceso de obtención de los nanoplexos CHI-ATV haciendo uso de un diseño experimental y una metodología de superficie de respuesta para obtener una masa y tamaño de partícula adecuados para la administración pulmonar.
- Desarrollar y validar métodos analíticos empleando espectrofotometría UV para la correcta determinación de eficiencia de complejación y el rendimiento de los nanoplexos CHI-ATV.
- Realizar caracterización física de los nanoplexos CHI-ATV utilizando técnicas como dispersión dinámica de luz, microscopía electrónica y óptica, difracción de rayos-x e infrarrojo para conocer las propiedades de los nanoplexos CHI-ATV y poder generar una formulación como polvo seco para inhalar.
- Evaluar *in vitro* la eficacia de los nanoplexos CHI-ATV obtenidos mediante estudios de liberación, pruebas de bioadhesión y propiedades aerodinámicas para conocer su comportamiento a condiciones deseadas.
- Desarrollar una formulación de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco para inhalar para poder administrarlo por la vía pulmonar y con potencial uso en el tratamiento del hipercolesterolemia.

## 7. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

### Reactivos

#### Fármaco

- ❖ Atorvastatina de calcio (DVA MEXICANA)

#### Polímero

- ❖ Chitosán (bajo peso molecular, 75-85 % desacetilado, SIGMA-ALDRICH ®)

#### Tensoactivo

- ❖ Kolliphor® 188 (SIGMA-ALDRICH®)

#### Soluciones

- ❖ *Buffer* de acetatos pH 5.3
- ❖ *Buffer* de fosfatos pH 7
- ❖ Ácido acético glacial 1%

#### Excipientes

- ❖ Lactosa (Lactohale® 200)
- ❖ Lactosa (Raspitose® ML001)
- ❖ Manitol
- ❖ Trehalosa
- ❖ Isoleucina

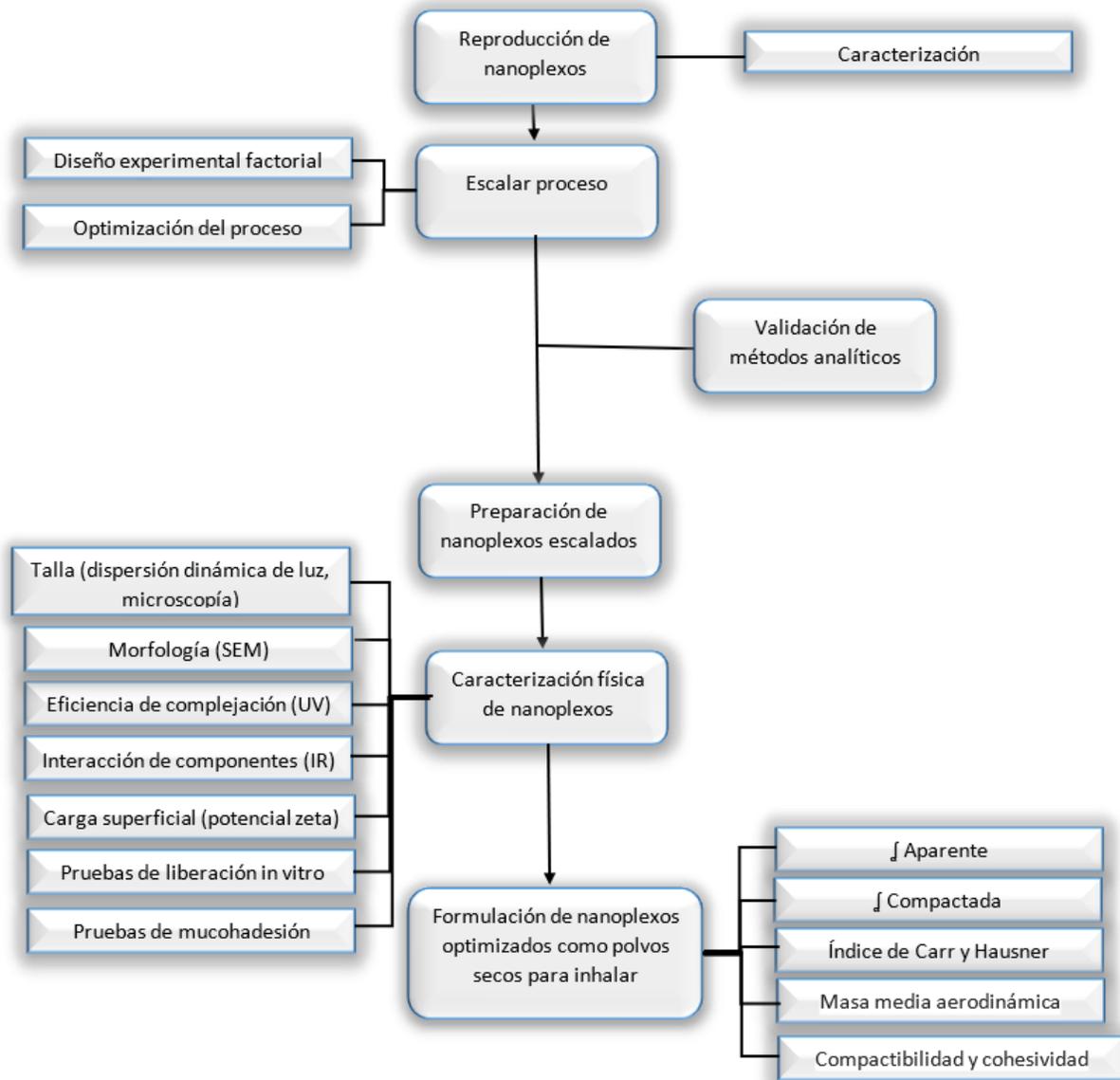
#### Equipos

- ❖ Homogeneizador de alto corte (Heidolph® silentcrusher)
- ❖ Potenciómetro (Jenco® VisionPlus pH 6175)
- ❖ Espectrofotómetro (Cary 60 UV/Vis)
- ❖ Zetasizer® (Nano-ZS90) marca Malvern
- ❖ Balanza analítica (Explorer OHAUS®)

- ❖ Agitador magnético (Biomega research products)
- ❖ Liofilizadora Benchtop® Pro
- ❖ Termocirculador Sous vide, marca PolyScience
- ❖ Vortex (Science MED)
- ❖ Parrilla múltiple de agitación, marca VARIOMAG-USA.

## 8. METODOLOGÍAS

### 8.1 Metodología general



## 8.2 Reproducción de nanoplexos CHI-ATV

Se tomó como referencia el método para la obtención de nanoplexos de CHI-ATV de un tamaño objetivo de 400 nm, generados por Arquieta-Flores Josué et al. (Arquieta J, 2019), siguiendo el diseño previamente optimizado por los autores. Los nanoplexos se prepararon en un total de 30 ml de solución, en la que la solución A consistió en preparar 15 ml de *buffer* de acetatos pH 5.3, 10.5 ml de ácido acético 1% y 4.5 ml de agua desionizada. Después se agregaron 22 mg de CHI a la solución A manteniéndola en agitación durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 195 mg de Pluronic® F68 a la solución A y se dejó en agitación durante otros 5 minutos. Enseguida se preparó una solución B disolviendo 22 mg de ATV en 3 ml de metanol, dejando en agitación durante 2 minutos. Por último, se vertió la solución B en la A gota a gota bajo homogenización a 15000 rpm durante 10 minutos.

## 8.3 Escalamiento en tamaño de partícula y de lote

Con el objetivo de escalar la obtención de nanoplexos CHI-ATV a un total por lote de 500 mg (partiendo de 80 mg), con un tamaño promedio de partícula objetivo entre 800 y 1000 nm (esta fue empleada como variable de respuesta). Para esto se elaboró un diseño experimental factorial, cuya matriz de diseño se muestra en la **Tabla 4**, en el que se plantearon diferentes niveles para 3 factores de estudio;  $X_1$ : concentración de polímero (CHI),  $X_2$ : concentración de estabilizante (Kolliphor® 188) y  $X_3$ : volumen de disolución (*Buffer* acetatos 5.3-ácido acético glacial 1%). El diseño se generó con el *software* Statgraphics® centurión XVIII.

**Tabla 4.** Matriz de diseño para el escalamiento de los nanoplexos CHI-ATV

Experimentos	Chitosán (mg)	Estabilizante (mg)	Volumen (ml)
1	22	1500	60
2	220	1500	60
3	22	1500	30
4	22	195	60
5	22	195	30
6	506	900	30
7	506	900	60
8	220	1800	60

### 8.3.1 Elaboración de nanoplexos CHI-ATV escalados y optimización del tamaño

Con base en la combinación de niveles del diseño experimental se siguió el procedimiento descrito en el punto 8.2. Una vez obtenido el análisis del diseño y el modelo predictivo a través de Metodología de Superficie de Respuesta, se predijeron los niveles óptimos de los factores para obtener nanoplexos CHI-ATV con una media de tamaño de 1000 nanómetros, buscando este valor como objetivo a través del modelo experimental obtenido.

Ya obtenidos los valores predichos de optimización, los nanoplexos CHI-ATV objetivos se prepararon de la siguiente manera: el volumen de disolución se estableció en 60 ml de solución, como solución A, que consiste en preparar 30 ml de *buffer* de acetatos pH 5.3, 21 ml de ácido acético y 9 ml de agua desionizada. Después se agregaron 290 mg de CHI a la solución A manteniéndola en agitación durante 5 minutos. Posteriormente se le agregó 220 mg de Kolliphor-188 y se dejó en agitación durante otros 5 minutos. Enseguida se preparó una solución B disolviendo 290 mg de ATV en 5 ml de metanol, dejando en

agitación durante 2 minutos. Por último, se vertió la solución B en la A rápidamente bajo homogenización a 10000 rpm durante 10 minutos para generar la suspensión de los nanoplexos CHI-ATV y evaporar parte del disolvente orgánico. Los nanoplexos CHI-ATV obtenidos se recuperaron por centrifugación de la solución a 14000 rpm por una hora en tubos Falcón de 15 ml.

#### **8.4 Liofilización de los nanoplexos CHI-ATV óptimos; elección del agente crioprotector**

Para el proceso de liofilización se realizó un estudio que tuvo por objetivo de elegir un agente crioprotector adecuado para los nanoplexos CHI-ATV, se evaluó el efecto de tres crioprotectores sobre las propiedades de los nanoplexos CHI-ATV obtenidos, como la capacidad de no generar agregados, estabilidad física o la posibilidad para formar mezclas físicas con excipientes: manitol, trehalosa e isoleucina, a tres concentraciones diferentes (1, 3 y 5 %w/v).

Los nanoplexos CHI-ATV recuperados por centrifugación se resuspendieron en agua destilada, agregando la cantidad de crioprotector necesaria para preparar las soluciones correspondientes. Estas suspensiones de nanoplexos CHI-ATV se liofilizaron al vacío a 80 °C por 24 horas (**Figura 13**). Una vez concluido el tiempo de liofilización, los polvos secos se resuspendieron en agua midiendo el tamaño de partícula, para determinar qué condiciones serían las más adecuadas para obtener nanoplexos CHI-ATV no agregados. El estudio se realizó por triplicado para cada concentración evaluada.



**Figura 13.** Equipo de liofilización para elección del agente crioprotector

## **8.5 Caracterización física de los nanoplexos CHI-ATV**

### **8.5.1 Determinación de tamaño de partícula y potencial Z**

El tamaño de partícula y el potencial z se determinaron por dispersión dinámica de luz utilizando el equipo Zetasizer® Nan-ZS90. Para determinar el tamaño de los nanoplexos CHI-ATV en el diseño experimental se diluyeron 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de nanoplexos CHI-ATV con 1000  $\mu\text{l}$  de agua desionizada en una celda para determinación de tamaño, determinando así el tamaño de partícula a 25 °C, utilizando *buffer* de acetatos pH 5.3 como medio dispersante. Para los nanoplexos CHI-ATV liofilizados, una muestra pequeña (punta de espátula) se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Para el potencial Z se realizó el mismo procedimiento, pero la dilución se colocó en una celda capilar plegada (DTS1070).(Zetasizer Nano ZS, 2020.)

### **8.5.2 Validación del método analítico**

Se validó un método analítico por espectrofotometría UV-Vis, evaluando la selectividad en dos pHs (5.3 y 7.4). El método a pH 5.3 fue empleado para la determinación de la eficiencia de complejación, mientras que el método a pH 7.4 se utilizó para la cuantificación de ATV en las pruebas de liberación *in vitro*.

En el estudio de validación se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño: Linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación

### **8.5.3 Determinación de la longitud de onda de máxima de absorción de ATV**

Una vez logrado el escalamiento de los nanoplexos CHI-ATV, se desarrolló un método analítico utilizando espectroscopía UV y se validaron sus parámetros con base en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos Biólogos de México (CNQFBM, AC 2002). Para la determinación de la longitud de onda de máxima absorción se preparó una solución de ATV 0.002 %p/v en metanol y se realizó un barrido en el área de 200 a 600 nm. (INAME. 2016)

### **8.5.4 Linealidad**

Se preparó una solución *stock* con 10 mg de ATV aforados con 10 ml de metanol, a partir de esta se tomaron 5 matraces aforados para preparar las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml posteriormente, determinando la absorbancia por triplicado a 246 nanómetros en el espectrofotómetro Cary 60 UV/Vis. Se calculó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de variación (CV).

