



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“ELABORACIÓN, OPTIMIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS PARA EL TRANSPORTE DE L-DOPA A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL”**

T E S I S

Que presenta

ISAAC HIRAM CABALLERO FLORÁN

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en la especialidad de

FARMACOLOGÍA

Directores de la Tesis

Dr. BENJAMÍN FLORAN GARDUÑO

Dr HERNAN CORTES CALLEJAS

CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO, 2017

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio #4 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño. Un proyecto financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y una beca otorgada por esta misma institución para el QFB Isaac Hiram Caballero Florán inscrito al departamento de Farmacología

Agradecimientos

Al Dr. Benjamín Florán por permitir desarrollar mi trabajo de tesis de posgrado en su laboratorio y con su equipo de trabajo tanto auxiliares, alumnado y técnicos que de manera directa e indirecta impactan en los proyectos realizados en el laboratorio.

Agradezco a mi Co-Tutor el Dr. Hernán Cortes Callejas por el apoyo, la dirección, la confianza a lo largo de todo el proyecto, pero sobre todo por este reto en mi formación académica, como lo fue el desarrollo de cada uno de los puntos que conforman la parte medular del trabajo realizado.

Al Dr. Gerardo Leyva Gómez por su gran contribución tanto en la logística como en el desarrollo metodológico y técnico del trabajo tanto en el laboratorio como en los seminarios realizados en el transcurso del posgrado.

Agradecimiento especial a mis sinodales el Dr. Jorge Aceves Ruiz y el Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, por todos los consejos y observaciones echas en los exámenes de avance de proyecto, su participación es invaluable muchas gracias.

Por todo el apoyo recibido en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en especial al Dr. David Quintanar Guerrero y a su equipo de alumnos por la guía, consejos y enseñanzas en parte de las técnicas empleadas en el proyecto.

A la Dra Andrea de Vizcaya Ruiz y su equipo de trabajo y alumnado en el departamento de Toxicología del CINVESTAV por abrimme las puertas de su laboratorio para hacer determinaciones clave en el desarrollo experimental.

A los doctores Jonathan Magaña, Oscar Hernández y Roció Suárez, por sus aportaciones, consejos e indicaciones relevantes en todo momento para enriquecer el proyecto.

Al Ing. Carlos Flores Morales del Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM, por el apoyo para la obtención de las capturas de microscopia TEM y orientación básica del tema.

Dedicatoria

A mi familia en general, pero particularmente a mis padres Rene Caballero y Dolores Florán, que sin todo el apoyo en todo momento así como en todos los aspectos de mi vida, las metas que me propongo no serian alcanzadas, a mi hermano René Nahum, por su consejo, apoyo y ejemplo de trabajo y profesionalismo.

A mis compañeros y amigos de Maestría con los que compartí numerosas experiencias académicas, así como retos y buenas vivencias. A mis compañeros del Laboratorio 4 de Neurociencias, junto con los cuales eh crecido de manera práctica y académica. A mis compañeros del Laboratorio de medicina genómica personas que a pesar de que sus trabajos son de temas totalmente ajenos al de este proyecto han colaborado en mi crecimiento profesional.

A mis amigos de la licenciatura, en especial a Mario Torres por su orientación en la parte estadística del trabajo, a mis amigos de ya hace muchos años Jaime y Eduardo, con los cuales espero seguir festejando varias metas individuales así como personales.

INDICE

1	Resumen.	pag. 08.
1.1	<i>Abstract</i>	pag. 09.
2	Antecedentes.	pag.10
2.1	<i>La enfermedad de Parkinson como problema de salud, su fisiopatología y terapéutica.</i>	pag.10
2.1.1	Generalidades sobre la enfermedad del Parkinson.	pag.10
2.1.2	Los Ganglios Basales y sus alteraciones en la enfermedad de Parkinson.	pag 11
2.1.3	Tratamientos farmacológicos para la enfermedad de Parkinson.	pag.15
2.1.4	L-Dopa, química de la molécula, tratamiento estándar, ventajas, áreas de oportunidad, comportamiento Farmacocinético y Farmacodinámico.	pag.16
2.1.5	Discinesias inducidas por L-Dopa.	pag 19
2.1.6	Desarrollo farmacéutico de L-Dopa y otros compuestos anti parkinsonianos.	pag 23
2.2	<i>Nanopartículas.</i>	pag.26
2.2.1	Tipos de nanopartículas, características generales, ventajas, utilidades.	pag 26
2.2.2	Tipos de nanopartículas.	pag 29
2.2.3	Caracterización de la nanopartícula: tamaño, y potencial Z.	pag 30
2.2.4	Potencial Z.	pag 31
2.2.5	Nanopartículas dirigidas al SNC: Mecanismos de transporte a través de Barrera Hemato-encefálica.	pag 33
2.2.6	Nanopartículas y L-Dopa.	pag 36
2.2.7	Quitosano, propiedades, ventajas y métodos de preparación.	pag 39
2.2.8	Nanopartículas de quitosano para Sistema Nervioso Central y enfermedad de Parkinson.	pag 45
3	Planteamiento del problema.	pag 46
4	Hipótesis.	pag 47
5	Objetivos.	pag 47
5.1	<i>Objetivo general.</i>	pag 47
5.2	<i>Objetivos particulares.</i>	pag 47

6	Materiales y métodos.	<i>.pag 48</i>
6.1	<i>Estrategia Experimental.</i>	<i>.pag 48</i>
6.2	<i>Materiales.</i>	<i>.pag 48</i>
6.2.1	Reactivos.	<i>.pag 48</i>
6.2.2	Equipos.	<i>.pag 48</i>
6.2.3	Material General.	<i>.pag 49</i>
6.3	<i>Método.</i>	<i>.pag 49</i>
6.3.1	Validación del Método.	<i>.pag 49</i>
6.3.2	Preparación de la solución de quitosano [0.6% m/v].	<i>.pag 50</i>
6.3.3	Solución de Tri-polifosfato de sodio (TPF) (3 mg/ml).	<i>.pag 50</i>
6.3.4	Elaboración de Nanopartículas.	<i>.pag 50</i>
6.3.5	Elaboración de Nanopartículas y encapsulamiento de L-dopa.	<i>.pag 51</i>
6.3.6	Determinación de tamaño de partícula.	<i>. pag 51</i>
6.3.7	Determinación de potencial Z.	<i>. pag 52</i>
6.3.8	Determinación de condiciones de temperatura, pH y potencia de sonicación.	<i>.pag 52</i>
6.3.9	Eficiencia de atrapamiento.	<i>. pag 53</i>
6.3.10	Perfil de Liberación.	<i>. pag 54</i>
7	Resultados.	<i>.pag 54</i>
7.1	<i>Validación del método analítico para la cuantificación de L-Dopa por espectrofotometría.</i>	<i>. pag 54</i>
7.1.1	Determinación del pico máximo de absorción.	<i>.pag 54</i>
7.1.2	Linealidad del método.	<i>.pag 56</i>
7.1.3	Límites de cuantificación y detección.	<i>.pag 57</i>
7.1.4	Precisión y Exactitud.	<i>.pag 57</i>
7.1.5	Selectividad.	<i>.pag 58</i>
7.2	<i>Elaboración de las nanopartículas.</i>	<i>.pag 59</i>
7.2.1	Tamaño de partícula.	<i>.pag 59</i>
7.2.2	Potencial Z.	<i>.pag 60</i>
7.2.3	Morfología.	<i>. pag 61</i>

7.3	<i>Determinación de condiciones óptimas de temperatura, pH y potencia de sonicación para elaborar nanopartículas con tamaño de partícula < 400 nm.</i>	.pag 62
7.4	<i>Eficiencia de Entrampamiento (EE).</i>	.pag 67
7.5	<i>Perfil de liberación.</i>	.pag 68
7.6	<i>Ajuste de la cinética de liberación.</i>	.pag 70
8	Discusión de Resultados.	.pag 71
8.1	<i>Validación.</i>	.pag 71
8.2	<i>Elaboración de Nanopartículas.</i>	.pag 74
8.3	<i>Optimización del tamaño de partícula.</i>	.pag 76
8.4	<i>Eficiencia de entrampamiento (EE).</i>	.pag 79
8.5	<i>Perfil de liberación.</i>	.pag 80
8.6	<i>Ajuste de la cinética de liberación.</i>	.pag 82
9	Conclusión.	.pag 83
10	Perspectivas.	.pag 83
11	Referencias.	.pag 84

1. Resumen

En la actualidad uno de los grandes problemas del tratamiento de la enfermedad de Parkinson con L-Dopa radica en la aparición de discinesias. Éstas se deben al alto grado de denervación dopaminérgica, a los cambios fisiopatológicos en los núcleos cerebrales que controlan el movimiento, así como a la actividad oscilatoria de este sistema de control motor debida a una estimulación variable provocada por los niveles fluctuantes de L-Dopa en el sistema nervioso central durante la terapia. Estas discinesias generalmente comienzan con estadios en los que el efecto del fármaco disminuye y posteriormente se produce la aparición de los movimientos involuntarios que además de ser incapacitantes pueden ser dolorosos. Algunas hipótesis han sugerido que para resolver este problema es necesario un cambio de esquemas de administración. Es por ello que en este proyecto ideamos una formulación de L-Dopa en nanopartículas, cuyo objetivo final es transportar al fármaco al sistema nervioso central. Nuestra estrategia está enfocada en recuperar los niveles de Dopamina y mantenerlos constantes por medio de un sistema de liberación lento. Para poder cumplir con este propósito se creó un sistema de nanopartículas menores de 400nm con base en quitosano, capaces de encapsular L-Dopa y liberarla lentamente. A lo largo de este trabajo se documentan los detalles de la elaboración de este sistema de acarreo de L-Dopa en nanopartículas, así como la evaluación de la liberación de L-Dopa en condiciones fisiológicas *in vitro*.

1.1 Abstract

Currently the main problem in the treatment of Parkinson's disease with L-Dopa is the development of incapacitating movements collectively known as dyskinesia. Dyskinesia is directly related with the extent of dopaminergic denervation, pathophysiological changes in cerebral nuclei related with motor control, and the oscillatory activity of this motor control system induced by a variable stimulation, due to fluctuant levels of L-Dopa in the central nervous system. These abnormal movements initiate when pharmacological effects are diminished, and then incapacitating involuntary movements are produced. In order to resolve this drawback, the administration schedule should be changed. In this project we develop a new formulation of nanoparticles in order to delivery this Dopamine precursor to the central nervous system to maintain neurotransmitter levels constant, by means of a slow delivery system and in consequence a less fluctuation in Dopamine levels. To this proposal we made chitosan based nanoparticles of less of 400 nm, they incorporate L-Dopa and release slowly. In this work we describe the elaboration method of this nanoparticle transport system and its evaluation in a release model in physiological conditions.

2. Antecedentes

2.1 La enfermedad de Parkinson como problema de salud, su fisiopatología y terapéutica.

2.1.1 Generalidades sobre la Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por afectar el control motor y que se produce por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta* (SNc) La falta de dopamina lleva a la aparición de las manifestaciones clínicas clásicas, como son la bradicinesia, la rigidez muscular y el temblor en reposo (1). A pesar de que los síntomas clásicos comunes de la enfermedad están relacionados con la pérdida del control motor, también hay complicaciones que afectan otras funciones corporales llevando consigo el desarrollo de otro tipo de síntomas. Dentro de las anormalidades que no tienen relación con los síntomas motores se encuentran problemas de sueño, ansiedad, depresión, depleción cognoscitiva, demencia, disfunción olfatoria, dolor, alucinaciones, y alteraciones del sistema nervioso autónomo incluyendo constipación e hipotensión postural. Es importante mencionar que estas complicaciones pueden aparecer poco antes de las complicaciones motoras o pueden estar relacionadas con las alteraciones on-off motoras durante el tratamiento y ser exacerbadas por un inapropiado ajuste de fármacos anti-parkinsonianos, por lo cual pueden tener mayor relevancia en estadios tardíos de la enfermedad (1).

Hoy en día las enfermedades neurodegenerativas se presentan cada vez con mayor frecuencia en la población, siendo la enfermedad de Parkinson la segunda enfermedad con mayor prevalencia a nivel mundial, solo después de la enfermedad de Alzheimer. Se estima que hay de 4.1 a 4.6 millones de pacientes mayores de 50 años que padecen la enfermedad de Parkinson. En México, se ubicó como la cuarta causa de consulta en

el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, con una prevalencia de 40 a 50 casos por cada 100 000 habitantes al año (2).

La enfermedad de Parkinson debe su nombre al médico James Parkinson quien la describió como “parálisis agitante” en 1817, debido a las complicaciones motoras que caracterizan a los pacientes. Hoy en día se sabe que estas complicaciones motoras, se deben principalmente a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro, particularmente en la SNc, lo que compromete la funcionalidad equilibrada de los Ganglios Basales.

En ese sentido, en 1980 se estableció el modelo funcional clásico de los Ganglios Basales, el cual se enfocó en la fisiopatología del Parkinson y las discinesias. Dicho modelo ayudó a comprender de manera importante la estrecha relación entre los Ganglios Basales y los movimientos anormales y gracias a él en los últimos años se ha encontrado una gran cantidad de evidencia acerca de la íntima interconexión de la Corteza cerebral con los Ganglios Basales, a través de conexiones neuronales segregadas, pero paralelas. (3)

2.1.2. Los Ganglios Basales y sus alteraciones en la enfermedad de Parkinson.

Para el desarrollo de nuevos abordajes con respecto al tratamiento de la enfermedad de Parkinson, es imprescindible conocer anatómicamente y fisiológicamente las estructuras cerebrales involucradas en el desarrollo de la patología, particularmente los Ganglios Basales, para ello hay que resaltar el hecho de que antes de que se estableciera el modelo clásico ya se habían elaborado algunas descripciones de las redes neuronales que conectan estos núcleos. Dentro de estas, había una que describía el circuito como una red que conectaba a la Corteza, el Estriado y los núcleos de salida. Dentro de este modelo previo se proponía que el complejo estriado recibía aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo, estas aferentes convergían en el Estriado para establecer sinapsis con las Neuronas Espinosas Medianas (NEMs). Se consideraba

también que de las células de los núcleos de salida el 95% eran GABAérgicas y representaban neuronas estriatales, neuronas no espinosas GABAérgicas e interneuronas colinérgicas largas. Otras aferentes neuromoduladoras eran predominantemente dopaminérgicas que procedían de la SNc hacia el Estriado. Estas proyecciones duales GABAérgicas y dopaminérgicas convergían en las espinas dendríticas de un misma NEM. Aunado a esto, interneuronas estriatales recibían tanto aferentes glutamatérgicas y dopaminérgicas, y la mayoría de las sinapsis de las neuronas espinosas medianas, representando un punto de llegada desde aferentes estriatales y neuronas de proyección estriatales (4).

Sin embargo, desde hace poco más de tres décadas los ganglios basales son descritos en la clínica moderna, debido a su íntima conexión anatómica y funcional principalmente, como el conjunto de núcleos cerebrales subcorticales que conforman un circuito segregado que anatómicamente involucra a la Corteza cerebral y al Tálamo. Clásicamente han sido descritos como 4 núcleos y sus subdivisiones: el Neostriado en sus segmentos Caudado y Putamen, el Globo Pálido dividido en Globo Pálido externo (GPe) y Globo Pálido interno (GPi), la *sustancia nigra* dividida en *pars compacta* (SNc) y *pars reticulata* (SNr), y finalmente el Núcleo Subtalámico (NST). La interconexión de estos núcleos se puede explicar mediante tres circuitos con distintas tareas fisiológicas, un circuito límbico (control de emociones), un circuito asociativo (tareas cognitivas) y un circuito motor (control de movimientos corporales), siendo el último el circuito más afectado conforme progresa la enfermedad de Parkinson (5).

En la descripción clásica del modelo funcional de los Ganglios Basales, la interacción entre las vías de neurotransmisión glutamatérgicas y dopaminérgicas en el Estriado son las que regulan la actividad de las vías directa e indirecta del modelo, las cuales son consideradas con el mismo funcionamiento hipotético, una organización dual del estriado y los núcleos de salida de los Ganglios Basales. De tal manera que el circuito motor se origina en la Corteza frontal motora e involucra a las porciones motoras del Estriado, GPe, STN, GPi, SNr y el Tálamo, regresando a la Corteza frontal. Dentro de este circuito el núcleo Estriado y el NST se consideran como los principales núcleos de

entrada de información proveniente de la Corteza motora, mientras que el GPi en conjunto con la SNr son los núcleos de salida. Las aferentes de tipo glutamatérgicas provenientes de la Corteza y el Tálamo, llegan al Estriado y al NST en dos grupos distintamente organizados. De tal manera que los núcleos de entrada y salida están conectados por dos vías principales: la vía monosináptica GABAérgica “directa” que incluye solamente a las neuronas con soma en el núcleo estriado y con proyecciones a la SNr, y la vía polisináptica “indirecta” que incluye proyecciones GABAérgicas del estriado al GPe y del GPe al NST, y proyecciones glutamatérgicas del NST hacia el GPe, Gpi y SNr. (6)

Por lo tanto, de acuerdo con este modelo la activación de las neuronas de la vía directa posee un efecto inhibitorio en la actividad del GPi y la SNr, en contraste la activación de las neuronas de la vía indirecta tiene un efecto de excitación sobre estos núcleos. Así mismo las interacciones entre y dentro de ambas vías, presentan patrones de disparo neuronal independientes a su velocidad. Por su parte, tanto el GPi como la SNr envían proyecciones GABAérgicas al tálamo y al tallo cerebral, que de igual manera poseen una comunicación con la porción ventral del Tálamo (VL_a) la cual se conecta con las porciones motoras de la Corteza frontal (imagen 1). (6)

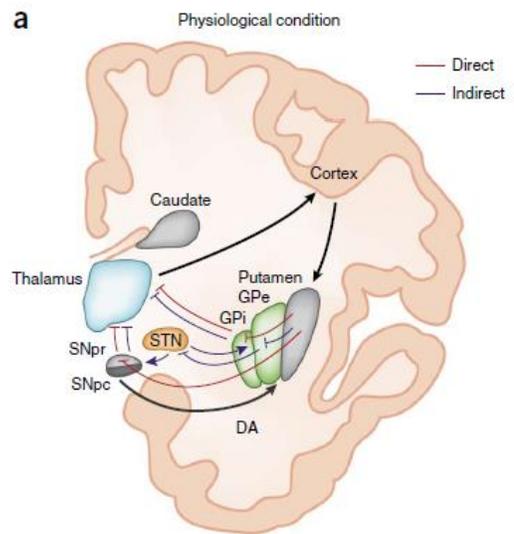


Imagen 1. Vía directa e indirecta clásica de los ganglios basales, que representa la comunicación inter nuclear para el control motor. Imagen tomada de Calabresi et al 2014

Es importante destacar que las NEMs estriatales se caracterizan por una expresión diferencial de receptores a Dopamina. Los receptores del tipo D1 son expresados predominantemente por las neuronas de la vía directa, mientras que los receptores D2 se encuentran expresados mayormente en la vía indirecta. Ambos tipos de receptores forman parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G; sin embargo, se

acoplan a diferentes proteínas y por lo tanto activan distintas vías de transducción de señales y producen respuestas bioquímicas diferentes después de su activación. Por lo tanto, se considera que esta segregación neuroquímica es la razón del efecto dicotómico de la activación de ambas vías. (4)

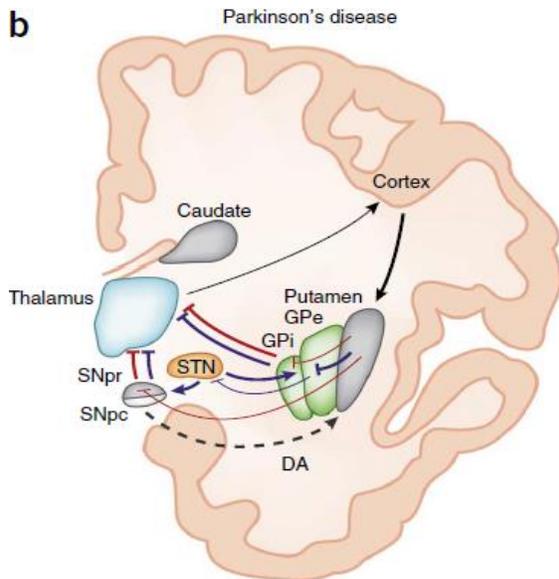


Imagen 2. Esquema de los ganglios basales donde se describe el desequilibrio del circuito motor de los ganglios basales en la enfermedad de parkinson (Imagen tomada de Calabresi 2014)

El modelo clásico de los ganglios basales, en años recientes se ha considerado un poco obsoleto para explicar en su totalidad la fisiopatología de la enfermedad, sin embargo, nos ayuda a tener un primer acercamiento y generalizar ciertos estadios para el desarrollo de estrategias farmacológicas y/o farmacéuticas. De igual manera, este modelo permitió dilucidar que algunas de las principales afectaciones motoras del estado parkinsoniano se deben a un incremento de la actividad de los núcleos GPi y SNr, los cuales llevan a la excesiva inhibición de los sistemas motores tálamo-corticales; el modelo también

predice que la disminución de dopamina reduce la activación de los receptores dopaminérgicos, resultando en una mínima inhibición de las neuronas de la vía indirecta y disminuyendo la actividad de las neuronas de la vía directa. Una menor inhibición de la vía indirecta lleva secuencialmente a una sobre inhibición del GPe, desinhibición del NST e incremento de la actividad de las neuronas en el Gpi/SNr. Por otra parte, la pérdida de dopamina ocasiona que las neuronas de la vía directa disminuyan su actividad causando una casi nula inhibición de la actividad del GPi /SNr (Imagen 2). A consecuencia de todo lo anterior, se produce una excesiva estimulación de los núcleos de salida de los ganglios basales acompañada por una inhibición de los sistemas del control motor, llevando a los síntomas motores clásicos de la enfermedad (5).

