

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Desarrollo de micropartículas de manteca de cacao para la encapsulación y liberación controlada de fármacos

Proyecto de investigación

María Mercedes Ponce Andrade

Ingeniería Química

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de:

Ing. Química

Quito, 21 de diciembre de 2017

Universidad San Francisco de Quito USFQ
Colegio de Ciencias e Ingeniería

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Desarrollo de micropartículas de manteca de cacao para la encapsulación y liberación controlada de fármacos

María Mercedes Ponce Andrade

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

José Francisco Álvarez Barreto, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 21 de diciembre de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María Mercedes Ponce Andrade

Código: 00111231

Cédula de Identidad: 1719929018

Lugar y fecha: Quito, diciembre de 2017

RESUMEN

Los sistemas de liberación de fármacos basados en lípidos son una nueva tecnología que se está utilizando con el objetivo de encapsular fármacos poco solubles por sus propiedades de absorción, solubilidad y biodisponibilidad. El presente estudio propone desarrollar tecnologías de encapsulación y liberación de fármacos a partir de micropartículas de manteca de cacao utilizando una metodología de emulsión. Se tomó en cuenta variables como temperatura, relación fase orgánica: fase acuosa, concentración de manteca y surfactante. Se caracterizó cada uno de los tratamientos aplicados según su tamaño, rendimiento, eficiencia y se utilizó herramientas estadísticas con las cuales se encontró diferencias significativas. Se reportó que el tamaño de partícula decrece al incrementar la concentración de *Tween80* en la fase acuosa, y que a su vez incrementa al encapsular el fármaco modelo. En cuanto al rendimiento este incrementa al utilizar una solución al 5% p/v de manteca y 1% v/v de *Tween80*. La eficiencia de encapsulación fue alta, donde se obtuvo un rango de (97.42- 99.14) %. Se estudió la liberación de ibuprofeno como fármaco modelo, con distintas concentraciones de manteca y surfactante, donde la máxima liberación alcanzada fue de 55.18% para micropartículas fabricadas con 2% p/v de manteca de cacao y 2% v/v *Tween80*, para las distintas micropartículas fabricadas se observó una liberación alta en la primera hora. Se concluye que es posible desarrollar tecnologías utilizando manteca de cacao aplicables a la industria cosmética y farmacéutica para la administración retardada de fármacos u otros agentes activos, sin embargo; todavía es necesario optimizar el proceso de encapsulación.

Palabras clave: Microencapsulación, *Tween80*, manteca de cacao, liberación controlada, ibuprofeno, emulsión

ABSTRACT

The use of lipids as core material for microencapsulation is a new technology that is being applied for controlled drug release systems, specifically for drugs that are non-soluble in water. The purpose of this study is to develop encapsulation technologies for controlled drug release systems with cacao butter as core material. The effect of variables including temperature, organic phase: aqueous phase ratios, and concentrations of cacao butter, and surfactant were examined. Particles were produced by an emulsion-solvent evaporation technique and were characterized by size, yield and efficiency. Results demonstrated that particle size decreased as surfactant concentration increased, while particle size increased when drug was encapsulated. A higher yield was achieved by using 5% w/v cacao butter solution and 1% v/v *Tween80* aqueous solution. Encapsulation efficiency of ibuprofen when using cacao butter was in the range of (97.42-99.14) %. Drug release of ibuprofen was studied where the highest value reported for microparticles produced with 2% w/v cacao butter and 2% *Tween80* was 55.18%, however the release pattern showed a burst effect for all prepared microspheres. Finally, it is possible to develop technologies using cacao butter as core material with an application in cosmetic and pharmaceutical industries for controlled drug rerelease systems however, it is still necessary to optimize and improve the process.

Key words: microencapsulation, *Tween80*, cacao butter, controlled drug release, ibuprofen emulsion

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Antecedentes	15
1.2. Justificación del proyecto.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo General del Proyecto	20
2.2. Objetivos específicos del Proyecto	20
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1. Liberación controlada.....	21
3.2. Vías de administración.....	23
3.3. Micro encapsulación y sus aplicaciones.....	25
3.4. Biopolímeros utilizados en micro encapsulación.....	26
3.5. Técnicas para fabricar micro partículas	28
3.6. Método de emulsión- evaporación de solvente	30
3.7. Factores que afectan al proceso de micro encapsulación.....	31
3.8. Materiales utilizados para la elaboración de micropartículas	33
3.8.1. Manteca de Cacao.....	34
3.8.2. Surfactante	35

3.8.3.	Solvente orgánico.....	36
3.8.4.	Fármaco modelo.....	36
4.	METODOLOGÍA.....	38
4.1.	Procedimiento para elaboración de micropartículas	38
4.2.	Encapsulación del fármaco.....	39
4.3.	Diseño experimental y variables de importancia	40
4.3.1.	Concentraciones y composiciones	40
4.3.2.	Temperatura	42
4.4.	Caracterización de las micropartículas.....	43
4.4.1.	Tamaño	43
4.4.2.	Rendimiento.....	44
4.4.3.	Eficiencia	45
4.4.4.	Liberación	45
4.5.	Análisis ANOVA y método de Tukey	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
5.1.	Fabricación de micropartículas	47
5.2.	Caracterización de micropartículas sin ibuprofeno	51
5.2.1.	Tamaño	51
	Relación fase orgánica: fase acuosa	52
	Concentración de manteca de cacao.....	53

Concentración de Tween80	55
5.2.2. Rendimiento	57
Relación fase orgánica- fase acuosa	57
Concentración de manteca.....	58
Concentración de Tween80	59
5.3. Caracterización de micropartículas con ibuprofeno.....	61
5.3.1. Tamaño	61
Micropartículas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo.....	61
Micropartículas con una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo.....	63
5.3.2. Rendimiento.....	66
Micropartículas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo.....	66
Micropartículas con una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo.....	68
5.3.3. Eficiencia de encapsulación.....	70
5.3.4. Liberación	71
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
7. FUENTES CONSULTADAS	77
8. ANEXOS	85
8.1. Medición de micropartículas utilizando el software ImageJ.....	85
8.2. Retícula cuadrangular de cámara de Neubauer	85

8.3. Curva de calibración de Ibuprofeno en UV-VIS utilizando soluciones estándares conocidas en PBS	86
8.4. Preparación del Buffer Fosfato Salino (PBS)	86
8.5. Ejemplo de análisis ANOVA y TUKEY en cuanto a tamaño.....	87
8.5.1. Relación fase orgánica: fase acuosa.....	87
8.5.2. Concentración de Tween80 (1:10).....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la manteca de cacao (Codini, Díaz, Ghirardi, & Villavicencio, 2004)	34
Tabla 2. Variables estudiadas en la fabricación de micropartículas de manteca de cacao con sus respectivas concentraciones y composiciones	40
Tabla 3. Temperaturas estudiadas en la fabricación de micropartículas	43
Tabla 4. Eficiencia de encapsulación para soluciones al 5% ibuprofeno	71
Tabla 5. Reactivos utilizados en la solución de PBS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de liberación de fármacos con liberación controlada y sin liberación controlada. Tomado de: (Das et al., 2011).....	22
Figura 2. Método de emulsión- evaporación de solvente (Wang, Li, & Truong, 2016).....	31
Figura 3. Micro cápsula del tipo matriz (Campos et al., 2013)	31
Figura 4. Estructura del ácido palmítico	35
Figura 5. Estructura del ácido esteárico	35
Figura 6. Estructura del ácido oleico	35
Figura 7. Molécula de ibuprofeno (Lakshmina, Maxwel, Anand, & Souza, 2017).....	37
Figura 8. Micropartículas de manteca de cacao sin solvente orgánico fabricadas por el método de emulsión a 25°C, utilizando Tween80 como agente emulsificante en la fase acuosa	48
Figura 9. Micropartículas de manteca de cacao sin solvente orgánico fabricadas por el método de emulsión a 37°C utilizando Tween80 a 37°C como agente emulsificante en la fase acuosa	48
Figura 10. Micropartículas de manteca de cacao fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución de manteca de cacao previamente disuelta en acetato de etilo y utilizando Tween80 como agente emulsificante en la fase acuosa.....	49
Figura 11. Micropartículas de manteca de cacao sin ibuprofeno tomadas a las 24 horas de agitación fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente con una solución al 2% p/v de manteca y 2% v/v de Tween80	50
Figura 12. Micropartículas de manteca de cacao fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente con una solución al 2% w/v de manteca, 2% v/v de Tween80 y 5% w/w de ibuprofeno tomadas a a las 24 horas de fase de evaporación.....	51

- Figura 13. Liofilizado de micropartículas de manteca de cacao fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5w/v% de manteca, una solución al 1% v/v de Tween80 como agente emulsificante y 5% w/w de ibuprofeno. 51
- Figura 14. Efecto de distintas relaciones fase orgánica: fase acuosa en el tamaño de micropartículas fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5% p/v de manteca de cacao y 0.5% v/v de Tween80 como constantes 53
- Figura 15. Efecto de la concentración de manteca de cacao en acetato de etilo sobre el tamaño de partículas fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 0.5% v/v de Tween80 y una relación de 1:10 como constantes. 54
- Figura 16. Efecto de la concentración de Tween80 sobre el tamaño de micropartículas sin ibuprofeno fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo y una relación de 1:10 como constantes. Donde A muestra el menor tamaño producido ($2.63 \pm 0.77 \mu\text{m}$) 56
- Figura 17. Efecto de la relación fase orgánica: fase acuosa en rendimiento (número de micropartículas sin ibuprofeno/mL) fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo y una solución al 0.5% v/v de Tween80 como constantes. Donde las mismas letras representan tratamientos estadísticamente iguales, mientras que distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ 58
- Figura 18. Efecto de la concentración de manteca de cacao sobre el rendimiento (número de micropartículas sin ibuprofeno/mL, utilizando el método de emulsión- evaporación de solvente con una solución al 0.5% v/v de Tween80 y una relación de 1:10 como constantes. Donde A representa el tratamiento con menor rendimiento..... 59

- Figura 19. Efecto de la concentración de Tween80 sobre el rendimiento (número de micropartículas sin ibuprofeno/mL), utilizando el método de emulsión- evaporación de solvente con una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo y una relación de 1:10 como constantes..... 60
- Figura 20. Efecto de concentración de Tween80 en tamaño para micropartículas de manteca de cacao fabricadas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo con y sin ibuprofeno. A muestra tratamientos sin ibuprofeno con diferencias significativas, B significa el tratamiento con ibuprofeno con un tamaño de partícula significativamente menor, C tratamientos iguales. 63
- Figura 21. Efecto de concentración de Tween80 en tamaño para micropartículas de manteca de cacao fabricadas con una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo con y sin ibuprofeno. Donde A muestra una diferencia significativamente menor para tratamientos con ibuprofeno, B y C muestran a una diferencia significativa en cuanto a tratamientos con y sin ibuprofeno. 66
- Figura 22. Efecto de concentración de Tween80 en rendimiento (número de micropartículas/mL) para una solución al 2% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo, una relación de 1:7, sin y con ibuprofeno. Donde A corresponde al tratamiento con más producción de micropartículas para soluciones con y sin ibuprofeno y B al tratamiento con menor producción de partículas para soluciones con y sin ibuprofeno. 67
- Figura 23. Efecto de concentración de Tween80 en rendimiento (número de micropartículas/mL) para una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo, una relación de 1:7, sin y con ibuprofeno. Donde A muestra la mayor cantidad de partículas producidas para soluciones con y sin ibuprofeno..... 69

Figura 24. Curva de liberación acumulativa del ibuprofeno, para una emulsión al 2% manteca y 2% Tween80	73
Figura 25. Curva de liberación acumulativa de ibuprofeno, para una emulsión al 5% manteca y 2% Tween80.	74
Figura 26 Curva de liberación acumulativa de ibuprofeno, para una emulsión al 2% manteca y 1% Tween80.	74
Figura 27. Curva de liberación acumulativa de ibuprofeno, para una emulsión al 5% manteca y 1% Tween80.	74
Figura 28. Medición de micro partículas	85
Figura 29. Cuadros cámara de Neubauer.....	85
Figura 30. Curva de calibración Ibuprofeno	86

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La encapsulación es una tecnología que tiene una variedad de aplicaciones en distintas industrias como la farmacéutica, alimenticia, agroquímica y cosmética (Suganya & Anuradha, 2017). Existen dos tipos de encapsulación, la micro encapsulación y la nano encapsulación. Por un lado, la micro encapsulación es un proceso en el cual pequeñas gotas o partículas de material sólido o líquido son cubiertas por una capa polimérica, con el objetivo de protegerlo, controlar su liberación y preservarlo (Miaomiao Hu, 2017). Generalmente, el diámetro del producto micro encapsulado está en un rango de 0.11 a 1000 μm (Chanana et al., 2013) . Por otro lado, la nano encapsulación es un proceso que permite encapsular sustancias a nano escala, los tamaños en cuanto a diámetro van de 10 a 100 nm (Suganya & Anuradha, 2017). Ésta tecnología tiene una gran ventaja frente a la micro encapsulación, ya que debido a su tamaño permite una mayor precisión y eficiencia al liberar el agente terapéutico encapsulado (Suganya & Anuradha, 2017). Sin embargo, la nano toxicidad es un problema que aún está por resolverse, pues a pesar de que cada vez hay más estudios en cuanto a nanomateriales con aplicación biomédica, se ha probado que comúnmente tienen propiedades citotóxicas (Soenen et al., 2011). No obstante, la micro encapsulación es un proceso ampliamente estudiado en el cual se han obtenido muy buenos resultados en la industria farmacéutica ya que permite una liberación controlada prolongada, protección del fármaco, compatibilidad, conversión de líquido a sólido, reduce su toxicidad, y mejora su olor y sabor (Shete, Pawar, & Aghav, 2014; Suganya & Anuradha, 2017).

La mayoría de los sistemas de liberación disponibles en el mercado, y los estudiados a nivel experimental, están diseñados para la encapsulación de fármacos hidrosolubles. Los sistemas de liberación basados en lípidos representan, por lo tanto una nueva tecnología que se está utilizando con el objetivo de encapsular fármacos poco solubles en agua, específicamente para administrarlos de forma oral, debido a sus propiedades de absorción, solubilidad y biodisponibilidad (Kalepu, Manthina, & Padavala, 2013). Para medicamentos que van a ser administrados de forma oral es de suma importancia que los excipientes no sean tóxicos y que sean biodegradables al momento de ser absorbidos por el cuerpo, por lo que se sugiere el uso de lípidos que provienen de alimentos (Benita, 2006). Existen varias ventajas en cuanto al uso de lípidos para micro encapsulación y liberación de fármacos. Permiten encapsular fármacos ya sea hidrosolubles o liposolubles, se los puede fabricar en varios tamaños, son biodegradables y permiten una liberación controlada del fármaco (Kulkarni & Betageri, 1995).

Debido a las limitaciones actuales en la industria farmacéutica, el uso de lípidos para mejorar las técnicas de micro encapsulación está en constante progreso. Existen algunos estudios prometedores como el de Perge y Robitzer donde se utilizó un método de dispersión en caliente con el cual se logró formar micropartículas libres de surfactante a base de dióxido de silicón. Se encontró que al encapsular ibuprofeno, la estructura cristalina del fármaco no se ve afectada al usar silicón; sin embargo, se encuentra una relación directa entre el tamaño de las micropartículas y la liberación controlada del fármaco (Perge, Robitzer, Guillemot, Devoisselle, & Legrand, 2012).

Existen algunos estudios donde se ha utilizado manteca de cacao para micro encapsulación de microorganismos. Uno de ellos se enfoca en encapsular bacterias como

Bifidobacterium animalis y *Lactobacillus acidophilus* en manteca de cacao utilizando una técnica de “spray chilling” o enfriamiento por pulverización (Pedroso, Dogenski, Thomazini, & Heinemann, 2013) El objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia de prebióticos a el proceso de enfriamiento por pulverización y se encontró que cuando las micropartículas están a una temperatura de -18°C las células se almacenaban sin problema por 90 días. Por otro lado, existe otro estudio donde se produjeron micro cápsulas de manteca de cacao por medio de un proceso llamado electrospray, donde se buscó encapsular una solución acuosa y su principal aplicación es en la industria alimenticia (Bocanegra et al., 2005).

El presente trabajo propone aplicar tecnologías de micro encapsulación utilizando manteca de cacao, a través de un proceso de emulsificación, con una potencial aplicación en liberación controlada de fármacos. Existen varios estudios y procedimientos desarrollados en cuanto a liberación controlada de fármacos hidrosolubles, sin embargo, el reto está en encapsular fármacos liposolubles. Debido a esto, se utiliza manteca de cacao para encapsular y estudiar la liberación de Ibuprofeno, un analgésico no esteroideo de baja hidro-solubilidad.

1.2. Justificación del proyecto

Entre los biopolímeros generalmente utilizados para la micro encapsulación se encuentran: polietileno, poliamidas, polivinilos, nitrato de celulosa, silicona, gelatina y parafina (Jyothi Sri, Seethadevi, Suria Prabha, Muthuprasanna, & Pavitra, 2012). Sin embargo, existen estudios en los que se sugiere trabajar con materiales naturales los cuales son económicos y capaces de reducir toxicidad y posibles residuos orgánicos (Gelperina, Kisich, Iseman, & Heifets, 2005). Ecuador es un país en vías de desarrollo en

el cual la industria petroquímica se ha desarrollado lentamente, y debido a que la materia prima generalmente utilizada en la micro encapsulación es polietileno de grado farmacéutico, éste no está disponible. Al ser un país rico en materiales naturales con posibles aplicaciones biomédicas. Es por eso que se plantea el uso de manteca de cacao para la formación de micro partículas, pues existen varios estudios que sugieren el uso de lípidos para encapsular fármacos.

Se escoge a la manteca de cacao como material para la micro encapsulación ya que es un lípido de alta calidad y disponibilidad en Ecuador. Una de las propiedades más importantes de la manteca de cacao es que contiene antioxidantes de origen natural, por lo que es capaz de prevenir y proteger el desarrollo de distintas patologías conocidas como patologías por estrés oxidativo (Valenzuela, 2007). Es decir, cuando el oxígeno se transforma en radicales libres inicia procesos de oxidación no controlados capaces de dañar funciones celulares que más adelante pueden desarrollar varias enfermedades como Alzheimer, cáncer (hepático, próstata, gástrico), enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. El cacao se caracteriza por tener una alta concentración de flavonoides, antioxidantes de origen natural con propiedades poliméricas, donde su monómero más importante es la procianidina (Valenzuela, 2007). El cacao, y por ende la manteca de cacao previene el envejecimiento celular y puede tener una potencial aplicación como biopolímero para la micro encapsulación de fármacos. Finalmente, el proceso de cristalización es sumamente importante para la liberación controlada de fármacos ya que de éste depende su eficacia. Según estudios la manteca de cacao cristaliza en una estructura altamente ordenada responsable de su dureza y comportamiento en la fusión (Codini, Díaz, Ghirardi, & Villavicencio, 2004).