### **8.5.5 Precisión por repetibilidad**

Se preparó una solución *stock* con 10 mg de ATV aforados con 10 ml de metanol, a partir de esta se tomaron 5 matraces aforados para preparar las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml posteriormente, determinando la absorbancia

por triplicado a 246nm en el espectrofotómetro Cary 60 UV/Vis. Se calculó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de variación (CV).

#### **8.5.6 Exactitud**

Se prepararon 3 concentraciones iguales a las del método de precisión y se leyeron a 246 nm, con base en sus absorbancias se determinó el porcentaje de recobro y los intervalos de confianza (95% de confianza).

#### **8.5.7 Límite de detección**

Se evaluó el límite de detección mediante la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. La determinación se realizó mediante a siguiente ecuación:

$$\sigma = \text{Desviación estándar del intercepto} \quad LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

**S** = Pendiente

#### **8.5.8 Límite de cuantificación**

Se evaluó el límite de detección mediante la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. La determinación se realizó mediante a siguiente ecuación:

$$\sigma = \text{Desviación estándar del intercepto} \quad Lc = \frac{10\sigma}{S}$$

**S** = Pendiente

### **8.6 Eficiencia de complejación (%EC)**

La evaluación se determinó a partir de los nanoplexos CHI-ATV escalados y optimizados. La suspensión de nanoplexos CHI-ATV se centrifugó a 11000 rpm durante una hora, posteriormente se tomaron muestras del sobrenadante para tres diferentes lotes y se leyó en el espectrofotómetro UV/VIS a 246 nm, obteniendo la absorbancia y haciendo el cálculo

correspondiente para determinar la concentración de ATV libre con la siguiente ecuación: (Arquieta J, 2019)

$$\text{Eficiencia de complejación, (\%EC)} = \left[ \frac{(M_i - M_n)}{M_i} \right] 100$$

Donde  $M_i$  es la cantidad de ATV añadida y  $M_n$  es la cantidad de ATV no conjugada o libre.

### 8.7 Rendimiento del proceso de manufactura

Se determinó el rendimiento de los nanoplexos CHI-ATV, mediante la siguiente ecuación, en el que la masa total de nanoplexo producido se refiere a la masa de nanoplexo recuperada después de la liofilización ( $M_n$ ) y  $M_t$  es la cantidad de ATV y CHI añadidos.

$$\text{Rendimiento = (\%)} = \left[ \frac{(M_n)}{M_t} \right] 100$$

### 8.8 Eficiencia de carga (%ECr)

Se pesaron 10 mg de nanoplexos CHI-ATV liofilizados y se disolvieron en 3 ml de metanol. Se tomó 1 ml de esta solución y se añadieron 2 ml de agua destilada, se agitó con ayuda de un vortex por 2 minutos y se midió su absorbancia con ayuda del espectrofotómetro UV a 246 nm de longitud de onda. Se determinó la concentración de ATV contenida en la masa partículas, expresando la eficiencia de carga con la siguiente ecuación.

$$\%ECr = \frac{\text{Masa ATV}}{\text{Masa nanoplexos}} \times 100$$

### 8.9 Interacción de los componentes por espectroscopía Infrarroja

Se tomaron alrededor de 3 mg de las materias primas (Kolliphor 188, chitosán,

atorvastatina), una mezcla física de atorvastatina-chitosán y los nanoplexos CHI-ATV optimizados. Los espectros infrarrojos fueron adquiridos por Agilent Technologies® Carry 630 FTIR (Santa Clara, CA, Estados Unidos). Se colocaron muestras de materias primas, en una celda ATR de diamante horizontal para registrar el espectro infrarrojo. Las mediciones representaron un promedio de 150 escaneos con una resolución de 16.

### **8.10 Morfología por SEM**

La morfología y la microestructura de los nanoplexos CHI-ATV se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido, SEM (MAIA3, TESCAN, Triglav™, Seúl, Corea del Sur) y se observaron utilizando un voltaje de aceleración de 6,5 kV después del recubrimiento por pulverización con oro al vacío (SEC, MCM- 100). La secuencia del procedimiento ocurre de la siguiente manera: Las muestras se colocan sobre la cinta de carbón la cual está adherida a los soportes de aluminio y después se recubren con oro.

### **8.11 Evaluación de la eficacia *in vitro***

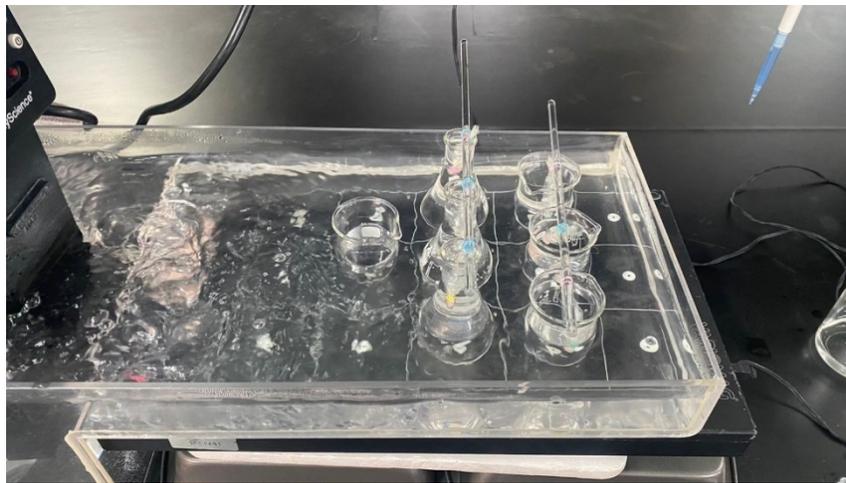
#### **8.11.1 Estudios de mucoadhesión**

En este estudio se utilizó mucina tipo II al 1 %p/v en solución. Se pesaron 10 mg de nanoplexos CHI-ATV optimizados y se resuspendieron en 10 mL de solución de mucina. Las soluciones obtenidas se colocaron en un baño maría a 37°C con agitación magnética a 100 rpm. Las muestras anteriores se analizaron a 37 °C diferentes tiempos, 60, 120, 180 y 240 min, determinando su tamaño de partícula y su potencial zeta utilizando el zetasizer® nano ZS90 siguiendo la metodología ya descrita.

#### **8.11.2 Estudios de liberación de fármaco**

Las pruebas se realizaron con 40 mg de nanoplexos CHI-ATV, los cuales contenían una cantidad equivalente de 10 mg de ATV. También se colocaron en el estudio muestras de 10 mg de ATV pura con fines comparativos. Ambas muestras fueron colocadas en una membrana de diálisis (corte de peso molecular: 14000 Da), con 500 µL de *buffer* de fosfatos pH 7.4 para hidratar los polvos. Después las bolsas se sumergieron en vasos de

precipitado que contenían 200mL de *buffer* de fosfatos pH 7.4 como medio de liberación. Los vasos se colocaron en baño maría a una temperatura de 37 °C, bajo agitación magnética a 100 rpm (**Figura 14**). Se tomaron muestras a los siguientes tiempos; 0.08, 0.016, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, las cuales se midieron por medio de espectrofotómetro UV-Vis con el método validado. La muestra sustraída fue reemplazada con la misma cantidad de *buffer* para mantener el volumen constante y condiciones “*sink*”. (O’Donnell, K. 2011). Los estudios se realizaron por triplicado, reportando el perfil de liberación, en gráficos de porcentaje liberado contra el tiempo.



**Figura 14.** Sistema para los estudios de liberación *in vitro*.

### **8.12 Formulación de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco para inhalación (DPI) y caracterización física**

Se realizaron mezclas físicas de nanoplexos CHI-ATV con lactosas para inhalación, mediante mezclado directo. Las lactosas evaluadas se resumen en la **Tabla 5**, evaluando dos diferentes proporciones lactosa:nanoplexos CHI-ATV (1:1 y 2:1). Las mezclas se realizaron colocando una masa de nanoplexos CHI-ATV constante de 10 mg en un tubo de ensayo, agregando la cantidad de lactosa correspondiente a la proporción a evaluar. Se mezclaron manualmente por 15 minutos hasta obtener una mezcla de polvos

visualmente homogénea.

**Tabla 5.** Propiedades de lactosas inhalables usadas

Nombre comercial	Tipo de lactosa	D50 ( $\mu\text{m}$ )
ML001	Polvo	37-61
LH200	Polvo grueso	50-100

D50: Diámetro medio aritmético.

### 8.13 Pruebas reológicas

Con cada una de las mezclas o DPIs obtenidos se determinó la densidad aparente y compactada. Para ello se colocó una masa de 750 mg de polvo en una probeta de vidrio de 10 ml, registrando el volumen inicial (aparente), se procedió a dejar caer la probeta a 5 cm de altura 250 veces registrando el volumen cada 50 y se registró el volumen final (compactado). Con los datos obtenidos y las siguiente formulas se determinaron los siguientes parámetros reológicos:

- *Densidad Aparente* ( $\rho_a$ ) =  $\frac{m}{V_i}$
- *Densidad compactada* ( $\rho_c$ ) =  $\frac{m}{V_f}$
- *índice de carr* =  $100(V_i - V_f)/V_i$
- *índice de Hausner* ( $HR$ ) =  $\frac{V_i}{V_f}$

Donde:

m= masa de la muestra (g)

$V_i$ = Volumen inicial (ml)

$V_f$ = Volumen final (ml)

Para determinar la cohesividad y la compactabilidad se aplicó el modelo de Kawakita en

la que se graficó:

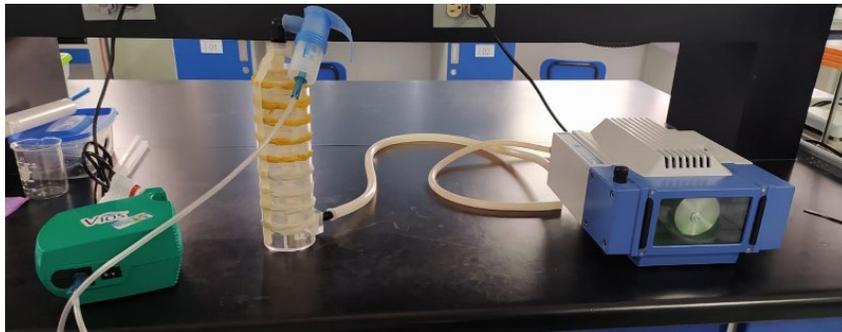
$$\frac{N}{C} = \frac{N}{a} + \frac{1}{ab}$$

Donde

- a es 1/m donde m es pendiente
- b es el la ordenada al origen
- C es el grado de reducción de volumen
- N es el número de asentamientos

#### 8.14 Evaluación de propiedades aerodinámicas (Deposición de polvo seco in vitro)

El diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) se determinó usando un impactador en cascada de ocho etapas(**Figura 15**). Se colocaron tres dosis de 50 mg de cada formulación directamente en un DPI de disco vacío que se conectó a un adaptador de boquilla que luego se sujetó al puerto de inducción en el impactador.



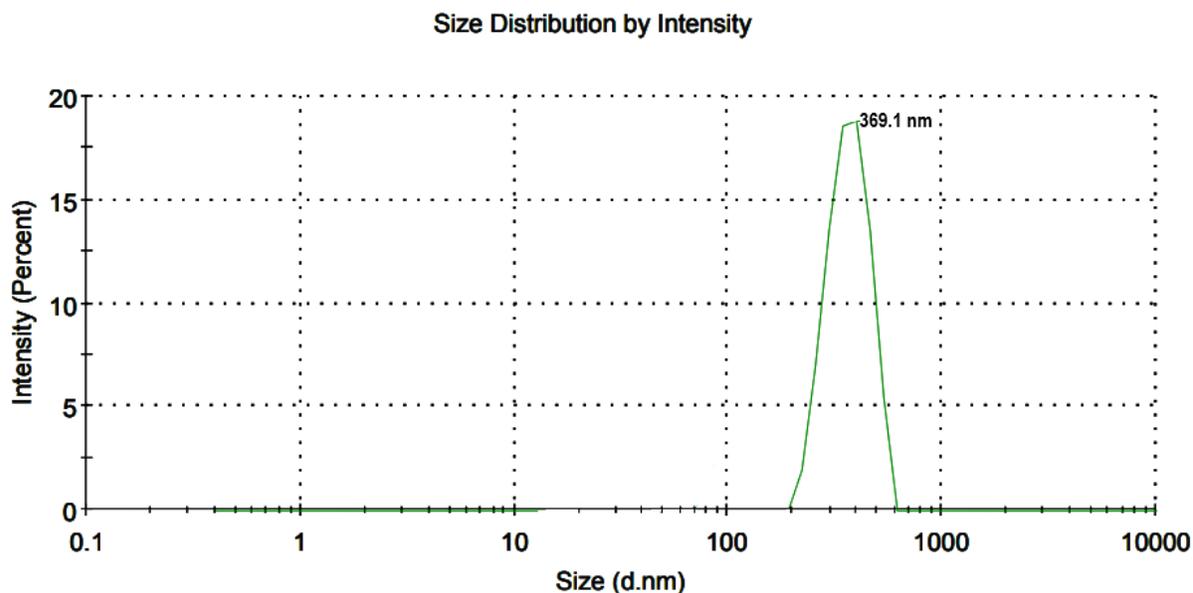
**Figura 15.** Impactador de cascada de Andersen

Todas las evaluaciones se realizaron a un caudal de aire volumétrico de 28,3 L por minuto durante 60 s a temperatura ambiente. La masa de partículas depositadas en cada etapa del impactador se determinó midiendo la diferencia de peso de cada etapa antes y después de realizar el experimento. Los diámetros de corte aerodinámicos efectivos para cada etapa fueron: etapa 0= 9  $\mu\text{m}$ ; etapa 1= 5,8  $\mu\text{m}$ ; etapa 2= 4,7  $\mu\text{m}$ ; etapa 3= 3,3  $\mu\text{m}$ ; etapa 4= 2,1  $\mu\text{m}$ ; etapa 5= 1,1  $\mu\text{m}$ ; etapa 6= 0,7  $\mu\text{m}$ ; etapa 7= 0,4  $\mu\text{m}$ . La masa acumulada de polvo menor que el diámetro de corte efectivo como porcentaje de la masa total recuperada en el ACI se representó frente al diámetro de corte efectivo. El MMAD es el tamaño de partícula en el que la línea cruzó el percentil 50.