2.1.3 Tratamientos farmacológicos para la Enfermedad de Parkinson.

El tratamiento de los signos y síntomas de la enfermedad de Parkinson se basa en estrategias que tienen como objetivo recuperar o reemplazar el déficit de dopamina ocasionado por la muerte de las neuronas dopaminérgicas. A 50 años del descubrimiento de la L-Dopa, su utilización por administración oral ha sido el tratamiento más efectivo contra los síntomas motores; sin embargo, tiene una limitante para el tratamiento de síntomas no motores, por lo que actualmente sigue siendo un reto el tratamiento de estos últimos.

La utilización de agonistas de receptores dopaminérgicos, inhibidores de la monoamino oxidasa b (MAO B) y la catecol-O-metiltransferasa, son estrategias encaminadas a mejorar las propiedades farmacológicas de la L-Dopa; sin embargo, después de varios años de progresión, el tratamiento comienza a complicarse con la aparición de discinesias y otras complicaciones motoras. Por otra parte, alternativas como la administración de L-Dopa intraduodenal y procedimientos quirúrgicos como la estimulación cerebral profunda (DBS por sus siglas en inglés: Deep Brain Stimulation), promueven en los pacientes severas fluctuaciones motoras, inclusive algunos pacientes desarrollan comportamientos anormales por tratamientos con fármacos dopaminérgicos que incluyen trastornos o síndromes de desregulación dopaminérgica.

El conocimiento de las limitantes que presentan los actuales tratamientos y el avance en el desarrollo de nuevos fármacos depende de múltiples y convergentes factores, entre los que se incluyen descubrimientos que transforman el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad, la diversidad y calidad de los modelos animales de Parkinson, que en conjunto afectan la transferencia de investigaciones preclínicas de laboratorio a los hospitales de investigación clínica. A pesar de lo anterior, la investigación de nuevos blancos farmacológicos que permitan aliviar la sintomatología tanto motora como no motora sigue en progreso, el principal reto es el desarrollo de tratamientos que modifiquen la enfermedad y/o confieran neuroprotección a los núcleos cerebrales de interés, por lo cual un importante foco de investigación es la generación

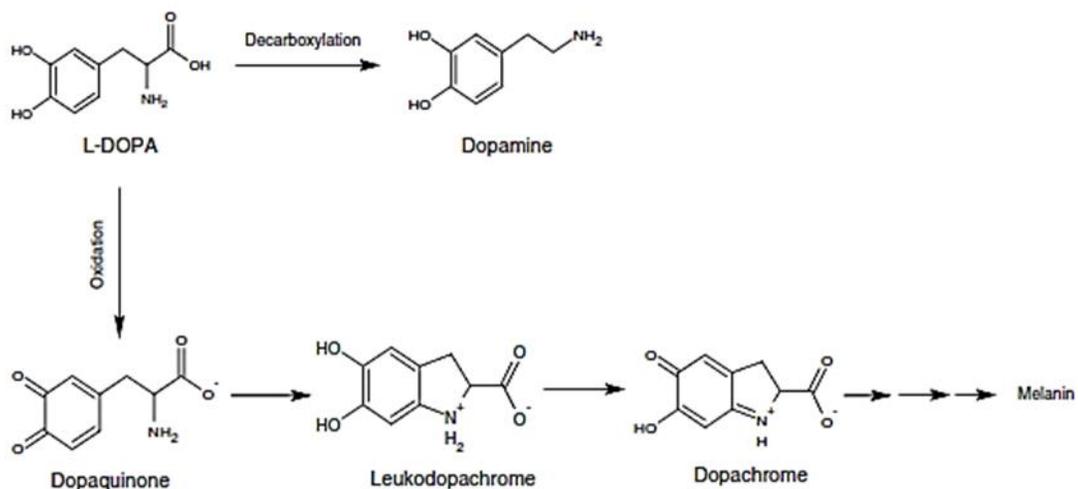
de nuevos tratamientos que puedan reducir la progresión de la muerte celular en neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas observada en la enfermedad. En este campo, la utilización de fármacos o inmunizadores pasivos ha sido de gran utilidad para el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, tales como la α -sinucleína. Cabe mencionar que, aunque el traslado de estos hallazgos a modelos de fases preclínicas no ha dado resultados completamente satisfactorios, nuevas estrategias podrían ayudar a superar numerosos retos en el desarrollo de tratamientos neuroprotectores para la enfermedad de Parkinson, incluyendo el entendimiento de la etiología y patogénesis de la enfermedad (1).

2.1.4. L-Dopa, química de la molécula, tratamiento estándar, ventajas, áreas de oportunidad, comportamiento Farmacocinético y Farmacodinámico.

En el caso de la utilización de L-Dopa para el tratamiento del Parkinson, para poder llevar a cabo estrategias de reformulación, es de vital importancia conocer su estabilidad molecular, velocidad y vías de degradación que pudieran modificar su farmacología, comprometiendo la eficacia terapéutica y a su vez llegar a producir efectos tóxicos. Precisando, la L-Dopa es un precursor natural de la dopamina presente en las neuronas catecolaminérgicas; después de su administración oral la L-Dopa se transforma en dopamina por acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DCAA) en el cerebro, de esta manera se recuperan los niveles del neurotransmisor y se restauran las funciones normales de las neuronas sobrevivientes. Sin embargo, solo alrededor del 1% de la cantidad de L-dopa administrada por esta vía llega hasta el sistema nervioso central. Esta baja concentración en el cerebro, se debe principalmente a la sensibilidad química de la molécula, así como a su degradación a nivel periférico por vía enzimática por acción de la DCAA periférica, la cual se encuentra en distintos órganos además del cerebro, como por ejemplo en las extensas paredes intestinales; por lo tanto, dicha degradación compromete la biodisponibilidad del fármaco. Por otra parte, también se ha reportado que la L-Dopa puede presentar reacciones oxidativas a

niveles de pH alcalinos, temperaturas elevadas, así como en ambientes oxidantes, formando compuestos que en solución presentan coloraciones oscuras. La L-Dopa además puede sufrir auto oxidación y oxidación enzimática (catalizadas por tirosinasas) que generan metabolitos tóxicos, como quinonas y radicales libres, los cuales pueden favorecer las condiciones de estrés oxidativo pre existente en la Sustancia nigra, que a su vez llevan a la muerte neuronal en este núcleo.

En el esquema 1 se ilustran las reacciones de descarboxilación y oxidación que pueden ocurrirle a la L-Dopa y que llevan a la formación de dopamina o que dan paso a la formación de melanina como producto final, respectivamente. La estructura química de la L-Dopa es similar a la hidroquinona, la cual tiene 2 grupos hidroxilo unidos a un anillo bencénico. La hidroquinona puede oxidarse a quinona en presencia de agua, la L-Dopa por su parte puede pasar por especies reactivas intermedias como la dopaquinona la cual puede eventualmente reaccionar y formar oligómeros de melanina (7).



Esquema 1: Reacciones químicas de degradación por descarboxilación y oxidación que puede sufrir la L-Dopa. Esquema tomado de Zhi Zhou 2012 (7)

Cuando la L-dopa se oxida, los átomos de hidrógeno de la estructura son eliminados. Bajo condiciones ácidas la oxidación puede ser llevada a cabo por los protones H^+ que se encuentran en abundancia. Debido a la participación de los iones hidrógeno en esta reacción, la formación de dopaquinona es dependiente de pH. Por otra parte, como la L-dopa posee tres sustituyentes ionizables, tiene 3 constantes de disociación que son $pK_{a1} = 2.3$, $pK_{a2} = 8.11$, $pK_{a3} = 9.92$. Por lo que cuando la L-dopa se encuentra en pHs de entre 2.3 y 8.11 posee tanto una carga positiva como una negativa, lo que contribuye a su baja solubilidad en estos rangos de pH. La administración oral de L-Dopa lleva consigo la interacción de la molécula con distintos, pH y enzimas presentes en todo el tracto gastrointestinal. Por lo que, en estudios de biodisponibilidad por administración oral del fármaco, es importante contar con un método analítico sensible y simple para poder detectar la presencia de productos de degradación tanto físico-químicos como enzimáticos; por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución (7).

En cuanto a los datos de farmacocinética reportados, después de una administración oral el tiempo de vida media de la L-dopa esta entre 1.54 a 2 horas, mientras que los niveles máximos del fármaco en plasma se encuentran a 1 hora. Cabe mencionar que el fármaco posee una impredecible absorción, pues esta se ve afectada por distintos factores, de tal manera que la concentración plasmática máxima (C_{max}) es variable dependiendo principalmente de la dosis administrada, así como del tiempo de vaciamiento gástrico. Una vez que se administra L-Dopa concomitante con inhibidores de DCAA 100/25 mg respectivamente, se alcanzan niveles plasmáticos entre 6-10 nmol/ml (1.18 – 1.97 $\mu\text{g/ml}$), mientras que con dosis de 200/50 mg se alcanzan niveles de entre los 13 y 17 nmol/ml (2.56 – 3.35 $\mu\text{g/ml}$). El umbral mínimo de concentración plasmática que debe alcanzarse para conseguir el efecto terapéutico es de 7 nmol/ml (1.38 $\mu\text{g/ml}$); sin embargo, se ha observado que esta concentración es entre 10 - 15 veces menor en fluido ventricular cerebro espinal. Por otra parte, se ha reportado que la L-Dopa posee un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas 25 – 50 %, dicha variación se debe a distintas metodologías utilizadas para su determinación. Finalmente, la L-dopa presenta una depuración de 0.4L/min (8).

Con el objetivo de mejorar la cinética de la L-Dopa, se han utilizado como estrategia inhibidores de la Catecol-O-Metil transferasa (COMT); por ejemplo el Tolcapone, el cual incrementa el Área bajo la curva cuando es administrada con L-dopa, pero no incrementa la Cmax. Por otra parte, el uso de Entacapone puede incrementar el área bajo la curva de un 20 a un 40 % y el tiempo de vida media casi un 40 %, sin cambios en la Cmax o la Tmax. Cabe mencionar que este abordaje farmacológico resulta efectivo; sin embargo, con el tiempo se produce la aparición de efectos no deseados relacionados con la utilización de estos inhibidores. En el caso de los inhibidores de la mono amino oxidasa B (MAO B) que evitan la transformación de Dopamina en Dopac, se ha reportado que la selegilina modifica los parámetros farmacocinéticos de la L-Dopa incrementando el tiempo de vida media casi en un 90%, sin incrementar la Cmax. En lo que respecta la rasagilina, aún no hay reportes de ensayos clínicos, pero en modelos murinos esta molécula es capaz de incrementar las concentraciones de L dopa casi al doble. (8)

2.1.5. Discinesias inducidas por L-dopa

Resulta hasta cierto punto impresionante que aun con toda la información farmacológica disponible para L-Dopa, los esquemas de tratamiento que se pueden diseñar con el fármaco y la administración concomitante de moléculas como coadyuvantes, aún no sea posible evitar las discinesias producidas con el tratamiento prolongado, por lo que esto nos lleva nuevas atmosferas de investigación para mejorar los tratamientos existentes.

Nuevamente, para poder proponer alguna novedosa estrategia de tratamiento es necesario tomar en consideración la descripción del funcionamiento de los Ganglios Basales, así como de las alteraciones presentes en estos circuitos, ocasionadas presumiblemente por un esquema de tratamiento con L-Dopa. En ese orden de ideas, el

modelo clásico propone que los síntomas en enfermedades como coreas ó el balismo resultan de la disminución de la actividad neuronal en el NST, GPi y SNr. Sin embargo, estos efectos son opuestos a los observados en el Parkinson, donde se ha descrito un aumento en la actividad de las neuronas del NST, SNr y GPi, así como una disminución en la actividad del GPe.

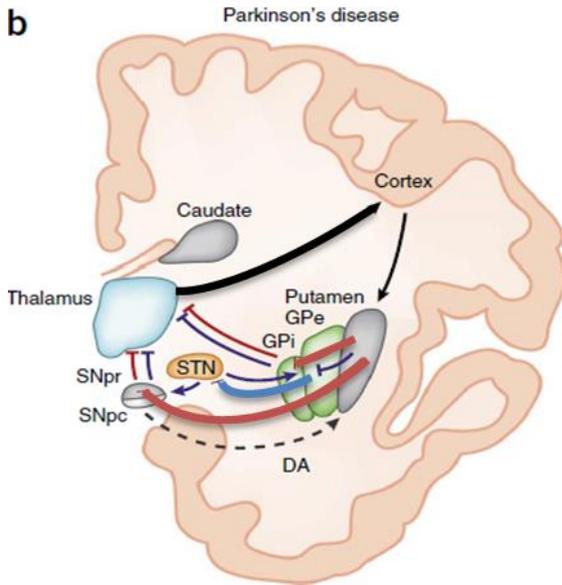


Imagen 3. Representación del estadio parkinsonico en el modelo clásico de los ganglios basales. imagen modificada de Calabresi 2014.

De acuerdo con lo anterior, el modelo predice que la L-Dopa puede causar las discinesias en modelos animales o pacientes por una excesiva inhibición de las neuronas que proyectan desde el Putamen hacia el GPe, llevando secuencialmente a la desinhibición del GPe, la sobreinhibición del NST y la inhibición de los núcleos de salida, GPI y SNr **(imagen 3)**. Adicionalmente, este modelo propone que la disminución de aferentes neuronales de los ganglios basales produce una reducción de los efectos inhibitorios sobre las neuronas tálamo corticales, lo que conduce a un exceso de actividad en las

áreas de la Corteza motora y la posterior aparición de discinesias. Como sustento de estas aseveraciones, diversos estudios electrofisiológicos han mostrado el incremento de la actividad neuronal en el GPe y una disminución de la actividad eléctrica en el GPi durante la inducción de discinesias con apomorfina en monos lesionados con MPTP y en pacientes con Parkinson (5).

Para poder establecer nuevos abordajes farmacológicos, es necesario hacer una revisión de la información pertinente de lo que son las discinesias causadas por el L-Dopa, bajo qué circunstancias del tratamiento se presentan, el tiempo que duran y que tan frecuentes son, con la finalidad de reconocer los distintos escenarios desde los cuales se puede abordar la problemática del tratamiento. Actualmente con la

información recabada durante varios años se ha vuelto casi una disciplina el estudio de las discinesias, de tal modo que se han podido clasificar y hoy en día se sabe que hay desde discinesias leves hasta las que son completamente incapacitantes, en todos estos casos es necesario modificar los esquemas de la administración de L-Dopa durante el desarrollo de la enfermedad.

Puntualizando, las discinesias debidas a la L-Dopa que se pueden presentar en los pacientes son causadas por respuestas fluctuantes durante el tratamiento. En ese sentido, aunque se ha descrito que se puede obtener una respuesta sostenida con relativamente dosis bajas, con la progresión de la enfermedad este periodo ideal se reduce y los pacientes experimentan episodios denominados "OFF", donde se producen los síntomas parkinsonianos que pueden ocurrir en cualquier momento del día y particularmente durante la noche, cuando el fármaco es metabolizado (bajo tiempo de vida media). Aparte de las fluctuaciones del movimiento, los pacientes pueden sufrir oscilaciones con síntomas no motores, como ansiedad, sudoraciones intensas, lentitud de pensamientos, fatiga e irritabilidad. (9)

Otro factor común que puede causar las discinesias es la pérdida de efecto de la L-Dopa (wearing off), este se manifiesta como una incapacidad de controlar los movimientos y comienza luego de algunos años del inicio del tratamiento con L-Dopa. El mecanismo fisiopatológico, se relaciona con la pérdida progresiva de terminales presinápticas de células dopaminérgicas, que lleva a la concentración de L-Dopa a niveles sub-terapéuticos entre cada dosis. Por lo que se ha observado un patrón en el que al principio hay una duración adecuada del efecto terapéutico, el cual va siendo progresivamente de menor duración entre cada dosis. El deterioro que se presenta cuando se va perdiendo el efecto de la L-Dopa, es generalmente predecible y mejora con la modificación del esquema de dosificación mediante la potenciación de su efecto a través de un incremento en la dosis del fármaco o administrando conjuntamente inhibidores de la MAO-B o de la COMT. Sin embargo, los pacientes con estas

alteraciones presentan temblor en horas tempranas de la mañana, inmovilidad nocturna o distonía nocturna, síntomas que mejoran después de la primera dosis matutina. (9)

Otro tipo de respuesta causada por fluctuación de L-Dopa es el denominado efecto retardado (delayed on). Causado por una absorción dispareja o atrasada después de la administración oral de L-Dopa, ya sea en el tramo inmediato proximal del yeyuno o a través de la Barrera Hematoencefalica, donde los aminoácidos neutros compiten con el fármaco por su absorción (9). Otro factor que contribuye a este efecto es el vaciamiento gástrico que se ve alterado en los pacientes con Parkinson.

Otro mecanismo que se ha conceptualizado sugiere que la pérdida de células dopaminérgicas conlleva la pérdida de la capacidad de amortiguación sináptica secundaria (9). El episodio OFF se refiere a esos momentos entre los intervalos de administración de L-Dopa y la inducción del subsecuente estado ON es retrasada o ausente, hasta que el paciente tiene el efecto de la administración anterior.

Por otra parte, se ha reportado que puede haber un comportamiento aleatorio entre estados ON y OFF, los cuales dan paso a episodios discinéticos. Estas transiciones entre los episodios ON y OFF son predecibles en estadios iniciales de la enfermedad, se trata de un patrón de respuestas oscilatorias que pueden ser observadas durante la progresión de la enfermedad y posteriormente de manera más frecuente en los estadios avanzados. Estas fluctuaciones pueden ser rápidas y al parecer no se encuentran relacionadas con las dosis orales de L-Dopa. Aunque el mecanismo exacto aún no ha sido descrito, se ha propuesto que la farmacodinamia y los cambios plásticos neuronales de las neuronas espinosas medianas en el estriado y en el circuito de los ganglios basales contribuyen a su generación (9).

Gracias a la gran cantidad de estudios realizados en pacientes con Parkinson, se ha podido realizar una tipificación de las discinesias causadas con L-Dopa, las cuales pueden resultar de la suma de los tiempos en los cuales fluctúa el efecto terapéutico, en la tabla A se describen de forma resumida los tipos de discinesias, que regiones anatómicas son más afectadas y si se encuentran asociadas o no al dolor. Es importante resaltar que las estrategias más comunes para abatir estos efectos son el cambio de dosis, variación en esquemas de administración y suspensión del tratamiento. Dichas estrategias varían entre cada individuo, dependiendo del estadio de la enfermedad, duración del tratamiento y los momentos en que se presentan las discinesias, por lo cual es necesario que los pacientes monitoreen sus episodios para ajustar las dosis o comenzar a utilizar otras moléculas disponibles.

	Most commonly affected site	Most common type of movements	Associated pain
LID type			
OFF-period dyskinesia	Lower limbs	Dystonic	+++
ON period	Extremities and neck	Choreic or choreoathetoid	-
<i>Peak-dose dyskinesia</i>			
<i>Square-wave dyskinesia</i>			
Diphasic	Extremities and neck	Choreic, choreoathetoid, dystonic, or ballistic	±

Tabla A: Tipos y características de las discinesias inducidas por L-Dopa. Tomado de Fox 2014 (9)

2.1.6. Desarrollo farmacéutico de L-Dopa y otros compuestos anti parkinsonianos.

La L-Dopa sigue siendo el estándar de oro para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, debido a que es muy efectivo en etapas iniciales de la enfermedad, es mejor tolerado, fácil de dosificar, además de que es más económico que otros fármacos nuevos en el mercado. Sin embargo, debido a las complicaciones que provoca el uso prolongado de dicho fármaco, la investigación para elaborar nuevos agentes terapéuticos no se ha detenido. Es por ello que durante varias décadas se han desarrollado distintas estrategias encaminadas a mejorar la absorción, y por lo tanto la

biodisponibilidad, para tratar de mejorar la cinética de la L-Dopa y mantener constantes sus concentraciones plasmáticas (10).

Una de las primeras estrategias fue la de formular medicamentos en los cuales se agregaba una combinación de L-Dopa con un inhibidor de la DCAA ya fuese la carbidopa (Sinemet®) o la benzeracida (Madopar®), con el fin de disminuir la transformación de L-Dopa a nivel periférico. Posteriormente se desarrollaron formulaciones complementadas con inhibidores de la COMT utilizando Entacapone principalmente, siendo el Stalevo® el único medicamento con los tres fármacos combinados. Gracias al desarrollo de estas nuevas formulaciones fue posible realizar investigaciones donde se observó que la fluctuación de las concentraciones de L-Dopa llevaba a incrementar la actividad dopaminérgica, haciendo que se modificaran las dosificaciones; sin embargo, algunos estudios clínicos mostraron que en ocasiones dichas modificaciones ocasionaron la pérdida de efecto terapéutico (11, 12).