Además de ser un lípido con alto potencial de aplicación en la elaboración de micro partículas, se conoce que el Ecuador es uno de los mayores productores y exportadores de cacao fino de aroma a nivel mundial (Castro, 2016). En el 2015 es Ecuador cultivó aproximadamente 264 mil toneladas métricas de cacao, una cifra que incrementa cada año (Moncayo, 2016). Debido a esto se obtiene una gran cantidad de materia prima disponible para la elaboración de micro partículas. La manteca de cacao tiene varias propiedades, las cuales ya han sido mencionadas anteriormente, que sugieren su uso como micro encapsulante. El presente trabajo propone aprovechar tanto la disponibilidad como las propiedades de la manteca de cacao al utilizarlo como agente encapsulante con una potencial aplicación en micro encapsulación y liberación controlada de fármacos liposolubles como ibuprofeno.

Finalmente, se ha seleccionado ibuprofeno como fármaco modelo debido a su extenso uso doméstico ya sea en niños o adultos, y por ser un fármaco no esteroideo de baja hidro-solubilidad con propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas. Al ser uno de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) con menos efectos secundarios su uso inapropiado incrementa aún más, donde al ser ingerido en dosis altas (>1200 mg/día) puede ser altamente peligroso. Los efectos adversos más comunes son dirigidos al sistema de coagulación, riñón o al tracto intestinal, por lo que propone encapsular este fármaco para eliminarlos (Bushra & Aslam, 2010). Además de los efectos adversos, uno de los principales problemas que enfrenta este fármaco es su fuerte sabor característico que al ser ingerido produce una sensación de ardor en la garganta (Rainsford, 2010). Lo cual es otra de las razones por las cuales se sugiere la micro encapsulación del mismo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General del Proyecto

Desarrollar tecnologías de encapsulación y liberación de fármacos a partir de micropartículas de manteca de cacao utilizando una metodología de emulsión.

2.2. Objetivos específicos del Proyecto

1. *Establecer un método para fabricación de micropartículas de manteca de cacao utilizando las técnicas de emulsión.*

Se utilizará la técnica de emulsión para la fabricación de micropartículas de manteca de cacao, en donde se analizarán variables como temperatura, concentración, volumen y agitación.

2. *Optimizar el proceso de fabricación de partículas a partir de manteca de cacao.*

Se analizará los resultados en cuanto a las variables aplicadas en la fabricación de micropartículas para definir el método óptimo.

3. *Caracterizar físico-químicamente las micropartículas fabricadas con diferentes formulaciones.*

Caracterizar partículas según su tamaño, morfología y estabilidad en fluidos simulados a los del cuerpo.

4. *Encapsular un fármaco modelo y desarrollar formulaciones para evaluar su liberación.*

Encapsular un fármaco modelo (Ibuprofeno) con el método optimizado anteriormente y evaluar su eficiencia de encapsulación y su liberación.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Liberación controlada

La liberación controlada tiene como objetivo liberar el fármaco a una velocidad y tiempo predeterminado (Langer, 1989). Es una tecnología que ha ido avanzando rápidamente durante los últimos años debido a sus numerosas ventajas frente a la dosificación convencional. Ésta mejora la eficacia del fármaco, la aceptación del paciente y reduce la toxicidad (Uhrich, Cannizzaro, Langer, & Shakesheff, 1999). Además, busca incrementar paulatinamente la actividad terapéutica del fármaco, reducir efectos secundarios y al mismo tiempo reducir la cantidad de dosis administradas (Kalepu et al., 2013).

Existen varios estudios de investigación en los que buscan aplicar la tecnología de liberación controlada en fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer. Esto se debe a que la mayoría de medicamentos oncológicos tienen una efectividad limitada debido a su alta toxicidad y baja solubilidad, al aplicar liberación controlada al fármaco se reduce su toxicidad y a su vez se mejoran sus efectos terapéuticos (Bae et al., 2005). Das y colaboradores utilizaron nanopartículas con el objetivo de mejorar los efectos terapéuticos de fármacos como la Cisplatin, un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado para tratamientos de cáncer. La mayoría del fármaco es excretado sin llegar al sitio de acción, y tiene varios efectos secundarios como la ototoxicidad, nefrotoxicidad y septicemia (S. Das et al., 2011). La Figura 1 muestra la importancia de mantener la concentración del fármaco en la ventana terapéutica, donde claramente se observan los

niveles tóxicos, terapéuticos y dosis administradas al comparar el fármaco nano encapsulado y sin encapsular.

Se observa que mediante la nano encapsulación la concentración del fármaco en el sitio de acción se mantiene en la ventana terapéutica, la cual garantiza la efectividad del fármaco. Es decir, el sistema de liberación controlada alcanza una concentración constante que se mantiene a medida que transcurre el tiempo. Mientras que, al utilizar el fármaco sin encapsular, la concentración del fármaco decae con el tiempo, se necesitan de más dosis administradas, y el paciente es más propenso a tener efectos secundarios. Los resultados mostraron que es una tecnología prometedora, al encapsular el fármaco utilizando albumina incrementó la biodisponibilidad, se logró una liberación controlada, reducir toxicidad y efectos secundarios (Das et al., 2011).

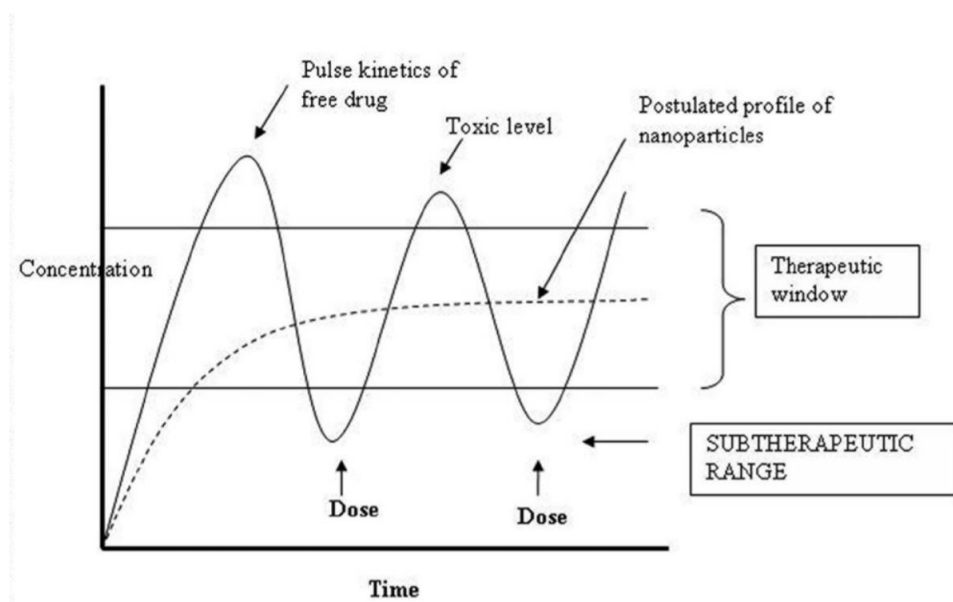


Figura 1. Gráfico de liberación de fármacos con liberación controlada y sin liberación controlada. Tomado de: (Das et al., 2011)

3.2. Vías de administración

Existen distintas maneras en las que se puede administrar un fármaco, estas son: vía oral, parenteral, inhalatoria, sublingual, transdérmica, tópica, rectal, vaginal, ótica, oftálmica, nasal y tópica (Le, 2017). Cada una de ellas tiene un propósito, así como sus ventajas y desventajas. Por un lado, medicamentos administrados por vía oral son los más utilizados debido a su conveniencia y usualmente son más seguros y menos costosos (Le, 2017). Una de las mayores desventajas que tiene este método es su transporte una vez que ya ha sido administrado. El medicamento debe viajar por el tracto digestivo a través de la pared intestinal hasta llegar al hígado, por lo que pueden ser alteradas químicamente antes de llegar a su sitio de acción (Le, 2017). Además, la absorción del medicamento inicia en la boca por lo que se requieren de dosis más altas. Comida y otros fármacos que se encuentren en el tracto digestivo pueden afectar a que tan rápido o que tan lento se absorbe el medicamento. Algunos tipos de medicamentos irritan el tracto digestivo como, por ejemplo, la mayoría de fármacos anti inflamatorios no esteroideos (AINE) pueden causar serios daños estomacales (Le, 2017), he ahí la importancia de encapsularlo.

Por otro lado, la vía parenteral es aquella que es administrada por medio de una inyección la cual puede ser intravenosa, intramuscular y subcutánea. La ventaja principal de este método es su rápida respuesta terapéutica, es decir, el fármaco hace efecto rápidamente (Le, 2017). Es importante mencionar que existen varios estudios sobre liposomas y sus posibles aplicaciones como micropartículas para liberación controlada y dirigida de fármacos. Uno de ellos analizó la posible aplicación de liposomas en fármacos antitumorales administrados de forma subcutánea e intramuscular (Oussoren, Eling,

Crommelin, Storm, & Zuidema, 1998). Debido a que una de las mayores desventajas de la administración de medicamentos vía parenteral son las altas probabilidades de adquirir efectos secundarios, se utilizan liposomas para eliminarlos y mantener los niveles terapéuticos. Los resultados mostraron que al encapsular fármacos como mitoxantrona y dexorubicina con liposomas se reducen efectos citotóxicos en tejidos especialmente al administrarlos de forma intramuscular (Oussoren et al., 1998).

Otro de los métodos utilizados para administrar medicamentos es la vía tópica, donde se aplica el medicamento directamente en la zona que se quiere tratar. Es decir, se conoce el sitio de acción del medicamento. Las ventajas de este método consisten en su fácil aplicación directamente en la zona a tratar. Sin embargo, la absorción del medicamento en la piel puede variar según el tipo de piel (Le, 2017). Su forma farmacéutica consiste en polvos, soluciones, cremas, lociones y geles. Vale la pena mencionar que se realizó un estudio en el que se utilizó oleato de etilo, Tween 80 y goma de Xantano para construir un hidrogel a partir de una micro emulsión para administración tópica de ibuprofeno (Chen et al., 2006). Los resultados fueron bastante prometedores y mostraron que hidrogeles basados en micro emulsiones cuentan con una posible aplicación para administración tópica de ibuprofeno.

Finalmente, la administración de fármacos por vía transdermal consiste en parches, films o apósitos que tienen el objetivo de liberar el medicamento desde la piel hacia el torrente sanguíneo (Le, 2017). La ventaja principal de este método es que se logra una liberación controlada, es decir, a una concentración constante en un tiempo prolongado. Sin embargo, al igual que por vía tópica, la absorción del fármaco dependerá del tipo de piel. Existen varios estudios en los que se utilizan distintos tipos de almidones con el

objetivo de lograr obtener apósitos de posible uso tópico. Por ejemplo, existe un estudio en el que utilizan almidón de maíz o también conocido como maicena para formar apósitos con propiedades regenerativas de la piel (Gomes, Ribeiro, Malafaya, Reis, & Cunha, 2001)

3.3. Micro encapsulación y sus aplicaciones

La micro encapsulación es un proceso en el que partículas pequeñas de material sólido o líquido son cubiertas por una capa polimérica. Debido a sus ventajas ya mencionadas anteriormente, esta técnica tiene una variedad de aplicaciones. En cuanto a medicamentos administrados por vía oral, existen una variedad de métodos con los cuales se puede encapsular distintos tipos de sustancias, y su liberación dependerá tanto del método como de las propiedades de los materiales utilizados. La degradación controlada de un sistema monolítico es uno de los mecanismos de liberación y se refiere a que la matriz se degrada, y debido a que el fármaco se encuentra adherido a la misma se va liberando lentamente. Por otro lado, la difusión controlada permite la liberación del fármaco por mecanismos de difusión a medida que la misma se va degradando (Jyothi Sri et al., 2012). Finalmente, existe otro método de difusión controlada en el cual el agente activo encapsulado se va liberando por difusión mediante una membrana que controla su velocidad de difusión (Jyothi Sri et al., 2012).

La micro encapsulación es una tecnología que se aplica en varios tipos de industrias. Como ya se ha mencionado antes, una de ellas es la industria farmacéutica, donde se utiliza esta tecnología principalmente para liberación controlada y dirigida de fármacos. Por otro lado, la industria alimenticia es una de las que más utiliza este tipo de tecnología debido a que está interesada en mejorar constantemente el sabor, aroma, estabilidad,

valor nutricional y apariencia de sus productos. La técnica más utilizada por la industria alimenticia es la de secado en spray, con la que generalmente se busca encapsular sabores, grasas, vitaminas y aceites (Balassa, Fanger, & Wurzburg, 1971). Por otra parte, la industria textil se ha desarrollado lentamente en comparación a la industria farmacéutica y alimenticia. Sin embargo, su mayor interés es utilizar tecnologías de micro encapsulación para la aplicación de fragancias duraderas y suavizantes (Nelson, 2002). Otra de las industrias interesadas en tecnologías de micro encapsulación es la agricultora. Su principal aplicación es encapsular sustancias tóxicas en pesticidas para mejorar la seguridad del trabajador y reducir el impacto ambiental (S. K. Das et al., 2011). Finalmente, la industria cosmética utiliza este tipo de tecnología para elaborar productos como desodorantes, champú, y sprays, con el objetivo de mejorar su estabilidad y biodisponibilidad. Generalmente utilizan tecnologías de emulsión para encapsular sustancias como vitaminas en productos que serán aplicados directamente en la piel (S. K. Das et al., 2011).

3.4. Biopolímeros utilizados en micro encapsulación

En comparación a los métodos convencionales de dosificación, los polímeros biodegradables mejoran la liberación del fármaco, el cual se libera lentamente y en un tiempo prolongado mejorando su eficacia y reduciendo posibles efectos secundarios al mantener los niveles del fármaco en la sangre (Berkland, King, Cox, Kim, & Pack, 2002). Los biopolímeros generalmente utilizados para la micro encapsulación son: polietileno, poliésteres, poliamidas, polivinilos, nitrato de celulosa, silicona, gelatina y parafina (Jyothi Sri et al., 2012). Uno de los copolímeros sintéticos biodegradables más estudiados es el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), debido a su tasa de degradación y

propiedades mecánicas que pueden ser controladas al variar la relación entre el ácido láctico y glicólico o al alterar los pesos moleculares de los polímeros (Park, Ye, & Park, 2005). Existen varias ventajas al utilizar PLGA: es aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (US FDA), se alcanzan niveles terapéuticos constantes, permite liberar el fármaco en un sitio específico, mejora solubilidad, biodisponibilidad, e incluso se lo puede aplicar en sistemas inyectables (Zhang, Wischke, Mittal, Mitra, & Schwendeman, 2016). A pesar de que hoy en día es comúnmente utilizado, una de las desventajas de este material es el alto costo en gran escala y su baja capacidad de carga y eficiencia al encapsular algunos fármacos (Danhier et al., 2013)

No obstante, Gelperina y colaboradores sugieren trabajar con materiales naturales los cuales son económicos y capaces de reducir toxicidad y posibles residuos orgánicos (Gelperina et al., 2005) Por ejemplo, el quitosano es un polisacárido natural biodegradable, biocompatible y no tóxico con posibles aplicaciones en hidrogeles, apósitos, micro y nano partículas (Chatterjee & Judeh, 2017). Actualmente se lo utiliza como material encapsulante en la industria alimenticia específicamente en aceites.

Los sistemas de liberación de fármacos basados en lípidos son una nueva tecnología que se está utilizando con el objetivo de encapsular fármacos poco solubles por sus propiedades de absorción, solubilidad y biodisponibilidad (Kalepu et al., 2013). Debido a esto, se plantea como una nueva y novedosa alternativa el uso de la manteca de cacao como lípido para la encapsulación de fármacos con propiedades hidrofílicas con posibles aplicaciones en liberación controlada.

3.5. Técnicas para fabricar micro partículas

Existen varias técnicas para la fabricación de micro cápsulas. Una de ellas es el secado spray, el cual consiste en atomizar un líquido utilizando gas caliente, generalmente aire, para obtener un polvo directamente (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007) Esta técnica se utiliza generalmente en la industria alimenticia y permite formar partículas de $10 - 50\mu m$. El secado en spray tiene algunas ventajas frente a otros métodos convencionales, permite controlar el tamaño de partícula, tiene buena reproducibilidad, las condiciones de trabajo son moderadas y no depende estrictamente de la solubilidad del fármaco en el polímero (Park et al., 2005). A pesar de ello, una de las mayores desventajas de esta técnica es la pérdida de material debido a la adhesión de las micropartículas a la pared interior del secador.

Otra técnica utilizada es la coacervación, un método físico-químico que se basa en la separación de fases. Esta técnica se utiliza generalmente para principios activos solubles en agua, y consiste en el recubrimiento de micropartículas con una película polimérica obtenida por medio de precipitación (Villamizar & Martínez, 2008). Una de las ventajas de este método es que permite tener una liberación controlada del componente activo y alcanzar hasta un 99% de carga (Gouin, 2004). Las desventajas de este método son la frecuente aglomeración de micropartículas debido a la falta de un estabilizador y a su vez es un método bastante costoso debido a la cantidad de solventes orgánicos que se utilizan (Ramos, Gómez, & Fernández, 2001)

El uso de fluidos supercríticos también es una técnica empleada para la fabricación de micropartículas. Éste proceso consiste en mantener a altas presiones el fluido supercrítico el cual contiene el principio activo y liberarlo a presión atmosférica por medio de un

pequeño orificio (Jyothi et al., 2010). Una de las ventajas de este método es su baja toxicidad y flamabilidad; sin embargo, la mayor desventaja es que tanto el principio activo como el material de recubrimiento deben ser altamente solubles en fluidos supercríticos.

Por otro lado, método de evaporación de solvente utilizando la técnica de doble emulsión se utiliza generalmente para encapsular fármacos hidrosolubles. Esta técnica es bastante sencilla y consiste en una emulsión de agua en aceite en agua (W-O-W). Es decir, se tiene una solución acuosa que contiene el agente encapsulante, la cual se añade a una solución polimérica disuelta en un solvente orgánico. A continuación se añade esta solución para formar una segunda emulsión que contiene un surfactante, donde por agitación se forman micropartículas de aproximadamente $600 \mu m$ y a su vez se evapora el solvente orgánico utilizado (Becker Peres, Becker Peres, de Araujo, & Sayer, 2016) Las ventajas de este método consisten en la alta eficiencia al encapsular fármacos hidrofílicos, mientras sus desventajas son la dependencia que existe entre las propiedades del polímero y la eficacia del método.

