

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DISEÑO, DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS BASADAS EN INTERACCIONES π - π
FÁRMACO-POLÍMERO PARA LA FORMULACIÓN DE
NANOMEDICAMENTOS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctora en Ciencias Farmacéuticas por:**

***MARIA GABRIELA VILLAMIZAR
SARMIENTO***

**Director de Tesis: Dr. Felipe Oyarzún Ampuero
Dr. Ignacio Moreno Villoslada**

Santiago-CHILE

Septiembre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARIA GABRIELA VILLAMIZAR SARMIENTO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido el día 25 de septiembre del 2020.

Director de Tesis:

Dr. Felipe Oyarzún Ampuero

Co-director de Tesis:

Dr. Ignacio Moreno Villoslada

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

Dra. Claudia Yañez

Dra. Lorena García

Dr. Santiago Palma

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felipe Oyarzún y al Dr. Ignacio Moreno, por guiarme y formarme durante este proceso académico. Gracias por la dedicación, los consejos, el apoyo incondicional y la confianza que han puesto en mí. Ha sido un verdadero honor el trabajo y el tiempo compartido.

Al Dr. Marcelo Kogan, quien me ha apoyado desde el primer día, y de tantas maneras posibles: como director del programa, como presidente de mi comisión e incluso como guía. ¡A Ud. gracias infinitas!

A mi comisión, Dra. Claudia Yañez, Dra. Lorena García y Dr. Santiago Palma, por sus sugerencias y correcciones, que permitieron llegar a una mejor versión de este trabajo.

A los profesores y compañeros del Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, por dejarme formar parte de sus vidas, son personas increíbles, talentosas y sobre todo muy humanas. Gracias por la amistad, en especial a Mariela y Wai-Houng.

A los compañeros del Laboratorio de Polímeros de la Universidad Austral de Chile. En especial al Dr. Mario Flores, por el recibimiento, buen trato y disposición en cada una de mis estancias.

A los compañeros del Laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología, por la colaboración y el apoyo mutuo a pesar de que nuestros trabajos no estaban ligados directamente.

A mis amigos y compadres: Andrea y Eugenio. Gracias por la motivación a hacer lo que parecía difícil, por recibirme a mí y a John en su hogar, por ser nuestra familia y apoyo durante este tiempo. Un pedazo de este logro también es de Uds.

A mis Padres: Ersley y Sonia, y a mi hermana Yessica. No hay distancia que nos separe y que impida sentirlos cerca. Uds. son mi fuerza y motivación para hacerlo cada día mejor.

A mi esposo, mejor amigo, y compañero de vida: John. Gracias por creer en mí, por caminar a mi lado e impulsarme siempre a sacar mi mejor versión. Gracias por elegirnos cada día y hacer de este viaje el más divertido de todos. ¡Hemos cumplido una meta más!

A todos: ¡Muchas Gracias!

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de *Drug Delivery* del Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1161450 y 1201899 del Dr. Felipe Oyarzún, FONDECYT 1150899 y 1181695 del Dr. Ignacio Moreno y por el proyecto FONDAP 15130011. Asimismo, se agradece a la Universidad de Chile por el apoyo con la Beca de Arancel y Manutención durante el período 2016-2020.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
FINANCIAMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xxi
I.INTRODUCCIÓN	1
I.1. Fármacos hidrofílicos y aromáticos de bajo peso molecular	1
I.2. Inclusión de fármacos HABP en sistemas de liberación de fármacos	4
I.2.1. Nanosistemas: Nanomedicina	6
I.3. Interacciones aromático-aromático como estrategia para el desarrollo de sistemas de <i>drug delivery</i>	9
I.3.1. Naturaleza de las interacciones aromático-aromático	10
I.3.2. Uso de las interacciones aromático-aromático en nanomedicina	12
I.4. Concentración de agregación crítica (CAC)	15
II. PROPUESTA	18
III. HIPÓTESIS	20

IV. OBJETIVOS	21
IV.1. Objetivo general	21
IV.2. Objetivos específicos.....	21
V. METODOLOGÍA	22
V.1. Diseño y desarrollo de los nanovehículos de los fármacos HABP con el polímero poli (4-estirensulfonato de sodio) que presenten alta eficiencia de asociación, carga de fármaco y rendimiento.....	23
V.1.1. Preparación de las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS	23
V.1.2. Determinación de tamaño, potencial zeta, concentración de nanopartículas y morfología	23
V.1.3. Estudios de estabilidad.....	24
V.1.4. Determinación de los parámetros de asociación	25
V.2. Elucidación de la naturaleza de las interacciones establecidas y caracterización del tipo de atrapamiento del fármaco en el nanovehículo (cinético y/o termodinámico)	26
V.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	26
V.2.2. Estudios de diafiltración.....	27
V.3. Estudio del perfil de liberación de los nanovehículos utilizando diálisis y aparato de disolución USP 4 y determinación del mecanismo de liberación	30
V.3.1. Diálisis convencional	30

V.3.2. Celda de flujo continuo aparato USP 4.....	31
V.3.3. Determinación del mecanismo de liberación	32
V.4. Estudio de la influencia de la concentración de agregación crítica “cac” en el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP desde los nanosistemas ...	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
VI.1. Diseño y desarrollo de los nanovehículos de los fármacos HABP con el polímero poli (4-estirensulfonato de sodio) que presenten alta eficiencia de asociación, carga de fármaco y rendimiento.....	35
VI.1.1. Desarrollo de las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS	35
VI.1.2. Determinación de tamaño, potencial zeta, concentración de nanopartículas y morfología.....	38
VI.1.3. Estudios de estabilidad.....	45
VI.1.4. Determinación de los parámetros de asociación	50
VI.2. Elucidación de la naturaleza de las interacciones establecidas y caracterización del tipo de atrapamiento del fármaco en el nanovehículo (cinético y/o termodinámico)	54
VI.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	55
VI.2.2. Estudios de Diafiltración	61
VI.3. Estudio del perfil de liberación de los nanovehículos utilizando diálisis y aparato de disolución USP 4 y determinación del mecanismo de liberación	74
VI.4. Estudios de la influencia de la concentración de agregación crítica “cac” en el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP desde los nanosistemas.....	81

CONCLUSIONES	94
PROYECCIONES	96
REFERENCIAS	98
ANEXO 1	117
ANEXO 2	119
ANEXO 3	125
ANEXO 4	132
ANEXO 5	133
ANEXO 6	134
ANEXO 7	136
ANEXO 8	137
ANEXO 9	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reconocimiento fármaco HABP-Receptor	3
Figura 2. Liberación <i>in vitro</i> de fármacos HABP incluidos en sistemas de <i>drug delivery</i>	5
Figura 3. Nanosistemas más comunes para el atrapamiento de fármacos HABP	7
Figure 4. Liberación <i>in vitro</i> de fármacos HABP incluidos en nanosistemas.....	8
Figura 5. Estabilización de la molécula de ADN mediante el apilamiento π - π entre sus bases nitrogenadas	10
Figura 6. Conformaciones geométricas: A) cara - cara, B) cara - cara con desplazamiento, C) borde-cara (en forma T) y D) en forma Y	12
Figura 7. Atrapamiento efectivo entre el fármaco HABP clorfenamina y el polímero PSS mediante interacciones $\pi - \pi$	15
Figura 8. Estructuras moleculares de los fármacos HABP seleccionados: amitriptilina (AMI), prometazina (PMZ), cloroquina (CQ), clorfenamina (CPM) y del polímero aromático poli(4-estirensulfonato de sodio) (PSS).	19
Figura 9. Imagen visual representativa: A) complejos solubles y/o ausencia de interacciones, B) sistemas coloidales, y C) precipitados. D) turbidimetría de los complejos AMI/PSS (línea naranja), PMZ/PSS (línea gris) y CQ/PSS (línea azul) en relación molar entre 0.1 hasta 1.2.....	37