## **9. Resultados y discusión**

### **9.1 Reproducción inicial de nanoplexos CHI-ATV**

Se reprodujeron los nanoplexos CHI-ATV a partir de los parámetros obtenidos por el autor Josué Arquieta (Arquieta J, 2019) para evaluar la reproducibilidad del método. En la **(Figura 16)** se observa la talla promedio de los nanoplexos CHI-ATV reproducidos, observándose un tamaño promedio de 369.1 nm con un índice de polidispersión de 0.32, los cual corresponden con los valores reportados por Aquieta-Flores y colaboradores.



**Figura 16.** Gráfico de intensidad para el tamaño promedio de los nanoplexos CHI-ATV por dispersión dinámica de luz

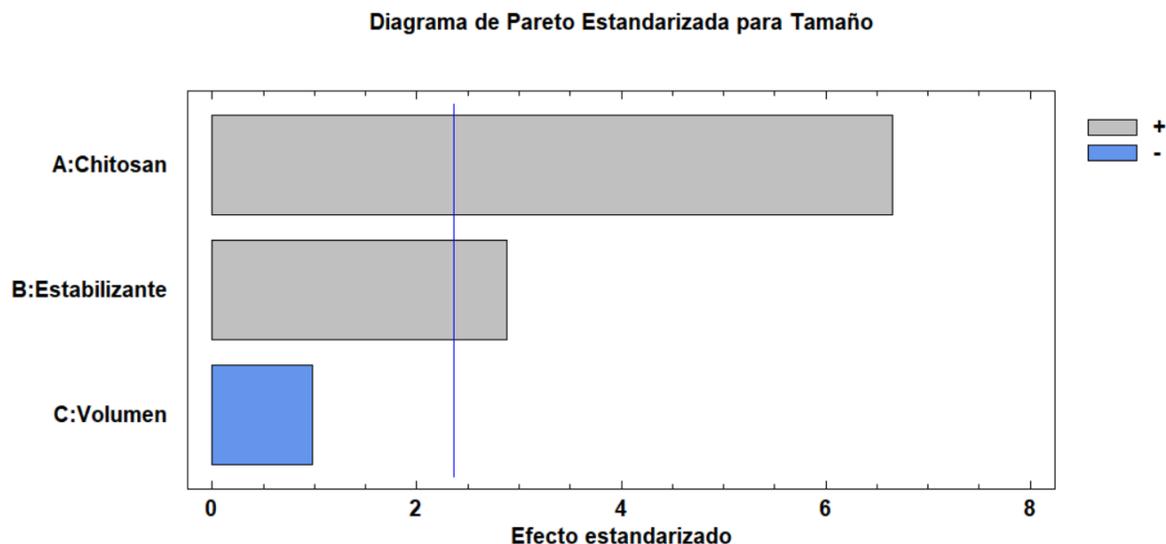
## 9.2 Escalado de los nanoplexos CHI-ATV

Para este estudio se utilizó un diseño factorial ya que este tipo de diseños permite evaluar el efecto principal de los factores que se consideraron influyentes sobre una variable de respuesta, que en este caso fue el tamaño de partícula promedio de los nanoplexos CHI-ATV. En este diseño se estudió el efecto de la concentración del CHI, del estabilizante y el volumen de disolución. En la **Tabla 6** se muestran los tamaños promedio obtenidos para cada una de las corridas o experimentos establecido en el diseño experimental.

**Tabla 6.** Matriz de diseño para el escalado de nanoplexos CHI-ATV

Experimentos	Chitosán (mg) (X1)	Estabilizante (mg) (X2)	Volumen (ml) (X3)	Tamaño (nm)
1	22	1500	60	508
2	220	1500	60	1072
3	22	1500	30	882
4	22	195	60	396
5	22	195	30	350
6	506	900	30	1260
7	506	900	60	1375
8	220	1800	60	985

En el diseño experimental se observa un rango de tamaños entre las zonas micro y nanométricas, lo que se considera bueno para procesarlos en un análisis estadístico por metodología de superficie de respuesta para poder obtener las condiciones experimentales para generar nanopartículas con un tamaño objetivo de entre 800 a 1000. En la **Figura 17** se muestra el diagrama de Pareto, en el que se representa el grado de importancia o de efecto que tienen los diferentes factores sobre el tamaño de partícula. Se aprecia que la concentración de CHI y de estabilizante tienen un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la talla promedio, ya que rebasan la línea de significancia. También se observa que tienen un efecto positivo lo que significa que a mayor concentración de CHI y estabilizante mayor será el tamaño promedio. En cuanto al volumen resultó ser un factor no significativo sobre el tamaño, pero se determinó que tienen un valor negativo ya que los valores más pequeños de tamaño de partícula arrojados se obtuvieron a un volumen menor.

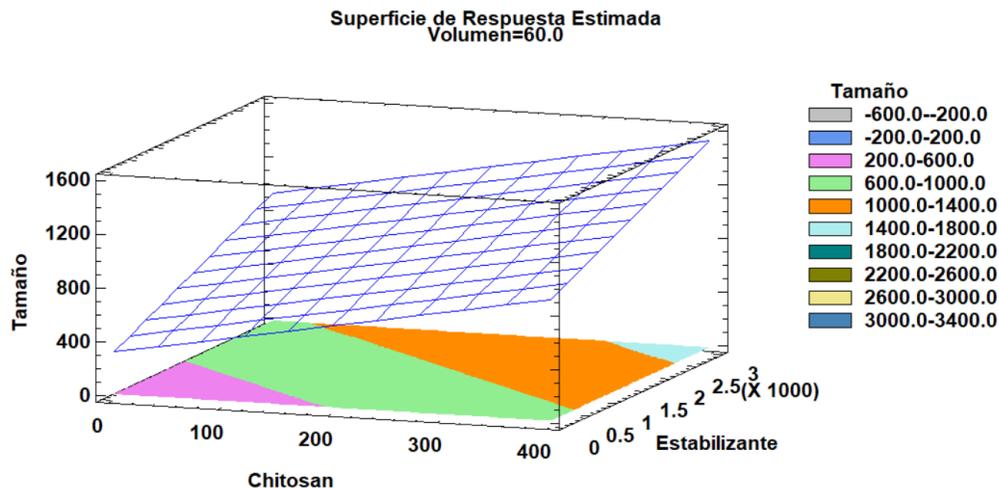


**Figura 17.** Diagrama de efectos de Pareto para el tamaño promedio.

Justificando el comportamiento del CHI en el cual el tamaño de partícula disminuye a menor concentración se debe a que se reduce la cantidad de grupos amonio ( $\text{NH}_3^+$ ) presentes en el chitosán que pueden interactuar con los iones carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) de la ATV, por lo cual el tamaño de los nanoplexos CHI-ATV tiende a ser menor.

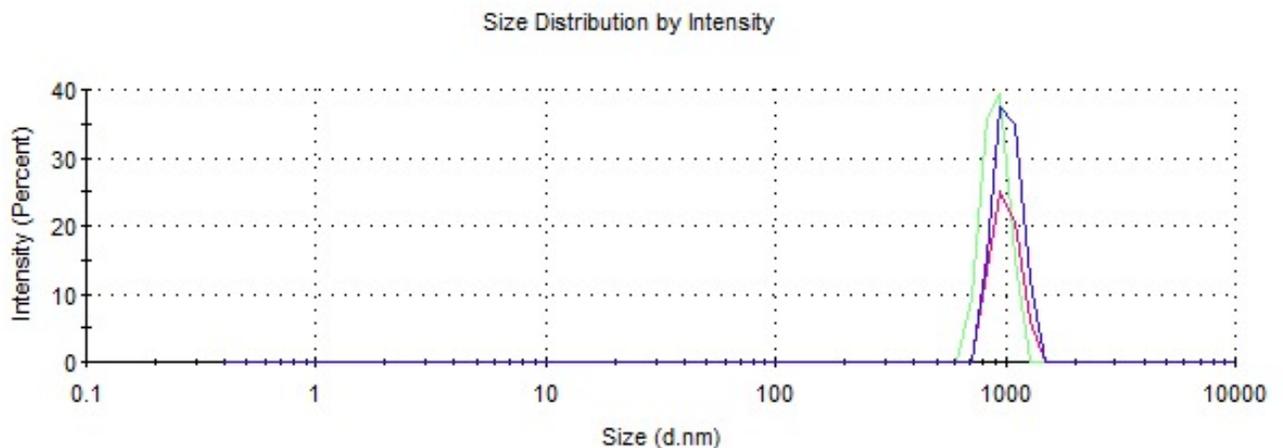
### 9.3 Optimización de los nanoplexos CHI-ATV

Para el proceso de optimización de los nanoplexos CHI-ATV se utilizó la metodología de superficie de respuesta. En la **Figura 18** se muestra el gráfico de superficie estimada en la que se observan las zonas de superficie que estiman tamaños de nanoplexos CHI-ATV en diferentes rangos. El modelo obtenido se ajustó a la siguiente ecuación “Tamaño =  $484.078 + 1.47266\text{Chitosan} + 0.211917\text{Estabilizante} - 2.83142 \cdot \text{Volumen}$ ”, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del 85.6 %. Este modelo fue significativo ya que nos permitió identificar un tamaño de partícula teórico (zona verde).



**Figura 18.** Superficie de respuesta estimada para el tamaño promedio

A partir del modelo ajustado se predijeron los niveles de los factores donde es posible obtener nanoplexos CHI-ATV de 1000 nm (objetivo de optimización). En la **Figura 19** se muestra el tamaño promedio de los nanoplexos CHI-ATV obtenidos bajo condiciones óptimas, empleando nuevamente la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Como se puede observar, los nanoplexos CHI-ATV presentaron un tamaño aproximado de 980nm, el cual es similar al tamaño predicho por el modelo estadístico.



**Figura 19.** Representación gráfica del tamaño de talla promedio de nanoplexos CHI-ATV escalados, cuantificada por dispersión dinámica de luz

Con base en los resultados obtenidos en el diseño de experimentos, se produjeron tres lotes de nanoplexos CHI-ATV a las condiciones predichas para validar el modelado. En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos.