Finalmente, la técnica de emulsión- evaporación de solvente es ampliamente utilizada y es considerada una técnica prometedora para la encapsulación de fármacos liposolubles a diferencia de la técnica de doble emulsión. El proceso consiste básicamente en formar una emulsión de aceite en agua (O-W) donde el fármaco estará previamente disuelto en un polímero y éste en un solvente orgánico el cual se añade a una solución acuosa en presencia de un emulsificante (Jyothi et al., 2010). En el presente trabajo se utiliza esta técnica para elaborar micropartículas de manteca de cacao debido a su simplicidad y

eficacia al encapsular fármacos liposolubles. El proceso se explica en detalle a continuación.

3.6. Método de emulsión- evaporación de solvente

La técnica de evaporación de solvente ha sido ampliamente utilizada debido a su variedad de aplicaciones y eficacia al encapsular tanto fármacos hidrosolubles como liposolubles. Además, ésta técnica permite el uso de una variedad de polímeros que pueden ser utilizados como recubrimientos de micropartículas (Shete et al., 2014). La técnica de evaporación de solvente es un proceso que se lleva cabo en un medio líquido, y consiste en elaborar una emulsión aceite en agua (O-W) (Jyothi Sri et al., 2012) . La fase orgánica de la emulsión está compuesta por el material que va a ser utilizado como recubrimiento, generalmente un polímero, el cual es previamente disuelto en un solvente volátil junto al fármaco o material que va a ser encapsulado. Se agrega rápidamente la fase acuosa a la fase orgánica donde el agente encapsulante se dispersa por medio de agitación constante. De esa manera se forman las micro cápsulas y finalmente se procede a agregar esta mezcla a una solución acuosa la cual continua en agitación con el objetivo de evaporar el solvente orgánico previamente utilizado. Debido a que el material que va a ser encapsulado se disuelve en el material polimérico o de recubrimiento se formará una micro cápsula del tipo matriz tal como lo muestra la Figura 3. El procedimiento se muestra detalladamente en la Figura 2.

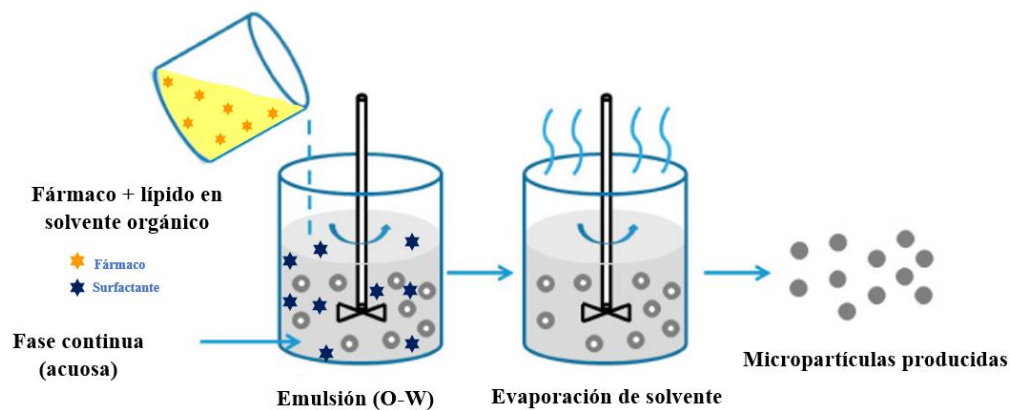


Figura 2. Método de emulsión- evaporación de solvente (Wang, Li, & Truong, 2016)

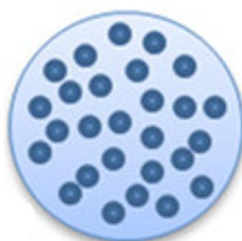


Figura 3. Micro cápsula del tipo matriz (Campos et al., 2013)

3.7. Factores que afectan al proceso de micro encapsulación

La eficiencia de encapsulación en micropartículas se ve afectada por distintos parámetros, estos son:

- Concentración: de lípido, surfactante y fármaco.
- Solubilidad: del fármaco en el lípido, fármaco en fase continua y del solvente orgánico en agua.
- Relación fase orgánica- fase acuosa.
- Agitación.

- Temperatura.

Se debe analizar cada uno de estos parámetros con el fin de ver su efecto en el proceso de micro encapsulación. Primero, tanto la concentración de lípido como de fármaco afectan directamente al tamaño de partícula, al incrementar su concentración se obtiene un tamaño de partícula mayor (Mäder & Mehnert, 2001). De la misma manera, la concentración de surfactante en la solución puede afectar a la estabilidad de la solución, incrementar la cantidad de micropartículas y a su vez reducir su tamaño promedio (Rosa, Iommelli, La Rotonda, Miro, & Quaglia, 2000). Es importante mencionar que la cristalización es un factor que se relaciona directamente con la eficiencia de micro encapsulación. Jyothi y colaboradores confirman que al incrementar la concentración de surfactante y decrecer la concentración de lípido, el proceso de cristalización se ve afectado (Jyothi et al., 2010). Esto resulta en un proceso de solidificación lento, y por ende una eficiencia de encapsulación baja (Dubey, Shami, & Bhasker Rao, 2009; zur Mühlen, Schwarz, & Mehnert, 1998).

Por otro lado, la solubilidad del fármaco en el lípido es un parámetro que se relaciona directamente con la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación (Mäder & Mehnert, 2001). Igualmente, la solubilidad del fármaco en la fase continua de la solución debe ser baja con respecto a la de la fase de dispersión con el objetivo de evitar pérdidas de material por difusión (Jyothi et al., 2010). Finalmente, la solubilidad del solvente orgánico en agua se relaciona con la eficiencia de encapsulación. Al tener mayor solubilidad la transferencia de masa entre la fase de dispersión y la fase continua es más rápida lo que resulta en una rápida precipitación del polímero, incrementando así su eficiencia de encapsulación (Yeo & Park, 2004).

La relación entre la fase orgánica y la fase acuosa es un parámetro de importancia ya que afecta al tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación y al proceso de cristalización. Jyiothi y colaboradores sugieren que al incrementar el volumen de la fase acuosa el tamaño de partícula incrementa al igual que la eficiencia (Jyothi et al., 2010). Es importante el lograr una relación adecuada entre la fase orgánica y la fase acuosa que permita formar una solución estable. Por otro lado, la agitación es uno de los parámetros más importantes ya que Conti, Pavanetto y Genta, confirman que al incrementarla el tamaño de partícula decrece considerablemente y se logra una mejor emulsión (Conti, Pavanetto, & Genta, 1992; S. Das et al., 2011; Park et al., 2005). Finalmente, la temperatura es un parámetro que puede afectar tanto a la estabilidad de las micropartículas al almacenarlas como a la acción terapéutica del fármaco, toxicidad, biodisponibilidad y morfología de las mismas (Tița, Fuliș, Bandur, Rusu, & Tița, 2010). Se concluye que cada una de las variables, la concentración de lípido, fármaco, surfactante y la relación entre la fase acuosa y la fase orgánica están relacionadas entre sí. La cristalización, tamaño de partícula, estabilidad y liberación del fármaco son factores que están relacionados con cada una de las variables.

3.8. Materiales utilizados para la elaboración de micropartículas

Para la elaboración de micropartículas por el método de emulsión- evaporación de solvente se utiliza manteca de cacao como lípido, acetato de etilo como solvente orgánico, *Tween80* como surfactante, e ibuprofeno como fármaco modelo. Cada uno de los materiales se explican en detalle a continuación.

3.8.1. Manteca de Cacao.

Como ya se ha mencionado antes, se escoge a la manteca de cacao como material de recubrimiento para el proceso de micro encapsulación debido a su disponibilidad como materia prima y por ser un lípido de alta calidad con propiedades de interés. La manteca de cacao es el ingrediente más importante para la elaboración del chocolate y es una grasa polimorfa extraída de la semilla del cacao. El proceso de elaboración de la manteca de cacao es bastante sencillo. Éste consiste en la recolección de los granos los cuales se encuentran en la pulpa de la fruta, se los limpia y se los fermenta. A continuación, se realiza un secado, se tuestan y se trituran los granos (Codini, Díaz, Ghirardi, & Villavicencio, 2004). Finalmente, se muelen los trozos de cacao triturado para crear el licor de cacao de donde será extraída la manteca (Codini, Díaz, Ghirardi, & Villavicencio, 2004). La composición de la manteca de cacao se observa en la Tabla 1. La composición aproximada de los ácidos grasos en la manteca de cacao es de 24.4% palmítico (Figura 4), 35.4% esteárico (Figura 5), 38.1% de ácido oleico (Figura 6), y su punto de fusión es de 34°C (Lema, 2013).

Tabla 1. Composición de la manteca de cacao (Codini, Díaz, Ghirardi, & Villavicencio, 2004)

Composición	Porcentaje [%]
Triglicéridos	98
Ácidos grasos libres	1
Diglicéridos	0.3-0.5
Monoglicéridos	0.1

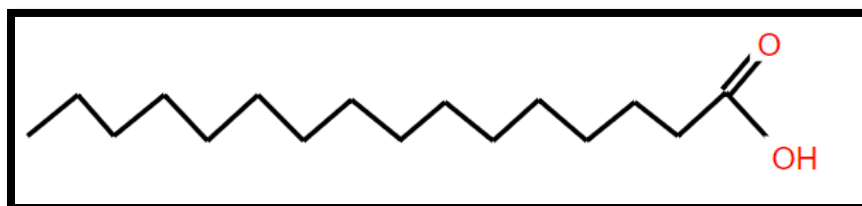


Figura 4. Estructura del ácido palmítico

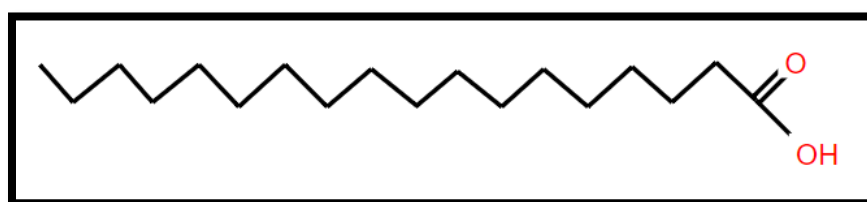


Figura 5. Estructura del ácido esteárico

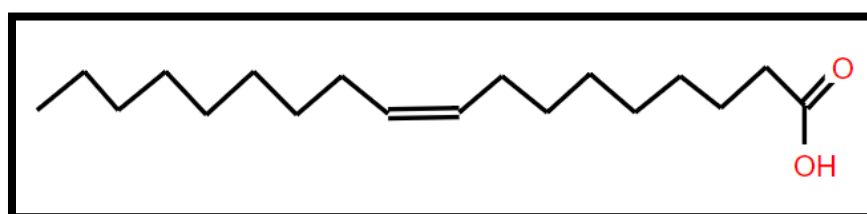


Figura 6. Estructura del ácido oleico

3.8.2. Surfactante

El surfactante utilizado en este estudio es Tween 80 o también conocido como Polisorbato 80, Este surfactante y emulsificante no iónico es generalmente utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica. Es importante mencionar que se lo utiliza usualmente para la dispersión de micropartículas hidrofóbicas en soluciones acuosas. Es un líquido de color amarillo soluble en agua, altamente viscoso y con una densidad de 1.064 g/cm^3 . Su baja toxicidad, estabilidad y biocompatibilidad son algunas de las

ventajas que brinda este surfactante (Müller, Rühl, Runge, Schulze-Forster, & Mehnert, 1997)

3.8.3. Solvente orgánico

El cloruro de metileno y el acetato de etilo son solventes orgánicos comúnmente utilizados al aplicar técnicas de emulsión. El cloruro de metileno tiene varias ventajas como: capacidad de disolver grandes cantidades de polímero, baja solubilidad en agua (2.0% w/v), y un punto de ebullición conveniente para su evaporación (39.8°C) (Tao Meng, Hui Ma, Qiu, & Guo Su, 2003). A pesar de ello, una de sus mayores desventajas son sus posibles efectos cancerígenos debido a su alta toxicidad (Jonsson & Johanson, 2001). Debido a esto, se escoge al acetato de etilo como solvente orgánico al ser considerado uno de los menos tóxicos y con menor impacto ambiental (Nilsson, 2016). Este solvente se utiliza usualmente en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y cosmética. Consiste en un líquido incoloro con un olor característico frutal, altamente inflamable y volátil. Su punto de ebullición es de 76.7°C, por lo que le tomará más tiempo en evaporarse que el cloruro de metileno. La solubilidad del acetato de etilo en agua es un poco alta (8.7% w/v), lo cual resulta en una rápida solidificación de micropartículas incrementando así su eficiencia (Tao Meng et al., 2003).

3.8.4. Fármaco modelo

El ibuprofeno es un fármaco que pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y es derivado del ácido propiónico (Figura 7). Este fármaco posee acción antiinflamatoria, analgésica, antipirética y es utilizado más que el ácido acetilsalicílico (Aspirina) debido a que sus efectos gastrointestinales son menores

(Clark, Finkel, Rey, & Whalen, 2001). El ibuprofeno puede ser administrado ya sea por vía oral, donde experimenta metabolismo hepático y se excretan por el riñón, o vía intravenosa, donde se lo utiliza generalmente para cerrar conducto arterioso permeable (Clark, Finkel, Rey, & Whalen, 2001). Este fármaco actúa como inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, la cual es la encargada sintetizar prostaglandina, la responsable de sensaciones de dolor, inflamación y fiebre (Robertson, 2014). Los efectos adversos más comunes son gastrointestinales como: hemorragias, úlceras, dispepsia, perforaciones en el estómago o el intestino. Sin embargo, también existen efectos adversos sobre el sistema nervioso central como cefalea, acufenos y mareo. El fármaco modelo utilizado en este proyecto será ibuprofeno debido a que es utilizado frecuentemente por pacientes y por sus efectos secundarios, los cuales podrían ser mitigados a través de la microencapsulación. Además, existen varios estudios en cuanto a micro encapsulación y liberación controlada que permitirán validar los resultados obtenidos.

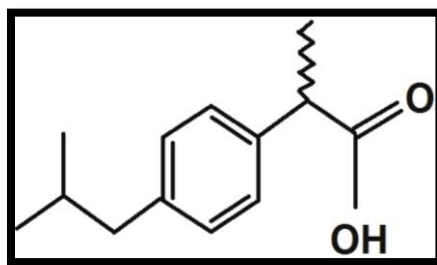


Figura 7. Molécula de ibuprofeno (Lakshmina, Maxwell, Anand, & Souza, 2017)

4. METODOLOGÍA

4.1. Procedimiento para elaboración de micropartículas

Se aplicó la técnica de emulsión-evaporación de solvente donde se elaboró una emulsión de aceite en agua (O-W). La primera solución consistió en la fase orgánica, la cual contenía el agente encapsulante (manteca de cacao); que se disolvió mediante agitación en acetato de etilo. Se prepararon soluciones al 2% w/v, 5% w/v y 10% w/v. La segunda solución consistió en la fase acuosa, la cual contenía distintas concentraciones (0.5% v/v, 1% v/v y 2v/v %) de *Tween 80* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), un emulsificante y surfactante, con el objetivo de mejorar la eficiencia de encapsulación, reducir el tamaño de las micropartículas, mejorar su estructura y uniformidad (Dinarvand, Moghadam, Sheikhi, & Atyabi, 2005). Para formar la emulsión se añadió la solución correspondiente a la fase orgánica en la solución correspondiente a la fase acuosa la cual se agitó rápidamente utilizando un Vórtex por aproximadamente 10 segundos con el fin de formar las micropartículas, de acuerdo a lo propuesto por (Becker Peres et al., 2016). Finalmente, se añadió esta mezcla a 200 mL de una solución acuosa, la cual continuó en agitación por 24 horas con el objetivo de evaporar el solvente orgánico. Luego de esto, la suspensión resultante de micropartículas se congeló y liofilizó. Las variables que se manipularon en esta etapa de experimentación fueron la temperatura, la relación fase orgánica: fase acuosa, y las concentraciones de manteca de cacao, Tween80, e ibuprofeno, las cuales se detallan en la sección 4.3.

4.2. Encapsulación del fármaco

Para la encapsulación del fármaco se utilizó el procedimiento descrito anteriormente, en el cual se empleó la técnica de emulsión- evaporación de solvente. Se prepararon las soluciones al 5% w/w de ibuprofeno con respecto a la manteca de cacao. Por ejemplo, para 1 g de manteca de cacao se añadieron 0.05g de ibuprofeno hasta que la mezcla se disolvió por completo a aproximadamente 34°C. Luego se añadieron 20 mL de acetato de etilo hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. A continuación, se añadió esta solución en la solución acuosa con surfactante y se agitó en un vórtex por 10 segundos para formar la emulsión. Se añadió esta solución a 200mL de agua y se la dejó en agitación por 24 horas. Finalmente, se tomaron 15 mL de la solución final y se añadió el contenido en varios tubos cónicos de centrifuga (Falcon) con los que posteriormente se liofilizó las micropartículas producidas. Las micropartículas liofilizadas se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su posterior caracterización y estudios de liberación.

Según los resultados se escogió la formulación de menor tamaño de partícula y mayor rendimiento para los estudios de liberación de fármaco. Perge y colaboradores realizaron micropartículas de silicón mediante un método de dispersión en caliente en el que encapsularon ibuprofeno utilizando una concentración de 5% p/p con respecto al lípido, en el que obtuvieron buenos resultados (Perge et al., 2012). Debido a esto, se prepararon micropartículas utilizando una concentración de 5% p/p al ser sugeridas previamente.

4.3. Diseño experimental y variables de importancia

4.3.1. Concentraciones y composiciones

En este estudio se analizaron cuatro variables y la influencia de estas con sus correspondientes concentraciones y composiciones como se detallan en la Tabla 2, para la fabricación de micropartículas de manteca de cacao. Cada una de las variables estudiadas se detallan a continuación.