Figura 10. Representación gráfica de: A) diámetro hidrodinámico (nm), B) índice de polidispersión y C) potencial zeta (mV) de las NPs AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) y CQ/PSS (azul) (promedio \pm d.e., n = 3).....	40
Figura 11. Concentración en NPs/mL (columna naranja) y turbidimetría expresada en unidades de absorbancia a 650 nm (línea azul) para las formulaciones: A) AMI/PSS, B) PMZ/PZZ, y C) CQ/PSS (promedio \pm d.e., n=3)	41
Figura 12. Diámetro hidrodinámico de las NPs AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) y CQ/PSS (azul), mediante DLS (relleno sólido) y NTA (trama) (<i>p-value</i> > 0.05, promedio \pm d.e, n=3).....	42
Figura 13. Micrografías STEM para las NPs: A) AMI/PSS 0.6, B) PMZ/PSS 0.6, y C) CQ/PSS 0.4.....	44
Figura 14. Microscopía óptica (10x) para las formulaciones: A) AMI/PSS 1.2, B) PMZ/PSS 1.2, y C) CQ/PSS 0.6	44
Figura 15. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: A) AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); B) PMZ/PSS (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y C) CQ/PSS 0.4 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (promedio \pm d.e., n=3).....	46
Figura 16. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: A)	

AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B**) PMZ/PSS (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C**) CQ/PSS 0.4 a diferentes pHs (promedio \pm d.e., n=3).....47

Figura 17. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A**) AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B**) PMZ/PSS (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C**) CQ/PSS 0.4 a diferentes temperaturas (promedio \pm d.e., n=3)48

Figura 18. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A**) AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B**) PMZ/PSS (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C**) CQ/PSS 0.4 durante el tiempo (promedio \pm d.e, n=3)49

Figura 19. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A**) AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B**) PMZ/PSS (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C**) CQ/PSS 0.4 después del proceso de liofilización y reconstitución en agua (como control se seleccionaron las formulaciones sin liofilizar) (promedio \pm d.e., n=3).....50

Figura 20. Eficiencia de asociación de las formulaciones AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) y CQ/PSS (azul) en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3)53

Figura 21. Representación gráfica de: A) carga de fármaco y B) rendimiento de las formulaciones AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) CQ/PSS (azul) relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n = 3).	54
Figura 22. Espectro de RMN- ¹ H en la región aromática de: A) AMI 1x10 ⁻³ M, B) AMI 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M, y C) PSS 1x10 ⁻² M.....	56
Figura 23. Espectro de RMN- ¹ H en la región aromática de: A) PMZ 1x10 ⁻³ M, B) PMZ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M y C) PSS 1x10 ⁻² M.....	56
Figura 24. Espectro de RMN- ¹ H en la región aromática de: A) CQ 1x10 ⁻³ M, B) CQ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M, y C) PSS 1x10 ⁻² M.....	57
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H NOESY en la región aromática de AMI 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M.....	59
Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H NOESY en la región aromática de PMZ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M.....	60
Figura 27. Espectro de RMN- ¹ H NOESY en la región aromática de CQ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M.....	60
Figura 28. Perfiles de DF de las formulaciones AMI/PSS (líneas multicolor) en: A) complejos solubles ([fármaco]/[polímero] = 0.1-0.5); B) nanopartículas ([fármaco]/[polímero] = 0.6-0.8); y C) precipitados ([fármaco]/[polímero] = 0.9-1.2). Experimentos control: AMI en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).	62

Figura 29. Perfiles de retención de las formulaciones AMI/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.1-0.5$; **B)** nanopartículas, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.6-0.8$; y **C)** precipitados $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.9-1.2$. Experimentos control: AMI en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).
.....65

Figura 30. Perfiles de DF de las formulaciones PMZ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.1-0.5$; **B)** nanopartículas, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.6-0.8$; y **C)** precipitados $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.9-1.2$. Experimentos control: PMZ en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e, n=3)
.....66

Figura 31. Perfiles de retención de las formulaciones PMZ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.1-0.5$; **B)** nanopartículas, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.6-0.8$; y **C)** precipitados $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.9-1.2$. Experimentos control: PMZ en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).....68

Figura 32. Perfiles de DF de las formulaciones CQ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** nanopartículas, $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.4$ y **B)** precipitados $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.5-1.2$. Experimentos control: CQ en ausencia de polímero a las distintas

concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3)	69
Figura 33. Perfiles de retención de las formulaciones CQ/PSS (líneas multicolor) en: A) nanopartículas, [fármaco]/[polímero] 0.4 y B) precipitados [fármaco]/[polímero] 0.5-1.2. Experimentos control: CQ en ausencia de polímero (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3)	71
Figura 34. Eficiencia de asociación determinada por las técnicas de diafiltración (azul) y ultrafiltración (naranja) de las formulaciones: A) AMI/PSS 0.1-1.2, B) PMZ/PSS 0.1-1.2, y C) CQ/PSS 0.1-1.2 (promedio \pm d.e., n=3, ***p-value < 0.001)	73
Figura 35. Liberación acumulada (%) de las formulaciones AMI/PSS 0.6 (línea azul), AMI/PSS 0.8 (línea naranja), PMZ/PSS 0.6 (línea gris), PMZ/PSS 0.8 (línea amarilla) y CQ/PSS 0.4 (línea roja) evaluado mediante diálisis (A), y celda de flujo continuo aparato USP 4 (B) (promedio \pm d.e., n=3).....	75
Figura 36. Mecanismo de liberación propuesto para los nanovehículos desarrollados	81
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H en la región aromática de: A) AMI 100x10 ⁻³ M, B) 50x10 ⁻³ M, C) 30x10 ⁻³ M, D) 20x10 ⁻³ M, E) 10x10 ⁻³ M, F) 1x10 ⁻³ M.....	82
Figura 38. Representación gráfica de: A) concentración de NPs (partículas/mL) versus turbidimetría (a.u.), B) diámetro hidrodinámico (columna), potencial zeta (rombo), e índice de polidispersión (número) de las nanopartículas CPM/PSS (promedio \pm d.e., n=3).....	85

Figura 39. Espectro de RMN- ¹ H en la región aromática: A) de CPM 1x10 ⁻³ M en ausencia del polímero PSS, B) CPM 1x10 ⁻³ M en presencia de 1x10 ⁻² M del polímero PSS y C) PSS 1x10 ⁻² M.	87
Figura 40. Perfiles de DF A) y perfiles de retención de las formulaciones B) CPM/PSS 1.4 y 1.6 (líneas multicolor). Experimentos blancos: CPM en ausencia de polímero (líneas en escala azules), (promedio ± d.e., n=3)	88
Figura 41. Liberación acumulada (%) de CPM/PSS 1.4 (línea azul) y CPM/PSS 1.6 (línea naranja) mediante: A) diálisis por 6 horas y durante 20 días (inserto), y B) celda de flujo continuo aparato USP 4 durante 6 horas (promedio ± d.e., n=3).	91
Figura A1. Representación gráfica del equipo de diafiltración	117
Figura A2. Representación gráfica del principio de la diafiltración.....	118
Figura A3. Espectro de RMN- ¹ H de: A) AMI 1x10 ⁻³ M, B) AMI 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M y C) PSS 1x10 ⁻² M.	119
Figura A4. Espectro de RMN- ¹ H NOESY de AMI 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M.....	119
Figura A5. Espectro de RMN- ¹ H de: A) PMZ 1x10 ⁻³ M, B) PMZ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M y C) PSS 1x10 ⁻² M.....	121
Figura A6. Espectro de RMN- ¹ H NOESY de PMZ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M.....	121
Figura A7. Espectro de RMN- ¹ H de: A) CQ 1x10 ⁻³ M, B) CQ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M y C) PSS 1x10 ⁻² M.....	123