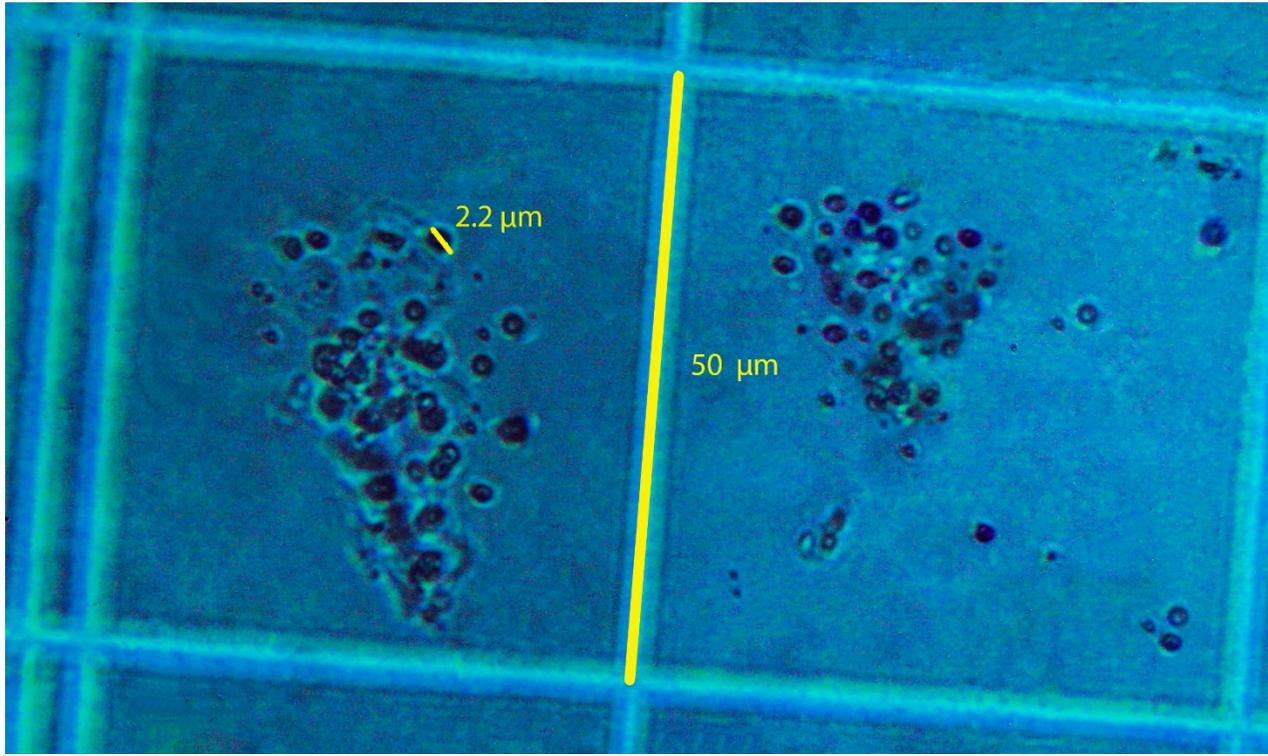
**Tabla 7.** Niveles optimizados para escalar el proceso

Factor	Niveles predichos	Respuestas (Y <sub>1</sub> : Tamaño promedio)		Error en la predicción
		Estimada	Observada	
<b>Estabilizante</b>				
<b>X1</b>	502.97 mg			
<b>Chitosán</b>				
<b>X2</b>	398.75 mg	1000 nm	980 ± 2.2 nm	1.97 %
<b>Volúmen</b>				
<b>x3</b>	60 ml			

El modelo utilizado fue de utilidad ya que se obtuvo un tamaño de 980 ± 2.2 nm, con un error de predicción del 1.97%.

#### 9.4 Microscopía óptica

Para verificar morfología y tamaño promedio, los nanoplexos CHI-ATV se analizaron con un método de microscopía óptica, midiendo el diámetro promedio de 200 partículas de nanoplexos CHI-ATV depositadas en una cámara de Neubauer (**Figura 20**) a 100x. Se calculó el tamaño promedio con un valor de 1.24 micrómetros. También se pueden apreciar partículas de forma esférica y regular.



**Figura 20.** Ejemplo de nanoplexos CHI-ATV observados a 100x en cámara de Neubauer

### 9.5 Desarrollo de la metodología analítica

En un barrido espectrofotométrico UV-Vis de 200 a 600 nm se observó que la ATV presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 246 nm (**Figura 27 en anexos**). Esto concuerda con lo reportado en la bibliografía (INAME, 2016), por lo que se consideró esta longitud de onda para realizar la validación de los métodos analíticos.

Para fines del proyecto se desarrollaron dos métodos, uno a pH 5.3 con la finalidad de evaluar la eficiencia de complejación y uno a pH 7.4 para determinar el perfil de disolución. La validación se llevó a cabo con base en los lineamientos establecidos en la FEUM 11va

edición volumen 11 y en la Guía de Validación de métodos analíticos editada por QFB de México (CNQFBM, AC 2002). Los parámetros que se evaluaron fueron linealidad, exactitud, repetibilidad y límites de detección y cuantificación. Los criterios o especificaciones para cada uno de estos parámetros de desempeño y los resultados obtenidos se encuentran en la siguiente tabla (ver **Tabla 8**)

**TABLA 8. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

PARÁMETRO	Criterio	Resultado		Cumple
		pH 5.3	pH 7.4	
<b>LINEALIDAD</b>	CV ≤ 2% R <sup>2</sup> ≥ 0.98 ICm no debe incluir el cero	CV: 1.70 % 0.9992 0.037 a 0.039	1.75 % 0.9988 0.037 a 0.039	Sí
<b>PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)</b>	CV ≤ 2%	1.32%	0.73%	Sí
<b>EXACTITUD</b>	CVrecobro ≤ 2 % ICrecobro, debe incluir el 100 %	1.17 % 98.97 % a 100.77 %	1.29% 99.89 % -a 101.90 %	Sí
<b>ESPECIFICIDAD</b>	Sin interacción en longitud de onda	No existe interacción en la longitud de onda (figura 27 anexos)	No existe interacción en la longitud de onda	Si
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>	-	0.197µg/ml	0.23µg/ml	-
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>	-	0.596µg/ml	0.70µg/ml	-

IC = intervalo de confianza a 95%. CV = Coeficiente de variación. m = pendiente

Con base en los resultados obtenidos se determinó que los métodos analíticos cumplen con los criterios establecidos y son aptos para cuantificar ATV en las etapas del proyecto que se indicaron, por lo que se consideran confiables para su uso de este proyecto.

### 9.6 Obtención de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco por liofilización

Para obtener nanoplexos CHI-ATV como polvo seco se procedió a determinar el mejor crioprotector, el que actúe como conservante de la estructura y tamaño de los nanoplexos CHI-ATV ante la liofilización. En la **Tabla 9** se muestran los crioprotectores evaluados y sus porcentajes usados. Con base en el tamaño de partícula y el PDI de los nanoplexos CHI-ATV obtenidos después de liofilizar se determinó que el manitol al 5% se emplearía en la formulación de los nanoplexos CHI-ATV como medio protector para el proceso de liofilización ya que preservó el tamaño y la estructura inicial de los nanoplexos CHI-ATV.

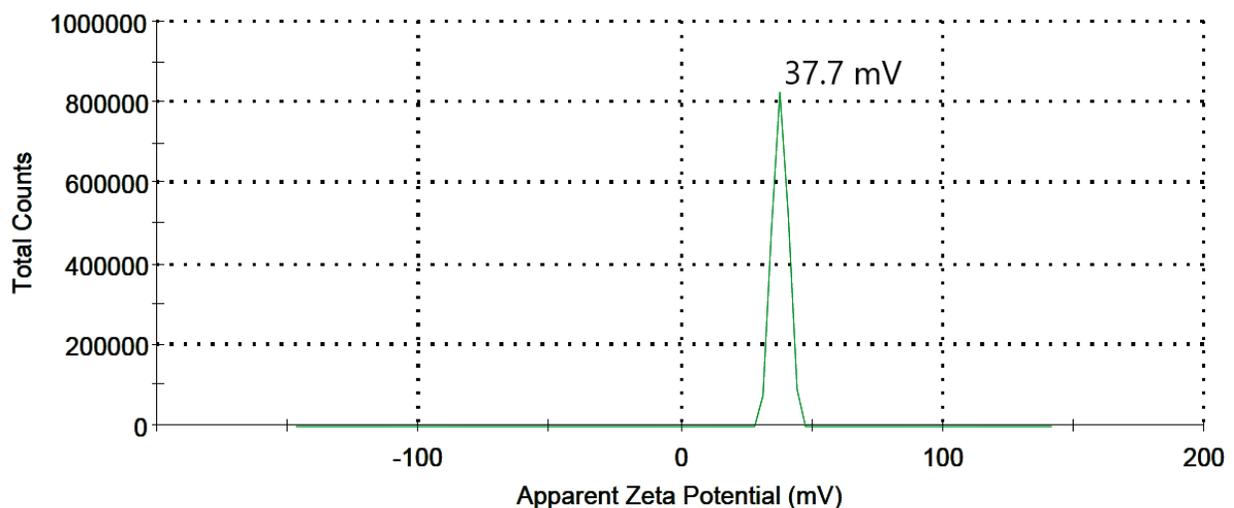
**Tabla 9.** Tamaño de partícula y PDI con crioprotectores

Crioprotector	Trehalosa	
%	Tamaño (nm)	PDI
1	1545	0.632
3	1232	0.611
5	1032	0.443
	Manitol	
1	1347	0.557
3	1140	0.627
<b>5</b>	<b>1007</b>	<b>0.409</b>
	Isoleucina	
1	2806	0.780
3	2286	0.562
5	2135	0.643

## 9.7 Caracterización de los nanoplexos CHI-ATV optimizados como polvo seco

### 9.7.1 Potencial Zeta

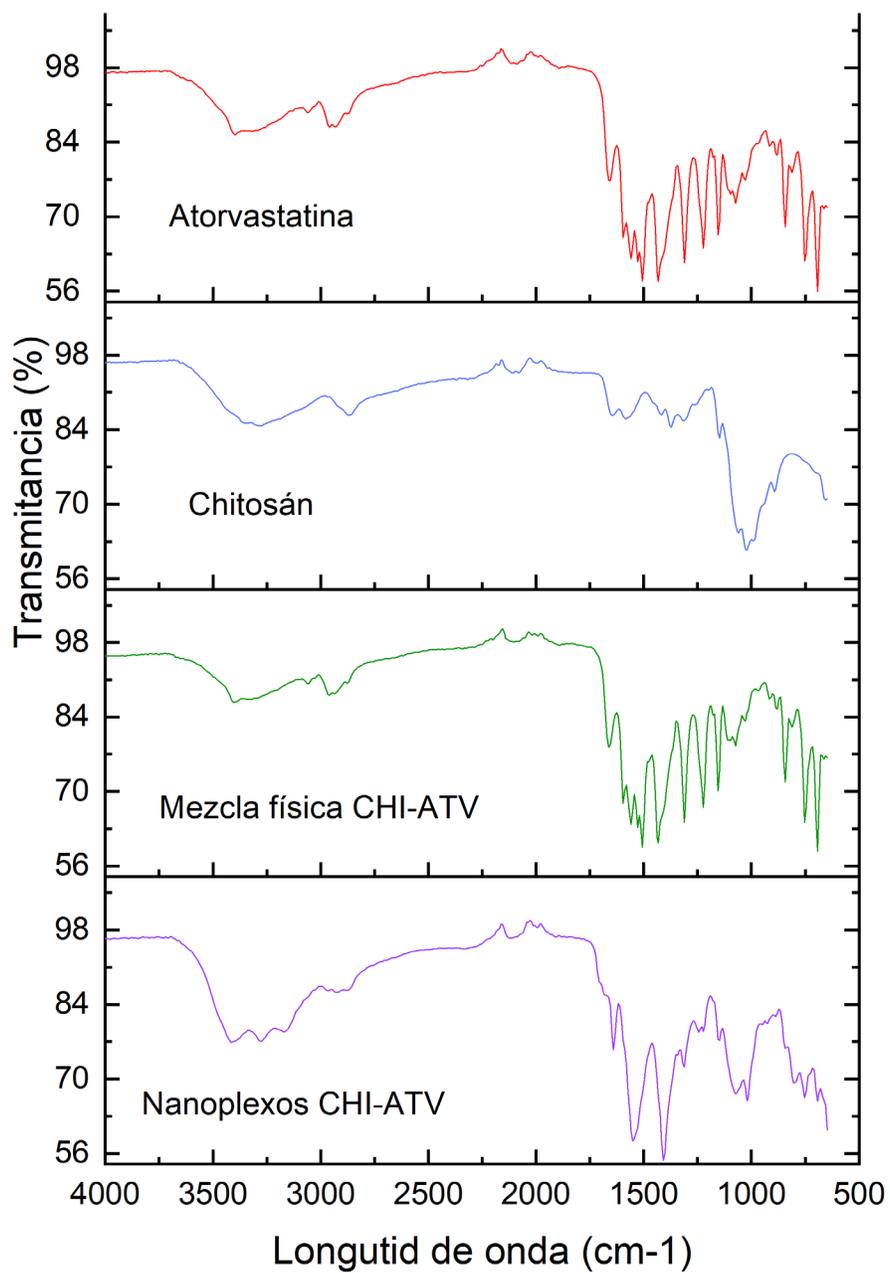
La potencial zeta es una medida de magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas y sus valores están relacionados con la estabilidad de estas en suspensión acuosa. En la **Figura 21** se observa el valor promedio obtenido de potencial zeta de los nanoplexos CHI-ATV escalados bajo condiciones óptimas, estos presentaron un valor de 37.3 mV con una buena calidad de lectura. Este valor positivo demuestra una buena estabilidad de los nanoplexos CHI-ATV en suspensión, por lo que no sufrirán procesos de agregación si se encuentran en suspensión.



**Figura 21.** Potencial Zeta de nanoplexos CHI-ATV escalados bajo condiciones óptimas.

### 9.7.2 Espectros infrarroja (FTIR)

La espectroscopia infrarroja nos permitió identificar las moléculas a través de las características vibracionales de los enlaces químicos en los grupos funcionales característicos. En este estudio se empleó espectroscopia infrarroja para determinar si los grupos funcionales de la ATV y el CHI se pueden reconocer en los nanoplexos CHI-ATV, con la finalidad de evaluar la interacción que ocurre entre los componentes. Así mismo, se tomó un espectro de una mezcla física entre la ATV y CHI, es decir materiales sin procesar, para considerarlo como referencia. En la **Figura 22** se muestra el espectro de infrarrojo de la ATV, del CHI, de la mezcla física CHI-ATV 1:1 y de los nanoplexos CHI-ATV.