Tabla 2. Variables estudiadas en la fabricación de micropartículas de manteca de cacao con sus respectivas concentraciones y composiciones

Variables de estudio	Concentraciones y composiciones			
Fase orgánica: fase acuosa	1:6	1:7	1:8	1:10
Manteca de cacao [% p/v] (con respecto al solvente orgánico)	2.0	5.0	10.0	-
Surfactante [%v/v]	0.5	1.0	2.0	-
Fármaco [%p/p] (con respecto a la manteca de cacao)	5.0	-	-	-

4.3.1.1. Relación fase orgánica: fase acuosa

De acuerdo a Yeo y Park (2004), la relación entre la fase orgánica y la fase acuosa debe ser la adecuada para lograr una emulsión estable y así incrementar la eficiencia de encapsulación (Yeo & Park, 2004). Por lo tanto, se analizaron las relaciones descritas en la Tabla 2. Estas relaciones fueron escogidas en base a

estudios previos de micro encapsulación con otros materiales (Becker Peres, Becker Peres, de Araujo, & Sayer, 2016), debido a que no existe información actual en cuanto a relaciones utilizadas con manteca de cacao como material encapsulante.

4.3.1.2. Concentración de manteca de cacao en la fase orgánica

Previamente se ha comprobado que al incrementar la concentración de lípido se incrementa a su vez el tamaño de partícula (Becker Peres, Becker Peres, de Araujo, & Sayer, 2016). Por esta razón se estudiaron las concentraciones descritas en la Tabla 2 con el objetivo de ver su efecto en cuanto a tamaño, rendimiento, liberación y eficiencia de encapsulación.

4.3.1.3. Concentración de Tween 80 en fase acuosa

Al igual que la relación fase orgánica: fase acuosa y la concentración del agente encapsulante, la concentración de surfactante es una variable de importancia ya que ésta afecta directamente al tamaño de partícula, estabilidad y rendimiento (Jiao & Burgess, 2003) (Becker Peres, Becker Peres, de Araujo, & Sayer, 2016). Debido a esto se prepararon distintas soluciones acuosas con las concentraciones descritas en la Tabla 2, ya que han sido sugeridas por estudios realizados previamente en los cuales se utilizó *Tween 80* como surfactante para la producción de micropartículas (Ko, Park, Hwang, Park, & Lee, 2002) . Se analizará el efecto de estas concentraciones en cuanto a tamaño, rendimiento, eficiencia y liberación.

4.3.1.4. Concentración del fármaco en el lípido

Las características tanto del fármaco como del lípido se deben analizar ya que el mismo será encapsulado en la matriz lipídica donde la solubilidad del fármaco afecta directamente a la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación (Mäder & Mehnert, 2001). Es importante mencionar que la cantidad de fármaco en el lípido afecta directamente al tamaño de partícula producido y a la eficiencia de encapsulación (Yeo & Park, 2004). Se utilizó una concentración de 5% p/p de ibuprofeno en la emulsión basado en estudios mencionados anteriormente.

4.3.2. Temperatura

La inestabilidad térmica de los fármacos es uno de los factores más importantes a considerar, ya que éste afecta directamente a la eficiencia terapéutica, toxicidad, biodisponibilidad y al proceso de obtención de tabletas (Tița et al., 2010). Es importante considerar que al trabajar con temperaturas altas la viscosidad del lípido es baja por lo que resulta en un tamaño de partícula menor. Sin embargo, altas temperaturas pueden a su vez incrementar la tasa de degradación del fármaco y del material encapsulante (Mäder & Mehnert, 2001). Las temperaturas utilizadas para la fabricación de micropartículas de manteca de cacao se detallan en la Tabla 3.

En una primera etapa se produjeron micropartículas por el método de emulsión donde se utilizó únicamente manteca de cacao líquida a 37°C en la fase orgánica y una solución de *Tween80* a 5°C, 24°C y 37°C en la fase acuosa de la emulsión. Se realizó esto con el propósito de obtener partículas sin utilizar

solvente orgánico y analizar el efecto de la temperatura de la solución correspondiente a la fase acuosa en la formación de micropartículas. Adicionalmente, se utilizó una temperatura de 24°C con la que se prepararon micropartículas mediante la técnica de emulsión- evaporación de solvente. Finalmente, se caracterizaron las micropartículas producidas a distintas temperaturas en función del tamaño, rendimiento, eficiencia y liberación del fármaco como se encuentra detallado en la sección 4.4.

Tabla 3. Temperaturas estudiadas en la fabricación de micropartículas

Solución	Temperatura [°C]
Manteca de cacao	37
Fase orgánica (manteca + acetato de etilo)	24
Fase acuosa (<i>Tween 80</i>)	5
	24
	37

4.4. Caracterización de las micropartículas

4.4.1. Tamaño

Se caracterizaron las micropartículas producidas según su tamaño, para lo cual se utilizó un microscopio LEICA DM 500 con cámara incorporada, el cual cuenta con el programa Leica Application Suite (LAS EZ) que permitió tomar fotos de las micropartículas producidas y editarlas a una magnificación de 10X y 40X. A continuación, se utilizó la aplicación ImageJ, que permitió medir las partículas

utilizando las fotos tomadas anteriormente (Anexo 8.1). Es muy importante caracterizar las micropartículas según su tamaño, ya que esto influirá en la liberación del fármaco y en su rendimiento. Es decir, a medida que aumenta la cantidad de polímero incrementará el tamaño promedio de partícula y a su vez reducirá la liberación del fármaco ya que, a medida que el tamaño de partícula es menor se tiene una mayor área de superficie disponible para la liberación del mismo (Trivedi, Verma, & Garud, 2008). Debido a esto se midió el tamaño de aproximadamente 30 micropartículas producidas con cada una de las formulaciones y se las caracterizó según su diámetro promedio.

4.4.2. Rendimiento

Se calculó el rendimiento utilizando una cámara de Neubauer o también conocida como hematocitometro. Esta consiste en una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos de aproximadamente 30 x 70 mm y 4 mm de grosor en la cual se encuentra grabada una retícula cuadrangular en la parte central (Bastidas, 2011). El procedimiento consistió en colocar un cubreobjetos en la parte superior de la cámara de Neubauer, se tomaron 10 μL de muestra con una micropipeta, se colocó la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos y se introdujo la muestra por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos desde la parte lateral. Finalmente, se contó la cantidad de micropartículas presentes en cada una de las esquinas y la parte central de la cámara de Neubauer tal como lo muestra el Anexo 8.2. Se realizó el conteo por triplicado para cada una de las muestras y se calculó su rendimiento, el cual se expresa en número de micropartículas/mL.

4.4.3. Eficiencia

Para medir la eficiencia de encapsulación se prepararon las emulsiones con las distintas concentraciones de *Tween80* y manteca de cacao mencionadas anteriormente para una relación de 1:7. Se utilizó una jeringa con la que se tomaron aproximadamente 3 mL de la solución de micropartículas con ibuprofeno y se procedió a realizar un filtrado donde se utilizó un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0.2 μm . De esta manera, el ibuprofeno que no fue encapsulado se encuentra presente en la solución que posteriormente se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 222 nm, y se calculó la cantidad de ibuprofeno sin encapsular al compararlo con la curva de calibración que se muestra en la Figura 30 en el Anexo 8.3. Al saber la cantidad exacta de ibuprofeno añadida en la solución y la encontrada en la solución filtrada se calculó la eficiencia de encapsulación para cada una de las variables estudiadas utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de Eficiencia} = \frac{(C_{IB,add} - C_{IB,sol})}{C_{IB,add}} \times 100$$

Donde: $C_{IB,add}$ corresponde a la concentración de ibuprofeno añadida a la emulsión y $C_{IB,sol}$ corresponde a la concentración de ibuprofeno en la solución filtrada

4.4.4. Liberación

Para el estudio de liberación se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS con el cual se midió la cantidad de ibuprofeno presente a una longitud de onda de 222 nm. Se realizó una curva de calibración (Anexo 8.3) utilizando soluciones de concentraciones conocidas de ibuprofeno en Buffer Fosfato Salino (PBS) a un pH

fisiológico de 7.3 (Anexo 8.4). Se estudió la liberación del fármaco para las siguientes composiciones: 5% w/v y 2% w/v de manteca de cacao, 1% y 2% *Tween80* y finalmente con una concentración de 5% w/w de fármaco con respecto al lípido. Primero se pesaron aproximadamente 2mg de micropartículas por triplicado, se las diluyó en 0.5 mL de PBS y se las colocó en una incubadora a 37°C. Luego de una hora se centrifugó la muestra por 5 minutos y se tomaron 50 µL de la solución y se la reemplazó por 50 µL de PBS. A la solución extraída, se añadieron 3mL de PBS, se agitó la muestra en un Vórtex y finalmente se midió su absorbancia en el espectrofotómetro. Se realizó el mismo procedimiento para las primeras 6 horas y a las 24 horas. Utilizando la curva de calibración y factores de disolución se calculó la cantidad de ibuprofeno liberada para cada medición, y al conocer el porcentaje de eficiencia de encapsulación se calculó el porcentaje liberado. Se realizaron curvas de liberación como porcentaje de liberación acumulativa en el tiempo

4.5. Análisis ANOVA y método de Tukey

Para todos los experimentos se utilizaron tres réplicas ($n=3$), a menos que se especifique de otra manera. Los resultados se reportaron como el promedio de las repeticiones \pm la desviación estándar. Se realizó un análisis ANOVA para los resultados en cuanto a tamaño y cantidad de micropartículas producidas para cada uno de los tratamientos. Se utilizó un valor $\alpha=0.05$ donde la hipótesis nula quiere decir que las medias calculadas no difieren significativamente para cada una de las variables estudiadas. Además, se aplicó el método de Tukey con un intervalo de confianza de 95% con el objetivo de estudiar si cada una de las medias son estadísticamente significativas entre sí. En el Anexo 8.5 se observa un ejemplo del análisis de ANOVA y Tukey.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Fabricación de micropartículas

Se estudió la factibilidad de la manteca de cacao como material encapsulante a través de técnicas de emulsión y evaporación de solvente. En un inicio se decidió trabajar con manteca de cacao líquida, luego de un paso previo de calentamiento, con el objetivo de obtener micropartículas biocompatibles libres de posibles productos tóxicos relacionados con el uso de solventes orgánicos. Al trabajar con manteca de cacao líquida se logró formar micropartículas, no obstante, se obtuvo una emulsión con algunas impurezas debido a la rápida solidificación del lípido al entrar en contacto con la fase acuosa en la emulsión tal como se muestra en la Figura 8. Al trabajar a una temperatura más alta (37°C) tanto en la fase acuosa como la fase orgánica, se logró una emulsión apreciablemente más limpia, con menos cantidad de impurezas, como se muestra en la Figura 9. Al utilizar ambas soluciones a la misma temperatura se evita que el proceso de solidificación de la manteca sea rápido y forme impurezas. Sin embargo, su replicabilidad resultó compleja debido a los parámetros de agitación los cuales deben ser ideales para lograr formar micropartículas. Al utilizar un homogenizador vórtex no es posible obtener las mismas condiciones de velocidad al agitar la emulsión, y en consecuencia no siempre se obtiene una solución de micropartículas libre de impurezas. Das y colaboradores confirman que al incrementar la velocidad de agitación no solo decrece el tamaño de partícula, sino que se logra una mejor emulsión (S. Das et al., 2011; Park et al., 2005)

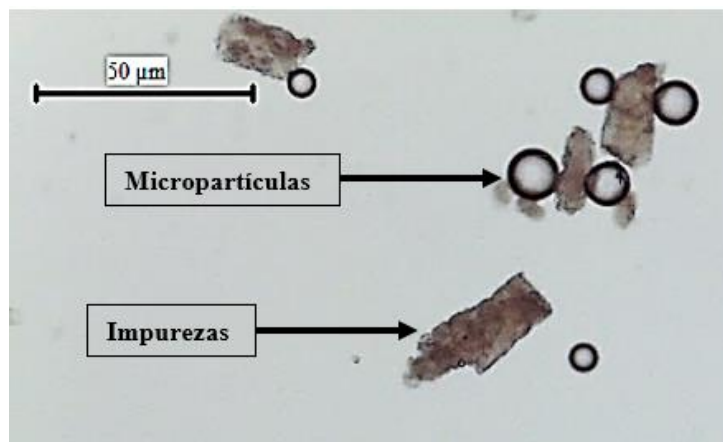


Figura 8. Micropartículas de manteca de cacao sin solvente orgánico fabricadas por el método de emulsión a 25°C, utilizando Tween80 como agente emulsificante en la fase acuosa

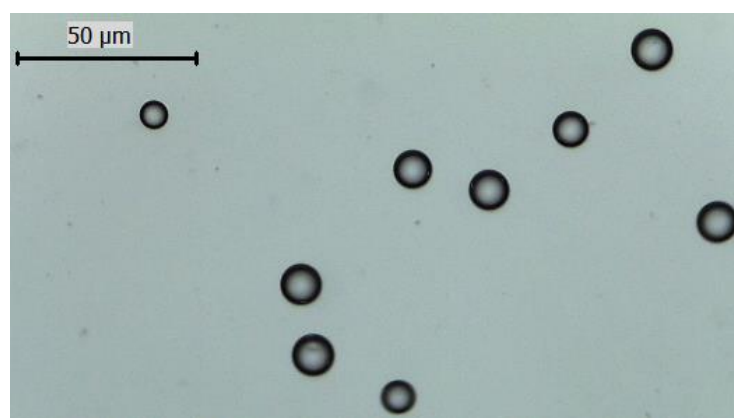


Figura 9. Micropartículas de manteca de cacao sin solvente orgánico fabricadas por el método de emulsión a 37°C utilizando Tween80 a 37°C como agente emulsificante en la fase acuosa

Con el objetivo de mejorar las propiedades físicas de la emulsión se disolvió la manteca de cacao en acetato de etilo y se aplicó la técnica de emulsión- evaporación de solvente. En la Figura 10 se observa que la emulsión mejora, es libre de impurezas y la formación de micropartículas incrementa. Los resultados muestran que el proceso de solidificación de la manteca de cacao al estar previamente disuelto en acetato de etilo es completamente distinto, por lo que se logró formar una solución sin impurezas utilizando

un homogeneizador vórtex. Debido a esto, se continuó la experimentación utilizando acetato de etilo como solvente orgánico ya que los parámetros de agitación utilizados no afectan los resultados de la emulsión como sucede al utilizar únicamente la manteca de cacao.

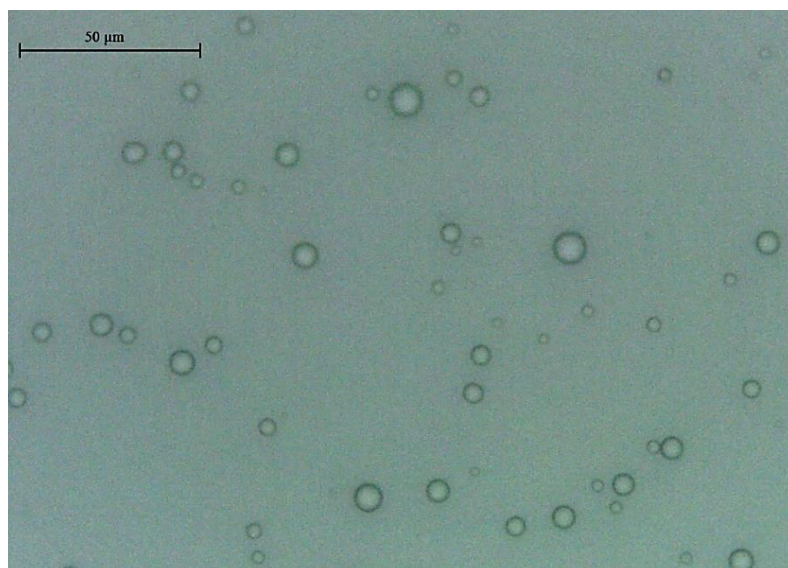


Figura 10. Micropartículas de manteca de cacao fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución de manteca de cacao previamente disuelta en acetato de etilo y utilizando Tween80 como agente emulsificante en la fase acuosa

Al fabricar las micropartículas se encontró que las mismas tienen un proceso de degradación significativa en un lapso de una semana. En la Figura 11 se observa las partículas formadas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo, una solución al 2% v/v de Tween80 en la fase acuosa y 0% ibuprofeno después de 24 horas de agitación. Al compararlo con la Figura 10, la cual fue tomada una semana después de realizar la emulsión con las mismas condiciones, se aprecia una disminución en la cantidad de partículas debido a la degradación. Una de las razones por la que se tiene una alta degradación de partículas es debido a que las mismas pueden contener

residuos tóxicos del solvente orgánico utilizado que además producen componentes tóxicos degradantes (Kim, Na, & Choi, 2005; Müller, 2000)

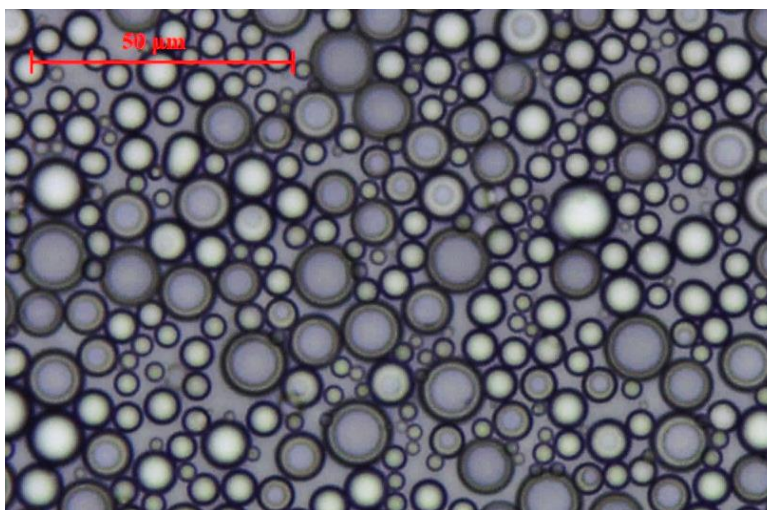


Figura 11. Micropartículas de manteca de cacao sin ibuprofeno tomadas a las 24 horas de agitación fabricadas por el método de emulsión-evaporación de solvente con una solución al 2% p/v de manteca y 2% v/v de Tween80

Al encapsular el fármaco modelo con una concentración de 5% p/p de ibuprofeno con respecto a la manteca de cacao, se comprobó nuevamente que existe la formación de micropartículas (Figura 12). Con el objetivo de controlar su degradación se congeló la solución inmediatamente después del proceso de evaporación y se la liofilizó. De acuerdo a lo propuesto por Mäder y Mehnert, la liofilización es una técnica prometedora que permite mantener la estabilidad química y física de las micropartículas (Mäder & Mehnert, 2001). En la Figura 13 se observan las micropartículas ya liofilizadas para una solución al 5% p/v de manteca de cacao, 1% v/v de Tween80 y 5% p/p de ibuprofeno.