Figura A8. Espectro de RMN- ¹ H NOESY de CQ 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M.....	123
Figura A9. Esquema del funcionamiento del equipo de DF (A) y de la celda de flujo continuo o Aparato USP en circuito cerrado y adaptado para nanopartículas (B)	132
Figura A10. Ajuste de los datos de liberación <i>in vitro</i> de PMZ/PSS 0.8	133
Figura A11. Espectro de RMN- ¹ H de: A) CPM 1x10 ⁻³ M, B) CPM 1x10 ⁻³ M en presencia de PSS 1x10 ⁻² M y C) PSS 1x10 ⁻² M.....	134
Figura A12. Imágenes ópticas de la nanopartícula CPM/PSS 1.4 en: A) comienzo del estudio de diafiltración y B) al final del estudio, donde se observa la “desaparición” de las nanopartículas durante el proceso de diafiltración.....	137
Figura A13. Ajuste de los datos de liberación <i>in vitro</i> de CPM/PSS 1.4	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros descritos para la técnica de diafiltración según el modelo propuesto por Moreno-Villoslada y cols. Los parámetros j_0 y u_0 , corresponden a los experimentos blancos (fármaco HABP en ausencia de polímero)	29
Tabla 2. Algunos parámetros fisicoquímicos de los fármacos HABP seleccionados.	33
Tabla 3. Parámetros de DF de las formulaciones AMI/PSS en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n = 3)	64
Tabla 4. Parámetros de DF de las formulaciones PMZ/PSS en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3)	67
Tabla 5. Parámetros de DF de las formulaciones CQ/PSS en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3)	70
Tabla 6. Análisis de datos según los modelos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas (diálisis y aparato USP 4) para las NPs AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS de acuerdo con los perfiles de liberación	79
Tabla 7. Parámetros de asociación de las NPs CPM/PSS estudiadas.....	86
Tabla 8. Parámetros de diafiltración para las nanopartículas CPM/PSS 1.4 y 1.6 (promedio \pm d.e., n=3).....	89
Tabla 9. Ajuste de datos (diálisis y aparato USP 4) de nanopartículas CPM/PSS 1.4 y 1.6 a modelos de liberación	92

Tabla A1. Asignación de protones correspondiente a la Figura A3 y Figura A4	120
Tabla A2. Asignación de protones correspondiente a la Figura A5 y Figura A6	122
Tabla A3. Asignación de protones correspondiente a la Figura A7 y Figura A8	124
Tabla A4. Parámetros de diafiltración de las formulaciones AMI/PSS en relaciones molares desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3)	125
Tabla A5. Parámetros de diafiltración de las formulaciones PMZ/PSS en relaciones molares desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3)	128
Tabla A6. Parámetros de diafiltración de las formulaciones CQ/PSS en relaciones molares desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3)	130
Tabla A7. Asignación de protones correspondiente a la Figura A11	134
Tabla A8. Parámetros de diafiltración para las nanopartículas CPM/PSS 1.4 y 1.6 (promedio \pm d.e., n =3).....	136

RESUMEN

La administración de fármacos hidrofílicos de bajo peso molecular constituye un gran desafío en *drug delivery*, sobre todo para la terapia de enfermedades crónicas. La biodistribución parcial y rápida eliminación de estas moléculas activas limitan su eficacia terapéutica y aumentan significativamente sus efectos secundarios. La inclusión de estos fármacos en sistemas nanoestructurados constituye una posibilidad atractiva al ofrecer propiedades farmacéuticas controlables, mayor biocompatibilidad y, en algunos casos, bajo costo. Sin embargo, la fuerte interacción entre estos fármacos y el medio acuoso compromete el éxito de su encapsulamiento. En la presente investigación, se ha propuesto una estrategia sencilla, mediante la simple mezcla de dos soluciones acuosas, para el desarrollo de nanomedicamentos que contengan fármacos hidrofílicos y aromáticos de bajo peso molecular (cloroquina, amitriptilina y prometazina) con el polímero aromático poli(4-estirensulfonato de sodio) (PSS). Las nanopartículas obtenidas presentaron tamaños en un rango entre 120-180 nm, bajo índice de polidispersión (0.2-0.3) y potencial zeta negativo (-60 a -80 mV). Interesantemente, las nanopartículas presentaron alta estabilidad frente a diferentes estímulos como variación de concentración de sales, pH, temperatura y tiempo. Además, son capaces de transformarse en un polvo reconstituible manteniendo sus características iniciales (diámetro hidrodinámico y potencial zeta). En cuanto a la eficacia del proceso, las nanopartículas evidenciaron eficiencias de asociación >90 % y carga de fármaco de hasta el 67 %.

Adicionalmente, las interacciones presentes entre los fármacos seleccionados y el PSS fueron identificadas. Los estudios de RMN- H^1 y NOESY demostraron la presencia de interacciones íntimas “aromático-aromático” que influyen en la formación y estabilización de los nanosistemas. Por su parte, la diafiltración determinó que el atrapamiento de estos fármacos es en su mayoría cinéticamente controlado (% KB), con constantes de disociación (K_{dis}) bajas, y con perfiles de liberación prolongados determinados por los estudios de liberación *in vitro* (diálisis convencional y aparato USP 4). Además, se encontró un buen ajuste a la ecuación de Korsmeyer-Peppas para los perfiles de liberación, y el análisis correspondiente indica la contribución de una combinación de fenómenos dinámicos tales como difusión, hidratación molecular, cambios conformacionales en la matriz polimérica, cambios en la movilidad molecular de las macromoléculas y un cambio en la naturaleza de la unión del fármaco al polímero. Finalmente, la inclusión de una cuarta molécula con menor capacidad de autoasociación (concentración de agregación crítica, *cac*) que las previamente estudiadas, clorfenamina maleato, comprobó que tanto el proceso de formación de las NPs como la liberación del fármaco desde la matriz, están directamente relacionados con la *cac*. Considerando la gran cantidad de fármacos hidrofílicos y aromáticos de bajo peso molecular con importancia terapéutica, y la simplicidad de la estrategia presentada, consideramos que estos resultados (formación, estabilidad, liberación y efecto de la *cac*) pueden ser la base para elaborar una

serie de sistemas de administración prolongada de fármacos con aplicaciones en diferentes patologías.

ABSTRACT

Design, Development and Characterization of Nanoparticles Based on π - π Drug-Polymer Interactions for the Formulation of Nanomedicines.