**Figura 22.** Espectros IR de CHI, ATV, nanoplexos CHI-ATV y mezcla física.

**Tabla 10.** Bandas características presentadas en los espectros IR.

	<b>cm<sup>-1</sup></b>	<b>Vibración asociada.</b>
<b>ATV</b>	3375	Estiramiento N-H
	3250 y 3050	Estiramiento asimétrico y simétrico O-H
	3000-2800	Estiramiento C-H
	1657 y 1590	Estiramiento C=O asimétrico y simétrico
	1521 y 1443	Estiramiento C-C
	1326	Deformación -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>
	1228	Estiramiento C-N
	1170	Estiramiento C-O
	1063	Flexión en el plano C-H aromático
	848, 819 y 750	Flexión fuera del plano C-H aromático
	692, 633 y 594	Flexión por deformación C-H
<b>CHI</b>	3250-3600	(O – H y N – H) característico de los alcoholes, aminas y amidas.
	2842	Estiramiento C – H
	1650-1550	Estiramientos C = O y N = H característicos de grupos amida
	1645 y 1432	(C = O) presente en un grupo amida (I) y un grupo amida (II)
	1367	Estiramiento C – H

En la mezcla física se observan las mismas bandas que los materiales por separado, lo que sugiere que sin el proceso de manufactura no existe una alguna interacción entre los materiales por efecto de la formación de los nanoplexos CHI-ATV. Por otro lado, los nanoplexos CHI-ATV presentaron bandas características de las dos moléculas, pero con algunos desplazamientos, el desplazamiento de la banda de deformación de la amina secundaria de la ATV 1550 a 1480 cm<sup>-1</sup> en los nanoplexos CHI-ATV, sugiere que la reacción de acoplamiento ocurrió entre el grupo amino de quitosano y el grupo carboxílico de AT lo que sugiere una interacción física entre los materiales (Mohammed A, 2011).

### 9.7.3 Eficiencia de complejación

En la **Tabla 11** puede observar la eficiencia de complejación (%EC) promedio, en una proporción de CHI/ATV 1:1, en un modelo escalado, la cual se encuentra en 94.45 %; dato que es concordante con lo ya reportado para estas partículas (89.8 %EC (Arquieta J, 2019)).

**Tabla 11.** Eficiencia de complejación de Nanoplexos (CHI-ATV)

ATV- añadida	ATV- no conjugada	Eficiencia de complejación
398.75 mg	22.11 mg	94.45%

Esta eficiencia de encapsulación se debe al medio ácido, ya que se agregó una proporción de ácido acético glacial al 1% que genera que los grupos amino del CHI se encuentren protonados de  $-NH_2$  a  $-NH_3^+$ , dando lugar a la encapsulación o formación de complejo con la ATV.

### 9.7.4 Rendimiento del proceso

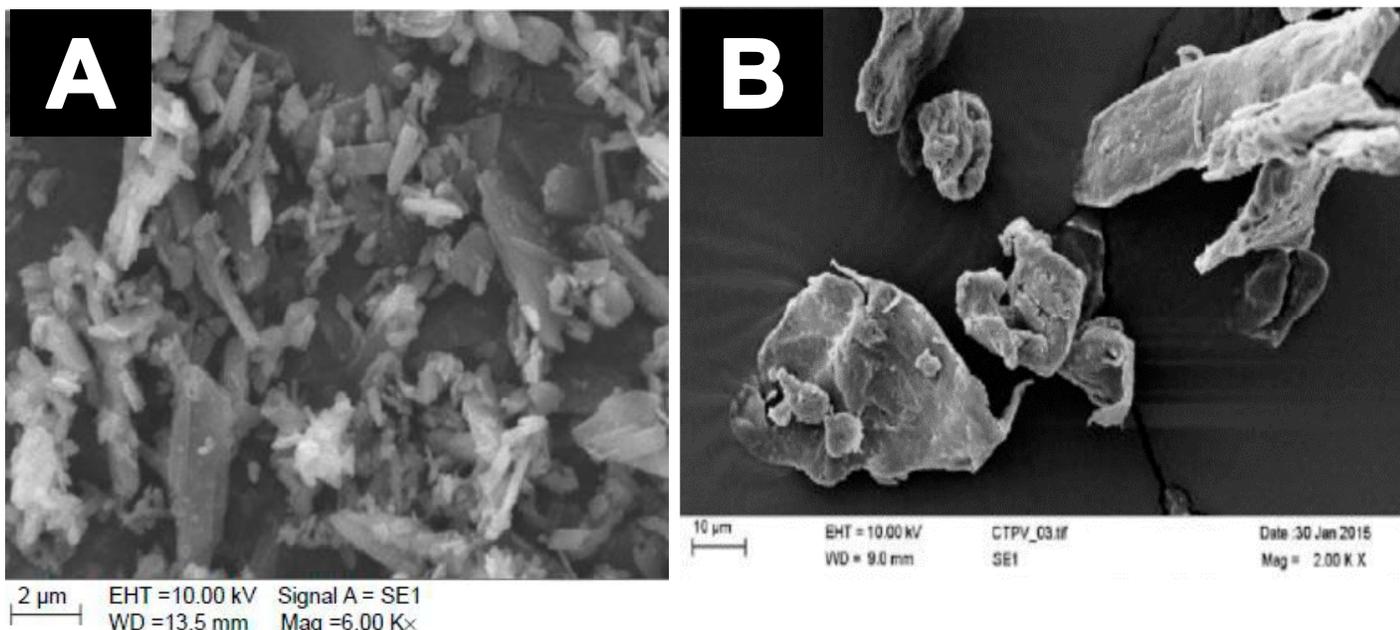
A partir del promedio de la masa recuperada de 3 lotes de nanoplexos CHI-ATV se determinó que el porcentaje de rendimiento obtenido para una relación de masa de CHI-ATV de 1:1 fue del 82.55%, calculado de una masa total de nanoplexos CHI-ATV por lote de 658 mg, logrando así un escalamiento deseado ya que se buscaba obtener entre 500 a 1000 mg de nanoplexos CHI-ATV.

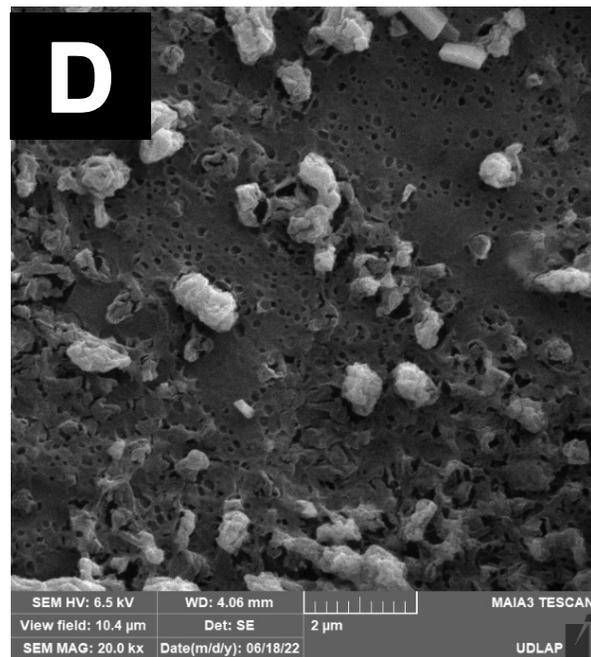
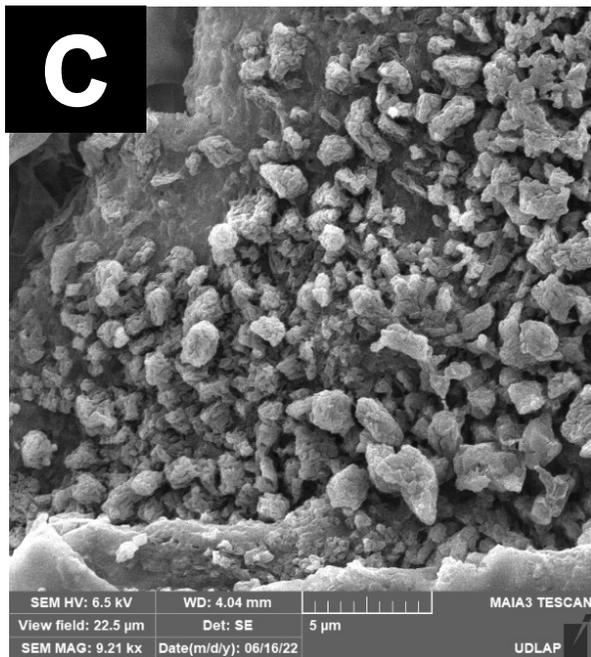
Al tener una relación 1:1 CHI-ATV se asegura que la mayoría de los iones carboxilato ( $COO^-$ ) de la ATV en la solución interaccionen con los grupos amino protonados ( $NH_3^+$ ) del CHI, lo cual se debe a que el CHI presenta un alto número de grupos amino libres en sus cadenas poliméricas, mientras que la ATV únicamente presenta un ácido carboxílico por molécula. (Arquieta J, 2019)

### 9.7.5 Morfología por SEM de nanoplexos CHI-ATV

En la **Figura 23 (A y B)** se muestran las micrográficas de la ATV y CHI obtenidas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) y reportadas por Josué Arqueta Flores (Arqueta J, 2019) las cuales pertenecen a la misma materia prima empleada en este proyecto. Estas imágenes permiten observar la ATV y CHI en forma pura, ambos presentan una forma irregular lo que concuerda con el estudio de rayos X reportados más adelante.

En la **Figura 23 (C y D)** se observa la imagen de los nanoplexos CHI-ATV como nanoestructuras esféricas y sólidas con un tamaño de partícula promedio de 1 $\mu$ m,



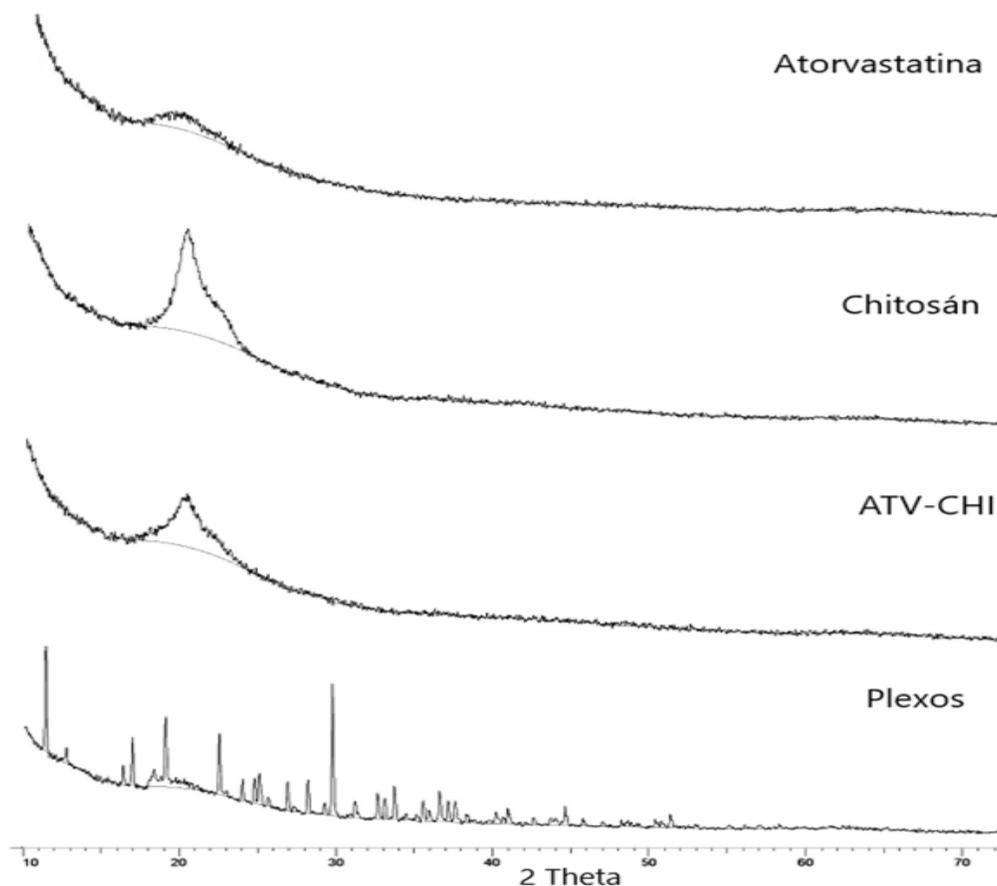


**Figura 23.** Micrografías de A) Atorvastatina, B) Chitosán, C y D) Nanoplexos CHI-ATV por microscopia electrónica de barrido (SEM)

### 9.7.6 Difracción de Rayos-X de polvos

Para investigar los cambios de la estructura cristalina de los plexos se realizaron los ensayos empleando la técnica de difracción de rayos X de polvos.