Por otra parte, además de las combinaciones de fármacos, se han probado diversas formulaciones de liberación prologada, donde se observó que los pacientes comenzaban a presentar más sensibilidad y dependencia por concentraciones de L-Dopa a nivel plasmático, conduciendo a deficiencias terapéuticas. Dentro de dichas formulaciones se pueden encontrar formas líquidas, tabletas dispersables, tabletas de desintegración oral, formulaciones de liberación dual, es decir con dos liberaciones en intervalos de tiempo en una sola dosis, liberación mediante la formulación de infusiones, microesferas biodegradables, formas de liberación gastro-enterales, matrices de liberación controladas administradas por implantes que dependen de concentraciones plasmáticas, estas últimas con el fin de abatir los episodios on - off en los pacientes, sistemas de liberación pulmonar, vía nasal y transdérmica. Sin embargo, ninguna de estas formas farmacéuticas ha llevado a la desaparición de las discinesias causadas por la L-Dopa, dejando un campo abierto para la búsqueda del mejoramiento en las formulaciones (10).

Como una alternativa a las diversas reformulaciones de moléculas que ya han sido aprobadas para el Parkinson, se han propuesto otras estrategias terapéuticas como la utilización de moléculas prescritas con otras indicaciones terapéuticas (isradipina, antihipertensivo; topiramato o metil-fenidato, antiepilépticos) y el desarrollo de nuevas moléculas pequeñas que podrían ser aprovechadas en terapia génica. Sin embargo, hay que resaltar que muchas de estas estrategias tienen como objetivo principal el tratamiento y/o prevención de las discinesias, mientras que existen pocos abordajes dirigidos a la búsqueda de mejorar los síntomas no motores, retrasar la progresión de la enfermedad o con fines neuroprotectores. (1) En el caso del enfoque neuroprotector, la eficacia de factores neurotróficos como el derivado de líneas celulares gliales (GDNF) o la neurturina ya evaluados en fases clínicas 1 y 2, presentan una deficiencia en los mecanismos de liberación o de llegada de estos factores al cerebro, siendo esta un área de oportunidad que puede ser aprovechada. Por otra parte, la identificación de genes relevantes correlacionados con la patología puede llevar a la búsqueda de terapias que modifiquen la progresión de la enfermedad por medio de la caracterización de nuevos blancos terapéuticos para la formulación de fármacos específicamente dirigidos. De igual manera, nuevas moléculas dirigidas como α -sinucleína, proteína cinasa 2 (repetidos y ricos en leucina), y parkina prometen innovaciones terapéuticas, lo que hace suponer que estos descubrimientos son la primera parte de grandes avances por venir (13).

Se espera que el descubrimiento de nuevas moléculas y blancos celulares, en conjunto con la evolución de la tecnología en genómica y proteómica, llevará a una nueva etapa de desarrollo de moléculas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En ese sentido, estas nuevas moléculas del tipo biológico como proteínas, genes, e incluso células requerirán de nueva tecnología para su liberación y/o acarreo a sus distintos blancos terapéuticos (13), es ahí donde la nanotecnología ha estado teniendo una participación cada vez más relevante en las últimas dos décadas, proponiendo nuevos sistemas de acarreo o transporte denominados nanopartículas.

2.2 NANOPARTÍCULAS

2.2.1. Tipos de nanopartículas, características generales, ventajas, utilidades.

La nanotecnología es un campo de investigación que se ha expandido rápidamente, siendo las ciencias de la salud uno de ellos. Tomando en cuenta que la nanotecnología hace referencia a aquellos materiales elaborados por el humano que tienen un rango de dimensiones de entre los 5 y los 1000 nm. Esta dimensión es menor que algunas macromoléculas o proteínas. Dentro de las definiciones clásicas de nanopartículas que se pueden encontrar en enciclopedias farmacéuticas hay una elaborada hace ya casi 40 años que las define de la siguiente forma: las nanopartículas con propósitos farmacéuticos son partículas sólidas coloidales que tiene un tamaño que va de 1 a 1000 nm (1 μ m) que consisten en materiales macromoleculares en los que el principio activo, es disuelto, entrampado, encapsulado, o para que el principio activo se adsorba. La definición anterior difiere de las elaboradas por los físicos o los científicos del área de materiales que limitan el tamaño de las nanopartículas a dimensiones no superiores a los 100 nm. Aunque la nanotecnología ha servido principalmente para obtener grandes avances y aplicaciones en áreas de comunicación, ingeniería, física, química y robótica, también ha sido utilizada en medicina con distintos fines, como lo es la liberación de fármacos con fines terapéuticos y/o diagnósticos para el tratamiento de enfermedades, síndromes o trastornos.

Las nanopartículas ofrecen la oportunidad de conferirles propiedades para ser compatibles con distintos equipos o blancos biológicos. Por lo cual, debido a las características de tamaño y forma de las nanopartículas, es posible controlar sus parámetros físicos para conferirles alguna función específica o modificar parámetros farmacológicos para volverlas blanco-selectivas y que puedan ayudar a tratar enfermedades o sugerir mecanismos de acción, interacción y/o absorción extracelular e

intracelular. En ese orden de ideas, debido a que para poder tratar enfermedades del sistema nervioso central es necesario que los fármacos atraviesen la barrera hematoencefálica, se han propuesto nuevos sistemas acarreadores para llevar a cabo esta tarea.

Las terapias modernas dirigidas a pacientes y enfermedades particulares se están desarrollando con formulaciones y/o activos farmacéuticos para un tipo celular o tejido, debido a que es necesario que estos activos sean liberados en sitios de acción específicos para alcanzar efectos terapéuticos mejorados. Por ejemplo, los mecanismos de liberación citosólica serían más adecuados para principios activos que habitualmente son expulsados de las células por medio de transportadores como los MDR que son transportadores de resistencia contra fármacos, lo que reduce la efectividad de dichos activos, por lo que las nanopartículas con la capacidad de penetrar células podrían actuar como reservorios de fármaco intracelulares. Adicionalmente, los avances nanotecnológicos podrían mejorar las terapias de fármacos dirigidas, establecer perfiles de liberación sostenida y proveer una protección a los activos de su expulsión y/o degradación (14).

Cabe mencionar que, aunque el tamaño de las nanopartículas es ideal para poder distribuirse por circulación sistémica, no todos los materiales resultan adecuados para este propósito; por ejemplo, los polímeros naturales (proteínas y polisacáridos) no son muy utilizados debido a la gran variabilidad en su pureza, además de requerir un entrecruzador que puede desnaturalizar el fármaco embebido o encapsulado. Por el contrario, los polímeros sintéticos tienen una mayor presencia y aceptación en esta área. De manera particular, dentro de los polímeros más utilizados están el poli- ϵ -caprolactona (PCL), el poli ácido-láctico (PLA), poli (ácido-glicólico) (PGA) y sus copolímeros, poli (ácido láctico-coglicólico) (PGLA). Además, la utilización de co-polímeros en bloques de PLA o polietilenglicol (PEG) y poli-aminoácidos, que se han utilizado para elaborar nanopartículas y estructuras micelares. Estos materiales son conocidos por su

biocompatibilidad y capacidad de ser absorbidos a través de vías naturales; además de poseer una tasa de degradación acorde a la velocidad de liberación que puede ser manipulada con base en la relación de PLA o PCL, incrementar su hidrofobicidad para el PGA, e incrementar su hidrofiliidad. En otro plano de materiales, nanopartículas basadas en sistemas de alta compatibilidad biológica como Liposomas, micelas, micelas con forma de gusano, polimerisomas y vesículas se han propuesto como prometedores vehículos, por su tamaño pequeño e hidrofiliidad del recubrimiento.

Claramente la versatilidad de los materiales disponibles permite formular nanoacarreadores con diversos activos y explorar distintas vías de administración a regiones específicas como puede ser sistema linfático, cerebro, paredes arteriales, pulmones, hígado, bazo, o para presentar una larga duración en torrente sanguíneo. Existen gran variedad de protocolos de síntesis de nanopartículas que normalmente son diseñados con base en ruta de administración o el principio activo o ambos, una vez elegidas estas, se deben encontrar las condiciones de síntesis más adecuadas para obtener las mejores características de partícula, dentro de las cuales las más importantes son la dimensión de la partícula, eficiencia de encapsulación o entrapamiento, potencial Z (carga eléctrica superficial) y características para la liberación del activo (15).

2.2.2. Tipos de nanopartículas

Nanopartículas poliméricas: son partículas con una dimensión generalizada $< 1 \mu\text{m}$ que pueden ser preparadas con polímeros sintéticos o naturales, son muy importantes en investigación pues permiten o confieren la habilidad, de liberar una amplia gama de fármacos a distintas áreas del cuerpo en periodos prolongados de tiempo. Durante la década de los 80 y 90s, los sistemas de liberación eran desarrollados para mejorar la eficiencia y minimizar los efectos tóxicos. Las primeras nano y macropartículas eran regularmente formuladas de poli ciano alquilacrilatos (14).

Nanopartículas Inorgánicas: consisten en materiales inorgánicos como sílica y alumina, algunas metálicas, óxidos metálicos, sulfuros metálicos. La variedad en estructuras, tamaño, forma y porosidad de este tipo de nanopartículas permite la adición superficial de varios ácidos carboxílicos saturados e insaturados, tioles, aminas y alcoholes, lo cual les puede conferir selectividad. Además, son relativamente estables a distintas temperaturas y pH, aunque hay aun dudas sobre su utilización debido a que su lenta disolución puede comprometer cuestiones de seguridad, especialmente si se requieren para administraciones en tiempos prolongados (14).

Nanopartículas Sólido lipídicas: basadas en acarreadores coloidales sub micrométricos, fueron inicialmente desarrollados en la década de los noventa. Presentan mejor estabilidad que los sistemas liposomales y su centro relativamente rígido consiste de lípidos hidrófobos sólidos a temperatura ambiente y corporal, rodeados por una monocapa de fosfolípidos, estabilizados por surfactantes en altas concentraciones. Debido a su fácil biodegradación son menos tóxicos que las partículas poliméricas o cerámicas (14).

Liposomas: son vesículas con bicapas concentradas y rodeadas de una membrana fosfolipídica, su naturaleza anfifílica hace fácil su modificación superficial, poseen un

buen perfil de biocompatibilidad que ayuda a mantener en circulación moléculas proteínicas y peptídicas. De igual manera, permite la formulación de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Estos pueden ser diseñados para acarrear activos entre membranas o liberarlos por fusión membranal. Sin embargo, a pesar de todas sus ventajas, los liposomas no han tenido un gran impacto en las formulaciones con finalidades terapéuticas debido a su baja estabilidad, además de que al no ser modificados tienen una gran inespecificidad por tejidos (14).

Dendrímeros: son macromoléculas basadas en la polimerización de monómeros u oligómeros que forman capas o ramificaciones que van duplicando o triplicando el número periféricamente. Generalmente son de estructura simétrica, y se les puede crear un espacio destinado para ser un sitio activo con una adecuada funcionalización. El espacio vacío entre estructuras, la longitud de entramado, su fácil modificación, preparación y la facilidad de elegir el tamaño le dan gran potencial para formular activos. Sin embargo, los dendrímeros requieren mayor investigación para mejorar sus perfiles de toxicidad, biocompatibilidad y biodistribución (14).

2.2.3 Caracterización de la nanopartícula: tamaño, y potencial Z

El objetivo inicial de las formulaciones con base en partículas de tamaño micrométrico era que pasaran de la luz intestinal a sistema linfático después de una administración oral; sin embargo, el efecto terapéutico de estas formulaciones resultaba pobre, debido a que, al ser administrado intravenosamente, las partículas sufrían una rápida depuración por fagocitosis. Esta fue una de las razones que detonó el diseño de nanopartículas, las cuales, por su menor tamaño, son mejores candidatas para ser administradas y poseer una liberación intravenosa, tomando en cuenta que los capilares sanguíneos más pequeños del cuerpo oscilan entre los 5 y 6 μm de diámetro, por lo que partículas de significativamente menor tamaño pueden ser distribuidas de

manera más uniforme sin formar agregados y evitar embolismos. Aunado a esto, se sabe que varios mecanismos celulares de internalización de sustancias se llevan a cabo mediante la formación de vesículas de diversos tamaños que pueden ir de 0.5-5 μm para la pinocitosis, de 60 – 80 μm y de 100 a 200 μm para mecanismos de endocitosis por caveolas o mediado por clatrininas respectivamente, por lo cual las nanopartículas pueden atravesar entre distintos tejidos (14, 15,16).

Además de sus dimensiones, para poder predecir de mejor manera el comportamiento de las nanopartículas en los sistemas biológicos es necesario conocer si presentan agregación o aglomeración, su morfología, porosidad, área superficial, carga superficial (eléctrica), formas cristalinas del material con el que son elaboradas y propiedades de disolución (17). Mientras más información se posea acerca de estas características, se podrían hacer mejores predicciones y también se podrían realizar modificaciones posteriores a la formulación.

2.2.4 Potencial Z

El potencial Z es un término utilizado científicamente en los sistemas coloidales para referirse a un potencial electro-cinético, un potencial eléctrico en una doble capa interfacial es localizado de un plano de deslizamiento desde la interface, hasta un punto en el fluido que rodea la partícula, el termino expresa la diferencia del potencial entre el medio de dispersión y la capa estática del fluido en contacto con la partícula dispersa. Este potencial se genera además por las interacciones de tipo coulombicas generadas por fuerzas físicas entre dos o más objetos (18). Por lo tanto, el potencial ζ se define como el promedio del potencial electrostático existente desde un plano hidrodinámico de deslizamiento, que se encuentre entre el plano popa y el final de la capa difusa, normalmente considerado cerca de los 0.2 nm desde la superficie de la partícula. La medida de la potencial zeta resulta ser muy simple y es una manera sencilla de

caracterizar la superficie de las partículas o coloides cargados, las conclusiones determinadas a partir del análisis de los datos obtenidos en estos ensayos se pueden correlacionar con concentraciones, distribuciones, adsorciones, ionizaciones y exposición o protección de restos cargados, regularmente las unidades de esa determinación se dan en miliVolts (mV).

Cabe destacar que el potencial Z puede afectar de manera directa las propiedades farmacocinéticas de nanosistemas en el cuerpo, (18, 19) por lo cual este parámetro debe ser considerado al momento de formular un sistema con un blanco específico, ya sean tejidos o tipos celulares. En ese sentido, las nanopartículas convencionales con carga negativa sin medicamento o modificación superficial, una vez dentro del torrente sanguíneo pueden ser rápidamente opsonizadas y captadas rápidamente por macrófagos, de igual manera se sabe que el sistema retículo endotelial (RES) presente en el hígado y bazo, es el mayor obstáculo para dirigir las formulaciones por tener una gran habilidad de reconocimiento de estos sistemas y removerlos de la circulación periférica. (19)

Por otra parte, una vez que la nanopartícula es captada por las células en sistemas biológicos, se puede dividir el proceso en dos pasos, el primero es un paso de contacto y unión de la partícula con la membrana y el segundo paso es la internalización. El primer paso que conlleva el contacto del sistema se ve prioritariamente afectado por la carga eléctrica de la partícula, por lo que la variación de la carga superficial puede ayudar a controlar la unión a tejidos, de tal manera que las partículas con altas densidades eléctricas superficiales poseen una alta tasa de captación celular, lo que facilita su llegada a compartimentos celulares que pueden ser evaluados tanto in vitro como in vivo. (18, 19)

En lo que respecta a magnitudes o valores de carga eléctrica, se considera un potencial Z adecuado u óptimo cuando este se aleja en mayor proporción a la neutralidad (0 mV). En ese sentido, se ha observado que también partículas con potencial Z negativo (alrededor de los -43 mV) presentan una elevada captación celular, a pesar de que las membranas celulares presenten una alta densidad en cargas aniónicas, se ha teorizado que las partículas tienen una alta interacción con sitios catiónicos que forman clusters o huecos en la superficie celular por la alta tasa de repulsión por estas cargas promoviendo así que la absorción de las nanopartículas se dé por una interacción electrostática llevada por una neutralización de cargas, favoreciendo así la inserción de la partícula. (18, 19) Una vez dentro de las células, las propiedades eléctricas, también influyen en el blanco intracelular que pueden ser lisosomas, mitocondria, citoplasma, los cuales pueden ser modificados, cambiando la carga superficial.

2.2.5.- Nanopartículas dirigidas al SNC: Mecanismos de transporte a través de Barrera Hemato-encefálica

Una parte importante que se debe tomar en cuenta para diseñar una nanopartícula es determinar el sitio de llegada o blanco al cual está dirigido, si debe atravesar barreras biológicas después de su administración y de ser así, que barreras biológicas son estas y que características poseen. En el caso de las nanopartículas dirigidas a Sistema Nervioso Central, uno de los mayores obstáculos con los que se enfrentan es con el paso a través de la barrera hemato-encefálica. La barrera hemato-encefálica es una estructura formada por un complejo sistema de células endoteliales, astrocitos, pericitos y mastocitos perivascuales. El grosor de esta barrera es atribuido al tejido vascular cerebral, cuyas células se encuentran conectadas de lado a lado por uniones estrechas que esta conformadas por proteínas como ocludinas, claudinas, moléculas de adhesión, que permiten el paso de linfocitos, neutrófilos y células dendríticas necesarias para la respuesta inmune y uniones adherentes que proveen de fuerza mecánica a las células adyacentes y las conforman caderinas y cateninas.

La principal característica de la barrera hemato-encefálica es que es selectivamente permeable, por lo que discrimina que compuestos pueden pasar a sistema nervioso central. Debido a esta permeabilidad selectiva el paso de pequeños compuestos lipofílicos de entre los 400 y 500 Da es sencillo, mientras que el acceso de agentes terapéuticos como antibióticos, anticancerígenos y moléculas hidrófilas suele ser limitado. Aunado a lo anterior, se ha descrito de la presencia de transportadores y enzimas expresados por las células en la barrera que transportan los agentes externos de regreso al lado apical. Por lo tanto, si se desea que macromoléculas de interés puedan pasar a través de la barrera hemato encefálica, se deben activar mecanismos celulares, de manera que tales sustancias pasen a través de la barrera sin alterar las proteínas de membranas celulares del espacio apical y el basolateral, conservando sus propiedades particulares. (20, 21)

Entre los mecanismos o rutas de transporte celular para macromoléculas través de la barrera hemato-encefálica que pueden ser aprovechados por formulaciones con nanopartículas se incluyen: el transporte mediado por acarreadores, mediado por receptores, por adsorción y endocitosis de fase fluida.

Transporte mediado por acarreadores: este tipo de mecanismo es facilitado por proteínas específicas de transporte que acarrean moléculas hidrofílicas pequeñas, como aminoácidos, nucleósidos o glucosa desde el torrente sanguíneo al cerebro y viceversa. Este transportador se encuentra presente en ambos lados de la barrera y su funcionamiento bidireccional es dependiente de gradientes químicos y eléctricos. Dentro de estos transportadores se encuentran el de la glucosa GLUT 1, lactato MCT 1, el de aminoácidos largos neutros LAT1 y el de adenosina CNT2 entre otros (20).

Transporte de transcistocis mediado por receptores. Este tipo de transporte es mediado por receptores presentes en la superficie luminal de los capilares endoteliales, los cuales dirigen la endocitosis por unión a receptor, seguida por un transporte con endosomas y lisosomas o transcistosis a través de las células, para terminar con una exocitosis en la superficie luminal o en capilares endoteliales. Este mecanismo es utilizado para transportar proteínas como la insulina, la transferrina, lipoproteínas de baja densidad y leptina.

Endocitosis adsortiva. Funciona de manera similar a la mediada por receptores, que también se utiliza una vesícula como medio de transporte, la diferencia está en que se requiere de una molécula con una alta carga predominante ya sea catiónica o aniónica que promueve una interacción inespecífica con la membrana celular, un ejemplo de estas es la albumina cationizada (21).

Endocitosis de fase fluida. Es un mecanismo no específico que se basa en las invaginaciones de las células que dan lugar a la formación de vesículas. De tal manera que el contenido en el fluido extra celular queda dentro de la vesícula y es internalizado a las células (20).

Otros factores que son de importancia y que se deben tomar en cuenta cuando las nanopartículas se encuentran en sistemas biológicos es que antes de que estas comiencen a interactuar con barreras biológicas, en primer lugar, entran en contacto con todas las biomoléculas presentes en los fluidos vitales. Por ejemplo, una vez que las nanopartículas ingresan a torrente sanguíneo hay varias fuerzas que se originan entre esta y el medio que la rodea, esta energía que se presenta es similar a la de los coloides, pero en escala nanométrica, dentro de estas se encuentran fuerzas hidrodinámicas, electrodinámicas, electrostáticas, de solvatación e interacciones estéricas. Estas fuerzas se ven influenciadas a su vez por factores como el pH y

temperatura plasmáticos, iones, proteínas, y especies oxidativas, que son consideradas por la teoría DLVO ((Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) para el comportamiento de las nanopartículas (20.21).