The administration of hydrophilic and low molecular-weight drugs constitutes a great challenge in drug delivery, especially for the therapy of chronic diseases. The partial biodistribution and rapid elimination of these active molecules limit their therapeutic efficacy and significantly increase their side effects. The inclusion of these drugs in nanostructured systems constitutes an attractive possibility by offering controllable pharmaceutical properties, greater biocompatibility and, in some cases, low cost. However, the strong interaction between these drugs and the aqueous medium compromises the success of their encapsulation. In the present investigation, a simple strategy has been proposed, by simply mixing two aqueous solutions, for the development of nanomedicines containing hydrophilic, aromatic and low molecular-weight drugs (chloroquine, amitriptyline, promethazine) with the aromatic polymer poly (4-styrene sulfonate) (PSS). The nanoparticles obtained presented sizes in a range between 120-180 nm, low polydispersity index (0.2-0.3) and negative zeta potential (-60 to -80 mV). Interestingly, the nanoparticles presented high stability against different stimulates such as variation in ionic strength, pH, temperature, and time. Furthermore, they can be easily converted to a reconstitutable powder maintaining their initial characteristics (hydrodynamic diameter and zeta

potential). Regarding the efficacy of the process, the nanoparticles showed association efficiencies >90% and drug load of up to 67 %. Additionally, the interactions present between the selected drugs and the PSS were identified. The RMN-H¹ and NOESY studies demonstrated the presence of intimate "aromatic-aromatic" interactions that influence the formation and stabilization of nanosystems. On the other hand, diafiltration determined that the entrapment of these drugs is mostly kinetically controlled (% KB), with low dissociation constants (K_{dis}), and with prolonged release profiles determined by *in vitro* release studies (conventional dialysis and USP apparatus 4). In addition, a good fit to the Korsmeyer-Peppas equation for the release profiles was found, and the corresponding analysis indicates the contribution of a combination of dynamic phenomena such as diffusion, molecular hydration, conformational changes in the polymer matrix, changes in the molecular mobility of macromolecules and a change in the nature of the binding of the drug to the polymer. Finally, the inclusion of a fourth molecule with a lower self-association capacity (critical aggregation concentration, *cac*) than those previously studied, chlorphenamine maleate, verified that the process of formation of the NPs and the release of the drug from the matrix are directly related to *cac*. Considering the large number of hydrophilic, aromatic and low molecular-weight drugs with therapeutic importance, and the simplicity of the presented strategy, we consider that these results (formation, stability, release and effect of *cac*) may be the basis for developing a

series of prolonged drug delivery systems with applications in different pathologies.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Fármacos hidrofílicos y aromáticos de bajo peso molecular.

Se estima que cerca del 90 % de los fármacos comercializados corresponden a moléculas de bajo peso molecular (< 900 Da) [1, 2]. Su aplicación terapéutica es amplia, abarcando un gran número de afecciones agudas y crónicas tales como inflamación, depresión, alergia, hipertensión, diabetes e infecciones, entre otras [3-10]. En comparación con los fármacos de alto peso molecular (péptidos, proteínas, enzimas, entre otros), los fármacos de bajo peso molecular presentan una gran ventaja ya que son más económicos y fáciles de sintetizar, transportar y almacenar. Sin embargo, su aplicación clínica puede verse limitada por una serie de desventajas como: baja absorción intracelular, degradación enzimática, desarrollo de resistencia, rápida eliminación, biodistribución parcial, bajo índice terapéutico y, en el caso de los fármacos antitumorales, falta de acumulación y retención dentro del tumor [11, 12]. Desafortunadamente, la estrategia más utilizada para contrarrestar estas características pasa por la necesidad de aumentar la dosificación (en términos de concentración y frecuencia), con el riesgo de incrementar los efectos secundarios.

Es importante destacar que la mayoría de los fármacos de bajo peso molecular son ácidos y bases débiles, ionizables en medio medio biológico y con la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con el agua (en consecuencia,

hidrosolubles), y muchos de ellos presentan al menos un anillo aromático en su estructura. Interesantemente, la inclusión de anillos aromáticos en el diseño de fármacos es clave; de hecho, históricamente ha sido una característica estructural clásica desde el descubrimiento de la aspirina a finales del siglo XIX [13]. Mao y cols. describieron que más del 70% de los medicamentos comerciales contienen al menos un anillo aromático. En detalle, los fármacos: antiinfecciosos (79.3% de ellos, ejemplo: antibióticos, antibacterianos, antifúngicos y antivirales); con efecto en el sistema nervioso central (85.3% de ellos, ejemplo: anticonvulsivantes, antidepresivos, antipsicóticos, ansiolíticos, anti-parkinsonianos y sedantes), con efectos cardiovasculares (87.4% de ellos, ejemplo: antianginosos, antiarrítmicos, antihiperlipidémicos, antihipertensivos, antihipertensivos, antitrombóticos, cardiotónicos y vasodilatadores) y antineoplásicos (73.8% de ellos), contienen al menos un anillo aromático [14].

Adicionalmente, la presencia de anillos aromáticos en fármacos hidrofílicos, aromáticos y de bajo peso molecular (HABP) se ha relacionado con una capacidad favorecida para interactuar con dianas biológicas de interés terapéutico. Entre otros antecedentes, se ha evidenciado que el anillo aromático en fármacos HABP promueve inhibición del citocromo P450 (enzimas que desempeñan un papel clave en el metabolismo de la mayoría de los fármacos) [15-18] (**Fig. 1**), inhibición del canal HERG (human ether-a-go-go-related gene, por sus siglas en inglés) [19, 20], y alta unión a proteínas plasmáticas [21-23]. Además, la presencia de anillos aromáticos en una molécula también proporciona

una plataforma para su funcionalización, sirviendo como núcleo que permite direccionar al fármaco hacia el destino deseado y, por lo tanto, mejorar las interacciones con receptores específicos [24].

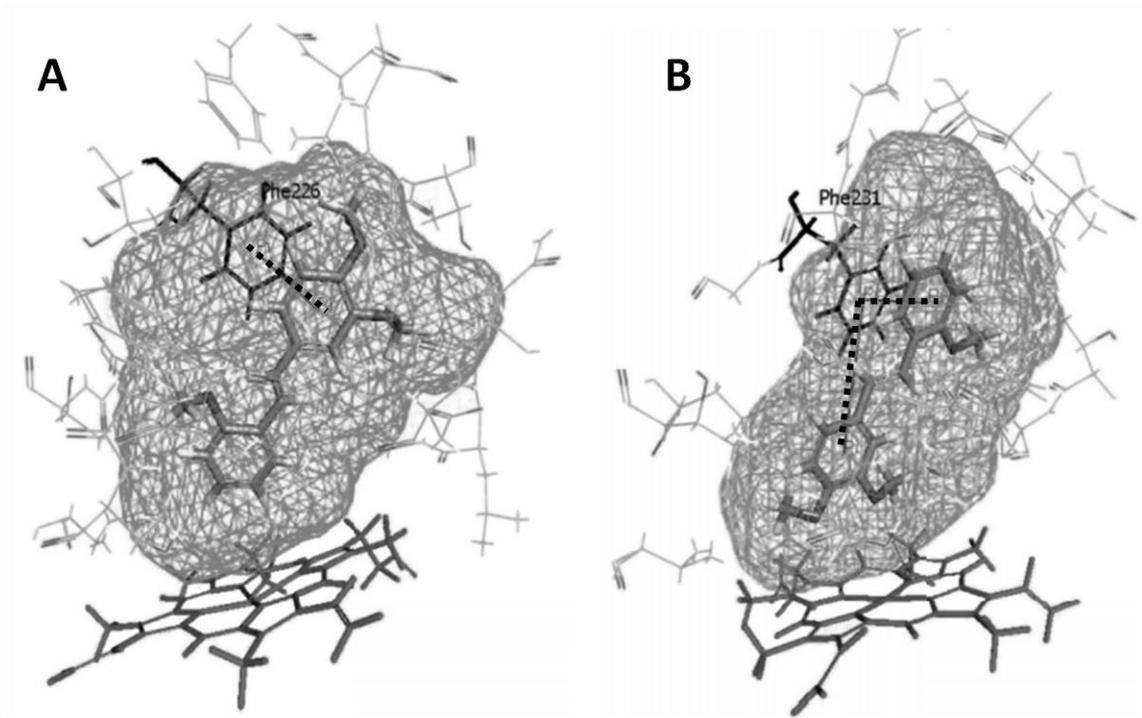


Figura 1. Reconocimiento fármaco HABP-Receptor: 2',3,4-trimetoxi-*trans*-estilbeno (compuesto reconocido por su actividad anticancerígena) acoplado a los sitios de unión CYP1A2 (**A**) y CYP1B1 (**B**). En la imagen los residuos de aminoácidos que rodean los sitios activos se visualizan como Phe226 y Phe231. Las líneas punteadas representan el reconocimiento entre los grupos aromáticos del fármaco y el citocromo P450 [25].