Los patrones de difracción de rayos-X de la ATV, CHI, mezcla física (CHI-ATV) y nanoplexos CHI-ATV se pueden observar en la **Figura 24**. El difractograma de los plexos muestra picos intensos en  $2\theta$  igual a  $11^\circ$  y  $30^\circ$  y un difractograma definido, lo cual nos habla de una estructura cristalina. En cuanto a la mezcla física de CHI con ATV, no se muestran picos definidos, así mismo los difractogramas del CHI y la ATV como materia prima tampoco presentaron picos definidos por lo cual corresponden a una sustancia amorfa.

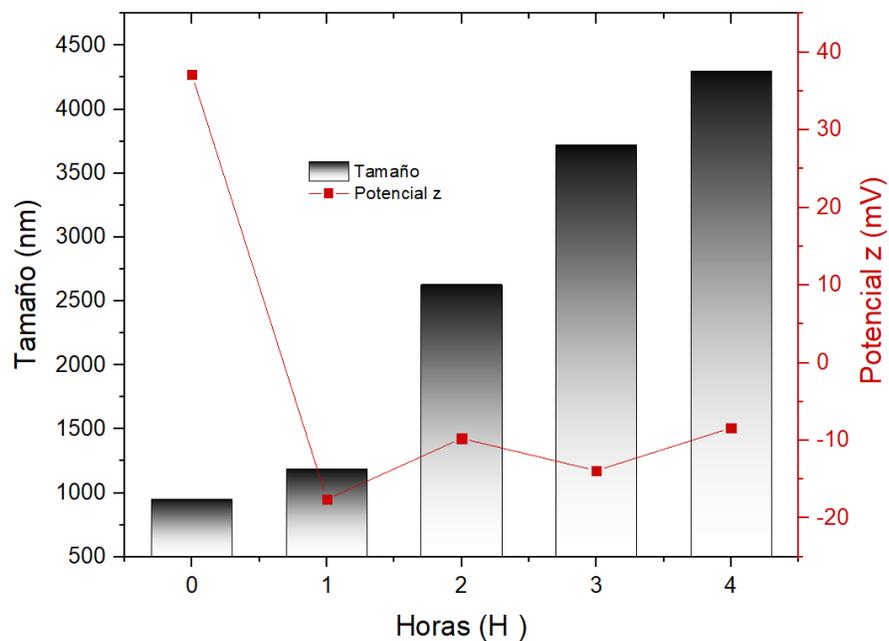


**Figura 24.** Patrón de difracción de Rayos X (DRX)

## 9.8 Pruebas de eficacia *in vitro*

### 9.8.1 Pruebas de mucoadhesión

En este estudio se utilizó mucina de cerdo tipo II al 1% p/v en *buffer* de fosfatos pH 7.4. Se pesaron 10 mg de nanoplexos CHI-ATV optimizados que fueron dispersos en 3 ml de solución de mucina en *buffer*, midiendo el tamaño y potencial Z a diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la **Figura 25**.



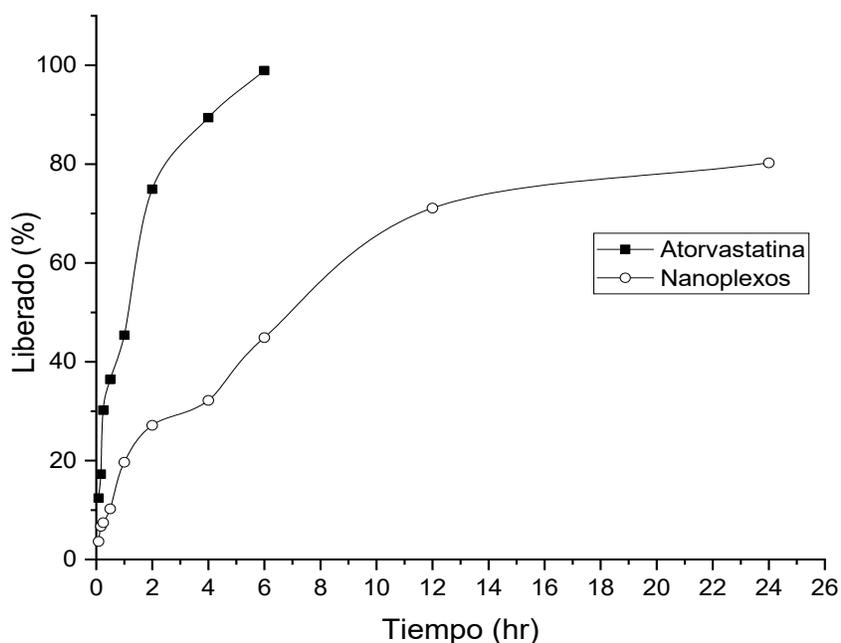
**Figura 25.** Tamaño promedio y potencial Z de nanoplexos CHI-ATV al interactuar con mucinas.

Estos evidenciaron un aumento en el tamaño de partícula de los nanoplexos CHI-ATV al transcurrir el tiempo de interacción con las mucinas; el tamaño promedio inicialmente fue de 951 nm, llegando a un tamaño de 4298 nm en cuatro horas. Este aumento en la talla promedio se relaciona con la mucoadhesión, ya que demuestra que los nanoplexos CHI-ATV se adhieren a las mucinas debido a la interacción electrostática entre la mucina y el CHI.

De la misma manera, se puede observar un cambio significativo en el potencial zeta, en la primera hora la interacción de mucina-partículas provoca un cambio en la carga. Esto surge dado que existe una interacción electrostática entre la mucina y el CHI (Arenas, 2021).

### 9.8.2 Perfiles de liberación

En la (Figura 26) se muestran los perfiles de liberación de ATV pura y de ATV en nanoplexos CHI-ATV bajo condiciones “*sink*”, simulando condiciones fisiológicas normales de pH 7.4. Como se puede observar la ATV pura se disolvió por completo en 5 horas, con una velocidad lenta debido a su disolución intrínseca. Por otro lado, los nanoplexos CHI-ATV apenas el 80.25% de ATV dentro de las primeras 24 horas, lo que representa una liberación prolongada de este fármaco; lo anterior se puede explicar por el hecho de que las cadenas poliméricas del CHI generan una disociación del fármaco más lenta ya que el polímero es poco soluble a este pH (Arquieta J, 2019).



**Figura 26.** Perfil de liberación de ATV y nanoplexos CHI-ATV

La liberación controlada que presentan los nanoplexos CHI-ATV podría disminuir los efectos secundarios relacionados al número de dosis administradas en un día. La liberación controlada podría permitir que los niveles de fármaco en el organismo permanezcan estables durante por lo menos 24 horas lo cual permitiría administrar una dosis diaria, lo que presenta ser una ventaja ante la ATV pura en la que demostró tener una liberación total en 5 horas lo que resulta en administrar un número mayor de dosis en un día.

### 9.9 Estudios de Formulación de nanoplexos CHI-ATV como DPI

En las formulaciones de polvo seco para inhalar con nanopartículas se necesita incorporar excipientes con un tamaño de partícula promedio más grande que actúan como acarreadores, ya que por lo general las nanopartículas cuentan con propiedades de flujo y cohesividad poco óptimas, ocasionadas por su tamaño de partícula promedio pequeño. En este proyecto se analizaron las propiedades reológicas y aerodinámicas de formulaciones en polvo seco empleando dos lactosas comerciales de grado inhalable (Respitose® ML001 y Lactohale® LH200). Se hicieron mezclas nanoplexo/lactosa 1:1 y 2:1, para las que se realizaron pruebas reológicas y de compactibilidad y cohesividad mediante el modelo de Kawakita (Satya Prakash et al., 2011). La **Tabla 12** resume los resultados obtenidos.

**Tabla 12.** Evaluación de lactosas para formulación de polvos secos para inhalar

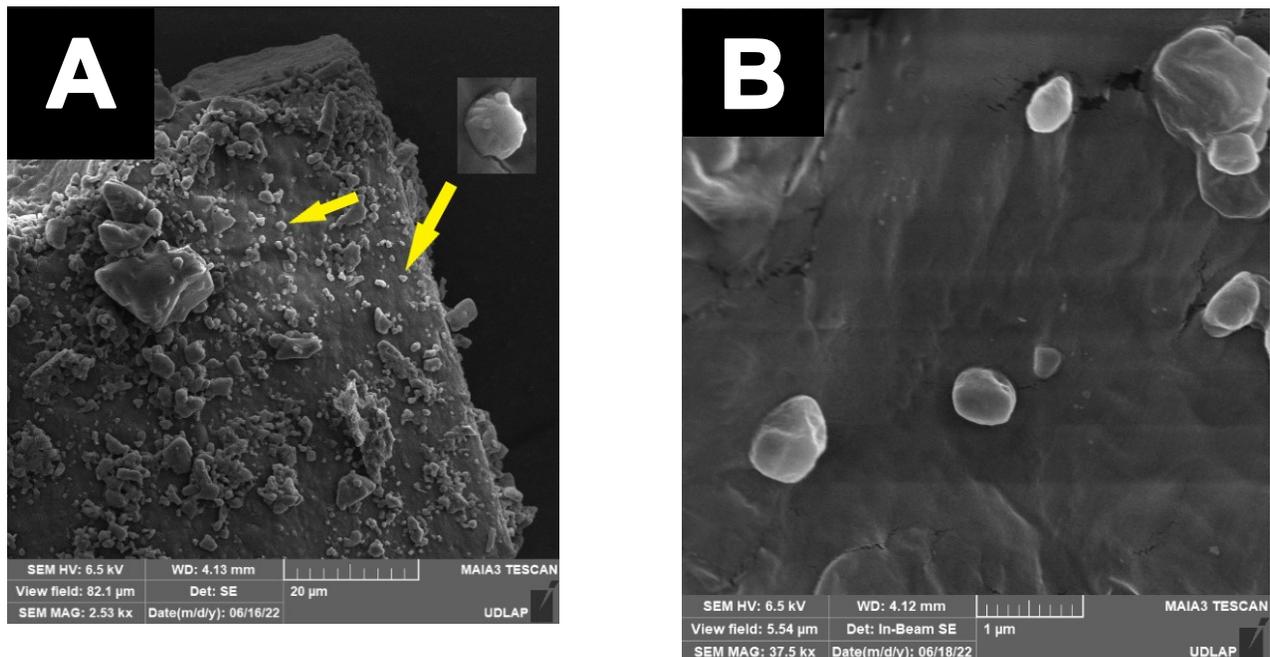
	Formulaciones (DPIs)				plexos
	LH200	LH2002	ML001	ML001	
Propiedad reológica	01:01	02:01	<b>01:01</b>	02:01	Blanco
Densidad aparente (g/mL)	0.23	0.26	<b>0.25</b>	0.33	0.23
Densidad compactada	0.34	0.42	<b>0.34</b>	0.47	0.29

(g/mL)					
Índice Carr (%)	31.25	37.93	<b>26.67</b>	30.43	21.21
Índice Hausner	1.45	1.61	<b>1.36</b>	1.44	1.27
Compactibilidad	0.30	0.45	<b>0.27</b>	0.40	0.23
Cohesividad	24.79	3.77	<b>4.7</b>	2.23	25.39
Ángulo de reposo (°)	48.30	48.78	<b>49.44</b>	50.15	48.75
Velocidad de flujo (g/s)	0.02	0.03	<b>0.02</b>	0.02	0.01

Con base en los resultados se puede observar que los nanoplexos CHI-ATV cuentan con un buen índice de Carr y Hausner, lo que nos indica que cuentan con una buena fluidez y compactibilidad, sin embargo, presentan una cohesividad muy alta por lo que se recurre a la incorporación de poblaciones de partículas gruesas (de 50 a 100  $\mu\text{m}$ ), esto para mejorar la dispersión del flujo y disminuir esa cohesión, regularmente se emplea como acarreador la lactosa monohidratada (Mastache A, 2019). Como se aprecia en la **Tabla 12** se determinó que la lactosa óptima para la formulación de polvos secos es Respitose® ML001 en una proporción de 1:1 ya que presentan el índice de Carr y Hausner más bajos y manteniendo una compactibilidad y cohesividad en los rangos óptimos para esta formulación ya que presenta los valores más bajos de las mezclas, además de que se sabe que las partículas con una densidad menor que 0.4 g/mL pueden ser depositadas exitosamente en el interior de los pulmones (Vanbever et al., 1999).

### 9.9.1 Morfología por SEM de nanoplexos CHI-ATV como DPI

En la **Figura 27-A** se observa una muestra de nanoplexos CHI-ATV como DPI con un campo de visión de 82.1µm en la cual se permite apreciar una gran cantidad de partículas de nanoplexos CHI-ATV adheridas a una partícula muy grande de lactosa ML001 de un tamaño aproximado de 70 µm. En la **Figura 27-B** se pueden observar nanoplexos CHI-ATV con un tamaño promedio de 1µm, adheridos a la lactosa ML001.