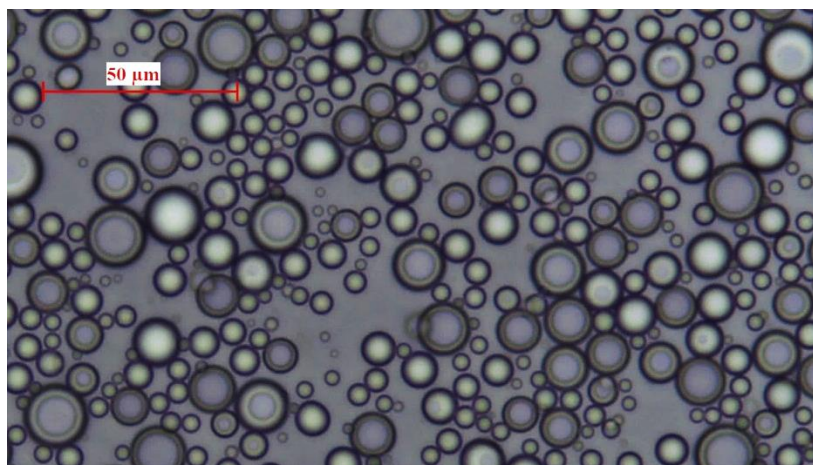


Figura 12. Micropartículas de manteca de cacao fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente con una solución al 2% w/v de manteca, 2% v/v de Tween80 y 5% w/w de ibuprofeno tomadas a las 24 horas de fase de evaporación.



Figura 13. Liofilizado de micropartículas de manteca de cacao fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5w/v% de manteca, una solución al 1% v/v de Tween80 como agente emulsificante y 5% w/w de ibuprofeno.

5.2. Caracterización de micropartículas sin ibuprofeno

5.2.1. Tamaño

Para analizar la eficacia de cada tratamiento en cuanto a tamaño, primero se caracterizaron las micropartículas producidas sin ibuprofeno. De esa manera, se analizó la importancia de cada una de las variables para luego escoger un tratamiento con el que pudiese encapsular el fármaco modelo.

Relación fase orgánica: fase acuosa

Para el estudio de la relación entre la fase orgánica y la fase acuosa se fabricaron micropartículas donde se utilizó una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo y una solución acuosa al 0.5% v/v de *Tween80* como constantes. Los diámetros promedio resultantes a distintas relaciones fase orgánica- fase acuosa se muestran en la Figura 14. Se observa que a medida que la fase acuosa incrementa, el tamaño de partícula tiende a decrecer, lo cual se debe al aumento de volumen de surfactante en la emulsión.

Sin embargo, el análisis ANOVA mostró que no existe significancia alguna ya que se obtiene un valor P de 0.304 (Anexo 8.5.1). Además, se realizó un diagrama de Tukey con el cual se corroboró que no existe un tratamiento significativamente distinto. Es importante mencionar que Becker y colaboradores (2016) realizaron un estudio en el que se analizaron distintas relaciones fase orgánica-fase acuosa utilizando *Tween80* como agente emulsificante en la fase acuosa y ácido esteárico y Crodamol como material encapsulante. Adicionalmente, reportaron que al incrementar el volumen de la fase acuosa con *Tween80*, el tamaño de partícula decrecía (Becker Peres, Becker Peres, de Araujo, & Sayer, 2016). Al realizar una comparación con los resultados obtenidos y los reportados por Becker y colaboradores, a pesar de que no se encontró una relación fase orgánica-fase acuosa estadísticamente distinta al resto, se puede ver una tendencia a que el tamaño producido decrezca al aumentar la relación al igual que lo reportado. Debido a esto, se continúa el análisis utilizando una relación de 1:10 ya que al tener mayor cantidad

de surfactante presente en la emulsión se presume que este tendrá un mayor rendimiento en cuanto a cantidad y un menor tamaño de partícula.

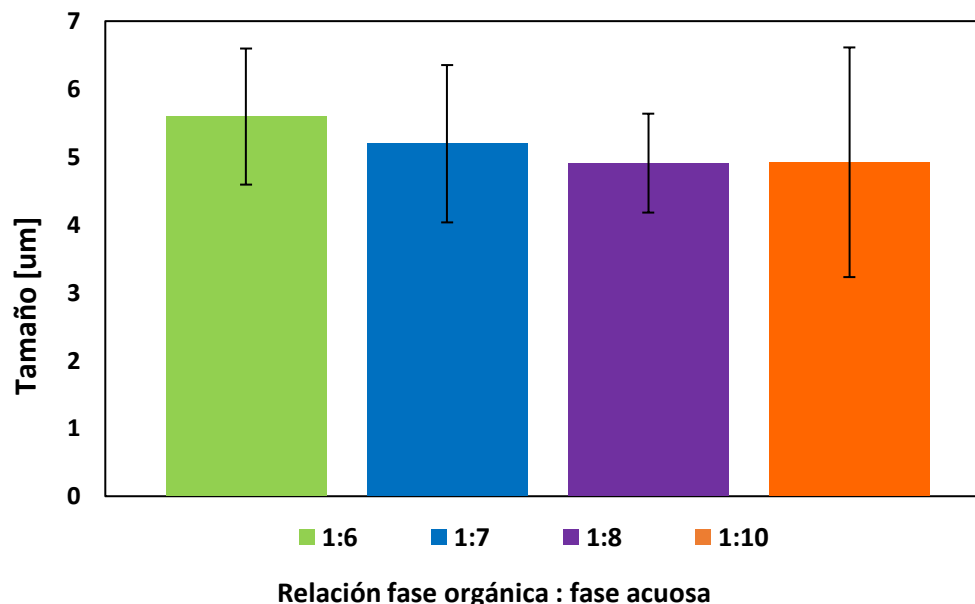


Figura 14. Efecto de distintas relaciones fase orgánica: fase acuosa en el tamaño de micropartículas fabricadas por el método de emulsión-evaporación de solvente utilizando una solución al 5% p/v de manteca de cacao y 0.5% v/v de Tween80 como constantes

Concentración de manteca de cacao

Para analizar la importancia de la concentración de manteca de cacao, se fabricaron micropartículas con una relación de 1:10 (fase orgánica: fase acuosa) y una solución acuosa al 0.5% v/v de *Tween80* como constantes. Los resultados se pueden apreciar en la Figura 15, donde se tiene una distribución normal en cuanto a tamaño de cada uno de los tratamientos. Es importante mencionar que las grandes barras de error se deben a que el tamaño de las micropartículas no es uniforme en un mismo lote de producción. Nuevamente, el análisis ANOVA no mostró significancia entre cada uno de los tratamientos, pues claramente el tamaño promedio es bastante similar (Anexo

8.5.2). Finalmente, mediante el diagrama de Tukey se comprobó que no existe significancia alguna en cuanto a la variación de concentración de manteca de cacao. Cheng y colaboradores realizaron nanopartículas a base de ácido poliláctico-glicólico para liberación controlada de fármacos anti cancerígenos donde corroboraron que al incrementar la concentración de polímero, el tamaño de partícula incrementa significativamente (Cheng et al., 2007). Mientras que, Kim, Na y Choi, reportaron que, al fabricar nanopartículas con manteca de cacao y curdlan, con concentraciones de 0.05 , 0.1, 0.25, 0.5, y 1%, el tamaño promedio de partícula no variaba significativamente (Kim et al., 2005), resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

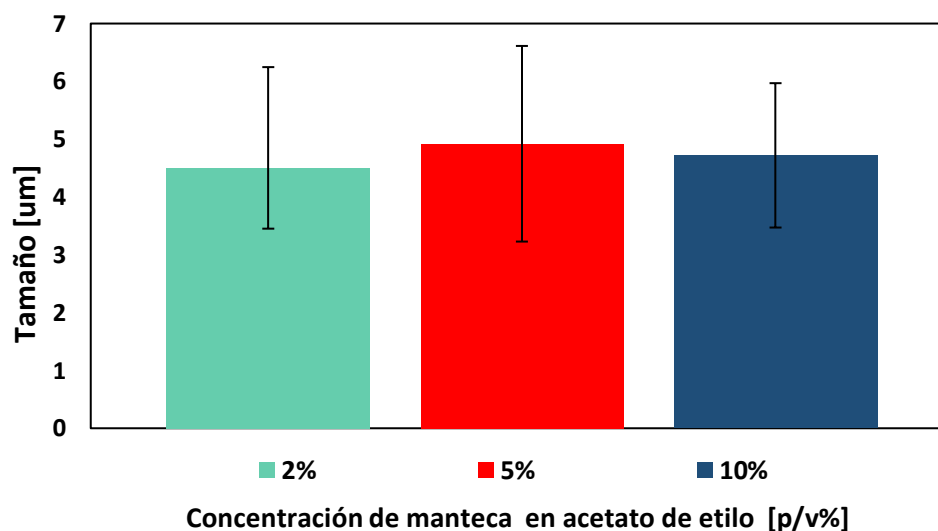


Figura 15. Efecto de la concentración de manteca de cacao en acetato de etilo sobre el tamaño de partículas fabricadas por el método de emulsión-evaporación de solvente utilizando una solución al 0.5% v/v de Tween80 y una relación de 1:10 como constantes.

Concentración de *Tween80*

Por último, se mantuvo constante una concentración de 5% p/v de manteca de cacao y una relación de 1:10 para así analizar los efectos de la concentración del surfactante en la emulsión. En la Figura 16 se observan los resultados, mostrando que al utilizar una concentración más alta de surfactante el tamaño de partícula se reduce. Al realizar un análisis ANOVA se obtuvo un valor P de 0, lo cual confirma que existe una diferencia estadísticamente significativa (Anexo 9.4.3.). Por otro lado, al analizar los resultados por el método de Tukey con un intervalo de confianza de 95%, se encontró que al fabricar micropartículas con una concentración de 2% v/v de *Tween80* se producen micropartículas significativamente más pequeñas, con un diámetro promedio de $2.63 \pm 0.77 \mu\text{m}$.

Jiao y Burgess analizaron los efectos del *Tween80* en la elaboración de emulsiones con aceite mineral como agente encapsulante. En su estudio variaron la concentración de *Tween80* a 0.1%, 1%, 5% y 10% y encontraron que concentraciones altas de este surfactante afectan directamente a la estabilidad de la emulsión (Jiao & Burgess, 2003). Debido a que en el procedimiento empleado para fabricar micropartículas de manteca de cacao se utilizó una solución de máximo 2% *Tween80*, se obtuvo una emulsión relativamente estable sustentada por la literatura. Por otro lado, Cheng y colaboradores realizaron un estudio en el que analizaron el efecto de la miscibilidad de distintos solventes orgánicos sobre el tamaño producido de partículas con ácido poliláctico-coalicólico (PLGA), donde reportaron que al utilizar un solvente orgánico con mayor miscibilidad en agua se logra producir un menor tamaño de partícula (Cheng et al., 2007). Es decir, se podría reducir aún más el tamaño de las

micropartículas de manteca de cacao al utilizar un solvente orgánico como cloruro de metileno. Becker y colaboradores también estudiaron diferentes concentraciones de *Tween80* en la producción de nanopartículas lipídicas, y encontraron que a medida que incrementa la concentración de *Tween80* decrece el tamaño de partícula y a su vez mejora su estabilización estérica (Becker Peres et al., 2016). La estabilización estérica es un mecanismo que explica el uso de distintos surfactantes capaces de inhibir la coagulación en distintas suspensiones (Hubbe, 2015) De esta manera se sustenta los resultados obtenidos que comprueban que al incrementar la concentración de *Tween80* el tamaño de partícula decrece.

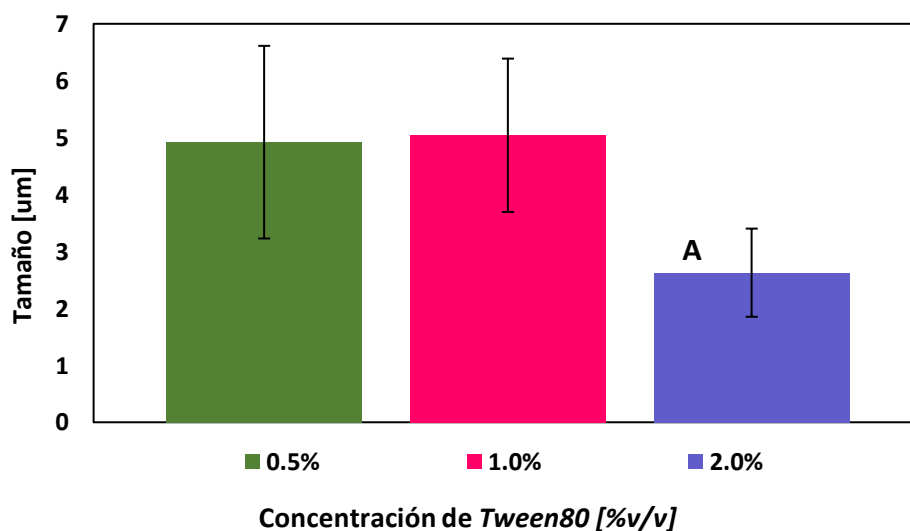


Figura 16. Efecto de la concentración de *Tween80* sobre el tamaño de micropartículas sin ibuprofeno fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo y una relación de 1:10 como constantes. Donde A muestra el menor tamaño producido ($2.63 \pm 0.77 \mu\text{m}$)

5.2.2. Rendimiento

Relación fase orgánica- fase acuosa

Se utilizó una cámara de Neubauer para calcular el rendimiento en cuanto a número de partículas por cada mililitro de solución. Al realizar cada una de las emulsiones se varió la relación fase orgánica- fase acuosa y se mantiene constante una solución al 5% w/v de manteca de cacao en acetato de etilo y una solución acuosa al 2% v/v de *Tween80*. En la Figura 17 se observa que a medida que el volumen de la solución de surfactante (fase acuosa) incrementa, el número de partículas decrece. Esto se debe a que la cantidad de manteca en la emulsión decrece a medida que la relación aumenta. Es decir, no hay suficiente cantidad de polímero disponible para la formación de micropartículas. Los resultados del análisis ANOVA muestran un valor P de 0, por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos aplicados. Al aplicar el método de Tukey se encuentra que no existe diferencia alguna entre los tratamientos con relación 1:6 y 1:7. Sin embargo; las relaciones 1:8 y 1:10 si muestran diferencias significativas. Se concluye que al utilizar una relación de 1:6 y de 1:7 el número de partículas por cada mililitro producido incrementa significativamente.

Es importante mencionar que el rendimiento generalmente es calculado en base al peso de micropartículas producidas con relación al peso del polímero utilizado. Como la cantidad de micropartículas producidas es demasiado baja (<5mg) se recurre a la cámara de Neubauer como método alternativo para calcular el rendimiento. Al analizar los resultados obtenidos, las soluciones con alto contenido de lípido

correspondientes a las relaciones 1:6 y 1:7 son las que reportan un rendimiento más alto.

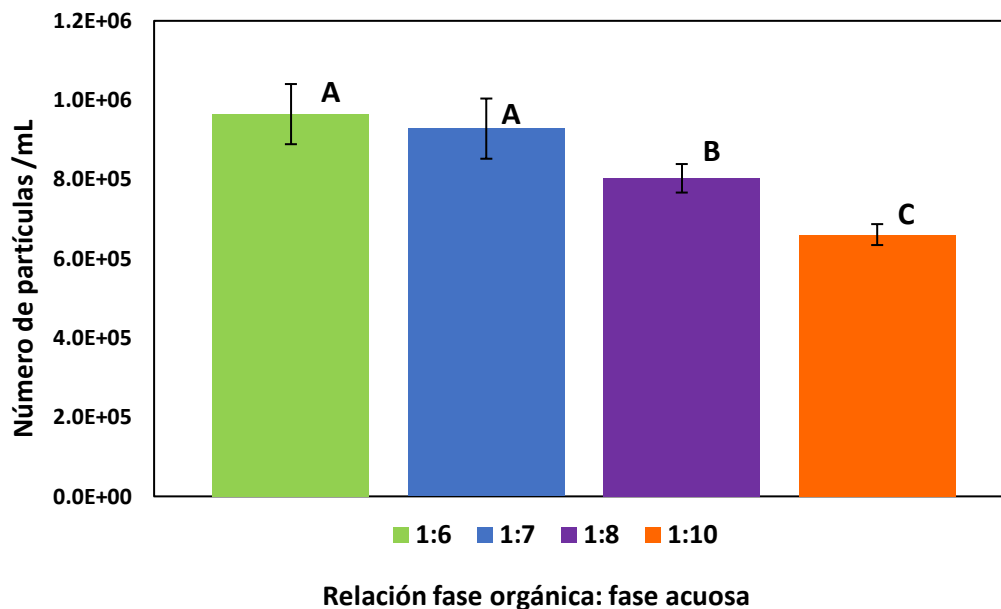


Figura 17. Efecto de la relación fase orgánica: fase acuosa en rendimiento (número de micropartículas sin ibuprofeno/mL) fabricadas por el método de emulsión- evaporación de solvente utilizando una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo y una solución al 0.5% v/v de Tween80 como constantes. Donde las mismas letras representan tratamientos estadísticamente iguales, mientras que distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$.

Concentración de manteca

A pesar de que se comprueba que al utilizar una relación fase orgánica: fase acuosa de 1:10 se obtiene menor cantidad de micropartículas, se analizó el rendimiento al variar la concentración de manteca manteniendo los otros parámetros constantes. En la Figura 18 se puede observar que con las soluciones al 2% y al 5% se obtiene mayor cantidad de partículas, mientras que con las de 10% su rendimiento decrece. Al realizar un análisis ANOVA se obtiene un valor P de 0.011, por lo que existe una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados con las distintas concentraciones de manteca de cacao. Por el método de Tukey se comprueba que la

solución al 10% de manteca de cacao resulta en un menor rendimiento, con $6.61E+05 \pm 2.64E+04$ micropartículas/mL. Es por esto que se considera que la solución al 10% no es la ideal para la formación de micropartículas en cuanto a rendimiento. Kim, Na y Choi reportaron que a medida que la concentración de lípido incrementa el rendimiento es menor debido a que existe agregación de micropartículas en la solución, con lo que se valida los resultados obtenidos (Kim et al., 2005). Se continúa con la experimentación utilizando la solución al 2% y al 5% de manteca en acetato.