Siendo más precisos, una vez que las nanopartículas ingresan por vía intravenosa, las proteínas plasmáticas, rápidamente interactúan con la superficie de ellas, envolviéndolas en una capa denominada “Corona proteica”, esta corona afecta principalmente el tamaño y carga eléctrica comprometiendo a su vez las demás características fisicoquímicas de la nanopartícula. Aunque, las características de la corona dependen directamente de la carga y tamaño de partícula, la corona proteica determina el tipo de interacciones que pueden surgir en el medio, y por lo tanto el comportamiento y destino de la partícula. Por ejemplo, si dentro de la corona hay presencia de opsoninas (anticuerpos no específicos y complementos proteicos), estas promoverán el reconocimiento de las células blancas sanguíneas y macrófagos llevando al proceso de opsonización que promueve la fagocitosis de macrófagos comprometiendo la presencia de las partículas en el plasma (16).

2.2.6.- Nanopartículas y L-Dopa

Hoy en día los tratamientos para enfermedades como el Parkinson muchas veces se encuentran rebasados por la complejidad de la enfermedad y/o el deterioro a causa de la progresión del padecimiento, lo cual ocasiona que los pacientes sufran un gran deterioro en su calidad de vida. Uno de los tratamientos que presenta este tipo de dificultad es la L-Dopa, que como ya se ha señalado anteriormente, el tratamiento en si presenta algunas desventajas y/o complicaciones. Debido a esto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y tradicionales se ha ido incrementando en años recientes. Sin embargo, debido a la capacidad de la L-Dopa para mejorar los síntomas de los pacientes y su relativamente bajo costo, aún resulta ser una molécula muy

atractiva para el tratamiento del Parkinson. Es por ello que diversos grupos interdisciplinarios relacionados con las áreas de la farmacología, farmacéutica y las neurociencias, están investigando la causa de los efectos secundarios, la durabilidad del tratamiento, las consecuencias de cambios de esquemas de dosificación y cómo prevenirlos o ayudar a mejorar los efectos terapéuticos de este principio activo.

Como se indicó previamente, en lo que respecta al desarrollo farmacéutico y farmacológico para el tratamiento del Parkinson una opción para la mejora de los tratamientos, es la de reformular las moléculas actualmente disponibles para el tratamiento de los pacientes. Este tipo de planteamientos se basa en la modificación tanto de la farmacocinética y farmacodinamia de las moléculas mediante la elaboración de formas farmacéuticas mejoradas, para mejorarlas se hacen reformulaciones buscando cambiar las vías de administración o extender la vida media del fármaco, adicionando activos y/o excipientes que ayuden a mejorar el efecto terapéutico. Debido al auge de las nanociencias en las últimas décadas, la formulación de activos en microesferas y nanopartículas está recibiendo un gran impulso, lo que ha producido resultados prometedores.

Mediante la búsqueda de trabajos disponibles en las redes de información científica se pueden encontrar algunos tipos de partículas basadas en diferentes tipos de materiales, las cuales tienen formulada L-Dopa o derivados de esta como principio activo con el fin de liberar de manera gradual y/o acarrear de manera más eficiente el fármaco a su sitio de acción. Dentro de las estrategias menos utilizadas se encuentran la formación de nanopartículas configuradas en dendrímeros conformados por monómeros de L-Dopa, estas preparaciones (22) requieren un largo procedimiento para su obtención y no se encuentra mucha información acerca de su utilidad en modelos celulares o animales. También se pueden encontrar partículas elaboradas con polímeros de metacrilatos con quitosano, (23,) las cuales presentan cinéticas de liberación prolongada, pero los métodos de preparación que pueden resultar muy complejos. Otro tipo de partículas

que ya han sido diseñadas para formular L-Dopa son las elaboradas con PGLA (Poli ácido láctico coglicólico), estas han sido formuladas con el profármaco L-Dopa metil ester (24,25) el cual requiere de la des-esterificación de la molécula original en un paso metabólico para poder obtener L-Dopa y posteriormente convertirse en dopamina, dicho paso podría ser mejorado con sistemas de liberación que lleven la L-dopa a su sitio de acción. Otras formulaciones basadas en PGLA se han elaborado para ser administradas por vía intranasal, (26,27) observándose que este tipo de formulaciones mejoran bastante los efectos discinéticos con respecto al tratamiento con L-Dopa por vía oral. Por otra parte, el costo de los materiales y el método de preparación son factores que podrían ser una limitante en la formulación; por ejemplo, el PGLA posee potenciales Z con polaridad negativa, lo que podría ser mejorado utilizando materiales que inviertan esta carga para mejorar las interacciones con membranas celulares. Es por ello que diversos grupos de investigación han optado por utilizar materiales de base lipídicas como la fosfatidil-colina, colesterol y triglicéridos (28,29); sin embargo, estos tienen la desventaja de que poseen una compatibilidad muy alta con las barreras biológicas, por lo que tienen gran inespecificidad, lo que conlleva a comprometer la biodisponibilidad al ser absorbidos por múltiples tejidos. Otros grupos reportan trabajos en los cuales se valen de diseños experimentales basados en la estadística (30) que son de gran utilidad para explorar todas las condiciones de elaboración que ayuden a mejorar el rendimiento de los métodos para obtener las partículas. Gracias a todos estos abordajes experimentales se han identificado algunas áreas de oportunidad que pueden ser aprovechadas para formular nuevas nanopartículas para acarrear L-dopa a sistema nervioso central. Uno de los materiales con los cuales se puede proponer una formulación y que presenta varias ventajas con respecto a otras materias primas es el Quitosano, el cual es descrito de manera más amplia en la siguiente sección.

2.2.7.- Quitosano, propiedades, ventajas y métodos de preparación.

El quitosano, es un derivado de la quitina, uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, solamente después de la celulosa. La quitina es un homopolímero compuesto por cadenas de N acetil glucosamina unidos por enlaces β 1,4, (31,32) que forma parte de la cutícula protectora (exoesqueleto) de crustáceos como los cangrejos, camarones, langostas y de barreras celulares de hongos de genero aspergillus y mucor.

Para la obtención del quitosano, la quitina es sometida a una des-acetilación alcalina y de manera comercial se encuentra en pesos moleculares promedio entre 3800 y 2000 KDa, en forma de hojuelas, polvo ó en solución con un 66 % a un 95% de desacetilación, de tal modo que el quitosano queda conformado por unidades con una amino primario y dos grupos hidroxilo por cada anillo de 6 carbonos. El quitosano es insoluble en agua y en solventes orgánicos, presenta solubilidad en soluciones ácidas de baja concentración con un pH menor a 6.5 por lo que particularmente es disuelto en soluciones acidas diluidas entre porcentajes de 1 – 3%, que convierte a las unidades de glucosamina grupos R-NH₃⁺ solubles dejando al polímero en una estructura lineal. El grado de des-acetilación y peso molecular pueden definir la capacidad de formular micro o nanopartículas, así como el tamaño de las partículas que pueden ser formadas, (31-33)

Dentro de las ventajas que ofrece el quitosano se encuentra la facultad de ser biocompatible con tejidos vivos, no causa reacciones alérgicas y el organismo no presenta rechazo hacia el mismo. Además, su metabolismo produce compuestos inocuos (como amino ácidos) que son completamente absorbidos por el cuerpo humano y se degrada por reacciones de fermentación que no son toxicas y que se depuran con facilidad del organismo sin causar efectos no deseados o reacciones adversas. De igual manera tiene un cierto potencial antimicrobiano, absorbe metales como el mercurio y cadmio, presenta una buena adhesión con habilidades de coagulación y actividad inmuno-estimuladora. Por otra parte, el quitosano permite obtener sistemas de

liberación modificada para el control de la administración de principios activos, evitando la utilización de solventes orgánicos que pueden resultar tóxicos durante su elaboración. Adicionalmente, debido a sus funciones muco-adherentes permite incrementar el tiempo en los sitios donde se absorbe. Por otra parte, la quitina y el quitosano poseen una baja toxicidad, en pruebas de laboratorio se calculó una LD50 de 16g/kg de peso, cantidades similares al del azúcar. Por estas razones el quitosano se ha empleado en aplicaciones de tipo clínico para la preparación de formulaciones mucoadhesivas, para mejorar la velocidad de disolución de activos pocos solubles y para dirigir y potenciar la absorción de algunos péptidos. (31, 32)

El quitosano tiene capacidades de hidratación pH-dependientes, por lo que tiene la propiedad de formar geles in situ. Para lograr este tipo de geles se adicionan otros polímeros como el ácido poliacrílico o se modifica su estructura por medio de tiolaciones que pueden alterar aún más las propiedades iónicas del polímero. Otra propiedad atribuida al quitosano es la de mejorar la capacidad de transfección, esto se debe probablemente a que los fármacos basados en DNA y siRNA tienen características polianiónicas y pueden conformar complejos estables con el quitosano, por lo que las partículas formadas poseen un potencial Z positivo si la relación del polímero respecto a la molécula es lo suficientemente alta.

Una de las razones por las que el quitosano resulta una opción atractiva para formular nanopartículas es porque al igual que otros polisacáridos, es capaz de inhibir a las bombas de eyección celular (proteínas de resistencia a fármacos), siendo las moléculas de quitosano de alto peso molecular las que presentan mayor inhibición. (35). Adicionalmente, el quitosano puede potenciar las capacidades de permeación de moléculas de interés. Dicha capacidad se debe al carácter electropositivo que posee el polímero, lo que permite que durante la interacción de las partículas de quitosano con las membranas biológicas se produzca una reorganización de las proteínas de uniones estrechas. Sin embargo, estas propiedades de interacción dependen en gran parte del

grado de acetilación y de la masa molecular del quitosano, ya que a mayor desacetilación y peso molecular se produce una mayor permeabilidad. En estudios realizados en modelos de membranas celulares se ha mostrado que gracias a las propiedades del quitosano este se absorbe de mejor manera en las primeras porciones del duodeno. Aunado a esto, también se ha evaluado la capacidad de interacción con modelos de capas fosfolipídicas, encontrándose una excelente interacción del polímero con este tipo de moléculas (34) lo que permitiría explorar distintas vías de administración.

En ese sentido, se han propuesto varias vías de administración, en el caso de la vía oral se ha observado que las propiedades derivadas de los derivados tiolados del quitosano le confieren un mayor carácter catiónico, lo que puede mejorar la biodisponibilidad de activos que se absorben en el duodeno. En el caso de la administración ocular, se ha propuesto que los sistemas de quitosano presentan una gran retención y biodistribución de los fármacos aplicados tópicamente en los ojos, por lo que aprovechando las propiedades de gelación in situ se pueden elaborar preparaciones como hidrogeles, nanopartículas y formulaciones de tipo coloidal, capaces de mejorar la eficacia terapéutica mediante el incremento del tiempo de la formulación y por ende del activo en el ojo (38,39).

Otra vía de administración que en primera instancia pareciera no ser la más adecuada es la vía nasal, ya que la nariz es un sitio donde hay mucha secreción y por lo tanto el tiempo que pueden estar los medicamentos suele ser muy limitado, lo que puede comprometer la biodisponibilidad de los fármacos en el organismo. Sin embargo, si se toma ventaja de las propiedades de quitosano como potenciador de la permeabilidad y muco-adherente se puede explotar con mejor efectividad esta ruta de administración. Lo anterior ha sido sugerido por estudios clínicos llevados a cabo con una formulación de quitosano-polaxamero188 (36), los cuales mostraron un incremento en la velocidad de absorción y biodisponibilidad de una formulación en atomizador nasal de fentanyl

comparando formulaciones de nanopartículas con y sin quitosano, con una ruta de administración transmucosal oral (lozenge).

Otras vías de administración exploradas como la bucal, la vaginal, la parenteral y la intravesical también han mostrado algunos resultados que prometen mejorar la dosificación de distintos principios activos, tomando en cuenta que dichas formulaciones son diseñadas con base en el tipo de vía más adecuado para el fármaco así como las modificaciones que pueden ser de ayuda para mejorar el efecto terapéutico de los activos. (37)

En formulaciones farmacéuticas comerciales, el quitosano se ha utilizado directamente como vehículo de tabletas de compresión directa, como desintegrante, como adherente, agente granulante y como acarreador en preparaciones de sistemas de liberación. En lo que respecta a los métodos de preparación de nanopartículas, se propone que este polímero es capaz de ser procesado en distintas técnicas usualmente comunes, tales como el método de emulsión y entrecruzador, método de precipitación y método de emulsión por goteo, entre otros. Por lo tanto, la selección del método a utilizar dependerá de varios aspectos como el tamaño de partícula requerido, la estabilidad química y térmica del principio activo a formular, la reproducibilidad de los perfiles de cinética de liberación, la estabilidad del producto final, así como de su toxicidad una vez obtenida la formulación.

MÉTODO DE EMULSIÓN Y ENTRECruzADOR. Este método se basa en el principio de preparación de emulsiones del tipo agua en aceite además de la utilización de un surfactante adecuado, aprovechando las propiedades de entrecruzamiento entre los grupos aldehído del Quitosano con algún agente entrecruzador.

METODO DE PRECIPITACIÓN COACERVACIÓN. Este método se fundamenta en las propiedades de insolubilidad del quitosano en medios de pH alcalino, debido a que se produce una precipitación por parte del polímero una vez que este comienza a estar en contacto con soluciones de carácter básico. Las partículas se obtienen por medio de la aspersión del quitosano en una solución de NaOH, NaOH-EtOH, o de Etanodiamina, utilizando un sistema de compresión de aire para formar gotas coacervadas, para su separación se filtran y centrifugan, seguido de lavados con agua fría y caliente.

METODO POR SPRAY DRY. Este método es ampliamente utilizado en la elaboración de polvos, granulados o aglomerados para la mezcla de principios activos y excipientes para suspensiones. El método consiste en secar gotas atomizadas en una columna de aire caliente, en el caso del quitosano, este es diluido en una solución de ácido acético y el fármaco es disperso o disuelto en dicha solución para posteriormente agregar el entrecruzador más adecuado para posteriormente atomizarlo y secarlo en la columna de aire caliente.

METODO DE EMULSION POR GOTEIO Y COALESCENCIA este método es un híbrido del método por precipitación y el método de emulsión con entrecruzador, en el cual se forman gotas estables del quitosano con el entrecruzador y posteriormente se induce una precipitación mediante la coalescencia de gotas de quitosano y de gotas de NaOH.

METODO DE FORMACIÓN MICELAR REVERSA; las micelas reversas son mezclas de agua, aceite y surfactantes termodinámicamente estables. A simple vista son homogéneas e isotrópicas, pero a nivel microscópico el agua y el aceite se encuentran separados por capas formadas por surfactantes.

MÉTODO POR TAMIZADO, este método se basa en la elaboración de un hidrogel de quitosano con un entrecruzador, posteriormente este gel se pasa filtra a través de un tamiz para obtener así partículas micrométricas. (31,37)

MÉTODO DE GELACIÓN IÓNICA O IONOTRÓPICA. Es uno de los métodos más utilizados dentro de la bibliografía, esta técnica fue acuñada en los años 90 por Calvo et al (39), aunque con el paso del tiempo se han ido realizando modificaciones para mejorarlo. El método se basa en el principio de una interacción de tipo electrónica entre los grupos amino protonados que confieren cargas positivas a lo largo del quitosano en soluciones de pH ácido, con contraiones que se denominan entrecruzadores que son principalmente compuestos aniónicos que pueden ser clasificados en tres categorías, contraiones de bajo peso molecular, entre los cuales se encuentran el pirofosfato, tripolifosfato, tetrapolifosfato, octapolifosfato, hexametáfosfato, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, contraiones hidrofóbicos como el alginato, k-carragenina, poli 1 hidroxil 1 sulfonato 2 propeno, ácido poliácido carbónico) y contraiones de alto peso molecular como el octil- sulfato, lauril sulfato, hexadecil sulfato, cetil- estearil sulfato.(31, 32) Dependiendo de la finalidad de la formulación, el tamaño de partícula deseado, así como de las características del activo y/o del equipo disponible para su elaboración, el procedimiento para llevar a cabo la reacción de entrecruzamiento para la síntesis de partículas varía. De tal manera que se pueden elaborar soluciones de distintas concentraciones de quitosano en soluciones de ácidos orgánicos o soluciones de contraiones a distintas concentraciones, posteriormente a una agitación constante se vierte ya sea el quitosano en las soluciones de contraion o de manera inversa las soluciones del contraion al quitosano. Una vez terminada la reacción, las partículas son separadas por centrifugación para su posterior caracterización, cabe mencionar que tanto el tamaño como carga eléctrica superficial (potencial Z) depende principalmente de la cantidad de quitosano y de contraion utilizado. Particularmente uno de los contraiones más socorrido para la síntesis de nanopartículas es el tripolifosfato de sodio, el cual debe estar en la formulación en una relación de 3:1 – 6:1 con respecto al quitosano (quitosano:TPF). De acuerdo con diversos reportes al mantener esas

relaciones con este método se pueden encontrar tamaños de partícula en dimensiones nanométricas. Sin embargo, es necesario controlar factores como el pH de las soluciones, la velocidad de agitación, la velocidad de goteo de la soluciones, la dimensión de las gotas, altura del goteo y temperatura a la cual se elaboran las partículas, s para optimizar las condiciones de la formulación deseada. (31,32, 40, 41).

2.2.8.- Nanopartículas de quitosano para Sistema Nervioso Central y enfermedad de Parkinson.

Con respecto a nanopartículas de quitosano dirigidas al sistema nervioso central, se han elaborado algunas formulaciones en conjunto con polisorbato 80 (42) y con PLGA (43), para la liberación de inhibidores de colinesterasas por vía nasal, la cual resulta ser muy conveniente para mejorar el transporte de fármacos a sistema nervioso.

En el caso particular de la enfermedad de Parkinson, algunos grupos han reportado formulaciones elaboradas con base en quitosano para acarrear bromocriptina (44) un agonista de receptores dopaminérgicos, con efectos terapéuticos positivos. También se han elaborado otras formulaciones donde se ha utilizado como principio activo a la propia dopamina (45), el neurotransmisor deficitario en el Parkinson. A pesar que estas formulaciones han sido evaluadas en modelos murinos con resultados positivos, dicha formulación no esla ideal, puesto que la dopamina es fácilmente degradada, lo que puede comprometer su efectividad.

Debido a que la L-Dopa sigue siendo el tratamiento estándar para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y a las propiedades del quitosano para funcionar como acarreador para el sistema nervioso central, proponemos que una formulación de L-Dopa en nanopartículas de quitosano podría ser una opción viable para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Este abordaje ha sido poco explorado y solo unas pocas formulaciones han utilizado L-Dopa como principio activo. Algunos grupos de investigación han propuesto

formulaciones a base de geles para su administración intranasal (46), elaborando nanopartículas que encapsulen al fármaco; otros grupos, han propuesto la adsorción de fármaco como alternativa para el entrapamiento del activo. Es importante destacar que dentro de estos pocos trabajos solo se han realizado algunos análisis in vitro que describen un comportamiento de liberación lenta desde la formulación (46), algunos hacen pruebas de viabilidad celular (48), o inclusive se han determinado las concentraciones de L-Dopa en el cerebro por medio de homogenados (46). Por lo tanto, es necesario realizar más investigación para poder establecer una formulación de nanopartículas con características adecuadas para el tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson.

3. Planteamiento del Problema

La estrategia principal para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson es la de restablecer los niveles de dopamina a nivel de los ganglios basales, siendo la L-Dopa el fármaco de referencia; sin embargo, los niveles de dopamina después de un tiempo comienzan a ser intermitentes y pulsátiles conforme a las dosis administradas de L-dopa, lo que ocasiona complicaciones motoras involuntarias. El desarrollo de sistemas de liberación modificada basados en nanopartículas podría ayudar a resolver este problema, debido a que el diseño de nanopartículas basadas en biopolímeros, que posean un tamaño de partícula y carga eléctrica adecuados ayudaría a optimizar la dosificación del fármaco por medio de una liberación más uniforme del activo con respecto al tiempo.

4. Hipótesis

La formulación de L-Dopa en un sistema de nanopartículas basadas en quitosano, con un tamaño de partícula, carga eléctrica, una eficiencia de entrapamiento y una funcionalización adecuados permitirá la liberación del principio activo de manera gradual, continua y prolongada.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general.

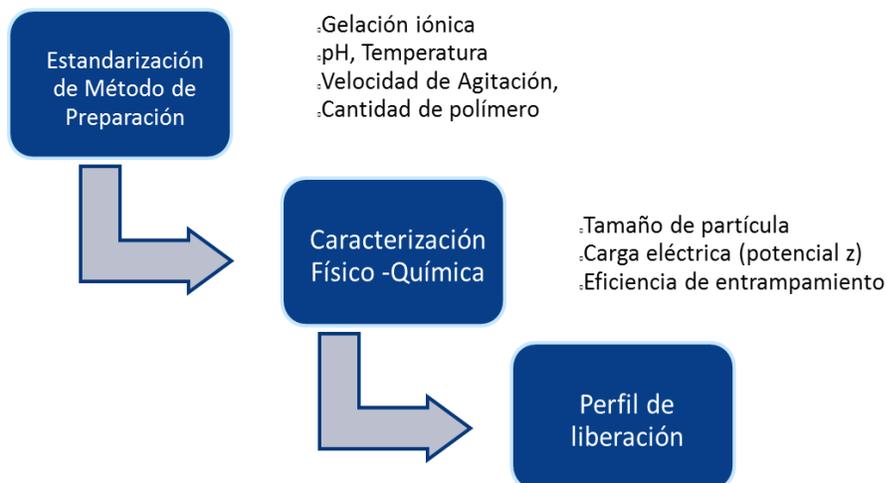
Elaborar, optimizar y caracterizar una formulación de nanopartículas con base en quitosano para el transporte de L-Dopa a sistema nervioso central.