**Figura 27.** Micrografías de Nanoplexos CHI-ATV como DPI. A) Campo de visión de 82.1µm. B) Campo de visión de 5.54µm.

### 9.9.2 Propiedades aerodinámicas (MMAD)

Debido a que los nanoplexos CHI-ATV formarán parte de un DPI se realizaron pruebas de caracterización basadas en aerosol por medio de impactación inercial, esta técnica *in vitro* ayuda a predecir el comportamiento del aerosol dentro de los pulmones. El método utilizado fue un impactador de cascada de Andersen, consistió en hacer pasar un aerosol con ayuda de una bomba a través de placas con diferente diámetro de poro, esto simuló

las partes que componen los pulmones. Con base a la cantidad de polvo registrado en los diámetros de cada capa se calculó el MMAD y GSD para determinar qué proporción de lactosa-plexos tenía mejor comportamiento en una simulación de administración pulmonar. En la **Tabla 13** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 13.** Diámetro de masa media aerodinámica (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD) para los DPIs obtenidos

<b>Lactosa</b>	<b>Proporción</b>	<b>MMAD (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>GSD (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
LH200	1:1	1.15	0.58
	2:1	1.68	0.33
ML001	1:1	1.72	0.36
	2:1	1.56	0.33

Se observa que, para los 4 métodos evaluados, se obtuvo un valor de MMAD entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$ , lo cual es lo idóneo para que las partículas se depositen por sedimentación en la región de los bronquiolos y alveolos (Ibrahim M, 2015).

Con respecto al GSD se obtuvieron valores menores a 2 $\mu\text{m}$ , estos son ideales ya que el tamaño de partícula se encuentra monodisperso y así se aumenta la deposición pulmonar. (Ibrahim M, 2015)

## 10. CONCLUSIÓN GENERAL

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se determinó que es posible reproducir, escalar y caracterizar nanoplexos CHI-ATV y generar una formulación de polvo seco para inhalar el cual cuenta con un sistema de liberación prolongada que potencialmente se podría emplear para administrar ATV por vía pulmonar como posible tratamiento para el hipercolesterolemia, lo que tendrá impacto en la reducción de la dosis empleada y la efectividad del fármaco.

- Se lograron reproducir y caracterizar nanoplexos CHI-ATV mediante nanoprecipitación con un tamaño de partícula promedio de 369.1 nm
- Se logró escalar el proceso, obteniendo así un promedio de 658 mg de masa total de nanoplexos CHI-ATV por cada lote con un tamaño de partícula promedio de 980.3 nm
- Se validó un método analítico que mostró cumplimiento con base a los requisitos de la FEUM para poder realizar la cuantificación de ATV en diferentes tipos de análisis
- Se caracterizó físicoquímicamente los nanoplexos CHI-ATV mediante dispersión dinámica de luz, microscopía electrónica y óptica, difracción de rayos-x e infrarrojo para conocer las propiedades de los nanoplexos CHI-ATV.
- Se logró evaluar *in vitro* la eficacia de los nanoplexos CHI-ATV obtenidos mediante estudios de liberación, pruebas de bioadhesión y propiedades aerodinámicas para conocer su comportamiento a condiciones deseadas.
- Se desarrolló una formulación de nanoplexos CHI-ATV como polvo seco para inhalar con potencial uso en el hipercolesterolemia

## 11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la formulación de nanoplexos ATV-CHI como polvo seco para inhalar en un modelo *in vivo*.
- Encapsular los nanoplexos CHI-ATV en cápsulas de gelatina dura para generar un sistema DPI.
- Realizar los estudios de estabilidad que demuestren el periodo de vida útil, permita establecer las condiciones de almacenamiento y el mejor sistema contenedor.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Ahedo Arenas, M. F. (2021). Desarrollo y evaluación in vitro y ex vivo de un polvo inhalable de NLC y 6-hidroxi flavona con potencial uso antiasmático.
- Arguedas Quesada, J. A. (2002). Actualización en farmacoterapia: La farmacología de las estatinas. Primera parte. *Revista Costarricense de Cardiología*, 4(1), 13-21.
- Arquieta, J (2019). Obtención, caracterización y evaluación in vitro de nanoplexos de chitosan-atorvastatina, y su impacto en la disolución, 45-72.  
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/386>
- Badwan, A. A., Rashid, I., Omari, M. M. H. A., & Darras, F. H. (2015). Chitin and Chitosan as Direct Compression Excipients in Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1519-1547. <https://doi.org/10.3390/md13031519>
- Bruton, L. L. (2015). Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 952.
- Canalizo-Miranda, E., Favela-Pérez, E. A., Salas-Anaya, J. A., Gómez-Díaz, R., & Jara-Espino, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*.
- Casanueva, C. O., Belinchón, J. P., & Méndez, S. de A. (2019) Dispositivos de inhalación en medicación inhalada, 14.
- Cheow, W. S., & Hadinoto, K. (2012). Green Amorphous Nanoplex as a New Supersaturating Drug Delivery System. *Langmuir*, 28(15), 6265-6275. <https://doi.org/10.1021/la204782x>
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFBM). (2002). Guía de Validación de métodos analíticos.
- De la Hija Díaz, MB. (2007). Dispositivos de inhalación para asma y EPOC. *Boletín Farmacoterapéutico de la Castilla-La Mancha*. Vol. VIII, N.º 1, 3-4.

- Douglas, S. Gardenhire. (2017) A guide to aerosol delivery devices for respiratory therapists, 4th edition, 2.
- GEMA (2020). Inhaladores, terapia inhalada: fundamentos, dispositivos y aplicaciones prácticas.
- González, C. M. (2013). Estudio farmacocinético de atorvastatina en pollos, Departamento de farmacología Universidad de Murcia, 27.
- Guerra-Morillo, M<sup>a</sup> Oliva, Rabasco-Álvarez, Antonio M, & González-Rodríguez, María Luisa. (2020). Fibrosis quística: tratamiento actual y avances con la nanotecnología. *Ars Pharmaceutica* (Internet), 61(2), 81-96. Epub 20 de julio de 2020. <https://dx.doi.org/10.30827/ars.v61i2.11358>
- INAME (2016). Atorvastatina Calcica, Sustancia de Referencia para Ensayos Físicos-Químicos.
- Ibrahim-Mariam, Garcia:Contreras, Lucila ; Verma, Rahul (2015). Inhalation drug delivery devices: technology update. *Medical Devices: Evidence and Research*, (), 131–. doi:10.2147/mdr.s48888
- Jeffrey, G. Weers, Danforth. (2015). Formulation Design of Dry Powders for Inhalation. Novartis pharmaceuticals corporation, San Carlos, California
- Kadam, R., Shendge, R., & Pande, V. (2015). A review of nanotechnology with an emphasis on Nanoplex. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, 255-263. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000200002>
- Kadota, K., Sosnowski, T. R., Tobita, S., Tachibana, I., Tse, J. Y., Uchiyama, H., & Tozuka, Y. (2020). A particle technology approach toward designing dry-powder inhaler formulations for personalized medicine in respiratory diseases. *Advanced Powder Technology*, 31(1), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2019.10.013>

- Kasar, P. M., Kale, K. S., & Phadtare, D. G. (2018). Nanoplex: a review of nanotechnology approach for solubility and dissolution rate enhancement. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 6-10. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2018v10i4.28467>
- Kendre, P. (2016). Dry Powder Inhaler: A Review. *Journal of Advanced Drug Delivery*, 3, 42-52.
- Kim, J.-S., Kim, M.-S., Park, H. J., Jin, S.-J., Lee, S., & Hwang, S.-J. (2008). Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1-2), 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.006>
- kula, M., El-Helw, A., Sobahi, T. R., & Abdelaal, M. Y. (2015). Chitosan based atorvastatin nanocrystals: Effect of cationic charge on particle size, formulation stability, and in-vivo efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 321-334. <https://doi.org/10.2147/IJN.S77731>
- Marian, C.C. (2008) Hipercolesterolemia. Diagnóstico y tratamiento.
- Martínez-Martínez, B. E., & Salgado-Aguilar, G. (2003). Aerosolterapia. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 62(1), 24-28.
- Mathur, M., & Devi Vemula, K. (2018). Investigation of different types of nano drug delivery systems of atorvastatin for the treatment of hyperlipidemia. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(12), 2048-2060. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1508225>
- McGavin, George C. (2000). *Insectos arañas y otros artrópodos terrestres*. Barcelona Omega. p. 11
- Mohammed A; Musarrat H. Warsi; Neha Mallick; Sohail Akhter; Sachin Gahoi; Gaurav K. Jain; Sushma Talegaonkar; Farhan J. Ahmad; Roop K. Khar (2011). Enhanced bioavailability of

- nano-sized chitosan–atorvastatin conjugate after oral administration to rats. , 44(3), 241–249. doi:10.1016/j.ejps.2011.08.001 Arayne, Mohammed & Sultana, Najma & Rizvi, Syeda. (2010). In vitro drug interaction studies of atorvastatin with ciprofloxacin, gatifloxacin, and ofloxacin. *Medicinal Chemistry Research*
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. (2019). Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1667-1692. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00904-x>
- Nelson, H. S. (2016). Inhalation devices, delivery systems, and patient technique. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 117(6), 606-612. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.05.006>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Las 10 principales causas de defunción.
- O'Donnell, K. (2011). *Controlled Pulmonary Drug Delivery*.
- Paranjpe, M., & Müller-Goymann, C. C. (2014). Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5852-5873. <https://doi.org/10.3390/ijms15045852>
- Rubio, C. (2016). Administración pulmonar de fármacos, 5-6.
- Satya Prakash, S., Patra, C. N., Santanu, C., Hemant Kumar, P., Patro, V. J., & Devi, M. V. (2011). Studies on Flowability, Compressibility and In-vitro Release of Terminalia Chebula Fruit Powder Tablets. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 10(3), 393-401.
- Soca, M., & Enrique, P. (2009). Dislipidemias. *ACIMED*, 20(6), 265-273.
- Tulbah, A. S. (2020). The potential of Atorvastatin for chronic lung diseases therapy. *Saudi*

Pharmaceutical Journal : SPJ, 28(11), 1353-1363.

<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.08.025>

Vanbever, R., Mintzes, J. D., Wang, J., Nice, J., Chen, D., Batycky, R., Langer, R., & Edwards, D.

A. (1999). Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharmaceutical Research*, 16(11), 1735-1742.

<https://doi.org/10.1023/a:1018910200420>

*World Health Organization* (WHO). (2002). Cardiovascular Death and Disability can be reduced more than 50 percent.

Zárate, A. (2015). Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento, 166-

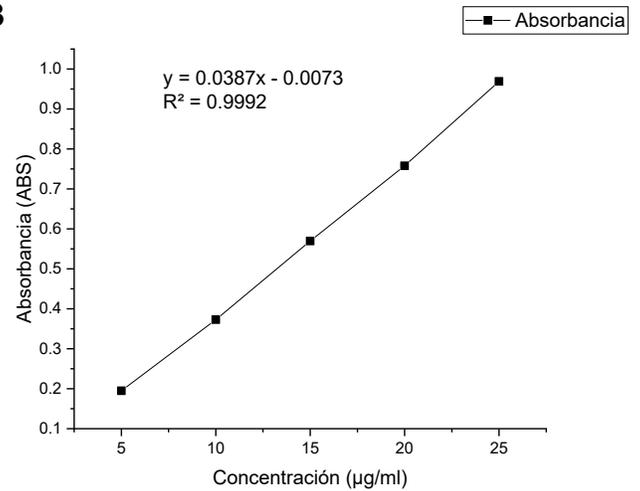
168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acmx.2015.12.002>

Zetasizer Nano ZS (2020) | Tamaño de proteínas, potencial zeta, movilidad de proteínas | Soporte de productos | Malvern Panalytical.