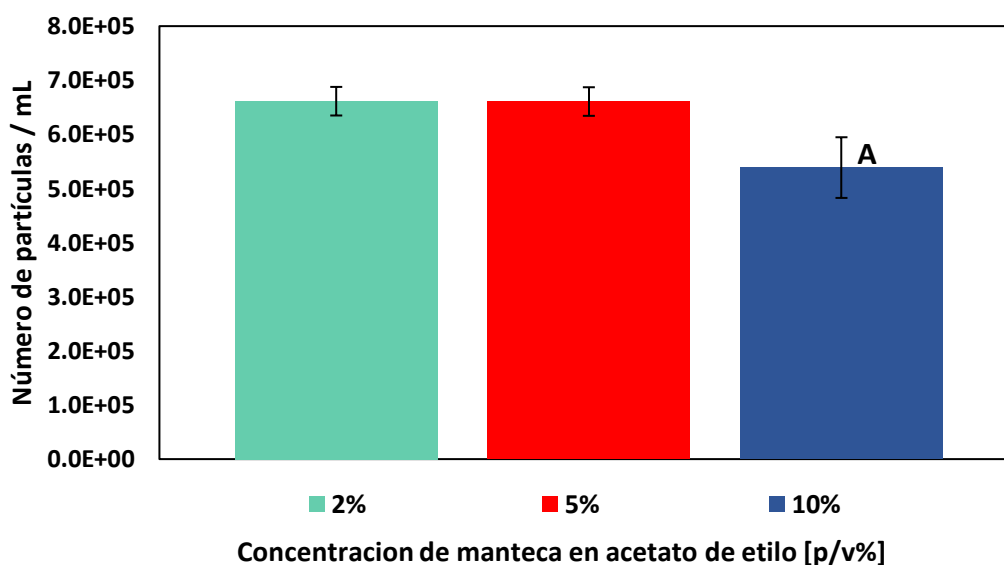


Figura 18. Efecto de la concentración de manteca de cacao sobre el rendimiento (número de micropartículas sin ibuprofeno/mL, utilizando el método de emulsión-evaporación de solvente con una solución al 0.5% v/v de Tween80 y una relación de 1:10 como constantes. Donde A representa el tratamiento con menor rendimiento.

Concentración de Tween80

Finalmente, se estudió distintas concentraciones de surfactante y su rendimiento manteniendo constante una solución al 5% p/v de manteca y una relación de 1:10. En la Figura 19 se muestran estos resultados, y se observa que no existen diferencias entre cada

una de las medias obtenidas para cada tratamiento, hecho corroborado por el análisis ANOVA que arrojó un valor P de 0.163. De igual manera, al analizar los resultados por el método de Tukey, se acepta la hipótesis nula, siendo las medias de cada tratamiento muy parecidas. Como ya se ha mencionado antes, la tasa de degradación puede afectar a la exactitud de los resultados. Sin embargo, es válido mencionar que la replicabilidad de la emulsión con una relación 1:10 es sumamente complicada debido a los parámetros de agitación, y al tener un volumen bajo de manteca de cacao en la emulsión, el número de partículas producidas es menor. Por lo tanto, se continuó la experimentación con una relación de 1:7 y una concentración al 2% y 5% de manteca de cacao en la emulsión.

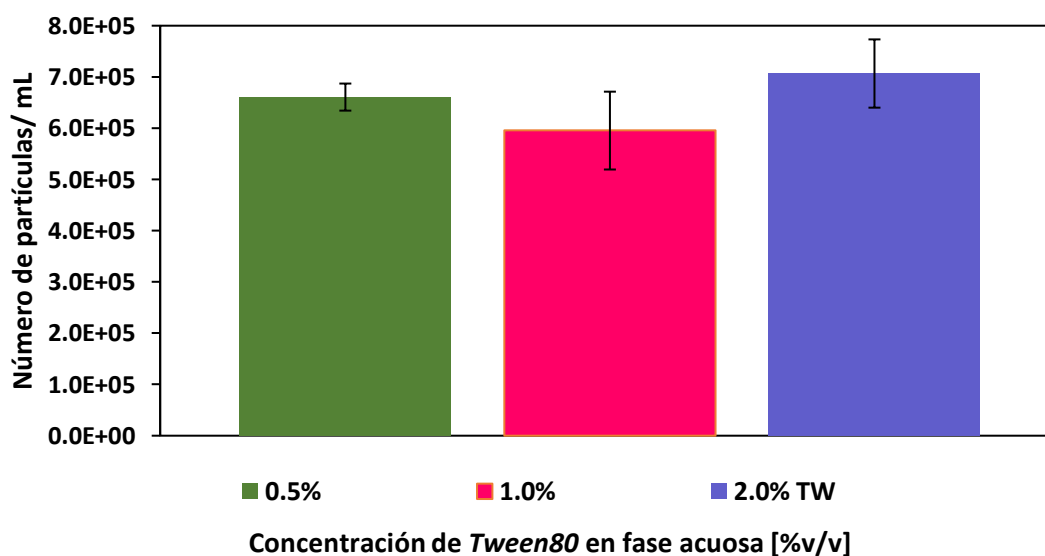


Figura 19. Efecto de la concentración de Tween80 sobre el rendimiento (número de micropartículas sin ibuprofeno/mL), utilizando el método de emulsión-evaporación de solvente con una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo y una relación de 1:10 como constantes.

5.3. Caracterización de micropartículas con ibuprofeno

5.3.1. Tamaño

Micropartículas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo

A continuación, se utilizó la relación fase orgánica- fase acuosa de 1:7 debido a los resultados obtenidos anteriormente en cuanto a rendimiento y replicabilidad de la emulsión con relación 1:10. Se caracterizó nuevamente las micropartículas sin ibuprofeno según su tamaño y se las comparó con micropartículas que ya contienen el fármaco modelo. En la Figura 20 se muestran los resultados en cuanto a tamaño para las distintas partículas fabricadas con una solución al 2% p/v de manteca, se observa claramente que el tamaño de partícula incrementa al encapsular el fármaco (ibuprofeno). Al realizar un análisis ANOVA en cuanto a tamaño de partícula sin fármaco se obtuvo un valor P de 0.01, por lo que existe una diferencia significativa a medida que se aumenta la concentración de surfactante. Se relaciona cada una de las medias utilizando el método de Tukey para encontrar las diferencias que existen entre cada uno de los tratamientos. Los resultados mostraron que solo existe una diferencia significativa entre partículas fabricadas con una solución al 2% v/v y al 0.5% v/v de *Tween80*, más no entre 2% y 1%, y, 0.5% y 1%. Es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa para tamaño entre las micropartículas fabricadas con 0.5% y 2% *Tween80* donde el tamaño promedio producido más alto fue de $(4.94 \pm 1.30 \mu\text{m})$ y el más pequeño de $(3.42 \pm 2.0 \mu\text{m})$ (Figura 20).

El análisis ANOVA para micropartículas con ibuprofeno resultó en un valor p de 0. A diferencia de las micropartículas sin ibuprofeno, al analizar el tamaño producido

con el método de Tukey se encontró que el tratamiento con una solución al 2% v/v de *Tween80* es significativamente menor al resto. Es importante recalcar que tanto en partículas con como sin ibuprofeno se obtiene un menor tamaño de partícula al utilizar una solución acuosa de *Tween80* al 2%, confirmando nuevamente que la concentración de surfactante se relaciona directamente con el tamaño de partícula. El promedio más alto producido con una solución al 2% w/v de manteca de cacao en acetato de etilo y 5% de ibuprofeno fue de $(7.49 \pm 2.04) \mu\text{m}$ y el menor de $(4.74 \pm 1.93) \mu\text{m}$.

Por último, al analizar los tamaños de partícula promedio para tratamientos con y sin ibuprofeno se obtuvo un valor P de 0 para el análisis ANOVA. Además, el método de Tukey confirmó que existe una diferencia estadísticamente significativa, el tamaño de partícula incrementa al encapsular el fármaco. La solución al 0.5% v/v de *Tween80* sin ibuprofeno tiene un tamaño menor que la solución al 0.5% v/v de *Tween80* con ibuprofeno, lo mismo para las soluciones al 1% y al 2%.

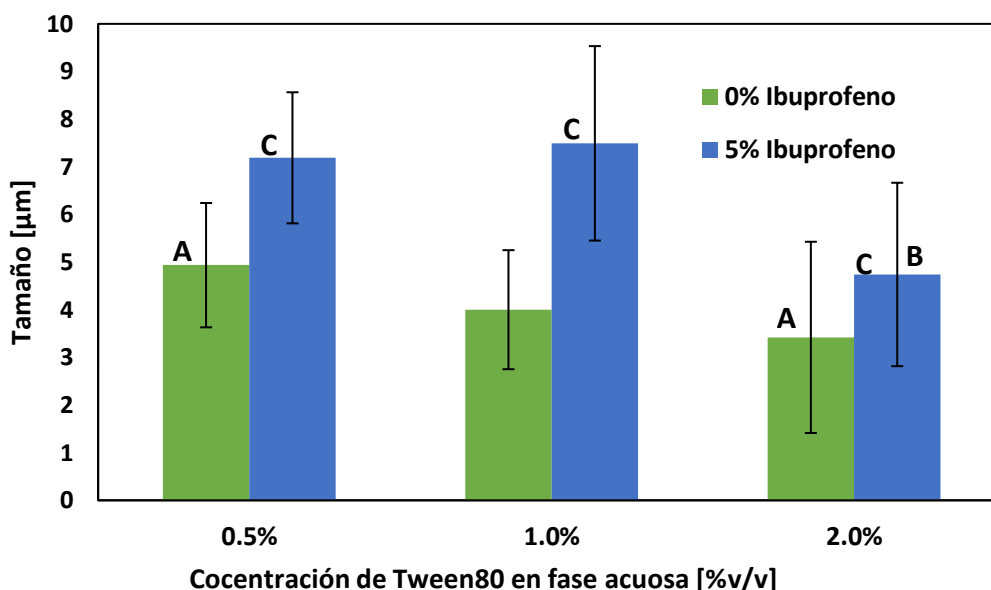


Figura 20. Efecto de concentración de Tween80 en tamaño para micropartículas de manteca de cacao fabricadas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo con y sin ibuprofeno. A muestra tratamientos sin ibuprofeno con diferencias significativas, B significa el tratamiento con ibuprofeno con un tamaño de partícula significativamente menor, C tratamientos iguales.

Micropartículas con una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo

En la Figura 21 se encuentran los resultados con respecto a tamaño para las distintas formulaciones utilizando una solución al 5% p/v manteca de cacao en acetato de etilo y una relación de 1:7. Nuevamente, se comparó tamaño de partícula con y sin ibuprofeno, donde prácticamente se obtuvo la misma tendencia que con la solución de manteca de cacao al 2% p/v. Visualmente el tamaño de partícula incrementa al encapsular el fármaco y a su vez decrece a medida que la concentración de surfactante aumenta. Al realizar el análisis ANOVA para micropartículas al 5% manteca de cacao sin ibuprofeno, se obtiene un valor P de 0.077. A diferencia de las

micropartículas al 2% manteca sin ibuprofeno, se encuentra que para 5% manteca no existe diferencias significativas en cuanto a tamaño. Donde, el tamaño de partícula promedio más alto fue de $(5.19 \pm 1.16) \mu\text{m}$ y el más menor de $(4.66 \pm 1.22) \mu\text{m}$.

Por otro lado, para partículas con ibuprofeno se obtiene un valor P de 0, donde al analizar los datos por el método de Tukey se encuentra que el tratamiento con una solución al 2% de *Tween80* es estadísticamente significativo al resto de tratamientos. Para ambas concentraciones de manteca (2% y 5%) el tamaño se reduce significativamente al utilizar un tratamiento de 2% *Tween80*.

Finalmente, se analizó si existe una diferencia significativa entre el tamaño de partícula de soluciones con y sin ibuprofeno. Se obtiene un valor P de 0 para el análisis ANOVA, y al utilizar el método de Tukey se observó que existe diferencias significativas para los tratamientos de 0.5% y 1% *Tween80* con y sin ibuprofeno. Sin embargo, al analizar la relación entre el tamaño promedio para tratamientos con 2% *Tween80* no se encuentra diferencias significativas en cuanto a tamaño con y sin ibuprofeno. El tamaño de partícula promedio más alto producido con una solución al 5w/v % de manteca de cacao en acetato de etilo y 5% de ibuprofeno fue de $(7.67 \pm 1.78) \mu\text{m}$ y el más pequeño de $(5.24 \pm 2.08) \mu\text{m}$.

Según estudios realizados por Yeo y Park, la cantidad de fármaco disuelta en el lípido afecta directamente al tamaño de partícula producido y a la eficiencia de encapsulación, lo cual se confirma con los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones (Yeo & Park, 2004). Para micropartículas fabricadas con una solución al 2% w/v y al 5% w/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo el tamaño de partícula incrementa significativamente al encapsular el fármaco modelo. Perge y

colaboradores utilizaron un método de dispersión en caliente para preparar micropartículas a base silicón y *Aerosil200* en el que encapsularon ibuprofeno al 5% w/v, y reportaron, de igual manera, que al encapsular el fármaco el tamaño de partícula incrementa (Perge et al., 2012). Es importante mencionar que las características tanto del fármaco como del lípido se deben analizar ya que el mismo será encapsulado en la matriz lipídica donde la solubilidad del fármaco afecta directamente a la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación (Mäder & Mehnert, 2001). En base a los resultados obtenidos se podría decir que el ibuprofeno es altamente soluble en manteca de cacao, lo cual resulta en un incremento en tamaño de partícula. Además, es válido mencionar que el ibuprofeno es casi insoluble en acetato de etilo por lo que estará completamente disuelto en la manteca de cacao.

Bolourtchian, Karimi y Aboofazeli encapsularon ibuprofeno con Eudraigit RS utilizando alcohol polivinílico (PVA) como emulsificante y cloroformo como solvente. Sus resultados mostraron que al incrementar la concentración de emulsificante (PVA) el tamaño de partícula decrece (Bolourtchian, Karimi, & Aboofazeli, 2005).

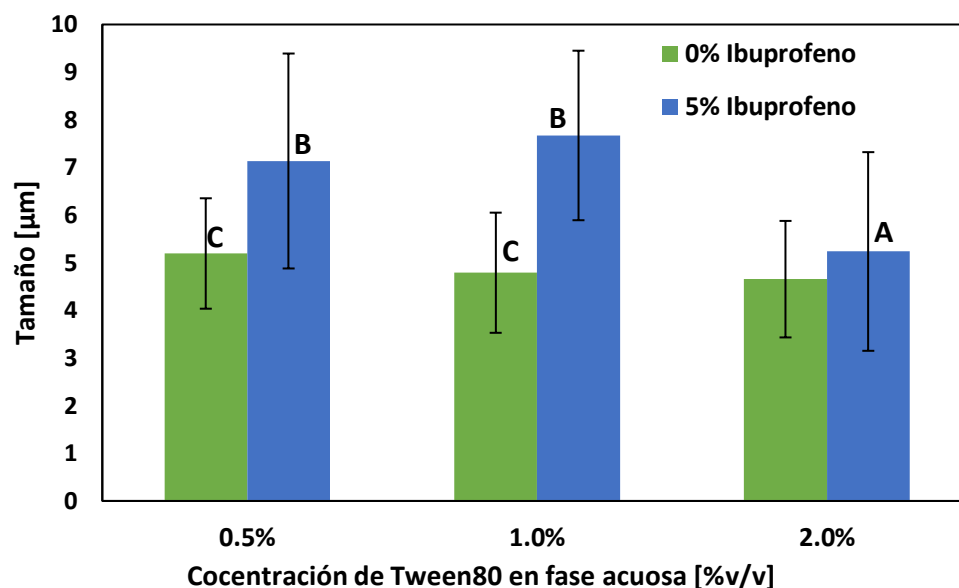


Figura 21. Efecto de concentración de Tween80 en tamaño para micropartículas de manteca de cacao fabricadas con una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo con y sin ibuprofeno. Donde A muestra una diferencia significativamente menor para tratamientos con ibuprofeno, B y C muestran a una diferencia significativa en cuanto a tratamientos con y sin ibuprofeno.

5.3.2. Rendimiento

Micropartículas con una solución al 2% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo

De la misma manera, se caracterizaron las partículas producidas con una relación fase orgánica: fase acuosa de 1:7 según su rendimiento. Esta vez se analizó el rendimiento con una solución de micropartículas recién hecha para evitar errores debido a la tasa de degradación. En la Figura 22 se observa los resultados para una solución al 2% w/v de manteca de cacao con y sin ibuprofeno. Primero se realizó un análisis ANOVA para el rendimiento de micropartículas sin ibuprofeno donde se encuentra una diferencia estadísticamente significativa con un valor P de 0.037. Mediante el método de Tukey se concluye que solo existe una diferencia significativa

entre el tratamiento con 0.5% y 2%, siendo el de 2% *Tween80* el que más micropartículas produce. Al realizar el mismo análisis estadístico para las micropartículas con ibuprofeno se encuentra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de 1% y 2%, pero sí con el tratamiento de 0.5% *Tween80* siendo este el que menos micropartículas produce. Mediante un último análisis se analiza el número de partículas producidas con ibuprofeno y sin ibuprofeno para 0.5%, 1% y 2% *Tween80*, donde no existe diferencias significativas con un valor P de 0.105. Es decir, el número de partículas producido con y sin ibuprofeno para un mismo porcentaje de surfactante no es significativo. La mayor cantidad de partículas son producidas con los tratamientos de 1% y 2% *Tween80*.

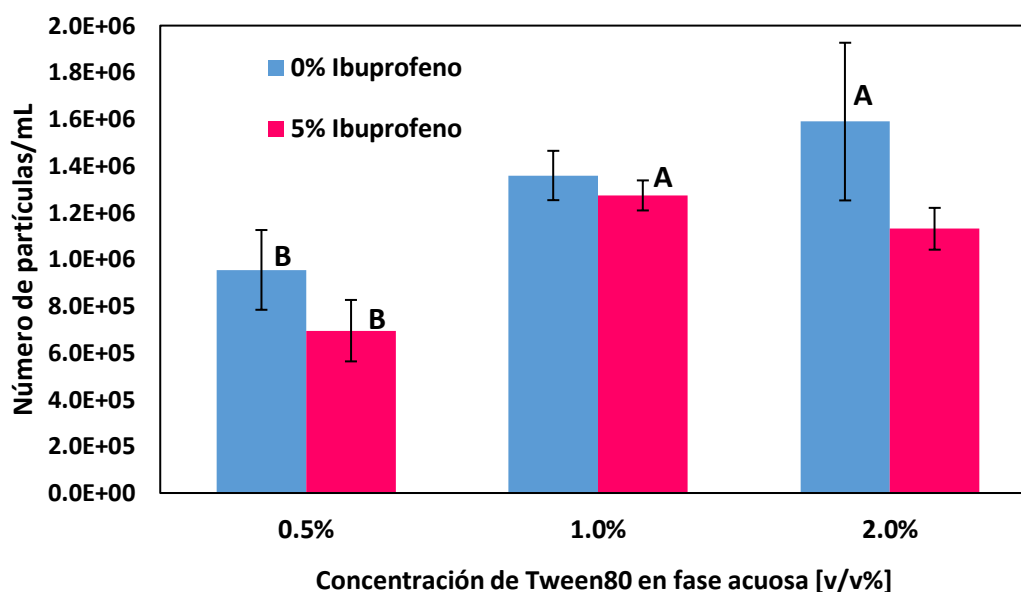


Figura 22. Efecto de concentración de *Tween80* en rendimiento (número de micropartículas/mL) para una solución al 2% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo, una relación de 1:7, sin y con ibuprofeno. Donde A corresponde al tratamiento con más producción de micropartículas para soluciones con y sin ibuprofeno y B al tratamiento con menor producción de partículas para soluciones con y sin ibuprofeno.