Considerando las ventajas ofrecidas por los fármacos HABP y su amplia aplicación en enfermedades agudas y crónicas, su inclusión en sistemas de liberación o administración de fármacos es de gran interés para la comunidad científica.

I.2. Inclusión de fármacos HABP en sistemas de liberación de fármacos.

Durante muchos años, la investigación en el campo de la formulación de fármacos se ha centrado en la exploración de sistemas que retrasen/prolonguen la liberación de fármacos después de su administración. Las razones se basan principalmente en la necesidad de manejar la alta variabilidad en los niveles circulantes del fármaco durante el curso de una enfermedad aguda y crónica, y prolongar el efecto para disminuir la frecuencia de la administración [26]. Para lograr niveles plasmáticos constantes y evitar las ineficiencias de las formulaciones tradicionales, relacionadas con rápida eliminación y biodistribución parcial que conllevan a una eficacia terapéutica reducida y mayores efectos secundarios, se requiere el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos (sistemas de *drug delivery*).

El uso de estrategias de *drug delivery*, mediante la inclusión de fármacos de bajo peso molecular en sistemas de liberación, se presenta como una alternativa para contrarrestar las características adversas antes mencionadas. En general, el atrapamiento y la liberación de fármacos desde una formulación hacia el medio, se ven afectados por las propiedades fisicoquímicas del propio fármaco y del/los excipientes seleccionados para desarrollar la formulación. En ese sentido, el atrapamiento de moléculas lipofílicas es bastante exitoso y en la literatura se pueden encontrar un gran número de estudios que así lo demuestran [27-32]. Sin embargo, el atrapamiento de moléculas activas HABP representa un gran desafío. Lo mencionado, se basa en la alta capacidad de los fármacos HABP

para interactuar de manera atractiva con el medio acuoso, lo que se traduce en una baja encapsulación y una liberación rápida y descontrolada desde los formulaciones tras su exposición a medios biológicos [33-35]. Por ejemplo, Ruel-Gariépy y cols. desarrollaron hidrogeles de quitosano para encapsular clorfenamina, observando una liberación inicial explosiva (*burst release*) del 40% en ensayos *in vitro* [36]. En una investigación desarrollada por Chen y cols. propusieron la inclusión de doxorubicina en un hidrogel termosensible a base de poli (N-isopropilacrilamida) y también se evidenció un 40 % de liberación inicial del fármaco [37]. En la **Figura 2** se muestran ejemplos de liberaciones desde sistemas con fármacos HABP que ocurren en periodos muy cortos de tiempo (desde segundos hasta pocas horas). Estas investigaciones reflejan la dificultad para lograr un atrapamiento eficiente y una liberación controlada de los fármacos HABP desde formulaciones que utilizan interacciones no covalentes para el atrapamiento.

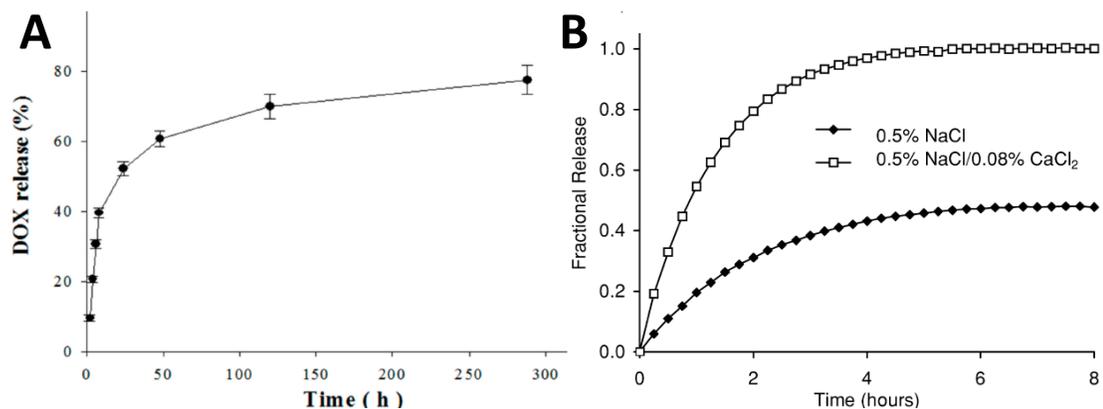


Figura 2. Liberación *in vitro* de fármacos HABP incluidos en sistemas de *drug delivery* siguiendo diferentes estrategias, y propuestos para tratar enfermedades crónicas: **A)** doxorubicina a partir de hidrogeles basados en poli (N-isopropilacrilamida) en solución salina tamponada con fosfato [37]; y **B)** doxorubicina en microesferas de intercambio iónico de sulfopropil dextrano en medio acuoso de NaCl y NaCl + CaCl₂ [38].

I.2.1. Nanosistemas: Nanomedicina.

En las últimas décadas, la nanomedicina ha surgido como una gran herramienta para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos. Los métodos de síntesis son muy variados e incorporan una serie de materiales que impactan directamente en las propiedades de los sistemas deseados [39-41]. En particular, los nanosistemas como las nanopartículas (NPs) representan una excelente alternativa debido a su gran estabilidad coloidal y a la alta superficie de contacto con respecto a su volumen total. Interesantemente, la mayoría de ellos se desarrollan a base de polímeros, entre los cuales podemos mencionar: formulaciones de fármaco-polímero combinadas físicamente, liposomas [42], conjugados fármaco-polímero [43], micelas poliméricas [44], NPs poliméricas [45], entre otros (**Fig. 3**). Además, desde su descubrimiento, se han utilizado una amplia gama de polímeros degradables y no degradables, con características tanto hidrofílicas como hidrofóbicas [46, 47]. En particular, los sistemas de matriz hidrofílica presentan algunas ventajas, ya que son simples de formular, económicos, fáciles de producir y tienen una buena correlación *in vitro-in vivo* [48-50]. Sin embargo, el éxito de estos sistemas como portadores de fármacos, está sujeto a un equilibrio complejo entre la afinidad del fármaco por los componentes poliméricos y por el disolvente, y que deberían proveer idealmente de una unión eficaz del fármaco y velocidades de liberación de este que sean deseables.