5.2 Objetivos particulares.

- Elaborar una nanopartícula, que permita la mejor carga de L-Dopa para obtener una liberación prolongada.
- Caracterizar la nanopartícula, evaluando sus dimensiones, su carga (potencial Z) y la cantidad de L-Dopa que puede acarrear.
- Determinar el perfil de liberación de L-Dopa y analizar si se ajusta a algún modelo de liberación aplicable a formas farmacéuticas sólidas.

6.- Materiales y Métodos

6.1 Estrategia experimental.



6.2 Materiales

6.2.1 Reactivos

Quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich), tripolifosfato sódico (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial, L-Dopa (Sigma-Aldrich).

6.2.2 Equipos

Nanodrop 2000 (Thermo Lab), Nanosier N4 (Coulter), Zetasizer Nano ZS (Nano series. Malvern Instruments.), Balanza Analítica (OHAUS). Placa de agitación y calentamiento con indicador digital (JAENWAY 1103), Centrífuga (Beckman Coulter Allegra 64R), Balanza doble platillo, Microscopio Electrónico de Transmisión.

6.2.3 Material General.

Celdas para Nanosizer y Zetasizer.	Barras magnéticas de agitación 22 x 5 mm y 2 de 25 X 8 mm
Discos de cobre con película de carbono de 300 mesh.	Bolsas de diálisis de 0.12 KDa.
Soporte Universal	Perilla de seguridad.
Gradillas	Papel Kimwipes
Pinzas de 3 dedos con Nuez	Filtros de PVDF 0.22 μm de 2 y 1 cm de diámetro.
Pinzas para Bureta	

6.3 Método

6.3.1 Validación del Método de determinación de L-Dopa.

Se realizó la determinación de los parámetros de: Selectividad, Linealidad, Precisión inter-día y Exactitud, Límite de Cuantificación y Límite de Detección como parámetros básicos de validación para corroborar que nuestra técnica de cuantificación de L-Dopa contaba con la confianza y viabilidad para el proceso de elaboración y optimización de la formulación.

6.3.2 Preparación de la solución de quitosano [0.6% m/v]

Se prepararon 100 ml de solución de CH_3COOH al [1% v/v] para disolver 0.6 g de quitosano para obtener una concentración de [0.6% m/v] (6 mg/ml), esta solución se colocó en agitación a temperatura ambiente por un tiempo de 8 horas, posteriormente se filtró por gravedad en papel convencional de poro cerrado, para ser finalmente colectado en su totalidad en frascos ámbar. Se hicieron los ajustes necesarios para poder preparar volúmenes menores o mayores a conveniencia de la cantidad de lotes por elaborar.

6.3.3 Solución de tri-polifosfato de sodio (TPF) (3 mg/ml)

Se pesaron aproximadamente 0.180 mg de TPF y se disolvieron por agitación en 60 ml de agua des-ionizada hasta completar la disolución, posteriormente se filtró por gravedad en papel convencional poro cerrado, para conseguir una concentración final de 3 mg/ml; con este mismo procedimiento se elaboraron las soluciones utilizados en cada experimento, los cuales se modificaron en base a la conveniencia de los lotes a elaborar.

6.3.4 Elaboración de Nanopartículas.

En primer término se hizo la mezcla de la solución de quitosano con una solución de CH_3COOH en un vaso de precipitados a 700 rpm, para la formación paulatina de las nanopartículas se adicionó la solución de TPF gota a gota a una velocidad continua de 2ml/min hasta alcanzar una relación 3:1 quitosano:TPF respectivamente, posteriormente la solución se mantuvo en agitación durante 60 minutos más. Una vez transcurrida la hora de agitación continúa después de la reacción de entrecruzamiento, la solución fue sometida a un procedimiento de sonicación con una sonda a una amplitud de 10 KHz durante 2.5 minutos (esquema 1). Un indicador físico de la reacción

de entrecruzamiento y de que por lo tanto se están formando las partículas es el cambio de aspecto de la solución de Quitosano de un aspecto cristalino a uno opalescente.

6.3.5 Elaboración de Nanopartículas y encapsulamiento de L-Dopa.

Para encapsular L-Dopa en las nanopartículas se probaron dos métodos (esquema 2), en el primero se hizo la mezcla de la solución de Quitosano con una solución de CH_3COOH en un vaso de precipitados en la cual se encontraba disuelta la L-dopa, mientras que en el segundo se agregó la L-dopa en polvo y se dejó homogenizando a 700 rpm. En ambos casos se adicionó posteriormente la solución de TPF gota a gota a una velocidad continua de 2 ml/min para la formación paulatina de las nanopartículas las cuales entrapan la L-Dopa contenida en la mezcla, la cual se mantuvo en agitación constante durante 60 minutos más. Todo el proceso se realizó manteniendo la agitación a 700 rpm y los volúmenes de quitosano y TPF se mantuvieron a una relación 3:1 respectivamente. Una vez transcurrido la hora de agitación continúa después de la reacción de entrecruzamiento, la mezcla fue sonicada con una sonda a una amplitud de 10 KHz durante 2.5 minutos.

6.3.6 Determinación de tamaño de partícula.

El tamaño de partícula fue determinado mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por las siglas en inglés Dinamyc Ligth Sactering), para ello se toma una pequeña muestra de la suspensión de nanopartículas, aproximadamente de 250 μL , posteriormente esta muestra es diluida en agua desionizada para llenar celdas de vidrio de 3ml. Las lecturas en el equipo se realizaron por triplicado.

6.3.7 Determinación de Potencial Z.

La determinación del potencial Z se llevó a cabo mediante la técnica de Electroforesis de Laser Doppler. Para esto se colectó una muestra de 1 ml de cada lote a determinar, las muestras se depositaron en celdas de plástico de 3 ml y se introdujeron electrodos del dispositivo Deep Cell procurando no derramar la muestra y secando el exceso para hacer la determinación en el equipo. Cada lectura se realizó por triplicado.

6.3.8 Determinación de condiciones de temperatura, pH y potencia de sonicación.

Con la finalidad de encontrar las condiciones de temperatura, pH y potencia de sonicación más adecuadas para obtener el mejor tamaño de partícula, se propuso implementar un diseño experimental 2^k . Este diseño permite evaluar K número de factores a dos niveles cada uno, para esto se eligieron dos niveles de cada factor, teniendo un nivel alto y bajo como se indica en la siguiente tabla (**tabla b**). Para darle validez al diseño, este fue realizado por triplicado y se obtuvieron 24 series de cada combinación con los distintos niveles de cada factor, una vez completados los datos, estos se introdujeron al programa Statgraphics Centurion XVI.II, con el cual se obtuvieron gráficas de interacción y análisis de varianza para elegir las condiciones con mejores resultados.

Temperatura [1=10 °C] [2=25°C]	pH [1 =3.2] [2=4.7]	Potencia Sonicación [1=10Khz] [2= 20 kHz]
1	1	1
1	1	2
1	2	1
1	2	2
2	1	1
2	1	2
2	2	1
2	2	2

Tabla b. Notación de diseño 2^3 , de los factores Temperatura, pH, Potencia de sonicación.

6.3.9 Eficiencia de entrapamiento,

Para determinar este parámetro se realizaron diluciones 1:2 de los lotes para disminuir la viscosidad de la preparación y facilitar la separación, las diluciones fueron centrifugadas a 18000 rpm durante 40 minutos, una vez transcurrido el tiempo se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 21000 rpm durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas de estos últimos sobrenadantes, las cuales fueron filtradas para determinar la cantidad de L-dopa por medio de la relación de la absorbancia respecto a la concentración, a una longitud de onda de 281 nm en el nanodrop interpolando la absorbancia en una recta. La eficiencia de entrapamiento se determinó con ayuda de la siguiente ecuación:

$$EE = \frac{\text{Farmaco total} - \text{Farmaco libre}}{\text{Farmaco total}} \times 100$$

Donde; EE= eficiencia de entrapamiento. Fármaco total= cantidad de fármaco utilizado para la elaboración de las nanopartículas, Fármaco libre= fármaco cuantificado en el sobrenadante después de la separación de las nanopartículas.

6.3.10. Perfil de Liberación.

Para los ensayos de perfil de liberación se tomaron nanopartículas contenidas en los botones obtenidos en la centrifugación, las cuales se colocaron dentro de una bolsa de diálisis con diámetro de poro de 0.12 kDa, asegurada con hilo nylon para evitar fugas. Las bolsas con la formulación dentro fueron sumergidas en solución de PBS a pH de 7.4 para simular un ambiente fisiológico. Durante los ensayos la temperatura de las soluciones se mantuvo a una temperatura de 36 ± 1 °C, en agitación continua de 200 rpm. Se propuso un esquema de toma de muestras con recuperación de volumen de PBS, para cuantificar mediante absorbancia la concentración de L-Dopa interpolando en una curva de calibración. Para la toma de muestras se propusieron intervalos de tiempo al minuto 5,10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 minutos, 3, 4, 5, 6,7, 8 y 9 horas. Para obtener curvas de % de L-Dopa liberada, con respecto al tiempo. Posteriormente se analizaron los datos para describir un ajuste de cinética de liberación.

7. Resultados

7.1 Validación del método analítico para la cuantificación de L-Dopa por espectrofotometría

7.1.1 Determinación del pico máximo de absorción.

Para la validación se determinó el pico de máxima absorción en el espectro electromagnético, mediante un barrido realizado en el espectrofotómetro. Para este procedimiento se utilizó una solución de **[1.0 mg/ml]** de L-Dopa en CH₃COOH [1% v/v], de esta manera se encontró que a una **$\lambda = 281$ nm** se registró el mayor pico de

absorción; sin embargo, la señal mostrada saturaba el equipo por encima de 1.0 de absorbancia (**Figura 1**), por lo que se procedió a realizar una dilución y determinar el pico de máxima absorción con una solución de L-dopa en ácido acético a una concentración de **[0.5 mg/ml]**. Las lecturas mostraron consistentemente que el pico de máxima absorción fue a una $\lambda = 281 \text{ nm}$ (**Figura 2**). Por lo que a los 281 nm es la λ a la cual se cuantificó L-Dopa a lo largo del proyecto.

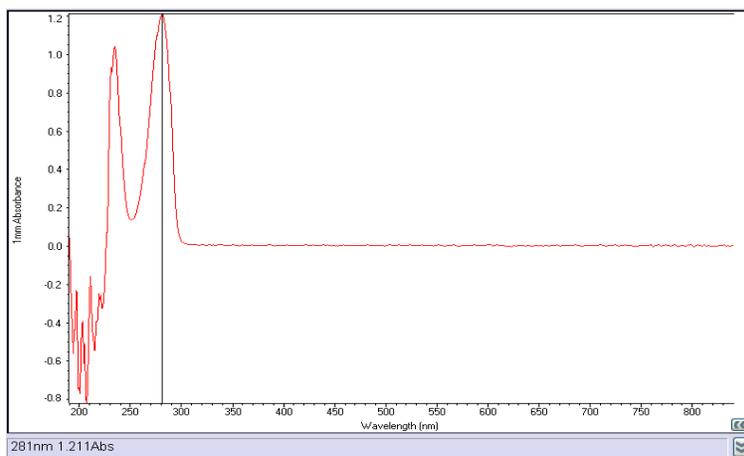
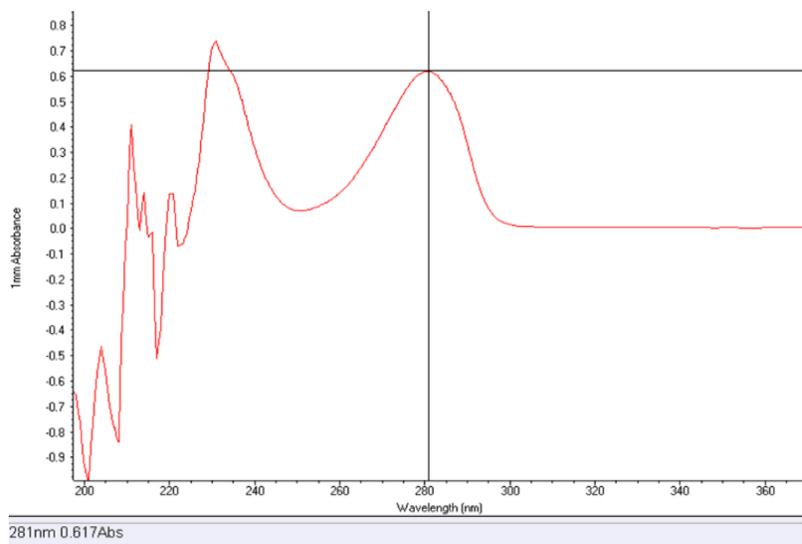


Figura 1: Curva obtenida con el barrido del espectrofotómetro de una solución de L-Dopa [1 mg/ml], a 281 nm se encuentra el pico máximo de absorción con un valor de 1.211 de absorbancia, indicativo de saturación del sistema.

Figura 2. Barrido en el espectro electromagnético en el espectrofotómetro con una solución de L-Dopa [0.5 mg/ml], a los 281 nm se observa el pico de absorción con un valor de 0.617 nm sin saturar el sistema. A los 281 nm es la λ seleccionada para cuantificar L-Dopa.



7.1.2 Linealidad del método de detección de L-Dopa.

Para el parámetro de linealidad se realizó la determinación de las absorbancias de una serie de disoluciones seriadas, a partir de una solución stock de **1 mg/ml** para obtener a partir de esta, soluciones de **0.725, 0.5, 0,25, 0.125, 0.062, y 0.031 mg/ml**. Las determinaciones mostraron una respuesta proporcional entre las absorbancias respecto a las concentraciones con una relación lineal, con un coeficiente de correlación $r^2=0.999$. (**Tabla 1 Figura 3**). Además de encontrar en una relación de factores de respuesta un coeficiente de variación $< 2\%$ y un promedio cercano al valor de la pendiente, que dan soporte al comportamiento lineal encontrado en la recta.

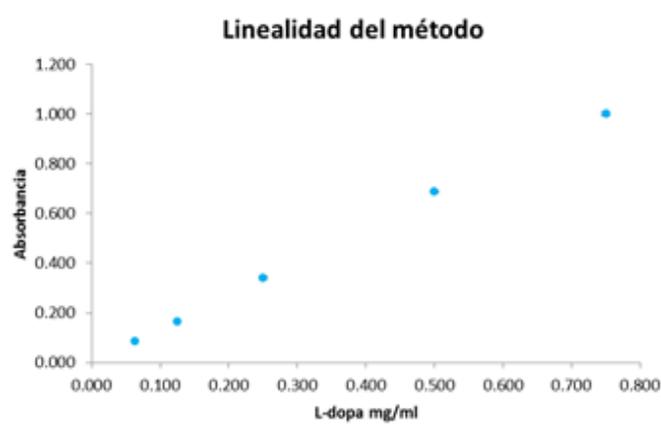


Tabla 1 (der): Resumen de los que comprueban la relación lineal entre las concentraciones de L-Dopa y la respuesta en absorbancia a 281 nm.

Figura 3 (arriba): Gráfico de la recta construida con los datos obtenidos para evaluar la linealidad del método. En la tabla 1 se encuentran los valores de la pendiente, ordenada al Origen y coeficiente r^2 correspondientes a la ecuación punto pendiente.

Parámetros	Valores
λ máx.	281 nm
Linealidad rango	0.750 – 0.063 mg/ml
Pendiente	1.342
Intersección	0.003
Coeficiente r^2	0.999
Limite de cuantificación	0.062 mg /ml
Limite de Detección	0.031 mg/ml

CV de los Factores de Respuesta	
Promedio	1.353
S	0.025
CV	1.865

7.1.3 Límites de cuantificación y detección

Para los límites de detección y de cuantificación se realizaron curvas a concentraciones desde **0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078, 0.00390 mg /ml**, evaluando el CV en cada nivel. A concentraciones menores de 0.0312 mg/ml se encontró una alta variabilidad entre los valores de absorbancias, lo cual compromete la confianza en las lecturas. Por lo tanto, se determinó que el límite de cuantificación está en una concentración de **0.0625 mg/ml**, y el límite de detección es de **0.0312 mg/ml. (Tabla 1)**.

7.1.4 Precisión y Exactitud

Para evaluar la precisión y exactitud del método se escogieron aleatoriamente 3 de los puntos incluidos en la curva de linealidad: uno alto [**0.680 mg/ml**], uno bajo [**0.090 mg/ml**] y uno intermedio [**0.380 mg/ml**]. Se elaboraron soluciones de L-Dopa a estas concentraciones y mediante un análisis por triplicado de cuantificaciones en el espectrofotómetro, se obtuvieron los coeficientes de variación (CV) donde observamos los siguientes datos: **CV = 2.856 %** nivel alto, **CV = 2.541%** nivel intermedio y **CV = 2.141%** nivel bajo, siendo una constante un CV < 3% en todos los niveles propuestos, y un % de Recobro del **95.9%, 97.4% y 100.1 %** de los niveles alto, intermedio y bajo respectivamente (**Tabla 2**). Con estos valores, se puede confiar en que los datos obtenidos durante un análisis por triplicado para determinar una concentración de desconocida de L-Dopa por triplicado tienen una alta fiabilidad pues presentan poca dispersión y una buena aproximación a datos propuestos teóricamente. Siendo un método adecuado para la cuantificación de L-Dopa. Estos resultados comprueban que el método empleado cumple con los parámetros de validación de Precisión y Exactitud, acorde con guías de validación.

	Precisión		Exactitud
C teorica mg/ml	C calculada mg/ml		(% recobro)
	Promedio	0.653	
0.680	Desvest	0.019	95.969
	CV	2.856	
	Promedio	0.370	
0.380	Desvest	0.009	97.419
	CV	2.541	
	Promedio	0.090	
0.090	Desvest	0.002	100.129
	CV	2.141	

Tabla 2. Datos obtenidos para la evaluación de la precisión y la exactitud del método de cuantificación de L-Dopa por espectrofotometría. Todos los valores de CV > 3%, lo que indica baja dispersión de los valores al cuantificarlos por triplicado en tres niveles distintos. Y porcentajes de recobro cercanos al 100% que indican una gran proximidad de los datos a los datos teóricos propuestos

7.1.5 Selectividad

Para el parámetro de selectividad se realizaron barridos en el espectrofotómetro con soluciones de los materiales utilizados para la elaboración de las nanopartículas, quitosano y tripolifosfato de sodio a concentraciones de **0.2% y 1.1 mg/ml** respectivamente, dichas concentraciones son aproximadas a las que se utilizan en el procedimiento de elaboración de las partículas. Se determinaron las absorbancias de las soluciones por separado, en combinación, en nanopartículas elaboradas y combinadas con L-dopa; en estos ensayos se observó que en ninguna de las condiciones propuestas ninguno de los materiales presentó respuesta $\lambda = 281 \text{ nm}$, que es la longitud a la cual la L-Dopa requiere ser detectada para su cuantificación. En las **Figuras 4 y 5** se observa claramente que la señal es encontrada únicamente en las condiciones donde la L-Dopa [**0.5 mg/ml**] se encuentra presente, siendo esta respuesta conservada al evaluarse en condiciones con un ensayo de formación de nanopartículas.