Micropartículas con una solución al 5% p/v de manteca de cacao en acetato de etilo

Se aplicó el mismo procedimiento de análisis para micropartículas producidas con una solución al 5% p/v de manteca en acetato, con y sin ibuprofeno. Para las partículas sin ibuprofeno se obtiene un valor P de 0.003, por lo que existen valores significativos. Mediante el método de Tukey se encuentra que el tratamiento con 1% *Tween80* es significativamente más alto que el resto. Mientras que al realizar el análisis ANOVA para micropartículas con ibuprofeno se obtiene un valor P de 0.001 y por el método de Tukey se obtiene que cada uno de los tratamientos es estadísticamente distinto. De todas maneras, al igual que con micropartículas sin ibuprofeno, al aplicar una concentración de 1% *Tween80* se obtiene una mayor producción de micropartículas. Al comparar la producción de partículas, con y sin ibuprofeno, para una misma concentración de *Tween80* se confirma que no existe diferencia significativa mediante el método de Tukey.

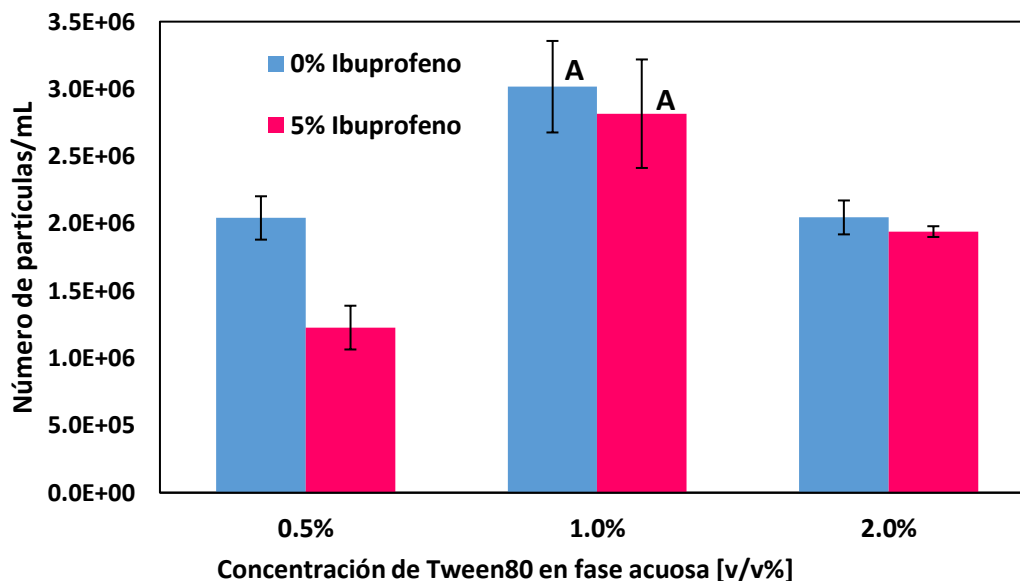


Figura 23. Efecto de concentración de Tween80 en rendimiento (número de micropartículas/mL) para una solución al 5% p/v de manteca de cacao disuelta en acetato de etilo, una relación de 1:7, sin y con ibuprofeno. Donde A muestra la mayor cantidad de partículas producidas para soluciones con y sin ibuprofeno.

Al evaluar la cantidad de micropartículas producidas con una solución al 2% w/w (Figura 22) y al 5% w/w (Figura 23) de manteca la producción de partículas es considerablemente mayor para la solución de 5% manteca. Al comparar los resultados con la literatura se encuentra que existe una relación en la concentración de lípido utilizado y la concentración de surfactante como lo reporta Becker y colaboradores (Becker Peres et al., 2016). Al tener una mayor cantidad de lípido presente en la emulsión se espera que se formen más micropartículas y por ende el rendimiento será mayor. De la misma manera al incrementar la concentración de surfactante, el tamaño de partícula se reduce por lo que se observa una tendencia a mayor producción de micropartículas. La interacción entre fármaco y lípido juega un papel importante en cuanto a rendimiento ya que claramente es menor, pues como ya se ha comprobado

anteriormente el tamaño de partícula incrementa. Debido a que se obtiene la menor cantidad de partículas al utilizar una solución de 0.5% *Tween80* en ambas concentraciones se realiza el estudio de liberación del fármaco modelo a partir del 1% *Tween80*.

5.3.3. Eficiencia de encapsulación

Con el objetivo de estudiar la capacidad de encapsulación de la manteca de cacao se determinó la eficiencia para las diferentes concentraciones de manteca y *Tween80* en una relación de 1:7. Se midió la absorbancia por triplicado para cada muestra donde se obtiene los resultados que se muestran en la Tabla 4. La manteca de cacao es un material prometedor para la encapsulación, ya que al observar los resultados en cuanto a eficiencia esta es notablemente alta. Al incrementar las concentraciones de manteca, la eficiencia de encapsulación aumentó ligeramente, mientras que al aumentar la concentración de surfactante ocurre lo contrario. Al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Perge, se encontró que en ambos procedimientos se alcanzó eficiencias de encapsulación sumamente altas. Por un lado, Perge reporta una eficiencia de 100% mientras que con la manteca de cacao se obtuvo eficiencias desde $(97.42 \pm 0.03)\%$ hasta $(99.22 \pm 0.15)\%$ (Perge et al., 2012). Es importante mencionar que el ibuprofeno tiene limitada solubilidad en acetato de etilo, por lo que todo el ibuprofeno estará disuelto en la manteca de cacao (Enciso, 2013). Una de las razones por la que se alcanzó una alta eficiencia al utilizar manteca de cacao es justamente porque existe gran solubilidad del fármaco en la misma.

Tabla 4. Eficiencia de encapsulación para soluciones al 5% ibuprofeno

	Tween80 [% v/v]	Eficiencia [%]
5% p/v Manteca	2	98.75± 0.02
	1	99.22± 0.15
	0.5	99.81 ± 0.08
2% p/v Manteca	2	97.42± 0.03
	1	98.12± 0.07
	0.5	98.18 ± 0.05

5.3.4. Liberación

Debido a que la cantidad de micropartículas producidas con una solución al 2% v/v de *Tween80* es menor, se estudió la liberación del fármaco para soluciones al 1% y 2%. En la Figura 24 se observa que la liberación para un 2% de *Tween80* y 2% de manteca alcanza un porcentaje de aproximadamente 55.18%. Es importante mencionar que durante la primera hora se liberó aproximadamente el 40% del fármaco. Al compararlo con la liberación al 5% manteca (Figura 25), prácticamente se obtuvo los mismos resultados ya que se alcanzó una liberación del 55.12%. Es decir, la cantidad de ibuprofeno liberado no se ve afectada por la cantidad de manteca de cacao lo cual se comprobó mediante un análisis ANOVA donde se obtuvo un valor $P > 0.05$.

Por otro lado, en la Figura 26 se muestran los resultados para la liberación de 2% manteca y 1% *Tween80*, donde se alcanzó una liberación del 51.72%. En cambio, para micropartículas fabricadas con 5% manteca, se alcanzó una liberación del 53.47%. Al igual que las micropartículas al 2% *Tween80*, se libera aproximadamente el 40% del fármaco en la primera hora.

Al trabajar con una solución al 2%, se alcanzó un porcentaje de liberación ligeramente más alto que al trabajar con una solución al 1%. Esto se debe a que a medida que el tamaño de partícula es menor, como en el caso de las micropartículas producidas con una solución de *Tween80* al 2%, la liberación del fármaco es mayor. Pues según lo reportado por Trivedi y colaboradores, a medida que el tamaño de partícula es menor se tiene una mayor área de superficie disponible para la liberación del fármaco (Trivedi et al., 2008).

Al comparar nuevamente los resultados obtenidos con los reportados por Perge y colaboradores, en los que se realizó la liberación de micropartículas de ibuprofeno utilizando PBS a un pH de 7.4, se encontró que en ambos procedimientos se tuvo una liberación alta de fármaco en la primera hora (Perge et al., 2012). Sin embargo, lograron controlar la liberación del fármaco al incorporar Aerosil200 tanto en la fase orgánica como en la fase acuosa (Perge et al., 2012). Al igual que lo reportado, se podría mejorar la liberación del fármaco encapsulado en manteca de cacao utilizando una combinación tanto de polímeros como de surfactantes que mejoren las propiedades físicas de las micropartículas. Por otro lado, Bolourtchian, Karimi y Aboofazeli reportan que la alta liberación en la primera hora se relaciona directamente con la cantidad de fármaco disuelto en el polímero, donde es posible que las partículas del fármaco se depositen en la superficie de la partícula sin ser encapsuladas causando que exista una liberación sumamente alta en la primera hora (Bolourtchian et al., 2005)

A pesar de que se obtuvo una eficiencia de encapsulación alta, los resultados muestran una liberación de tan solo 55.18% como máximo. Una de las razones por lo

que esto sucede se puede deber a que existen importantes interacciones entre el fármaco y los ácidos presentes en la manteca de cacao (como el palmítico, esteárico y oleico) limitando así su completa liberación.

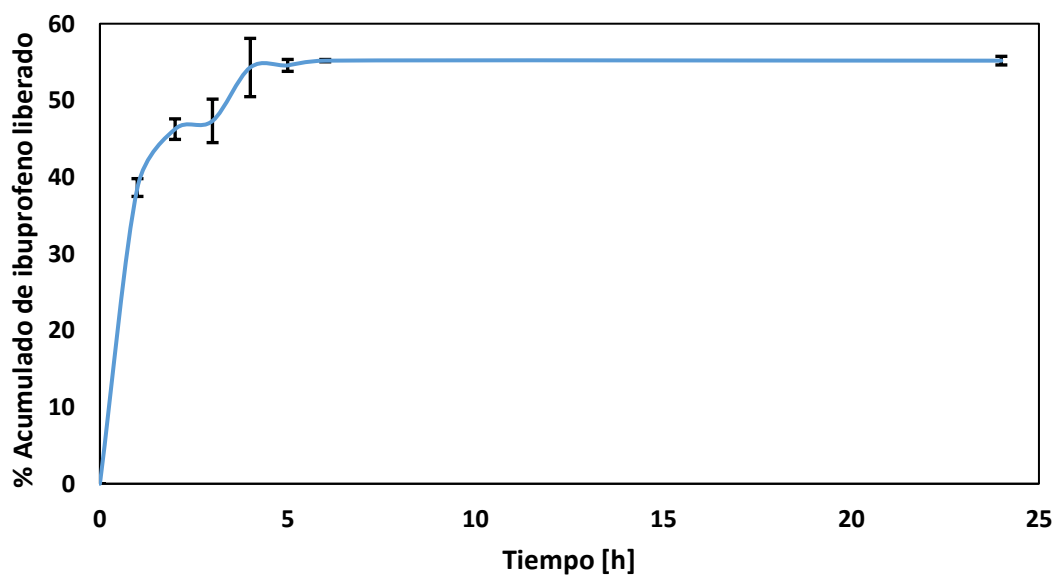


Figura 24. Curva de liberación acumulativa del ibuprofeno, para una emulsión al 2% manteca y 2% Tween80

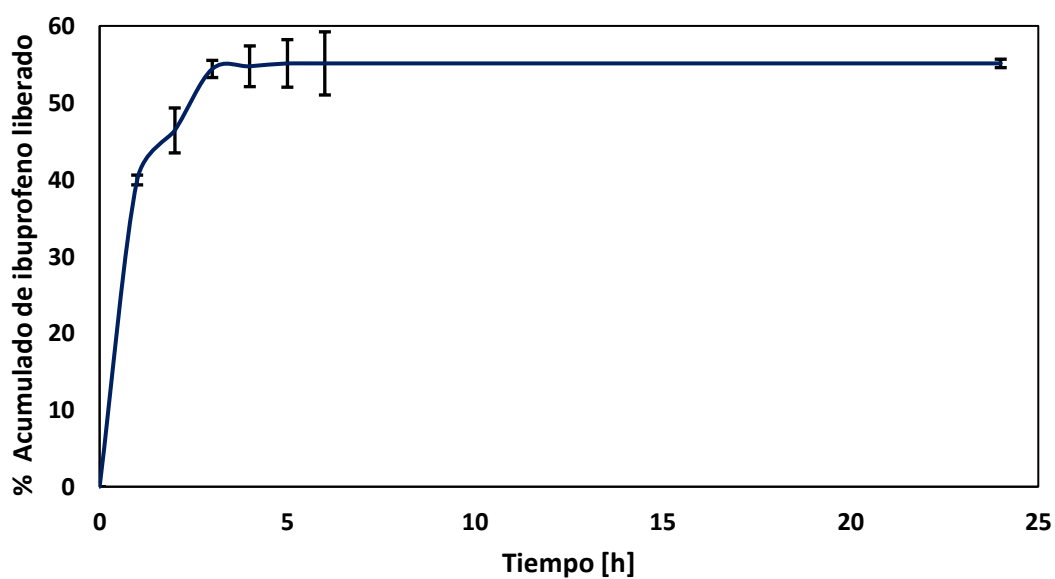


Figura 25. Curva de liberación acumulativa de ibuprofeno, para una emulsión al 5% manteca y 2% Tween80.

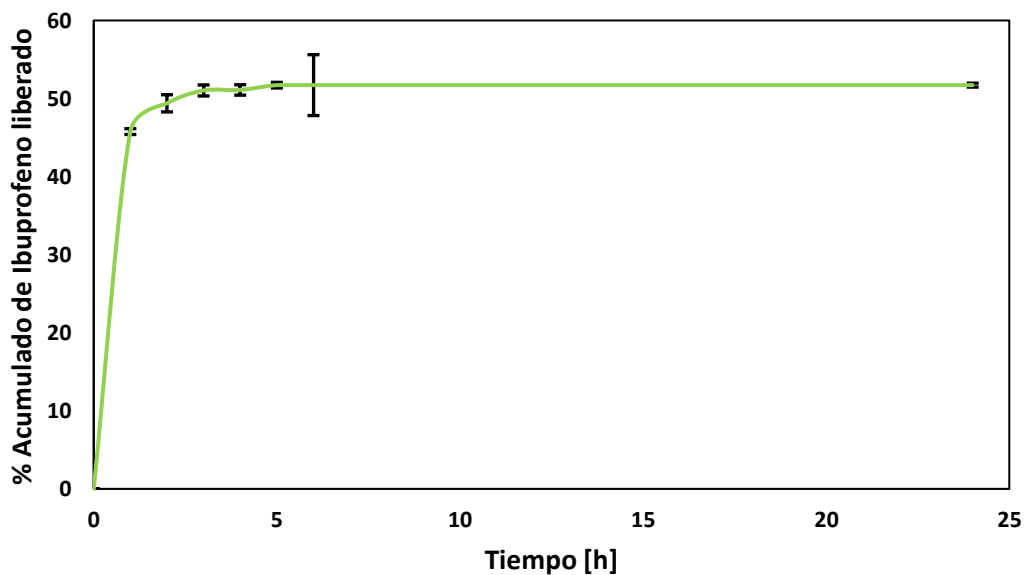


Figura 26 Curva de liberación acumulativa de ibuprofeno, para una emulsión al 2% manteca y 1% Tween80.

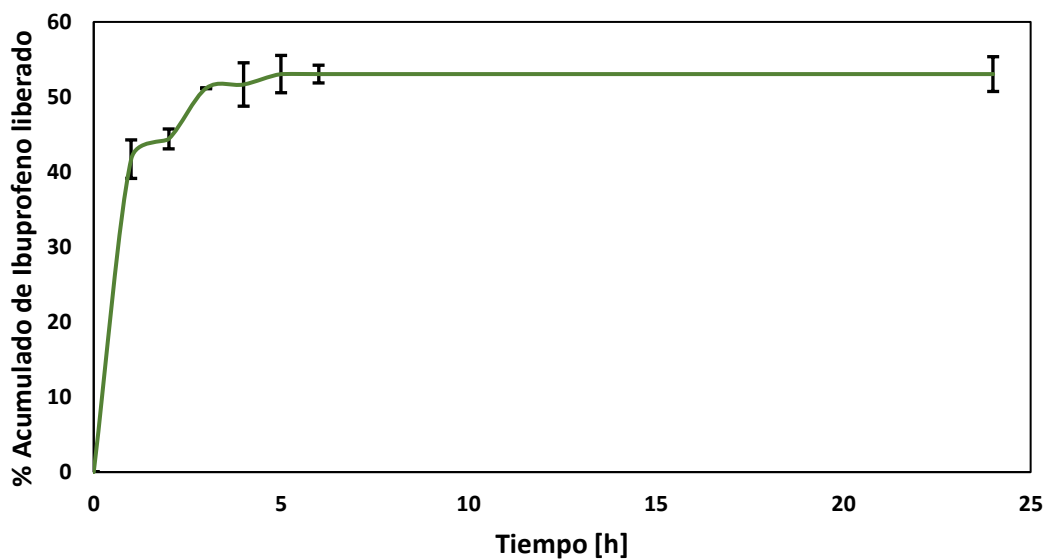


Figura 27. Curva de liberación acumulativa de ibuprofeno, para una emulsión al 5% manteca y 1% Tween80.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye que es posible utilizar la manteca de cacao para micro encapsular fármacos liposolubles utilizando una metodología de emulsión- evaporación de solvente y así potencialmente controlar su liberación. Es decir, es posible desarrollar tecnologías utilizando manteca de cacao aplicables a la industria cosmética y farmacéutica para la administración retardada de fármacos u otros agentes activos. Sin embargo, todavía es necesario optimizar el proceso de encapsulación. A pesar de que no se ha logrado desarrollar un método óptimo en cuanto a la fabricación de micropartículas para la encapsulación de fármacos debido al extenso estudio que esto implica, se han encontrado resultados importantes que pueden servir de base para continuar su estudio.