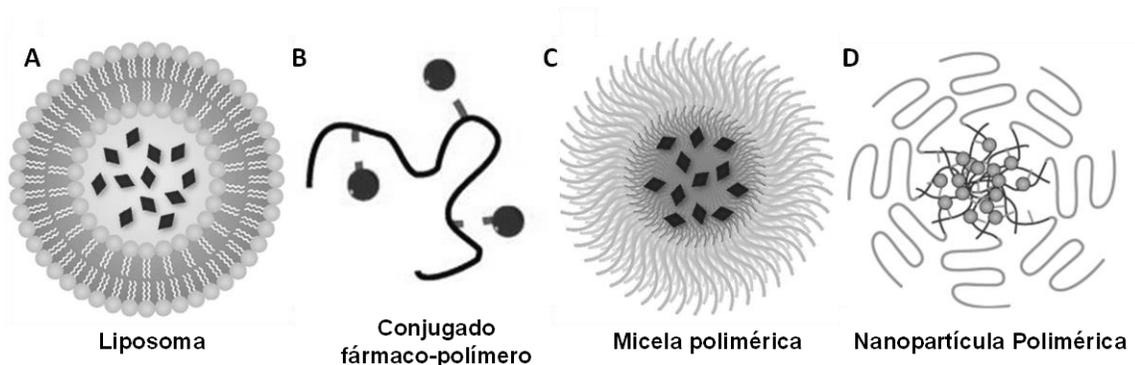


Figura 3. Nanosistemas más comunes para el atrapamiento de fármacos HAPB: **A)** Liposomas compuestos de una bicapa lipídica con un núcleo acuoso [51], **B)** conjugado fármaco-polímero compuesto por una unión covalente entre el fármaco y el polímero [52], **C)** micela polimérica compuesto de copolímeros de bloque anfífilicos [51], y **D)** nanopartícula polimérica compuesto por el fármaco disperso dentro de una matriz de polímero [53].

Específicamente, la unión entre los fármacos y los nanovehículos poliméricos puede estar sujeta a dos tipos de interacciones químicas: i) enlaces covalentes o ii) interacciones supramoleculares (electrostáticas, puentes de hidrógeno, de van der Waals, aromático–aromático, entre otras). La unión por enlaces covalentes tiene la ventaja de proporcionar una fuerte unión entre ambos componentes, pero se necesitan procedimientos de producción y/o mecanismos de liberación más complejos y costosos. Mientras que, las interacciones supramoleculares son deseables debido a su sencillez y potencial escalabilidad industrial. Una estrategia muy prometedora para generar NPs poliméricas que contienen fármacos hidrofílicos consiste en simplemente mezclar dos soluciones acuosas que contienen macromoléculas de carga opuesta (una que contiene el fármaco y la otra que contiene el polímero) a temperatura ambiente. En este caso, el atrapamiento del fármaco está gobernado por un gran número de interacciones iónicas atractivas entre los componentes macromoleculares. Sin embargo, la

estrategia descrita se limita al uso de fármacos poli-iónicos de alto peso molecular [54-57]. En el caso de fármacos HABP, se han propuesto otras estrategias como la congelación de la fase interna de emulsiones múltiples que contienen NPs poliméricas [58], autoensamblaje de NPs que comprenden polímeros modificados químicamente [59] y síntesis de nanocristales derivados de diferentes celulosas [60]. A pesar de que estos intentos permiten retener los fármacos HABP, se evidencian cargas de fármaco muy bajas y/o una liberación muy rápida y descontrolada del activo, con liberaciones iniciales de alrededor del 40 %, **Fig. 4**.

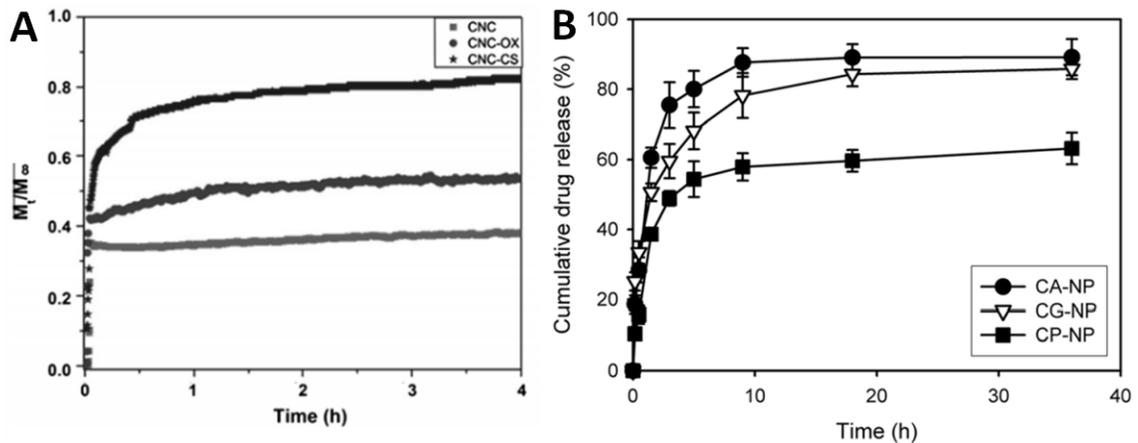


Figure 4. Liberación *in vitro* de fármacos HABP incluidos en nanosistemas siguiendo diferentes estrategias, y propuestos para tratar enfermedades crónicas: **A)** Imipramina a partir de nanocristales derivados de diferentes celulosas (celulosa nativa (CNC), CNC oxidado (CNC-OX) y CNC injertado de oligosacárido de quitosano (CNC-CSOS)) [60], y **B)** ácido cafeico (CA), ácido clorogénico (CG) y cisplatino (CP) a partir de nanocompuestos de fosfato de calcio [61].

Los inconvenientes observados guardan relación con interacciones relativamente débiles con los polímeros, que, junto con la fuerte afinidad de la molécula de interés por el medio (solvente), resulta en una liberación rápida.

También es importante destacar que si bien un gran número (o masa) de excipientes podría permitir un atrapamiento efectivo, también se relaciona con una baja carga de fármaco, lo que dista de ser ideal para sistemas de *drug delivery*. En consecuencia, el atrapamiento supramolecular, y la liberación controlada de fármacos HAP en matrices hidrofílicas, sigue siendo un desafío. Investigaciones recientes demuestran que complejos y nanoestructuras formados/as entre contraiones de fármacos y polímeros con grupos aromáticos presentan altas tasas de atrapamiento del fármaco (a pesar de ser desarrolladas por la simple mezcla de las moléculas en medio acuoso). Esto se debe a la presencia de interacciones iónicas complementadas por interacciones aromático–aromático de corto alcance entre los grupos aromáticos de los constituyentes [62-64].

I.3. Interacciones aromático-aromático como estrategia para el desarrollo de sistemas de *drug delivery*.

Las interacciones no covalentes fármaco-polímero han ganado gran importancia en el diseño y formación de sistemas de administración de fármacos debido a sus múltiples ventajas. Principalmente, las interacciones no covalentes permiten la unión no destructiva entre el fármaco y el polímero, manteniendo inalterables las propiedades farmacológicas y evadiendo posibles efectos toxicológicos que se pueden generar a partir de la modificación química de los mismos [65]. Específicamente, las interacciones aromático–aromático

(conocidas también como apilamiento π - π) son una de las principales fuerzas no covalentes que gobiernan el reconocimiento molecular y la estructura biológica de macromoléculas (**Fig. 5**) [66, 67]. Por lo tanto, se consideran de crucial importancia en muchas áreas de la química, biología molecular y ciencias de los materiales.