## 13. ANEXOS

### 13.1 Linealidad del método analítico a pH 5.3

Conc	ABS	m
5	0.194	0.0388
5	0.1948	0.03896
5	0.1955	0.0391
10	0.3745	0.03745
10	0.3714	0.03714
10	0.3725	0.03725
15	0.5697	0.03798
15	0.5686	0.03790667
15	0.5703	0.03802
20	0.7578	0.03789
20	0.7532	0.03766
20	0.7621	0.038105
25	0.9734	0.038936
25	0.9658	0.038632
25	0.968	0.03872
	PROMEDIO	0.03816998
	DESVESTA	0.00064835
	CV%	1.69858068



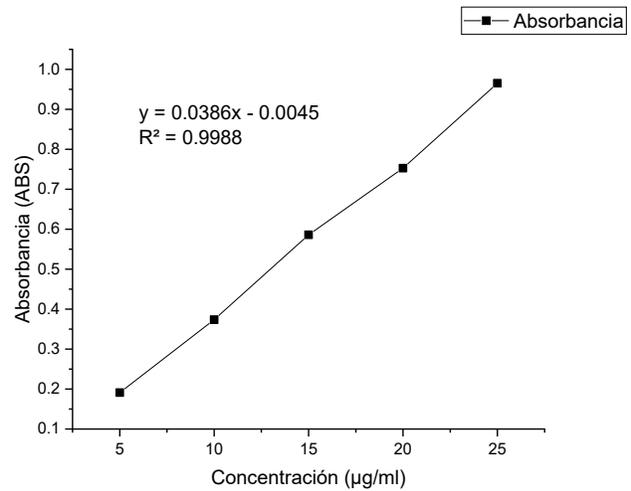
### 13.2 Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 5.3

<b>Repetibilidad</b>		
<b>Conc</b>	<b>ABS</b>	<b>m</b>
<b>5</b>	0.1845	0.0369
<b>5</b>	0.1883	0.03766
<b>5</b>	0.1905	0.0381
<b>15</b>	0.5721	0.03814
<b>15</b>	0.571	0.03806667
<b>15</b>	0.5748	0.03832
<b>25</b>	0.9675	0.0387
<b>25</b>	0.949	0.03796
<b>25</b>	0.9564	0.038256
	PROMEDIO	0.03801141
	DE	0.00050225
	CV%	1.32130366

<b>Exactitud</b>			
<b>Conc</b>	<b>ABS</b>	<b>Con</b>	<b>%recobro</b>
<b>5</b>	0.1803	4.856	97.173
<b>5</b>	0.1862	5.011	100.222
<b>5</b>	0.1855	4.993	99.860
<b>15</b>	0.5794	15.171	101.141
<b>15</b>	0.5772	15.114	100.762
<b>15</b>	0.5734	15.016	100.108
<b>25</b>	0.9523	24.807	99.227
<b>25</b>	0.9568	24.923	99.692
<b>25</b>	0.9661	25.163	100.654
		Promedio	99.871
		DE	1.169
		CV%	1.170

### 13.3 Linealidad del método analítico a pH 7.4

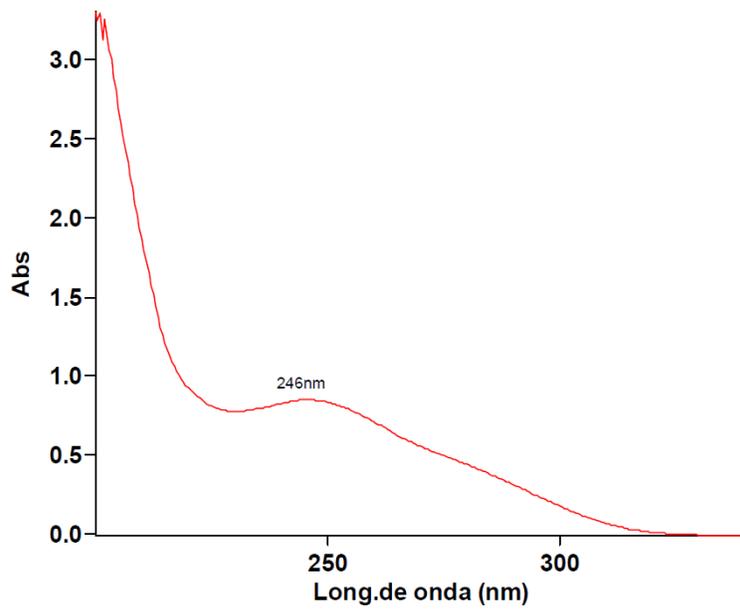
Conc	ABS	m
5	0.1902	0.03804
5	0.1917	0.03834
5	0.1914	0.03828
10	0.3714	0.03714
10	0.3729	0.03729
10	0.3765	0.03765
15	0.5876	0.03917333
15	0.5842	0.03894667
15	0.5863	0.03908667
20	0.7571	0.037855
20	0.7555	0.037775
20	0.7458	0.03729
25	0.9653	0.038612
25	0.9632	0.038528
25	0.9676	0.038704
	PROMEDIO	0.0382
	DESVESTA	0.00066817
	CV%	1.7500287



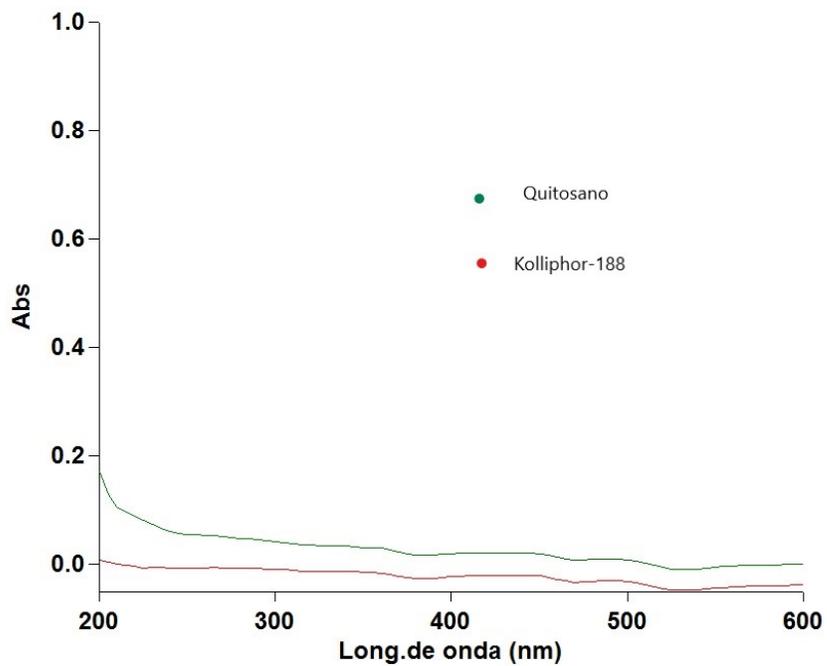
### 13.4 Repetibilidad y exactitud del método analítico a pH 7.4

Repetibilidad		
Conc	ABS	m
5	0.1927	0.03854
5	0.1919	0.03838
5	0.1943	0.03886
15	0.5852	0.03901
15	0.5785	0.03856
15	0.5716	0.03810
25	0.9575	0.0383
25	0.9624	0.03849
25	0.9678	0.03871
	PROMEDIO	0.03855
	DE	0.00028
	CV%	0.72685

Exactitud			
Conc	ABS	Con. Calc	% recobro
5	0.1922	5.10779	102.15595
5	0.1928	5.12336	102.46727
5	0.1909	5.07407	101.48142
15	0.5879	15.36580	102.43867
15	0.579	15.13523	100.90155
15	0.569	14.87616	99.17444
25	0.9545	24.86316	99.45264
25	0.9628	25.07818	100.31274
25	0.9569	24.92533	99.70135
		media	100.89845
		DE	1.30351
		CV%	1.29191



**Figura 28.** Espectro de absorción de la ATV en el rango de 100 a 600 nm.



**Figura 29.** Espectros de absorción UV de los materiales en la formulación de los nanoplexos

### 13.5 Porcentaje de ATV liberado en pH 7.4

Horas	%atv pura	%atv plexos
<b>0.08</b>	12.43	4.40
<b>0.16</b>	17.26	6.52
<b>0.25</b>	30.18	7.23
<b>0.5</b>	36.41	12.29
<b>1</b>	45.37	19.82
<b>2</b>	74.91	25.86
<b>3</b>	83.55	30.30
<b>4</b>	89.39	32.25
<b>5</b>	98.92	39.39
<b>7</b>		45.68
<b>8</b>		55.61
<b>9</b>		65.08
<b>10</b>		69.58
<b>11</b>		70.84
<b>12</b>		72.28
<b>24</b>		80.26

Fecha: 26 de septiembre de 2022  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de Notificación: Electrónica  
Folio: FF/D/SD/JLF/108/2022

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis “**Desarrollo de un polvo seco inhalable de nanoplexos de atorvastatina-chitosán con potencial uso en la hipercolesterolemia**” presentado por el/la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Juan Rodrigo Torres Mojica, (10010882)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado	Firma
Dr. Efrén Hernández Baltazar	_____
Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez	_____
Dr. Jesús Rivera Islas	_____
Dra. María Crystal Columba Palomares	_____
Dra. Magdalena Zulema Figueroa Suárez	_____



**ATENTAMENTE**  
**“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ**  
**SECRETARIA DE DOCENCIA**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ** | Fecha:2022-09-27 00:18:37 | Firmante

Gbw5CM1c9S5VfJCQCsjPG9NWXt2PLzSkFX/ou7d6BmhFbVskV9E5O/YUB+F5CT1OxZ2lkQOdUrxziJI38TWmP6cpWF7poF1chg1FfLju100QRMx6pP5vCKAfrLrAKuWO/lrgqWNRU40gyQOsDdU1qelmcEx+LNxge/KheYdv9tzJLjerfaB4vib6CMKnM5Co5a+Ufby5aCVLPksR78/JIR1VEDgwCvG2QVAV0o0vrC5WLaO7KJIWnPwUzt5ww6dOkYsh73s9Jj/5pnd9V4c248wEZeu3av9ulFc03kD38hkDeUYoAyfqWCSuVY8A+BTm9/KPBgUI9UFhdO3zjs/nA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[hXM3fFmnZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Zk70ogSokCm7WJRikuWbYpMInuQeceRs>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MAGDALA ZULEMA FIGUEROA SUAREZ | Fecha:2022-10-04 17:57:34 | Firmante**

b8tNvRNO1487uDKEH2oyrIP9k3pasbjcdXkwolyJqks3k8uuLp1q1D88hE31NrlTFWnP3HSslXq8r6vkBtPFvyDHL8aQSpvgG66ixLSd3YajR1/WzK+0+TyBYskfV8dEVINW5hXa/e3SWvDUnou/JtTorfqrR7wesj/M3LQArAhLssuW/4jSwo/30PCnlFloYrcNxRF0r4sZbQWv29w0xaXUKyeUE8UXbDwFmM+CNh+LONBVnuOnCKF0KSdU6gysxGiSUQBTXy2UwnhCMyrolw4CRyVysOQya5w1U2fDa8fGxXEdZyaE+go3nQXUVFnljEi8BZ7vQs0xUB+1Aem9A==

**EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2022-10-04 23:43:44 | Firmante**

a5XlpuvT3D2M94m061bBRXmPykC928qlA072UBoSIzOHIAZQsmM+P4m7SmHFLqDDRD8tLfnBvffZsA5utJ6Jr+6Qhj6JDAFGKTqkqbTHlwCG3DpRkgmjfxRyyL8zpzVxJK12zLIMyUjaDBDWBlnC/Rzd5GjLfkEqZbO0dlFi9Rqwc25x/wAAcNj+KZ7yxiJ2j4r7WTqxxsDkEuhG1QGvV0EHaY2QYEUmIVGdKPsTnHfSfSqcTGI6Nwms98xZNfpCGoJP+F+rCJUtlSyzY1obuB0MjSZVRxQc4lqhdq7BH0JI23U2+08Xz13t9mYwG11rCHaVQFWX7zZP5apybEw==

**JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2022-10-05 12:10:18 | Firmante**

PDwtDVC07r4PhdR+XrVgVUuEkwCRbhZ66yfnckqukjYYAy4nN9z6SllgPXb/gdbsKjhJSmcVAsakDMHBHUXOYEPxGfO42DItI6Ih0W8+4pnD2Fa1B0YztPf5xX/1A6xShXVPTYu6xihECdyUvlo72AjAdrBBlhA3+Lu/u9Pa3mFalqQFB6MVWzuaPWBr0Jq99mbpAxaB1mTode77LKQSayWq3S2oNXD1xpqczO0paMC4sC8htAprjMoU9kAwwUVxMTs7qERr19pU9sRSDAK+Utw3NlyYf8WlJrKmpIxbn7vKEctyR370MLQFivf8OxaJwNf1uyNWqWz/3DjKjDCg==

**MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2022-10-05 14:29:43 | Firmante**

hh7LJnQGdEN4Cz+YzWQyChaK56Pp7AqcbtBAOOPFLbLV5qUC91eIz1gz9i2Cnqaf4SK5QNCgkfvcpwuOpR2nLKXTWHibEcrrPBuY6ckf4Hck0keSGpVo3INGhFk8JwSnjzCLO7VnfxozTBUa4srP0Ag9Rk0YZ9qPKerJym0hB6cfke+XTv+MbSzAYZwZ6vs3AH6doBjmQVTLtbC/CRYWwXDr/vAfRdTDcqxMXY/FOUJEWn6+TZ+oF8AZWGWZFiV+0y6r/VM1Tx3Nfh+DknibLL0percV6nEpxZi5Jp6/Ji90AxtxPGce/3/RKkqKqg+JFZdlj0fh6xB9qY5TCw==

**SERGIO ALBERTO BERNAL CHAVEZ | Fecha:2022-10-06 11:32:49 | Firmante**

AacUeA8YcCMjw9G+ZQ67Zw6tXqFrtIvaFR98gnBfbaBvE2X/gW5Ggs2HlvUF/m+NE5f4cGpa8juS7s3pYy3LyZUmecwJfKuzp4PZINr54YlctygyRa+L2gHKAoyD5ZDmAY5RTi5H1nGrksnQUWjFEaOcUa4lJ0XqszvfGA4KMD6QCXxlbsGaqGI4HGd1aTP9q6KIYsZQRmW6eMAvRoKQtXR1JtDuxTdHlsVZS3XMCMD74F5ZyZfidtmNsc04aA2+vnOBBdos2zBW/8LK/CJxoi2wJZTFFJtl930uYNUyjmGsHI1r7AR3c8PkjTlcSuE4WaL1yThxRhL0AJDsFaBJg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Hw8vb5AID

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8eygrWztY3oHNZlc8ojnJToL1Tz7AFxC>