Una de las mayores limitantes que tiene la manteca de cacao como agente encapsulante es su rápida degradación. Sin embargo, se obtienen buenos resultados al aplicar la técnica de emulsión- evaporación de solvente ya que se logra obtener una gran cantidad de micropartículas. Al caracterizarlas según su tamaño, se logra obtener un rango de diámetros de (3.42- 4.93) μm para micropartículas con una solución al 2% de manteca sin ibuprofeno y un rango de (4.65- 5.19) μm para una solución al 5% de manteca sin ibuprofeno. Al utilizar herramientas estadísticas como ANOVA y el método de Tukey se encuentran varias diferencias significativas. Se comprueba que el tamaño de partícula incrementa al encapsular el fármaco, donde se obtiene un rango de (4.74-7.18) μm para soluciones al 5% ibuprofeno y 2% p/v de manteca y un rango de (5.23-7.67) μm para soluciones al 5% ibuprofeno y 5% p/v de manteca. Además, los resultados experimentales se ajustan a estudios realizados previamente, ya que al incrementar la concentración de Tween80 el tamaño de partícula decrece significativamente. En cuanto a rendimiento, se comprueba que el número de

micropartículas decrece a medida que la relación fase orgánica: fase acuosa incrementa y que el mejor tratamiento para obtener una mayor cantidad de partículas es con una solución al 2% de *Tween80*.

La eficiencia alcanzada por cada uno de los tratamientos es superior al 97% lo cual muestra que la manteca de cacao es un material con alto potencial para la micro encapsulación. La liberación del fármaco modelo tiene un máximo de 55% para micro cápsulas fabricadas con 2% *Tween80* y concentraciones de 2% y 5% de manteca. Una de las mayores desventajas de este material es que no se alcanza una liberación controlada debido a que con todos los tratamientos aplicados se libera aproximadamente el 40% del fármaco en la primera hora.

Finalmente, ya que se obtienen resultados prometedores al utilizar la manteca de cacao como agente encapsulante, se sugiere continuar con su estudio. Para mejorar las propiedades físicas de las micropartículas fabricadas se puede estudiar la combinación de dos biopolímeros, como por ejemplo manteca de cacao con ácido poliláctico-glicólico (PLGA), el cual es altamente utilizado en micro encapsulación. Además, se pueden combinar varios surfactantes como *Aerosil200* o alcohol polivinílico para así mejorar la estabilidad y el rendimiento de las partículas producidas. Se recomienda analizar si existen trazas de solvente en las micropartículas producidas debido a que pueden generar componentes tóxicos degradantes (Kim et al., 2005; Müller, 2000) Además, se podría estudiar la toxicidad de las micropartículas *in vitro* y en animales para así analizar su posible aplicación en el área de farmacología. Posibles aplicaciones en la industria alimenticia son de alto interés debido al gran potencial de la manteca de cacao como agente encapsulante, por lo tanto, se recomienda estudiar su encapsulación en alimentos funcionales.

7. FUENTES CONSULTADAS

Bae, Y., Nishiyama, N., Fukushima, S., Koyama, H., Yasuhiro, M., & Kataoka, K. (2005).

Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjugate Chemistry*, 16(1), 122–130. <https://doi.org/10.1021/bc0498166>

Balassa, L. L., Fanger, G. O., & Wurzburg, O. B. (1971). Microencapsulation in the food industry. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 2(2), 245–265.

<https://doi.org/10.1080/10408397109527123>

Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.

Becker Peres, L., Becker Peres, L., de Araujo, P. H. H., & Sayer, C. (2016). Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 317–323.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.033>

Berkland, C., King, M., Cox, A., Kim, K., & Pack, D. W. (2002). Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *Journal of Controlled Release*, 82(1), 137–147. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00136-0)

Bocanegra, R., Gaonkar, A. G., Barrero, A., Loscertales, I. G., Pechack, D., & Marquez, M. (2005). Production of cocoa butter microcapsules using an electrospray process. *Journal of Food Science*, 70(8), e492–e497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11520.x>

- Bolourtchian, N., Karimi, K., & Aboofazeli, R. (2005). Preparation and characterization of ibuprofen microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 22(5), 529–538.
<https://doi.org/10.1080/02652040500161941>
- Bushra, R., & Aslam, N. (2010). An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*, 25(3), 155–1661. <https://doi.org/10.5001/omj.2010.49>
- Campos, E., Branquinho, J., Carreira, A. S., Carvalho, A., Coimbra, P., Ferreira, P., & Gil, M. H. (2013). Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal*, 49(8), 2005–2021.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.04.033>
- Chanana, A., Kataria, M. K., Sharma, M., Bilandi, A., Bihani, S. G. L., College, S. D., ... Ganganagar, S. (2013). MICROENCAPSULATION : ADVANCEMENTS IN APPLICATIONS, 4(2), 2–6.
- Chatterjee, S., & Judeh, Z. M. A. (2017). Impact of the type of emulsifier on the physicochemical characteristics of the prepared fish oil-loaded microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, 34(4), 366–382. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1341561>
- Chen, H., Chang, X., Du, D., Li, J., Xu, H., & Yang, X. (2006). Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 315(1–2), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.10.016>
- Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., ... Farokhzad, O. C. (2007). Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28(5), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.047>

- Conti, B., Pavanetto, F., & Genta, I. (1992). Use of polylactic acid for the preparation of microparticulate drug delivery systems. *J. Microencapsulation*, *9*(2):153-1(Drug delivery\PLGA), PLGA, polylactic acid, microspheres, implants cont.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., Pr at, V., ... Rotello, V. M. (2013). Nanocarriers for Targeting in Inflammation. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, *6*(2), 3–12. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2305-8>
- Das, S., Jagan, L., Isiah, R., Rajesh, B., Backianathan, S., & Subhashini, J. (2011). Nanotechnology in oncology: Characterization and in vitro release kinetics of cisplatin-loaded albumin nanoparticles: Implications in anticancer drug delivery. *Indian Journal of Pharmacology*, *43*(4), 409–413. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.83111>
- Das, S. K., David, S. R. N., Rajabalaya, R., Mukhopadhyay, H. K., Halder, T., Palanisamy, M., ... Nanda, A. (2011). Microencapsulation Techniques and its Practices. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *6*(2), 1–23.
- Dinarvand, R., Moghadam, S. H., Sheikhi, A., & Atyabi, F. (2005). Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique. *Journal of Microencapsulation*, *22*(2), 139–151. <https://doi.org/10.1080/02652040400026392>
- Dubey, R., Shami, T. C., & Bhasker Rao, K. U. (2009). 2009 Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal*, *59*(1), 82–95. <https://doi.org/10.14429/dsj.59.1489>
- Enciso, L. J. (2013). Manual de Procedimientos, 1–2.

- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D., & Heifets, L. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *172*(12), 1487–1490.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200504-613PP>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, *40*(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gomes, M. E., Ribeiro, A. S., Malafaya, P. B., Reis, R. L., & Cunha, A. M. (2001). A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: Morphology, mechanical and degradation behaviour. *Biomaterials*, *22*(9), 883–889. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00211-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00211-8)
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, *15*(7–8), 330–347.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Jiao, J., & Burgess, D. J. (2003). Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS PharmSci*, *5*(1), 62–73.
<https://doi.org/10.1208/ps050107>
- Jonsson, F., & Johanson, G. (2001). A Bayesian analysis of the influence of GSTT1 polymorphism on the cancer risk estimate for dichloromethane. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *174*(2), 99–112. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9206>
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency.

Journal of Microencapsulation, 27(3), 187–197.

<https://doi.org/10.3109/02652040903131301>

Jyothi Sri, S., Seethadevi, A., Suria Prabha, K., Muthuprasanna, P., & Pavitra, P. (2012).

Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(1), P509–P531. <https://doi.org/10.1007/BF00569928>

Kalepu, S., Manthina, M., & Padavala, V. (2013). Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(6), 361–372.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.10.001>

Kim, B. Do, Na, K., & Choi, H. K. (2005). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(2–3), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.10.008>

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.10.008>

Ko, J. ., Park, H. ., Hwang, S. ., Park, J. ., & Lee, J. . (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1–2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00487-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00487-8)

[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00487-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00487-8)

Kulkarni, S. B., & Betageri, G. V. (1995). Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes, 12(3), 229–246.

Langer, R. (1989). Robert langer*, 1595(1985).

Mäder, K., & Mehnert, W. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2–3), 165–96.

[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)

Müller, R. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the

state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161–177.

[https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4)

Nelson, G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00141-2)

Oussoren, C., Eling, W. M. C., Crommelin, D. J. A., Storm, G., & Zuidema, J. (1998). The influence of the route of administration and liposome composition on the potential of liposomes to protect tissue against local toxicity of two antitumor drugs. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1369(1), 159–172. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00221-6)

Park, J. H., Ye, M., & Park, K. (2005). Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, 10(1), 146–161. <https://doi.org/10.3390/10010146>

Pedroso, D. L., Dogenski, M., Thomazini, M., & Heinemann, R. J. B. (2013). and Lactobacillus acidophilus in cocoa butter using spray chilling technology, 783, 777–783.

Perge, L., Robitzer, M., Guillemot, C., Devoisselle, J., & Legrand, P. (2012). New solid lipid microparticles for controlled ibuprofen release : Formulation and characterization study, 422, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.027>

Rosa, G. De, Iommelli, R., La Rotonda, M. I., Miro, A., & Quaglia, F. (2000). Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres. *Journal of Controlled Release*, 69(2), 283–295. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00315-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00315-1)

Shete, A., Pawar, V., & Aghav, I. (2014). A NEWER TECHNOLOGY FOR

MICROENCAPSULATION AND ITS, 3(11), 145–162.

- Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., & Braeckmans, K. (2011). Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*, 6(5), 446–465.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.08.001>
- Suganya, V., & Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and Nanoencapsulation : A Review, 9(3), 233–239.
- Tao Meng, F., Hui Ma, G., Qiu, W., & Guo Su, Z. (2003). W / O / W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release*, 91, 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00273-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00273-6)
- Tița, B., Fuliaș, A., Bandur, G., Rusu, G., & Tița, D. (2010). Thermal Stability of Ibuprofen . Kinetic Study Under Non - Isothermal Conditions. *Rev . Roum . Chim*, 55(9), 553–558.
- Trivedi, P., Verma, A., & Garud, N. (2008). Preparation and characterization of aceclofenac microspheres. *Asian J Pharm*, 2(April), 110–115. <https://doi.org/10.4103/0973-8398.42498>
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem. Rev*, 99, 3181–3198. <https://doi.org/10.1021/cr940351u>
- Villamizar, L. F., & Martínez, F. (2008). Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con eudragit S100 ®. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 15(1), 123–131.
- Yeo, Y., & Park, K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric

microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research*, 27(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1007/BF02980037>

Zhang, Y., Wischke, C., Mittal, S., Mitra, A., & Schwendeman, S. P. (2016). Design of Controlled Release PLGA Microspheres for Hydrophobic Fenretinide. *Molecular Pharmaceutics*, 13(8), 2622–2630. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00961>

zur Mühlen, A., Schwarz, C., & Mehnert, W. (1998). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45(2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00150-1)

8. ANEXOS

8.1. Medición de micropartículas utilizando el software ImageJ

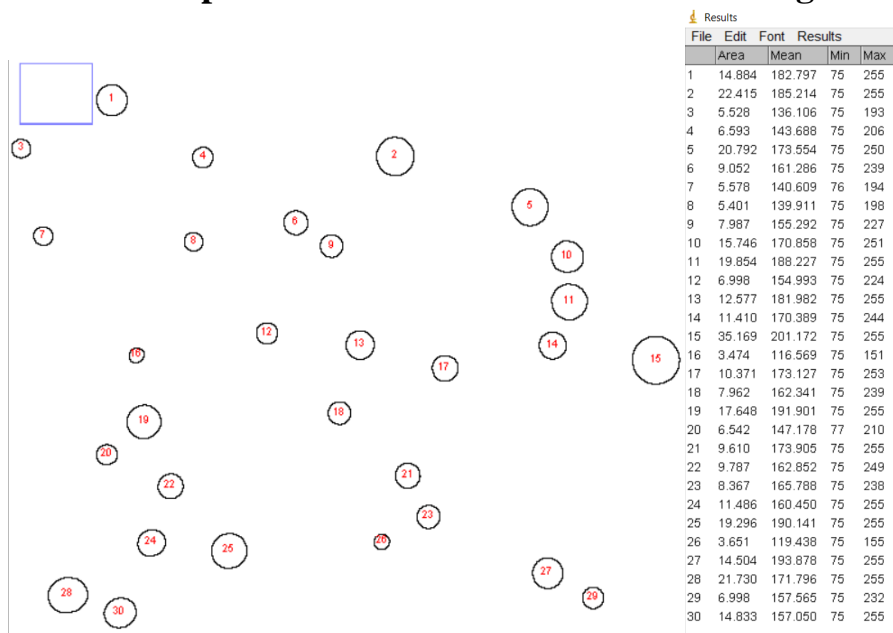


Figura 28. Medición de micro partículas

8.2. Retícula cuadrangular de cámara de Neubauer

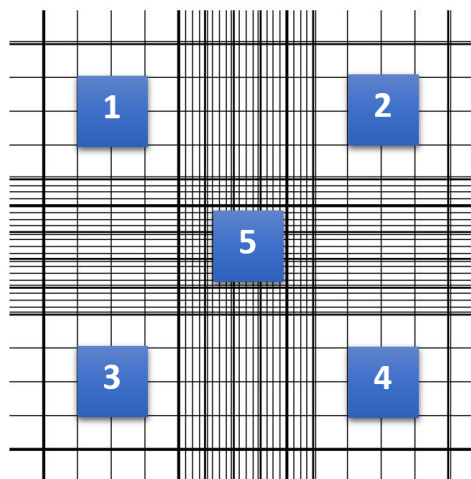


Figura 29. Cuadros cámara de Neubauer

8.3. Curva de calibración de Ibuprofeno en UV-VIS utilizando soluciones estándares conocidas en PBS

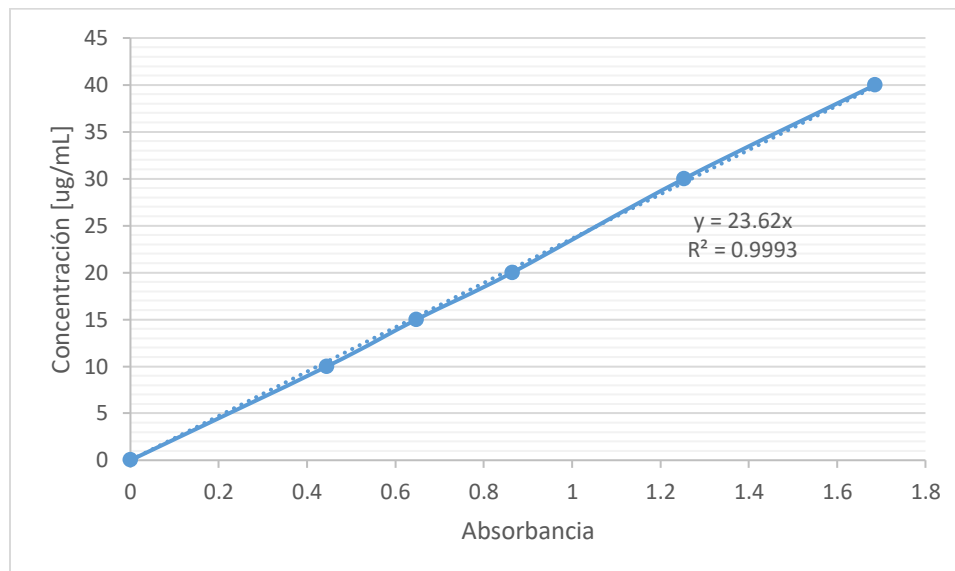


Figura 30. Curva de calibración Ibuprofeno

8.4. Preparación del Buffer Fosfato Salino (PBS)

Para preparar 1L de PBS se añade 800mL de agua destilada a un vaso de precipitación donde se añade cada una de las cantidades de los materiales descritos en la siguiente tabla.

Tabla 5. Reactivos utilizados en la solución de PBS

Reactivo	Cantidad [g]
NaCl	80.0
KCl	2.00
Na ₂ HPO ₄	14.4
KH ₂ PO ₄	2.40

A continuación, se afora la solución utilizando un balón de 1L y finalmente se ajusta el pH con NaOH hasta 7.3.

8.5. Ejemplo de análisis ANOVA y TUKEY en cuanto a tamaño

8.5.1. Relación fase orgánica: fase acuosa

Analysis of Variance

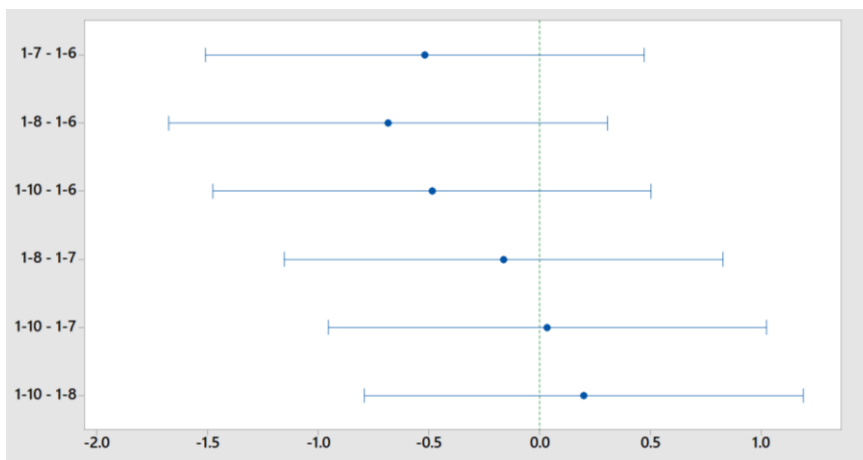
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Relacion FO-FA	3	5.237	1.746	1.23	0.304
Error	76	107.800	1.418		
Total	79	113.037			

..

Means

Relacion	N	Mean	StDev	95% CI
FO-FA				
1-6	20	5.594	1.003	(5.064, 6.124)
1-7	20	5.073	1.179	(4.542, 5.603)
1-8	20	4.908	0.729	(4.378, 5.439)
1-10	20	5.106	1.658	(4.576, 5.637)

Pooled StDev = 1.19097



8.5.2. Concentración de Tween80 (1:10)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tween80	2	113.4	56.710	32.48	0.000
Error	88	153.6	1.746		
Total	90	267.1			

Means

Tween80	N	Mean	StDev	95% CI
0.50%	30	4.921	1.692	(4.441, 5.400)
1.00%	30	5.042	1.347	(4.562, 5.521)
2.00%	31	2.628	0.775	(2.156, 3.099)