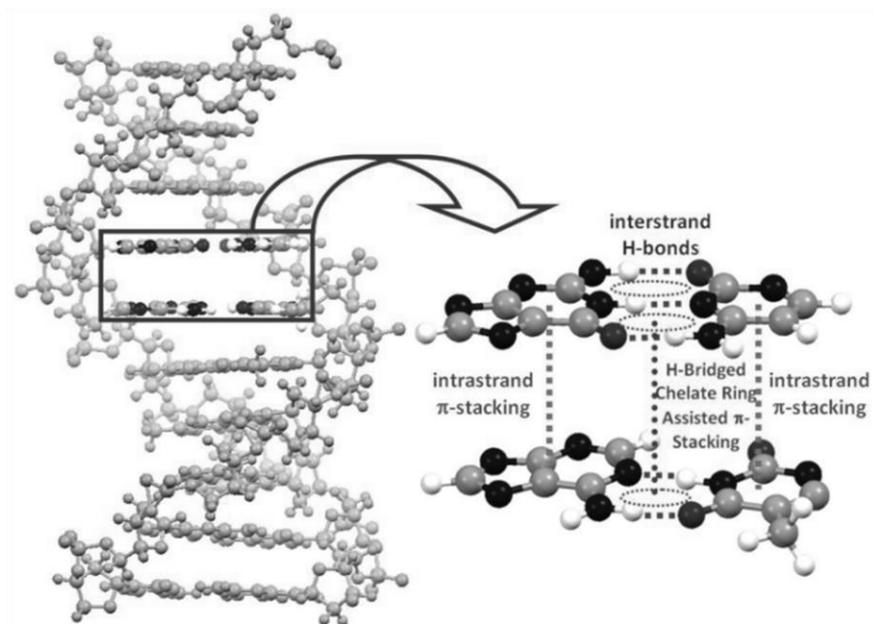


Figura 5. Estabilización de la molécula de ADN mediante el apilamiento π - π entre sus bases nitrogenadas [68].

I.3.1. Naturaleza de las interacciones aromático-aromático.

A principio de la década de 1990 Hunter y Sanders [69] establecieron un modelo ampliamente aceptado que ofrece "reglas básicas" para comprender y anticipar las interacciones aromático-aromático basadas en la competencia de fuerzas electrostáticas y de van der Waals. Los hallazgos establecen que la

densidad electrónica en la mayoría de los anillos aromáticos crea un cuadrupolo con carga negativa parcial sobre ambas caras aromáticas y una carga positiva parcial alrededor de la periferia. Por lo tanto, las interacciones aromático-aromático nacen de la interacción entre la carga originada por la nube electrónica π de un anillo aromático y la carga del esqueleto de enlace σ de una molécula aromática vecina en el medio. Adicionalmente, el proceso de desolvatación es clave en este tipo de interacción, ya que las superficies apolares generan una interacción solvofóbica en medio acuoso. Esto quiere decir que, producto de las interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos, la población de moléculas de agua que se encuentran altamente ordenadas alrededor de un anillo aromático “serán liberadas”, aumentando la entropía del medio. Esta situación se considera energéticamente favorable ya que se liberan una cantidad importante de moléculas de agua que solvatan los anillos aromáticos [70].

En particular, el modelo de Hunter y Sanders establece una distribución de cargas simple que intenta explicar las preferencias geométricas cualitativas para las interacciones entre moléculas aromáticas. De acuerdo con sus investigaciones, en las interacciones aromático-aromático se pueden apreciar tres conformaciones características: i) apilamiento cara a cara (*face-to-face*), ii) apilamiento cara a cara con desplazamiento iii) apilamiento de borde a cara (*edge-to-face* o en T). Otros autores han incluido una cuarta categoría: iv) geometría en forma de Y, donde dos átomos de hidrógeno se dirigen hacia el anillo aromático aceptor [71] (**Fig. 6**). Es importante destacar que las

interacciones aromático-aromático no son las únicas en las que participan moléculas aromáticas. Varias investigaciones han expuesto la participación de anillos aromáticos en interacciones tipo π -catión, π -anión, π -CH, π -NH y π -OH [72].

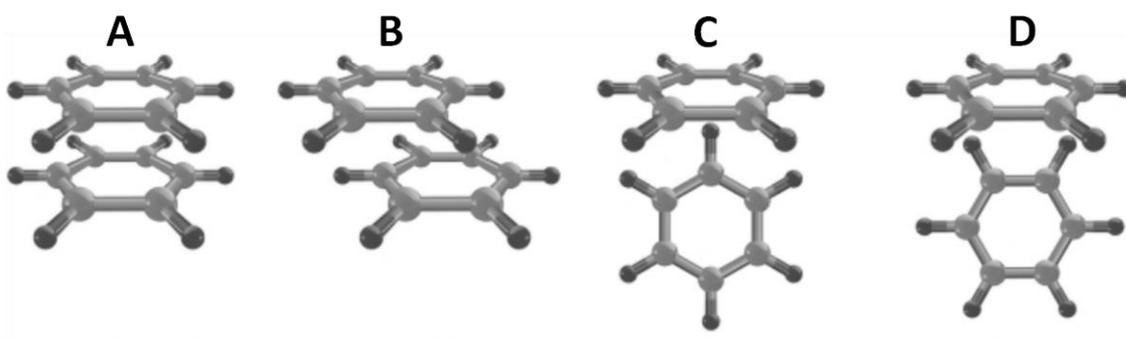


Figura 6. Conformaciones geométricas: **A)** cara-cara, **B)** cara-cara con desplazamiento, **C)** borde-cara (en forma T) y **D)** en forma Y [73].

I.3.2. Uso de las interacciones aromático-aromático en nanomedicina.

Debido a que gran parte de los fármacos comercializados poseen anillos aromáticos, las interacciones aromático-aromático han cobrado un papel importante en el diseño de sistemas de *drug delivery*. Investigaciones demuestran el aprovechamiento de estas interacciones como estrategia para lograr mayores cargas de fármaco en nanosistemas. Por ejemplo, Pei y cols. cargaron doxorubicina y cisplatino, ambos fármacos HABP, en óxido de nanografeno pegilado mediante apilamiento π - π para generar un sistema combinado de quimioterapia. El sistema final demostró ser capaz de aumentar sustancialmente la capacidad de carga de doxorubicina y cisplatino en nanosistemas. Adicionalmente, los ensayos de liberación *in vitro* mostraron que

ambos fármacos se liberaron de manera lenta y controlada desde los nanosistemas desarrollados, con 28.4 % y 29.1 % después de 72 horas, respectivamente [74]. De manera similar, Wang y cols. demostraron que las interacciones aromático–aromático fueron responsables de la alta capacidad de carga de doxorubicina en NPs de quitosano, con una carga de 1 miligramo de doxorubicina por miligramo de NPs, junto con una liberación sostenida a diferentes valores de pH (menos del 10 % a pH 5.5 y menos del 40 % a pH 7.4, durante 50 horas en ambos casos) [75].