Figura 4. Barrido de soluciones: quitosano 0.2%, Tripolifosfato Sódico 1mg/ml, y L-Dopa 0.5 mg/ml. La curva en rojo corresponde a la solución de L-Dopa absorbancia de 0.627 a una $\lambda = 281\text{nm}$, donde no hay presencia de los componentes para las nanopartículas. Sobre posición de los 3 barridos realizados, y utilizando como blanco CH_3COOH 1%

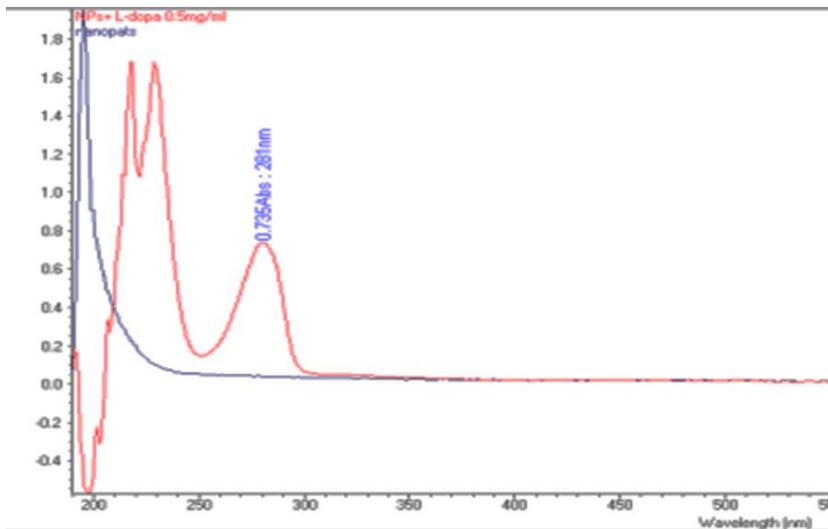
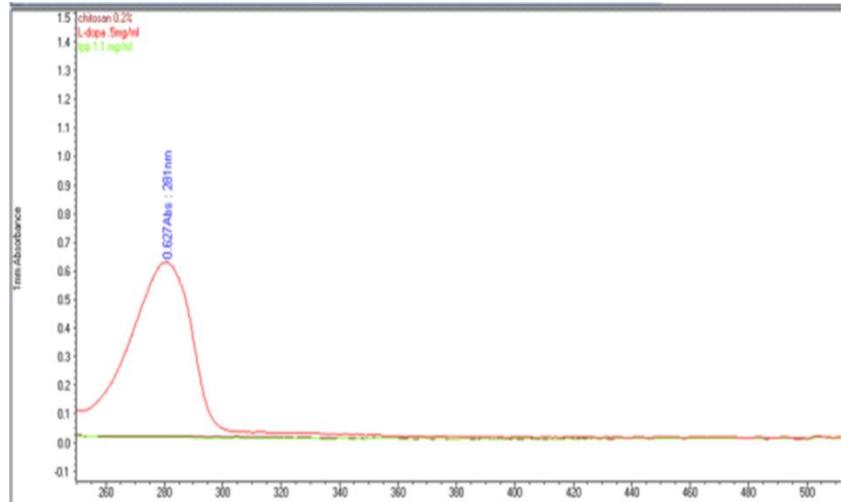


Figura 5. Ensayo de barrido de una muestra de nanopartículas (quitosano + tripolifosfato), y mezcla de nanopartículas con L-Dopa 0.5 mg/ml, en la que se observa una señal a $\lambda = 281\text{ nm}$ cuando se encuentra presente la L-Dopa. Indicativo de que los materiales no interfieren de manera significativa en la detección de la L-Dopa.

7.2 Elaboración de las nanopartículas

7.2.1 Tamaño de partícula

Como primer paso se propusieron una serie de experimentos con el objetivo de obtener nanopartículas sin L-Dopa, para comprobar que la utilización del polímero bajo las condiciones del método general generaba partículas de tamaño adecuado. Adicionalmente, se evaluó si someter a un proceso de sonicación en la elaboración

tenía repercusión significativa sobre el tamaño de las partículas. Se encontró que al someter a una sonicación de **10 khz** durante aproximadamente **2.5 min** es posible encontrar partículas de un tamaño < a los **400 nm**, con dimensiones aproximadas entre los **257 - 324 nm**, por el contrario, cuando las partículas no son sonicadas sus dimensiones se encuentran por arriba de los **400 nm** oscilando entre los **718 - 816 nm**

Lote	Tamaño (nm)	S	% CV
Lotes sin sonicación			
1	816.8	136.7	16.7
2	780.7	155.1	19.8
3	718.8	140.7	19.5
Lotes con sonicación			
1	324.1	12.8	3.9
2	312.5	39.5	12.6
3	257.5	53.4	20.7

Tabla 3: Lotes de nanopartículas elaborados para evaluar el efecto de la sonicación, 3 lotes de cada condición propuesta. Se indica en la parte inferior de la tabla los lotes sometidos a sonicación, en los cuales se encontraron tamaños de partícula < 400 nm, es decir con un tamaño aceptable para ser formuladas con L-dopa

(Tabla 3). El resultado sugirió que para cumplir con el objetivo de obtener partículas con dimensiones menores a los **400 nm**, se debía de adoptar la medida de sumarle un paso de sonicación al procedimiento de elaboración de las nanopartículas.

7.2.2 Potencial Z

Una vez que se determinaron las condiciones para obtener nanopartículas de tamaño adecuado, se procedió a explorar el valor del potencial Z de dichas partículas. Para determinar el potencial Z se elaboraron lotes por triplicado ya con el proceso de sonicación incorporado al método de elaboración. Las mediciones mostraron que las nanopartículas tuvieron un tamaño de entre los **286 - 295 nm**, con potenciales Z en un rango de **25.9 – 28.4 mV (Tabla 4)**. El resultado sugirió que con este método de

elaboración se pueden obtener nanopartículas con un tamaño < 400 nm y una carga eléctrica que seguramente mantendrá una estabilidad constante evitando la fusión de éstas, lo que llevaría a incrementar sus dimensiones.

Lote	Tamaño (nm)	S	CV%	Potencial Z(mv)	S	CV%
1	295.1	19.9	6.7	25.9	0.9	3.8
2	290.5	67.0	23.0	27.1	0.2	0.7
3	286.9	1.4	0.5	28.4	0.2	0.9

Tabla 4: Determinación de la carga eléctrica de nanopartículas de Quitosano n=3, cada lote elaborado independientemente y bajo las mismas condiciones presenta cargas superiores a los 20 mV.

7.2.3 Morfología.

La morfología de las nanopartículas fue analizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés), para ello se tomaron muestras aleatoriamente de 2 de los 3 lotes empleados para la determinación del potencial Z. Mediante la técnica de TEM se corroboró que las partículas presentaban un tamaño adecuado (**Figura 5**). En la **figura 5A** se muestra un ejemplo de las partículas observadas, la cual tiene un tamaño < **200 nm**. Mientras que en la **figura 5B** se observa una partícula de un tamaño de entre los **200 – 300 nm**. Ambas partículas presentaron una morfología difícil de definir, con patrones irregulares; sin embargo, cumplieron con uno de los objetivos principales, poseer dimensiones menores a los 400 nm.

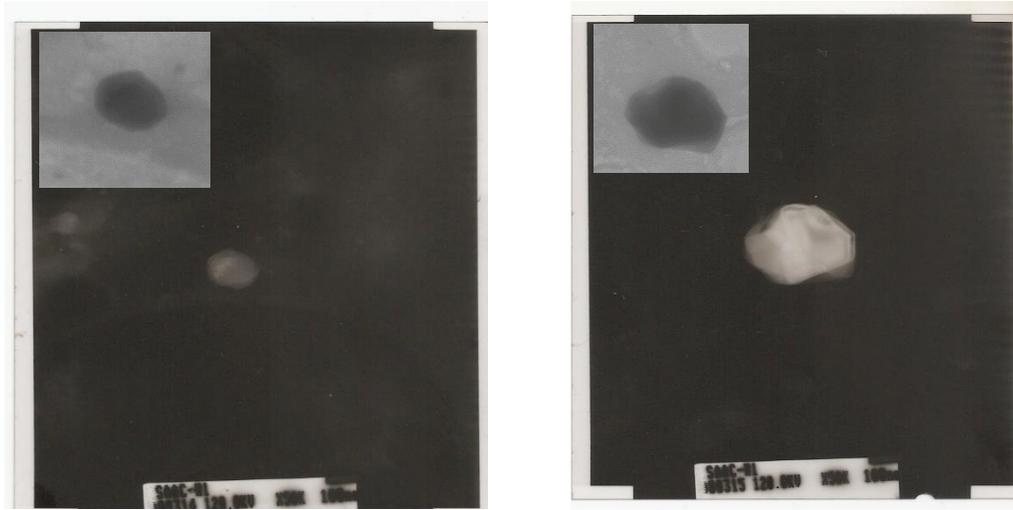


Figura 5: Negativos obtenidos por microscopía electrónica de transmisión, negativo A (izq) se observa una nanopartícula de quitosano de ≈ 150 nm, en el negativo B (der) una nanopartícula de quitosano de ≈ 250 nm.

7.3 Determinación de condiciones óptimas de temperatura, pH y potencia de sonicación para elaborar nanopartículas con tamaño de partícula < 400 nm.

Una vez encontrado un método base para la elaboración de partículas con tamaño y potencial Z adecuados, se procedió a investigar si cambiar condiciones como la temperatura, la potencia de sonicación y pH de la solución de quitosano previo a la adición del tripolifosfato y podían afectar de manera significativa el tamaño de partícula, para alcanzar este objetivo nos valimos de un diseño experimental 2^k , con tres réplicas.

Mediante este diseño experimental se obtuvieron gráficos de interacción de los factores puestos a prueba. Como se puede observar en la **Figura 6**, el tamaño de partícula es notablemente afectado por la temperatura a la cual se elaboran las partículas, siendo la temperatura más adecuada de aproximadamente **25 °C**. En esta figura también se observa que a un **pH ≈ 3.2** al inicio del proceso de elaboración, en ambas temperaturas

da como resultado un tamaño de partícula cercano a los **200 nm**, indicando que se obtiene un mejor tamaño de partícula con esta condición.

Por otra parte, en la **figura 7**, se puede observar que hay una mayor influencia del pH sobre el tamaño de partícula, con respecto a la potencia de sonicación, pues ambas condiciones de sonicación se comportan de manera muy similar, así mismo la utilización de un pH más ácido aun a una potencia alta de sonicación resulta en tamaños de partículas **< 400 nm**.

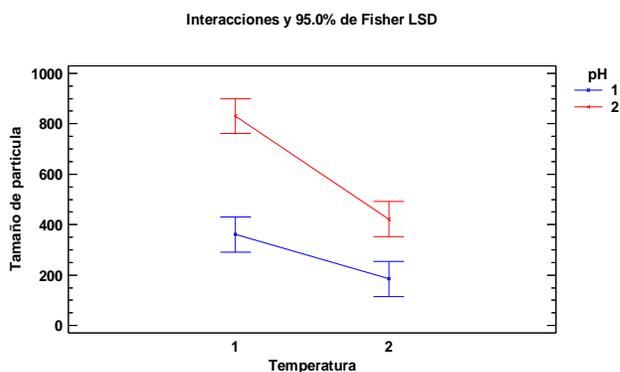


Figura 6: Gráfico de interacción, Temperatura, pH vs Tamaño de Partícula, la combinación de temperatura **25 °C** y un pH **≈3.2** antes de agregar TPF, permiten obtener el mejor tamaño de partícula **≈ 200 nm**. Gráficas obtenidas con el programa Statgraphics Centurion XVI.II.

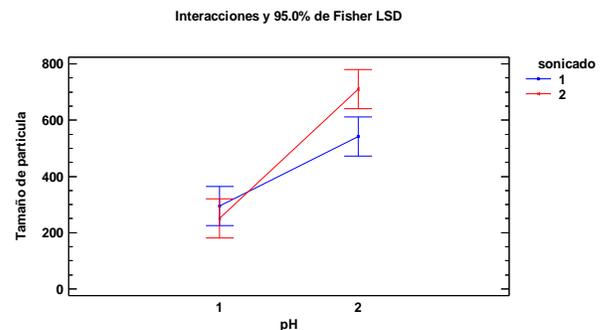


Figura 7: Gráfico de interacción. pH, Sonicación, vs Tamaño de partícula. Es claro que la influencia del pH en el tamaño de partícula es mayor que el de la sonicación. Se observa que a un pH de **≈3.2** previo al TPF es una condición donde se obtienen tamaños **< 400 nm**. Gráficas obtenidas con el programa Statgraphics Centurion XVI.II.

Finalmente, al evaluar el efecto de la temperatura y de la potencia del sonicación, se puede observar un tamaño de partícula menor a los **400 nm** a una temperatura de aproximadamente **25 °C**, observándose un efecto poco significativo en las dimensiones de la partícula por parte de la sonicación Figura 8. Este resultado pone de manifiesto que la temperatura a la cual se elaboren las partículas puede resultar determinante.

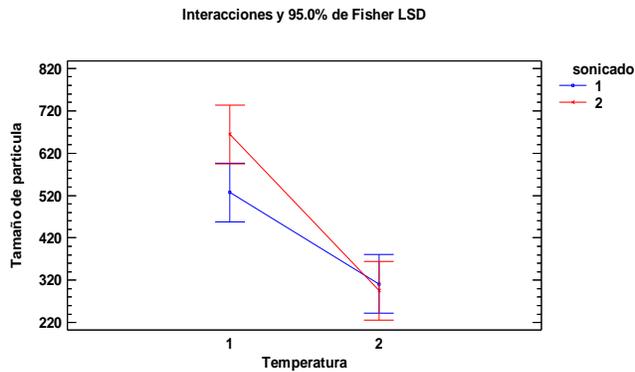


Figura 8. Gráfico de Interacción, Temperatura, potencia de sonicación vs tamaño de partícula. En lo que respecta a la interacción de estas dos variables, la influencia de la temperatura con respecto a la sonicación es predominante, por lo que la elaborar nanopartículas de quitosano a 25°C resulta más conveniente, pero se puede utilizar una potencia de sonicación de 10 o 20 kHz indistintamente Gráficas obtenidas con el programa Statgraphics Centurion XVI.II..

Además de los gráficos de interacción, se realizó un análisis de varianza para corroborar estadísticamente las aseveraciones hechas sobre ellos. El análisis de varianza comprobó que la temperatura y el pH inicial, pueden influir en la obtención de tamaños de partícula por debajo de los **400 nm**; sin embargo, el pH parece tener una mayor influencia que la temperatura (**tabla 5**).

Análisis de Varianza para Tamaño de partícula - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	513718.	1	513718.	39.55	0.0000
B:pH	748184.	1	748184.	57.60	0.0000
C:sonicado	22283.3	1	22283.3	1.72	0.2077
INTERACCIONES					
AB	80910.1	1	80910.1	6.23	0.0231
AC	34998.8	1	34998.8	2.69	0.1191
BC	67320.6	1	67320.6	5.18	0.0360
RESIDUOS	220803.	17	12988.4		
TOTAL (CORREGIDO)	1.68822E6	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 5: Analisis de varianza hecho con el programa Statgraphics Centurion XVI.II., destaca en rojo los factores que tienen una influencia significativa sobre el tamaño de partícula con un 95% de nivel de confianza, así como las interacciones de los otros factores evaluados con el diseño experimental.

Por lo tanto, las condiciones óptimas para la elaboración de las partículas son a una temperatura de **25 °C**, con un **pH ≈ 3.2** en la solución inicial del quitosano, ya que bajo estas condiciones se produce un tamaño de partícula < **400 nm** cercano a los **200 nm**. Por otra parte la potencia de sonicación no tiene un efecto significativo en este

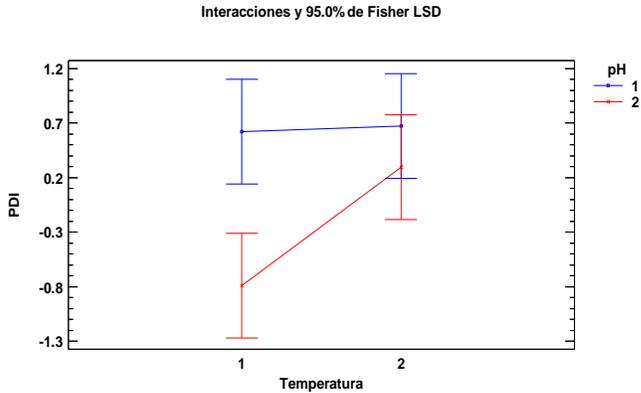


Figura 9: Gráfica de interacción: temperatura, pH vs PDI. En este gráfico se observa que al elaborar las partículas a 25 °C hay menor dispersión de tamaño, y aparentemente utilizar el ajuste de pH en el nivel alto, hay menos variabilidad, sin embargo al hacer el análisis de interacción con la temperatura, este no tiene una diferencia significativa. Gráficas obtenidas con el programa Statgraphics Centurion XVI.II.

entre las dimensiones de las partículas analizadas, es decir, durante la obtención de las partículas puede haber variabilidad en los tamaños, siendo un PDI lo más cercano a 0.1 lo más adecuado. Es importante analizar el PDI de la formulación porque utilizando este dato se pueden hacer modificaciones al proceso de elaboración para optimizarlo y disminuir dicha variabilidad en tamaños. Como se puede observar en la **Figura 9**, con un pH ajustado a 4.5 previamente a la adición del tripolifosfato y con una temperatura de 25 °C, se obtienen PDIs más convenientes. Sin embargo, el gráfico de interacción sugiere que la temperatura no afecta tanto el PDI, pues no varía a las dos temperaturas evaluadas, mientras que el pH parece una determinante de la uniformidad de las partículas.

Por otra parte, al evaluar el efecto de la sonicación junto con la

parámetro, es decir, someter a una sonicación de 20 o 10 kHz no afecta significativamente el tamaño de partícula **Figuras 6, 7 y 8**.

Adicionalmente, usando el mismo abordaje del diseño 2^K y los datos obtenidos con los equipos de DLS, se analizó si estos factores afectan el índice de polidispersión (PDI). El PDI es un dato por debajo de la unidad que nos permite saber si hay gran dispersión

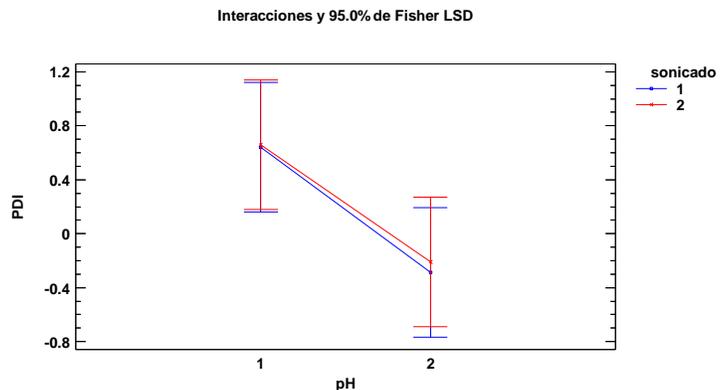


Figura 10: Gráfica de interacción: sonicación, pH vs PDI. El efecto debido al pH sobre el PDI es claramente mayor que el que puede ejercer la sonicación a 10 o 20 kHz. La elaboración de partículas con un pH en el nivel superior claramente presenta en promedio una menor dispersión. Gráficas obtenidas con el programa Statgraphics Centurion XVI.II.

temperatura, se encontró que la elaboración de las partículas a una temperatura de **10 °C** produce una uniformidad de tamaño mejor en comparación con una elaboración de partículas a **25 °C**, en lo que respecta a la sonicación, parece ser un factor que no tiene mucha influencia sobre este parámetro (**Figura 10**).

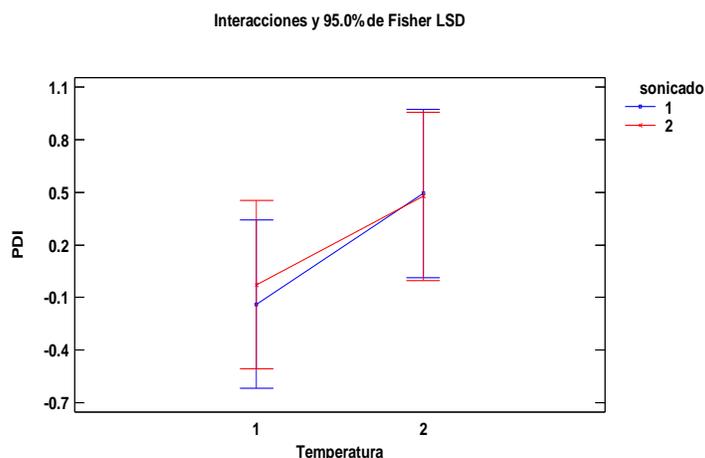


Figura 11. Gráfico de interacción: temperatura, sonicación vs PDI. La elaboración de nanopartículas a una temperatura menor aparentemente resulta en una menor dispersión, sin embargo la variabilidad de la dispersión en ambas condiciones no es significativamente distinta, sin embargo tiene una mayor influencia sobre el PDI que la sonicación. Gráficas obtenidas con el programa Statgraphics Centurion XVI.II.

Adicionalmente, cuando se evaluó el efecto del pH y la potencia de sonicación, se puede apreciar que la obtención de partículas, cuando la solución de quitosano se ajustó a un pH de **4.5**, produjo una menor dispersión en el tamaño, mientras que se confirmó que la potencia de sonicación no impacta en el PDI, el cual es prácticamente igual al aplicar ya sea **10 o 20 KHz** a las nanopartículas (**Figura 11**).

Finalmente, el análisis de varianza mostró que el único factor que tiene efecto significativo sobre la dispersión del tamaño de las partículas es el pH, además de que aparentemente no hay una interacción considerable entre los factores analizados sobre dicha dispersión (**Tabla 6**).

Análisis de Varianza para PDI - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	1.93234	1	1.93234	3.11	0.0960
B:pH	4.8151	1	4.8151	7.74	0.0128
C:sonicado	0.0135375	1	0.0135375	0.02	0.8845
INTERACCIONES					
AB	1.5965	1	1.5965	2.57	0.1276
AC	0.0247042	1	0.0247042	0.04	0.8444
BC	0.00510417	1	0.00510417	0.01	0.9289
RESIDUOS	10.577	17	0.622175		
TOTAL (CORREGIDO)	18.9643	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 6: Analisis de varianza obtenido con el programa Statgraphics Centurion XVI.II. Con esta prueba se puede presumir que la variacion del PDI depende significativamente con un 95% de confianza del pH al cual se elaboren las particulas, pero que no tiene una interaccion con otro de los factores, es decir que hay un efecto abatido por los otros dos factores.

Los datos obtenidos con el diseño experimental permitieron definir las condiciones para implementar un método base para obtener tamaños de partícula menores a los 400 nm, un tamaño que es importante tomar en cuenta, pues resulta un factor relevante para que las nanopartículas puedan llegar a sistema nervioso central. Dichas condiciones incluyen elaborar las partículas a **25 °C**, a un pH inicial previo al TPP de aproximadamente de **3.2**, y con una potencia de sonicación de **10 KHz** durante **2.5** minutos.

7.4 Eficiencia de Entrampamiento (EE)

Una vez concluido el diseño experimental, se comenzó a trabajar con las condiciones establecidas para estudiar distintos parámetros. En primer término, se exploró la capacidad de las partículas para atrapar L-Dopa, para ello se emplearon concentraciones del fármaco por debajo de su límite de solubilidad, en su límite de solubilidad y por arriba del límite de solubilidad. Dicho límite se evaluó experimentalmente en el laboratorio, estableciéndose en **2.6 mg/ml a 25 °C**, en CH₃COOH al 1%.

En la **Tabla 7** se resumen las series que mostraron las mejores eficiencias de

L- Dopa (mg)	Concentración (mg/ml)	% EE
21.990	0.733	11.922 ± 1.381
43.960	1.465	15.307 ± 1.026
59.550	1.985	16.560 ± 2.026
60.000	2.000	16.899 ± 8.294
69.900	2.330	46.980 ± 20.802
122.100	3.881	19.683 ± 3.715
181.860	5.982	17.212 ± 5.087

Tabla 7: Resumen de los niveles de L-Dopa para evaluar la Eficiencia de Entrampamiento. Las cantidades y concentraciones de L-Dopa en esta tabla fueron utilizados para dilucidar que a partir de los **69 mg**, se pueden obtener eficiencias de atrampamiento de **46.980 ± 20.802 %**, donde la concentración final de L-Dopa en el procedimiento de elaboración es de **2.33 mg/ml**, llegando al punto de sobre saturación de la L-Dopa en CH₃COOH [1%], dato evaluado durante el procedimiento

entrampamiento, en niveles crecientes de mg de L-Dopa utilizada, a partir de **21.9 mg** hasta **181.8 mg**. Como se puede apreciar las mayores eficiencias se encuentran a partir de los **2.3 mg/ml** hasta concentraciones de saturación y sobresaturación de L-Dopa. Cabe destacar que la mejor eficiencia se encontró utilizando una masa de **69.9 mg** de L-dopa, aunque la variabilidad entre las réplicas es muy elevada, ya que se obtuvieron porcentajes de entrampamiento en un intervalo de **26 - 66%**. Por lo tanto, los resultados sugirieron que la capacidad de entrampamiento de las partículas puede estar limitada, pues a pesar de que se incrementó la cantidad de L-dopa, éstas ya no son capaces de encapsular más principio activo una vez que llegan a estar saturadas.

7.5 Perfil de liberación

Concluida la búsqueda de la cantidad de L-dopa que deber ser utilizada para una aceptable eficiencia de entrampamiento, se realizaron una serie de experimentos para evaluar el tipo de liberación que presentaban las partículas, esperando hipotéticamente la obtención de curvas de liberación lenta. Para explorar la cinética de liberación se elaboraron lotes de nanopartículas y se seleccionaron muestras conteniendo aproximadamente **5.932 ± 0.901 mg** (n=3) de L-dopa encapsulada. Las muestras fueron concentradas por centrifugación y se obtuvieron las curvas de % de fármaco liberado con respecto al tiempo en horas.

Tiempo h	% L-Dopa Liberada	s	CV
0.083	10.803	0.353	3.268
0.167	14.948	1.104	7.383
0.333	21.767	0.515	2.367
0.500	23.254	2.667	11.470
0.833	27.336	2.459	8.994
1.000	39.347	1.061	2.697
1.333	42.233	3.154	7.468
1.667	43.814	2.574	5.875
2.000	50.405	0.724	1.437
3	57.110	1.629	2.853
4	61.627	1.532	2.486
5	64.209	2.428	3.782
6	64.960	3.644	5.610
7	66.315	3.574	5.389
8	67.084	4.383	6.534
9	68.572	3.487	5.085

Tabla 8: Tabla de tiempos de muestreo y porcentaje de L-Dopa Liberada. En esta tabla se detallan los 16 puntos de muestreo hechos para la construcción de las curvas de liberación (n=3). El punto con mayor variación es el del muestreo a los 30 minutos, los demás muestran un **CV < al 10%**, indicio de poca variabilidad entre los lotes elaborados

En la **Figura 12** se muestra la representación gráfica de los perfiles de liberación, conforme a los datos obtenidos en la Tabla 8. Se realizó un muestreo continuo durante 9 horas, durante este tiempo se alcanzó la liberación de alrededor del **70%** de la cantidad de fármaco con respecto a la cantidad de fármaco nominal. Los datos obtenidos mostraron una desviación estándar variable en los distintos puntos, siendo a los 30 minutos donde hay mayor variación con un CV del **11.4%**, el cual va disminuyendo conforme transcurre el tiempo, a las **2 horas** se alcanzó el **50%** de la liberación que continuó con un comportamiento de meseta desde la tercera hora.

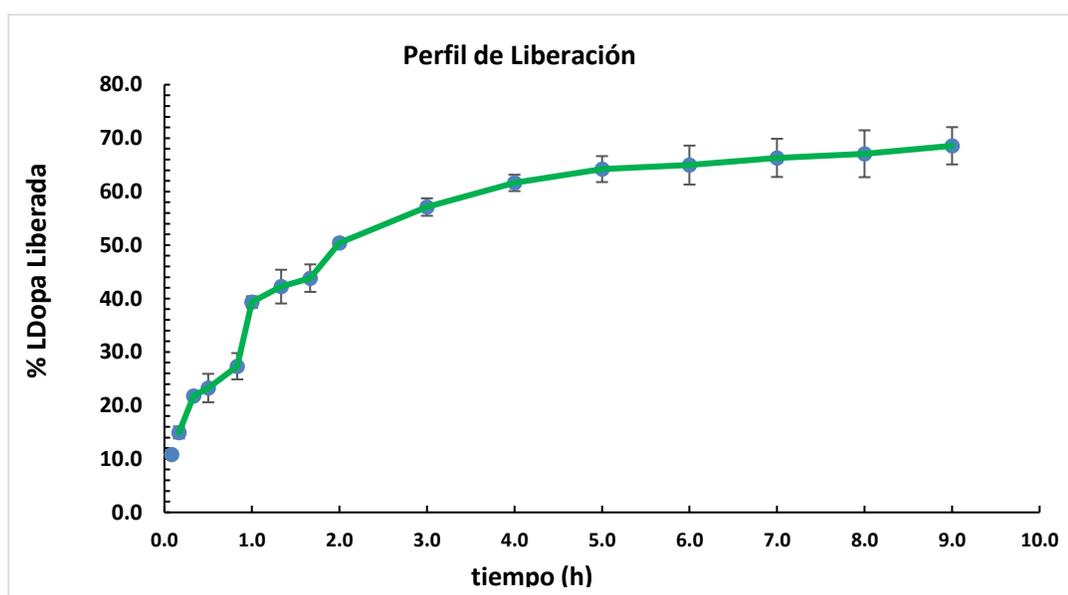


Figura 12. Curva de liberación de L-Dopa desde nanopartículas de quitosano. EL gráfico se construyó con el promedio de **3** curvas independientes. El comportamiento de las curvas tuvo poca variabilidad entre los **16 puntos** de los que está constituida en 9 horas de ensayo. En cada una de las curvas se describió una liberación veloz durante las primeras **2 horas**, seguido de una liberación con una velocidad significativamente más lenta, llegando al **68%** de liberación durante la duración del experimento.

7.6. Ajuste de la cinética de liberación.

Una vez que se obtuvieron los perfiles de liberación, se analizó si la relación del porcentaje de fármaco liberado podía comportarse de manera lineal. Para ello los datos obtenidos fueron ajustados a distintos modelos de liberación, los cuales son aplicados a las formas farmacéuticas sólidas como tabletas y/o cápsulas; con él fin de poder discernir el tipo de cinética que pudieran estar siguiendo y obtener más información acerca de las nanopartículas y su comportamiento in vitro, simulando condiciones fisiológicas.

Para poder explorar el tipo de cinética al que se ajustaban mejor las nanopartículas, los datos fueron tratados para buscar el mejor coeficiente de determinación r^2 en 4 modelos básicos de cinética, el de Orden cero, Orden uno, Hixon - Crowel (ley de la raíz cúbica) y Higuchi. **Tabla 9.**

Modelo	Orden Cero	Orden 1	Raíz Cubica	Higuchi
Ecuación	$M = M_0 + k_d(t-t_0)$	$M = M_0(1 - e^{-k_d(t-t_0)})$	$M = M_0 - [\sqrt{M_0 - K_d(t-t_0)}]^3$	$M = k_d \cdot \sqrt{(t-t_0)}$
r^2	0.777	0.617	0.677	0.919
m	5.953	0.153	0.170	21.755
b	26.664	3.201	2.937	11.726

Tabla 9: Pruebas de ajuste a modelos de cinética de liberación. Los datos obtenidos en la curva fueron tabulados para ser ajustados a los 4 tipos de modelos de liberación expresados en la modalidad de fórmula de la recta punto pendiente, donde se acepta que el modelo en el cual el coeficiente de determinación r^2 sea el más cercano a 1 es el que describe mejor el comportamiento de liberación, que en el caso de esta formulación es el modelo de Higuchi.

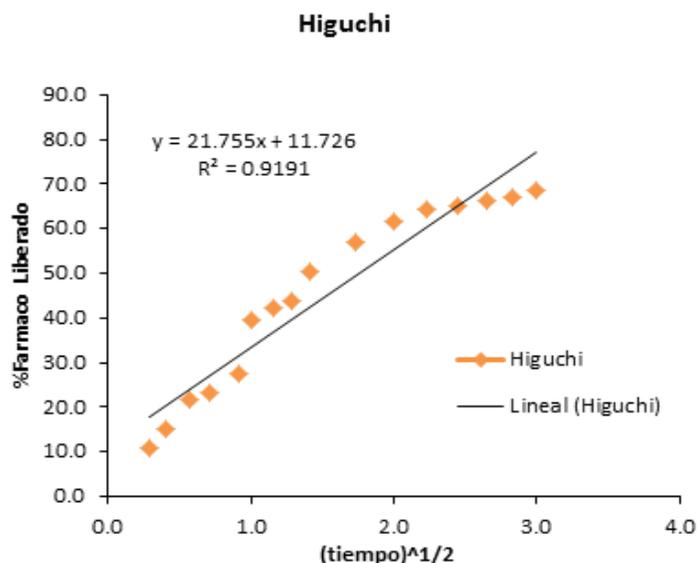


Figura 13. Gráfica de la recta del modelo de cinética Higuchi. La Liberación de fármaco a partir de las nanopartículas presenta un comportamiento lineal al tratar la variable del tiempo como raíz del mismo, lo que nos da un coeficiente de determinación de $r^2= 0.9191$, con una pendiente positiva $m=21.755$, siendo que con estos datos el modelo de Higuchi el que mejor puede describir la cinética de liberación

Tal y como se muestra en la **tabla 9**, el modelo de cinética al cual se ajusta mejor el perfil de liberación es al modelo de Higuchi al presentar un coeficiente de determinación más cercano a la unidad (**de $r^2= 0.9191$**). A pesar de que dicho coeficiente no tuvo un valor ideal, la recta trazada en la **Figura 13** ayuda a describir este comportamiento lineal, el cual puede ayudar a explicar la manera en la que el activo se desprende de la formulación de nanopartículas

8 Discusión de resultados

8.1 Validación

La validación del método analítico de cuantificación de L-dopa por espectrometría UV en el equipo nanodrop 2000 se realizó con la finalidad de tener datos documentados acerca de la confiabilidad del método. Actualmente tener una validación es prácticamente obligatorio en cualquier tipo de ensayo, pues con ello se asegura que el método sea confiable y cumpla con el propósito para el cual es empleado. Los parámetros de validación evaluados en esta parte del proyecto son los más importantes y le dan sustento a las pruebas posteriores realizadas a lo largo de la investigación.

Cabe resaltar que las guías de validación encaminan al cumplimiento de normas oficiales que son requeridas para la venta de medicamentos, tanto en México como a nivel mundial. Por lo tanto, a pesar de que este proyecto se realizó con fines académicos y de investigación, el contar con un método validado puede llegar a dar sustento a futuros procesos que pudieran ser adoptados por trabajos basados en el presente proyecto.

En el ensayo de elección del pico máximo de absorción en el espectro electromagnético para cuantificar L-Dopa de concentración de [1 mg/ml] en CH₃COOH 1%, se encontraron dos picos que saturaban el sistema, uno a 281 nm y otro por arriba de los 240 nm; sin embargo, diversos autores reportan que la L-Dopa presenta absorción a los 280 y 220 nm (49), en medio acuoso y ácido respectivamente. Con esta premisa, bajo nuestras condiciones experimentales, la elección del mejor pico de absorción fue a la longitud de 281 nm encontrado en el barrido de una solución de L-Dopa a 0.5 mg /ml. En este ensayo la transición de la L-Dopa a $\lambda \approx 220$ nm mostró señales de absorbancia difíciles de correlacionar con las concentraciones, lo que complica la cuantificación de L-dopa a esta longitud de onda, haciéndola menos fiable e imprecisa. Lo anterior podría indicar una saturación, probablemente debida a impurezas del solvente o del propio fármaco.

Para asegurar que la respuesta a los 281 nm se comportaba de manera proporcional se procedió a hacer la determinación de la linealidad encontrando que los cambios en las lecturas debidas al analito correlacionaron con las concentraciones utilizadas, con poca variación en cada nivel CV < 3%, encontrando un rango de linealidad entre concentraciones de 0.750 – 0.063 mg/ml, con un coeficiente de determinación de 0.999, por lo que dentro de este rango de concentraciones las lecturas en el espectrofotómetro pueden predecir una concentración desconocida de L-Dopa.

Para evaluar la capacidad del método de cuantificación para determinar concentraciones bajas de L-Dopa, se elaboraron varias curvas a partir de una

concentración de 0.126 mg/ml hasta 0.0015 mg/ml, con esta evaluación se puede determinar el límite de cuantificación (0.062 mg/ml), y el de detección (0.031 mg/ml) donde el coeficiente de variación en el límite de detección se incrementa por arriba del 10% de variación lo que pone en tela juicio la confiabilidad de las determinaciones a partir de esta concentración y en menores a ella.

Con el parámetro de linealidad obtenido, se procedió a evaluar la precisión y exactitud, con este parámetro esperando que las respuestas para determinar la concentración de soluciones a un nivel alto, intermedio y bajo interpolando dentro de la curva de linealidad, estuvieran cerca de un valor nominal estimado mediante el cálculo matemático, evaluado esto por el porcentaje de recobro y que a su vez la variación entre un número de determinaciones del mismo punto no variase más allá de un $CV < 3\%$.

Por último y no menos importante se puso a prueba la selectividad del método para verificar que los materiales empleados durante la elaboración de las nanopartículas no interfieran con la determinación de la L-Dopa al momento de su cuantificación. De tal manera que se evaluaron soluciones de los materiales a utilizar, el tripolifosfato y el quitosano, los cuales fueron analizados mediante un barrido en el equipo, donde no se encontró una señal que interviniese en lecturas a una longitud de onda de 281 nm. Aunado a esto, se hizo un ensayo de elaboración de nanopartículas para observar si éstas podrían interferir con la determinación. Durante esta última prueba la solución con nanopartículas no presentó señal de absorbancia a 281 nm, posteriormente con la mezcla de esta solución y una de L-Dopa, la señal a esta longitud de onda aparece, lo que nos llevó a la conclusión de que el método muestra selectividad para poder analizar L-Dopa.

8.2 Elaboración de Nanopartículas

Al llegar al punto en el que se comenzó a plantear la metodología de elaboración de nanopartículas, a pesar de que ya se tenía la elección del método de gelación iónica, al indagar más acerca del método, se encontraron algunas variantes que podrían ser opción en la elaboración, que van desde la utilización de diferentes equipos para realizar la mezcla utilizando un ultraturax, la barra magnética, o una propela, sin embargo se ha reportado que hay un impacto dependiente de la utilización de estas tres opciones en el tamaño de partículas, siendo una agitación con barra magnética convencional la mejor opción (50) por lo cual este tipo de agitación fue seleccionado para el proyecto.

Una vez seleccionado el sistema de agitación, se evaluó si la adición de un paso de sonicación en el método de elaboración podría repercutir a favor o en contra del objetivo buscado, en lo que respecta al tamaño de partícula. Esta evaluación se realizó debido a la falta de consenso en la literatura, pues en el método base de gelación iónica (40) así como en varios de los trabajos donde se trabaja con nanopartículas de quitosano por este método no se reporta la utilización de algún tipo de sonicación en el proceso de elaboración; sin embargo, en un trabajo reciente reportan la sonicación con sonda como un paso con el cual se llegan a obtener hasta nanopartículas con dimensiones menores a los 200 nm (46). De manera interesante, la utilización de una sonicación en nuestro método de elaboración impactó de manera significativa en el tamaño de partícula determinado por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Con esta prueba se comprobó que la formación de las partículas no se veía comprometida por la sonicación; sin embargo, esto ayudó a disminuir drásticamente el tamaño de partícula y a su vez tener lotes más homogéneos entre repeticiones, siendo así un paso que suma en lo que respecta a la obtención de un tamaño de partícula pequeño.

Al tomarse la decisión de utilizar la sonicación como paso dentro del método de elaboración, se comenzó a sospechar si este proceso no comprometía la estabilidad de las partículas, una manera de evaluar esto es mediante la determinación del potencial Z, en esta prueba encontramos que lotes con un tamaño de partícula menor a los 400 nm, mostraron cargas eléctricas con valores mayores a los 20 mV. Este valor es un indicio de las interacciones electrostáticas las cuales se teoriza obedecen la ley de cargas de Coulomb, permiten fuerzas de repulsión entre partículas, evitando así la fusión entre ellas, lo que impacta directamente en el tamaño de partícula. En el presente trabajo se observó que en lotes con partículas de dimensiones cercanas a los 1000 nm, se presenta una evidente división de fases mediante la precipitación de las partículas, lo cual hizo que se descartasen para posteriores evaluaciones.

Con la obtención de un tamaño y carga eléctrica aceptables, nos dispusimos a corroborar el tamaño de partícula mediante la captura de imágenes de las partículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello se elaboraron dos preparaciones para ser observadas, y se obtuvieron dos imágenes de partícula por lote, sospechamos que probablemente había una gran dispersión en las preparaciones, pues se esperaba como en algunos otros trabajos encontrar conglomerados de partículas (40, 50 , 51, 52), los cuales contribuirían a tener mejor idea de la homogeneidad de los lotes, sin embargo ambas partículas capturadas en escala de 100 nm, cumplen con la particularidad de poseer dimensiones por debajo de los 400 nm, lo cual es un acierto más en la búsqueda de los objetivos planteados.

8.3 Optimización del tamaño de partícula

Durante la revisión de distintos trabajos de elaboración de nanopartículas, se encontró que no había una homogeneidad en los métodos de elaboración, a pesar de que en la mayoría de los reportes se menciona el método de gelación iónica (40) como el empleado en este proyecto, se observó que este procedimiento era el inicial y que en la mayoría de los proyectos después ajustan las variables de temperatura a la cual se elaboran las partículas, el pH, velocidad de agitación, velocidad a la cual se adiciona el entrecruzador, temperatura de elaboración, buscando los mejores resultados. Por este motivo se decidió investigar las condiciones que favorecerían la obtención de mejores resultados en lo que respecta al tamaño de partícula. Con esta finalidad, se consideró que algunos ensayos realizados por otros grupos, donde se reportan distintas condiciones de temperatura y pH. Sin embargo, ningún grupo reportaba el impacto o la relación de utilizar distintas potencias de sonicación, por esto se decidió incluir esta variable para nuestro estudio. En lo que respecta a la temperatura hay métodos realizados a temperaturas de 2-4 °C (49), así decidimos evaluar a 10 °C una temperatura promedio en un cuarto frío y otros a temperatura ambiente aproximadamente de 25 °C (39, 45, 52) otra condición es el grado de acidez bajo el cual se hace la reacción de entrecruzamiento, pues ésta depende principalmente del grado de protonación de polímero en medios ácidos que en el caso de quitosano la utilización de ácido acético al 1% para disolver el polímero es un común denominador en varios trabajos (39, 45, 52), pero solo algunos equipos de trabajo describen un ajuste de pH a 4.5 previa a la reacción de entrecruzamiento (51) mientras que otros no ajustan el pH y realizan la reacción al pH que presenta el polímero en la solución de ácido acético al 1% que es de aproximadamente de 3.5 (45, 48). Para la elección de la potencia de sonicación solo se encontró un trabajo con el dato del tiempo (46) que transcurren las partículas bajo esta condición, por lo que se eligieron dos porcentajes de potencia ajustados en el equipo, que fueron al 50 y 100% esperando encontrar una diferencia en cada condición seleccionada.

Para poder analizar estas variables nos valimos de un diseño experimental 2^k donde $K=3$ (47) , por lo que se evaluaron las 3 variables a dos niveles cada una, lo que nos dio un número considerable de experimentos, que sin ser una cantidad exagerada pero representativa, nos permitió concluir que las mejores condiciones para obtener un tamaño de partícula mejor eran las de llevar el procedimiento a una temperatura aproximada de 25 °C, con un pH de la solución de quitosano en ácido acético 1% sin modificarse a pHs menos ácidos, y que la sonicación durante un tiempo de 2.5 minutos a 100 o a 50 % de la potencia de la sonda no tenía un efecto significativo, es decir que aplicar una u otra potencia afecta de igual manera el tamaño obtenido.

Por lo que siendo el pH y la temperatura variables con mayor impacto. Se puede sospechar que la temperatura al ser un factor que afecta la viscosidad de todo tipo de fluido, en el caso de la solución de quitosano, cuando se elaboraron las partículas a temperatura baja, probablemente la viscosidad de la solución se incrementó, promoviendo una menor movilidad y dispersión del polímero en la solución lo que puede acarrear una menor eficiencia de mezclado con la potencia de agitación utilizada. Por lo tanto, al adicionar el entrecruzador este quizá no se distribuyó de manera uniforme, por lo que la reacción de entrecruzamiento habría involucrado más polímero en los puntos donde se concentra el polianión, lo que resulta en la obtención de partículas mayores a los 400 nm, y que aun con la sonicación estas no disminuyan su dimensión por debajo de este valor.

Por otra parte se sabe que muchas reacciones químicas pueden verse afectadas por la temperatura, debido a que las temperaturas bajas disminuyen la energía cinética de las moléculas, y una temperatura elevada la incrementa, sin embargo tampoco se hizo un ensayo subiendo la temperatura, debido a que se podía sospechar que al elevar la temperatura, se podría comprometer la estabilidad del polímero, pero con un mayor impacto sobre la estabilidad de la L-Dopa que es una molécula sensible a los cambios de temperatura y que se oxida con facilidad, además de ser fotosensible; por lo que se

tenía que tomar en cuenta que los procesos deben estar en condiciones donde se proteja la molécula de la luz a una temperatura no muy elevada.

Así de manera más sistematizada con un plan de trabajo se logró obtener resultados contundentes; aunado a esto con la utilización del software Stathgraphics XII se obtuvieron gráficos en los cuales, claramente se observa el efecto debido a los tratamientos, además de un análisis de varianza que nos permitió darle sustento a nuestros resultados. Para poder proseguir con las evaluaciones pertinentes.

En lo que respecta a la variabilidad del tamaño de partícula parámetro indicado por el PDI, cuyos valores fueron evaluados aprovechando el diseño experimental, durante el análisis de los datos obtenidos en las condiciones de temperatura seleccionadas, detectamos que esta variación de tamaño incrementa de manera considerable dependiendo en gran parte si se elabora a temperatura de 10 °C o de 25 °C. Sin embargo ésta es mejor a temperatura ambiente. En lo que respecta al pH, se encuentra una menor dispersión de los lotes donde se utilizó un pH menos ácido, sin embargo el tamaño de partícula es mayor a 400 nm en estas condiciones, por eso el elaborar partículas a ese margen de pH nos alejaría de las dimensiones de partícula buscadas. En estas series experimentales encontramos que la potencia de sonicación evaluada tampoco tiene un efecto significativo en lo que respecta al valor del PDI, pues como se observa en los gráficos obtenidos es que las variables de temperatura y pH poseen un mayor influencia sobre este parámetro que deriva del tamaño de partícula que se puede obtener en estas condiciones.

Como se hizo en el tamaño de partícula con la obtención del análisis de varianza, se puede corroborar que la variabilidad del tamaño es afectado principalmente por la temperatura, sin embargo el pH es el factor que más influye sobre la variación siendo

la potencia de sonicación la que presumiblemente afecta en menor magnitud la variación del tamaño.

8.4 Eficiencia de entrapamiento (EE)

Para determinar la eficiencia de entrapamiento bajo las condiciones que mejores resultados se obtuvieron de tamaño de partícula, se evaluaron distintas concentraciones de L-Dopa que son menores y mayores al límite de solubilidad de L-Dopa en CH₃COOH [1%]. Para este fin se realizaron ensayos variando la manera de adicionar la L-Dopa en la reacción, primero se agregó L-Dopa disuelto (46) a la solución del quitosano previo a la adición del entrecruzador, sin embargo, al hacer el ensayo no se lograron resultados adecuados. Por lo tanto, se diluyó el principio activo en la solución de TPF, sin embargo la estabilidad de la L-Dopa se vio afectada, pues el pH de la solución de TPF es demasiado alcalino, lo que promueve una reacción que modifica la L-Dopa (7) cambiando el aspecto de la solución de translúcida a turbia en aproximadamente 1 minuto. Tomando en cuenta que la adición de la solución de TPF se lleva a cabo paulatinamente durante un lapso de 5 – 6 minutos, es posible que ocurra una degradación antes de quedar atrapada dentro de las nanopartículas, por lo que se descartó la adición del principio activo de esta manera.

Después de las experiencias anteriores, se propuso la adición de L-Dopa en polvo, haciendo pesadas individuales de cada repetición, con la misma premisa de evaluar concentraciones que fueran menores y superiores al límite solubilidad del principio activo. Con esta serie de ensayos se encontró que las nanopartículas son capaces de entrapar a partir de concentraciones de 0.733 mg/ml que se obtiene desde una masa de 21.9 mg en ensayos de volúmenes finales de 30 ml, en una relación 3:1 de quitosano y tripolifosfato (56,51), que corresponde a la relación que distintos grupos de trabajo han reportado como adecuada para la obtención de tamaños de partícula

menores a los 400 nm. A partir de estos niveles de L-Dopa se logró entrapar a partir de un 11% de eficiencia de entrapamiento, siendo a partir de los 69 mg condiciones en las que se alcanza hasta el 40% de entrapamiento. A pesar de que se llegan a encontrar eficiencias de entrapamiento mejores con otros materiales poliméricos como PGLA, (30) se puede apelar a que el quitosano presenta mejor biocompatibilidad. Por otra parte los trabajos que llegan a encontrar entrapamientos cerca del 50% (45), no precisan las condiciones que favorezcan la reproducción de dichos resultados. Sin embargo, con las condiciones trabajadas durante el desarrollo de esta formulación se encontraron datos relevantes que pueden encaminar a la búsqueda de modificaciones que permitan mejorar los resultados hasta ahora alcanzados por nuestro grupo de trabajo.

8.5 Perfil de liberación.

Con el objetivo de conocer el perfil de liberación de L-Dopa y determinar si esta nueva formulación permite una disposición prolongada para evitar los efectos adversos de la L-Dopa, se empleó un sistema para perfiles de disolución de formas farmacéuticas solidas (55, 56) que considera un sistema de agitación con calentamiento a 36° C, en un medio con amortiguador y pH fisiológico ≈ 7.4 , en condiciones Sink para no superar el 20% de la solubilidad de la L-Dopa en el medio (57). Se tomaron alícuotas a determinados tiempos considerando el tiempo que ocupa entre cada administración de L-Dopa en los pacientes, para después cuantificar mediante interpolación en una curva de calibración la cantidad de L-Dopa presente en el medio.

En estos ensayos se encontró que las nanopartículas son capaces de liberar cerca del 68% de L-Dopa incorporado en su interior, lo cual corresponde a 5.932 ± 0.901 mg, en un lapso de 9 horas. Se determinó un 50% de liberación de L-Dopa después de 2 horas de iniciado el ensayo, esta parte se puede considerar como una liberación rápida

debida principalmente a la desorción de L-Dopa que puede estar presente en la superficie de la nanopartícula. Posteriormente, se observa un comportamiento de liberación más lento desde la segunda hasta la novena hora que completa los 16 muestreos. Considerando que esta prueba se realizó con el fin de describir el tipo de liberación desde las nanopartículas, se sugiere que la incorporación de esta formulación en una forma farmacéutica, complementando tal vez con algún recubrimiento y/o la combinación con otros polímeros como el Poli-etilenglicol, esta liberación pueda ser aún más lenta desde las primeras dos horas, además de conferirle otras propiedades que mejoren la internalización de la partícula o disminuyan su degradación siendo estas últimas propiedades evaluadas con otros métodos experimentales.

Con este resultado se tiene un panorama del tipo de liberación de L-Dopa desde las nanopartículas y el posible efecto en un sistema in vivo; en este proyecto, considerando una liberación de aproximadamente la mitad del activo en 2 horas, se esperaría que el efecto terapéutico se llegue una vez establecido el comportamiento de meseta, esperando que la administración de la siguiente dosis sea posiblemente dos horas antes de que termine la liberación de la administración anterior, para buscar que las fluctuaciones de la L-Dopa por administración desaparezcan, y a su vez la discinesias causadas por L-Dopa. Cabe mencionar que esto tendría que verificarse en un sistema in vivo.

8.6 Ajuste de la cinética de liberación

De manera complementaria al perfil de liberación, los resultados obtenidos se ajustaron a un modelo de cinética de liberación con el objetivo de describir el tipo de mecanismo de difusión del fármaco a partir de las nanopartículas. En el caso de nuestro sistema de liberación, en la evaluación de ajuste a los modelos de cinética más comunes, se encontró que el modelo de cinética de Higuchi fue el que mostró un coeficiente de correlación mayor en el ajuste de los datos a una ecuación de la recta. Esto significa que la liberación de L-Dopa desde una formulación ocurre por desorción desde la

superficie y posteriormente por erosión de la matriz de la nanopartícula, permitiendo la disolución del principio activo, descrito también como una velocidad de transferencia de masa desde una superficie sólida hacia el medio de disolución, bajo condiciones estándar de interfase sólido-líquido, temperatura y composición del medio de disolución.

Como se describe en la sección de resultados, el modelo se ajusta a una cinética de Higuchi, quien desde los años 60s describió que en la disolución están involucrados uno o hasta 3 mecanismos, uno basado en la formación de una capa de difusión, el segundo denominado de barrera interfacial (o interfase), y otra denominada modelo de Danckwert que precisa de la existencia de paquetes de disolventes que al alcanzar el plano de interface y que al entrar en contacto con el sólido se desprende el soluto y es remplazado por otro paquete de solvente (lo cual correspondería a la etapa de erosión de la matriz de la nanopartícula) (58). Pero lo que el modelo matemático de Higuchi predice que la liberación del fármaco desde una matriz insoluble, que en este caso son las nanopartículas, es un proceso dependiente del tiempo y en procesos de difusión correspondientes a la ley de Fick (59). Consideran que hay un involucramiento y penetración simultánea del líquido en la matriz, disolución del fármaco y lixiviación a través de poros o canales en la matriz donde se encuentra el fármaco, siendo éstos los posibles mecanismos de disolución a los cuales se ajusta o responde la liberación del fármaco desde las partículas de quitosano.

9 Conclusión

Se logró obtener una formulación de nanopartículas con base en quitosano capaz de capturar L-Dopa. Dichas nanopartículas poseen características deseables en la partícula que tienen como fin el acarrear activos a sistema nervioso central, en este caso L-Dopa. Dentro de estas características se encuentran que la dimensión de las partículas en promedio no es mayor a los 400nm, el potencial Z se encuentra con una carga positiva por arriba de los +20 mV. Se les suman a estas características un perfil de liberación lento de L -Dopa por pruebas in vitro en condiciones de simulación de condiciones fisiológicas.

10. Perspectivas.

- Comparar el perfil de liberación desde una muestra de L-Dopa en solución salina.
- Reanalizar el tamaño de partícula por Microscopia
- Pruebas para funcionalización de las partículas
- Ensayos de esterilización
- Ensayos de toxicidad en cultivos celulares
- Pruebas *in vivo* en modelos de Parkinson experimental en roedores.

11. Referencias.

1. Meissner WG, Fariser M, Gasser T, Goets CG, Lozano A, Piccini P, Obeso JA, Rascol O, Schaira A, Voon V, Weiner DM, Tison F, Bezard E. Priorities in Parkinson's disease research. *Nature Reviews*. 2011. 10: 377 – 393.
2. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, México: Secretaría de Salud, 2010.
3. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Stamelou M, Bhatia KP, Bum DJ. The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *Lancet*. 2014. 384: 523 – 531.
4. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*. 2014. 17: 1022-1030.
5. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trens Neurosci*. 2000. 23: S8 – S19.
6. Rommelfanger KS, Wichman T. Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2010. 4: 1 – 17.
7. Zhi Zhou Y, Alany RG, Chuang V, Wen J. Studies of the Rate Constant of L-DOPA Oxidation and Decarboxylation by HPLC. *Chromatographia*. 2012. 75 : 597 – 606.
8. Hout P. (ed). *Pharmacological Properties of Levodopa*. En. Fox SH, Brotchie JM. *Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease*. London, Inglaterra: Springer-Verlag London: 2014. p. 147 – 151.
9. Zis P, Chaudhuri KR, Samuel M. Phenomenology of Levodopa-Induced Dyskinesia. Fox SH, Brotchie JM. *Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease*. London, Inglaterra: Springer-Verlag London: 2014. p. 1 - 7.

10. Ngwuluka N, Pillay V, Du Toir LC, Ndesendo V, Choonara Y, Modi G, Naidoo D. Levodopa delivery systems: advancements in delivery of the gold standard. *Expert Opinion Drug Delivery*. 2010. 7: 203 – 224.
11. Piccini P, Brooks DJ, Korpela K, et al. The catechol-o-methyltransferase (COMT) inhibitor entacapone enhances the pharmacokinetic and clinical response to Sinemet CR in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68:589-94.
12. Hauser RA. L-dopa/carbidopa/entacapone (stalevo). *Neurology*. 2004; 62: 564-71.
13. Garbayo E, Ansorena E, Blanco-Prieto MJ. Drug development in Parkinson's disease: From emerging molecules to innovative drug delivery systems. *Maturitas*. 2013. 76: 272 – 278.
14. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009. 17: 2950 – 2962.
15. Hans ML, Lowman AM (eds). *Nanoparticles for Drug Delivery*. En: Gogotsi Y. *Nanomaterials Handbook*. Boca Raton, Florida, Estados Unidos. CRC Taylor & Francis Group. 2006. En Línea, Disponible en: http://homes.nano.aau.dk/fp/selfssembling/lecture%20notes/nanoparticles_for_drug_delivery_CRC.pdf. [Acceso 12 octubre 2015].
16. Rascol E, Devoisselle JM, Chopineau J. The relevance of membrane models to understand nanoparticles–cell membrane interactions. *Nanoscale*. 2016. 8: 4780–4798.
17. Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know?. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014. 71: 2 – 14.
18. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013. 12: 255-264

19. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013.12: 265-273.
20. Masserini M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochemistry*. 2013. Volume 2013, Article ID 238428: 1-18.
21. Mc Carthy DJ, Malhotra M, O'Mhony Am, Cryan JF, O'Driscoll. Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance. *Pharm Res*. (2015) 32:1161–1185.
22. Tang S, Martinez LJ, Sharma A, Chai M. Synthesis and Characterization of Water-Soluble and Photostable L-DOPA Dendrimers. *Organic letters* 2006. 8: 4421 - 4424.
23. Ngwuluka N, Pillay V, Choonara YE, Modi G, Naidoo D, du Toit LC, Kumar P, Ndsendo VMK, Khan RA. Fabrication, Modeling and Characterization of Multi-Crosslinked Methacrylate Copolymeric Nanoparticles for Oral Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. 12: 6194-6225.
24. Ren T, Yang X, Wu N, Cai Y, Liu Z, Yuan W. Sustained-release formulation of levodopa methyl ester/benserazide for prolonged suppressing dyskinesia expression in 6-OHDA-leisoned rats. *Neuroscience Letters*. 2011. 502: 117 -122.
25. Yang X, Zheng R, Cai Y, Liao M, Yuan W, Liu Z. Controlled-release levodopa methyl ester/ benserazide-loaded nanoparticles ameliorate levodopa-induced dyskinesia in rats. *International Journal of Nanomedicine*. 2012. 7: 2077–2086.
26. Kondrasheva IG, Antipova TA, Barsegyan GG, Gambaryan PY, Guseva AA, Kamensky AA. Efficacy and Safety of Nasal Administration of “Na-no-L-DOPA” Based on PLGA Nanoparticles. *Engineering*, 2012. 5: 27-29.
27. Gambaryan PY, Kondrasheva IG, Severin ES, Guseva AA, Kamensky AA. Increasing the Efficiency of Parkinson's Disease Treatment Using a poly(lactic-co-

glycolic acid) (PLGA) Based L-DOPA Delivery System. *Experimental Neurobiology*. 2014. 23: 246-252.

28. Di Stefano A, Carafa M, Sozio P, Pinnen F, Braghiroli D, Orlando G, Cannazza G, Ricciutelli M, Marianecchi C, Santucci E. Evaluation of rat striatal l-dopa and DA concentration after intraperitoneal administration of l-dopa prodrugs in liposomal formulations. 2004. 99: 293 – 300.

29. Ravani L, Sarpietro MG, Esposito E, Di Stefano, Sozio P, Calcagno M, Drechsler M, Contado C, Longo F, Giuffrida MC, Castelli F, Morari M, Cortesi R. Lipid nanocarriers containing a levodopa prodrug with potential antiparkinsonian activity. *Materials Science and Engineering C*. 2015. 48: 294-300.

30. Zhou YZ, Alany RG, Chuang V, Wen J. Optimization of PLGA nanoparticles formulation containing L-DOPA by applying the central composite design. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2012. 1-11.

31. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004. 274: 1–33.

32. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004. 100: 5 –28.

33. Tiyaboonchi W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal* 2003; 11: 51-66.

34. Fang N, Chan V, Mao HQ, Leong KW. Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH. *Biomacromolecules* 2001, 2, 1161-1168.

35. Föger F, Schmitz T, Berknkop-Schunürch. In vivo evaluation of an oral delivery system for P-gp substrates based on thiolated chitosan. *Biomaterials*. 2006. 27: 4250–4255.

36. Fisher A, Watling M, Smith A, Knigh A. Pharmacokinetic comparisons of three nasal fentanyl formulations; pectin, chitosan and chitosan-ploxamer 188. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2010. 48: 138-145.
37. Bernkop-Schnürch A, Dúnnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012. 81: 463-469.
38. Gupta S, Vyas SP. Carbopol/Chitosan Based pH Triggered In Situ Gelling System for Ocular Delivery of Timolol Maleate. *Scientia Pharmaceutica*. 2010. 78: 959–976.
39. Gupta H, Velpandian T, Jaing JS. Ion- and pH-activated novel in-situ gel system for sustained ocular drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 2010; 18: 499–505
40. Calvo P, Remuñan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Pharmaceutical Research*. 1997. 14: 1431-1436.
41. Nagpal K, Singh Sk, Mishra DN. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chem. Pharm. Bull*. 2010. 58: 1423—1430.
42. Bhavna V, Sharma M, Ali S, Baboota , Aliu J. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Nose to Brain Delivery of a Cholinesterase Inhibitor. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007. 69: 712-713.
43. Wang ZH, Wang ZY, Sun CS, Wang CY, Yiang TY, Wang SL. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials*. 2010. 31: 908-915.
44. Shabad Md, Khan RA, Mustafa G, Chuttani K, Baboota S, Sahni J, Ali J. Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Scintigraphy study in mice model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008. 48: 393–405.

45. Trapani A, De Giglio E, Cafagna D, Denora N, Agrimi G, Cassano T, Gaetini S, Cuomo V, Trapani G. Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011. 419: 296–307.
46. Sharma S, Lohan S, Murty RSR. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermoreversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014; 40 : 869–878.
47. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 8 ed. Arizona EUA. 2013. Cap 6 pp 241- 253.
48. Sadigh-Ethegad S, Talebi M, Farboudi M, Mahmoudi J, Reybani B. Effects of Levodopa loaded chitosan nanoparticles on cell viability and caspase-3 expression in PC12 neural like cells. *Neurosciences* 2013; 18: 281-283.
49. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.[Base de datos en internet]. US. Compound summary for CID 6047. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, USA. [consultado Noviembre 2016]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/levodopa#section=Information-Sources>.
50. Hombach J, Bernkop-Schnürch A. Chitosan solutions and particles: Evaluation of their permeation enhancing potential on MDCK cells used as blood brain barrier model. *International Journal of Pharmaceutics* 2009. 376: 104–109.
51. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012. 90: 21–27.
52. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005. 295: 235–245.

53. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003. 250: 215 – 226..
54. Fabregas A, Miñarro M, Garcia-Montoya E. Lozano-Peres P, Carrillo C, Sarrate R, Sánchez N, Ticó JR, Suñé-Negree JM. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013. 446: 199– 204.
55. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11 edición.
56. US Pharmacopeia.
57. Kumar V, Hiremath P, Disolution (eds). En: Felton L. *Remington Essentials of Pharmaceutics*. Albuquerque NM, USA: Pharmaceutical Press. 2013. p 65-66.
58. Singhvi G, Singh M. Review: in-vitro drug release characterization models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2011. 23: 77 – 84.
59. Korsmeyer RW. Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983. 15: 25-35.