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha estudiado el rol de las interacciones aromático-aromático entre algunas moléculas de interés biológico y fármacos HABP, todos ellos catiónicos, hidrofílicos, aromáticos y de bajo peso molecular (azul de metileno [67, 76], clorfenamina maleato [77-79], sales de tetrazolio [80], tetraciclinas [81]) con el polímero hidrosoluble y aromático poli(4-estirensulfonato de sodio), PSS. El PSS es un excipiente aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la hiperkalemia (o hiperpotasemia) [82, 83], y varias investigaciones apuntan a su uso como material de recubrimiento debido a su adecuada biocompatibilidad, no citotoxicidad, no inmunogenicidad y actividad antimicrobiana [84-87]. Interesantemente, en los estudios mencionados se demostró que la interacción entre las moléculas HABP cargadas positivamente y el PSS (cargado negativamente), permite formar complejos solubles cuya fuerza de interacción es significativamente más fuerte en comparación con otros polímeros no aromáticos

(ácido algínico, carboximetilcelulosa y carragenina). En un estudio interesante, se demostró que los complejos formados entre el fármaco HABP clorfenamina (CPM) y el polímero PSS presentan mayor estabilidad en comparación con los polímeros no aromáticos y con carga negativa (ácido algínico, carboximetilcelulosa y carragenina), y donde la interacción entre ambos componentes permanece aún en presencia de una alta concentración de sales (**Fig. 7A**) [78]. El fenómeno descrito se atribuyó a interacciones de corto alcance entre los anillos aromáticos de CPM y PSS, las cuales fueron identificadas mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN- H^1 y NOESY) (**Fig. 7B** y **7C**) [77]. Finalmente, se demostró que la interacción/atrapamiento entre los componentes es mayormente cinética que termodinámica, lo que sugiere una mayor estabilización y una liberación prolongada del fármaco HABP desde la formulación. Estos resultados sustentarían que la presencia de grupos con alta densidad de electrones π y anillos aromáticos, aumentarían las fuerzas de interacción entre el polímero (o nanosistema) y las moléculas HABP, aumentando la capacidad de carga del fármaco y otorgando mayor estabilidad.

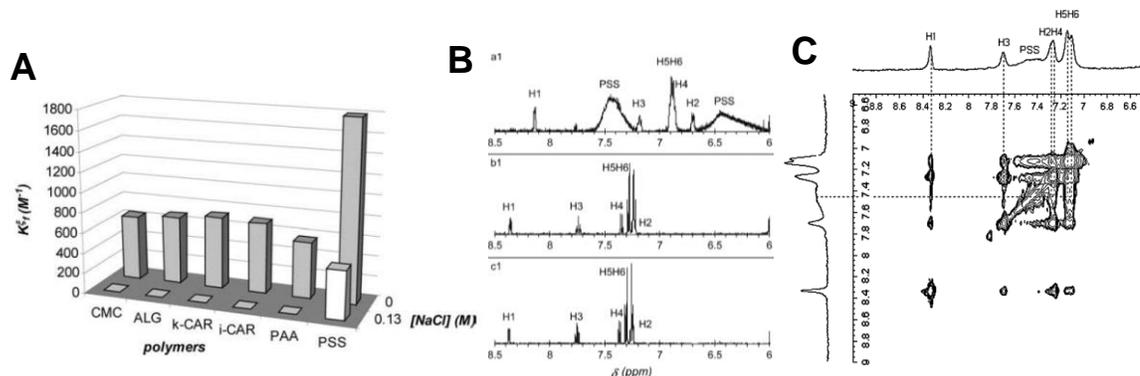


Figura 7. A) Constante de formación de CPM con polímeros no aromáticos y PSS en presencia y ausencia NaCl [78]. **B)** Espectro de RMN- H^1 en la región aromática (6–8 ppm) de CPM [1×10^{-3} M] en presencia de PSS [1×10^{-2} M] y los polímeros no aromáticos poli(2-(N-acrilamida)-2-metilpropansulfonato de sodio) (PAMPS) [1×10^{-2} M] y poli (vinil sulfonato de sodio) (PVS) [1×10^{-2} M]. **C)** Espectro de RMN- H^1 NOESY en la región aromática (6-8 ppm) de CPM [1×10^{-3} M] en presencia de PSS [2×10^{-3} M] y NaCl [5×10^{-2} M]) [77].

Lo anteriormente descrito permite considerar a este tipo de interacciones como una estrategia fisicoquímica para mejorar la estabilización, retención y posterior liberación de fármacos en sistemas poliméricos con características aromáticas.

I.4. Concentración de agregación crítica (cac).

Es conocido que un gran número de moléculas de bajo peso molecular (incluyendo varios fármacos) exhiben un comportamiento coloidal típico en solución acuosa. El proceso se produce de forma natural y espontánea, con interacciones hidrófobas que forman autoagregados a concentraciones suficientemente altas. A esta concentración, a la cual muchos fármacos incluyendo los HABP, las moléculas experimentan autoasociación o autoagregación, y se conoce como “concentración de agregación crítica” (*cac*) [88].

Interesantemente, la autoagregación de fármacos y su comportamiento de unión/interacción con otras especies moleculares, son interesantes y con potenciales aplicaciones farmacológicas. En especial, los sistemas fármaco-tensioactivo se utilizan comúnmente para tratar enfermedades, demostrando tener un efecto aditivo o sinérgico que mejora la eficacia [89]. Recientemente, se han estudiado las interacciones de algunas especies HABP en ausencia y en presencia de aditivos [90, 91]. Sin embargo, y a pesar de que muchos estudios describen la autoagregación de fármacos HABP, solo unos pocos se han centrado en la importancia de esta propiedad en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos. Recientemente, Ahnfelt y cols. investigaron el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP dodecilpiridinio, cetilpiridinio, amitriptilina, clorpromazina y adifenina, con hidrogeles de carga negativa. En particular, encontraron una correlación directa entre la tasa de liberación del fármaco y la concentración de autoagregación del fármaco, que además era dependiente de la concentración de sal en el medio [88, 92]. Resultados similares fueron obtenidos por Al-Tikriti y cols., quienes estudiaron el atrapamiento (a baja fuerza iónica) y la liberación (a alta fuerza iónica) del fármaco tricíclico antidepresivo clorhidrato de amitriptilina con hidrogeles de poliacrilato de sodio [93]. Estos hallazgos proporcionan información valiosa para el diseño de nuevos sistemas de *drug delivery* basados en la capacidad de autoasociación de los fármacos, que hasta donde sabemos, no han sido descritos anteriormente para nanomedicamentos.

Considerando el gran número de fármacos HAP, y el éxito de su asociación con el polímero PSS mediante interacciones aromático-aromático (previamente informado por nuestro grupo de investigación), resulta interesante explorar el efecto de la capacidad de autoagregación de los fármacos HAP sobre el proceso de formación de nanovehículos y la liberación posterior del fármaco.

II. PROPUESTA

La propuesta principal de este trabajo de investigación se basa en estudios previos que demuestran que las moléculas de bajo peso molecular que tienen cargas positivas y grupos aromáticos son capaces de establecer interacciones aromático-aromático con el polímero PSS y otros polielectrólitos aromáticos [76, 78, 80, 94-98]. Potencialmente, esta interacción íntima entre los grupos aromáticos sería clave para la formación de los nanomedicamentos y además controlaría la liberación del fármaco desde el nanosistema hacia medios acuosos. Para este estudio se han seleccionado inicialmente, tres fármacos modelo de interés para terapias crónicas: i) amitriptilina (AMI): antidepresivo de la familia de los tricíclicos [99]; ii) prometazina (PMZ): antihistamínico derivado de la familia de las fenotiazinas [100]; y iii) cloroquina (CQ): antimalárico y antiviral, derivado de la familia de las quinonas [101]. Los fármacos seleccionados AMI, PMZ y CQ son de bajo peso molecular (313-515 Da), hidrofílicos, aromáticos e ionizables (grupos funcionales con carga positiva). El excipiente seleccionado para la formulación es el polímero poli(4-estirensulfonato de sodio) (PSS) que es hidrofílico, aromático y cargado negativamente. Las estructuras moleculares de los fármacos HABP y el polímero PSS se muestran en la **Figura 8**.

La estrategia propuesta permitiría obtener nanomedicamentos que contienen fármacos HABP, a partir de la simple mezcla de dos soluciones acuosas (fármaco

y polímero), cuya formación se basa en la afinidad iónica y se estabiliza mediante interacciones aromático-aromático.

Adicionalmente, el estudio de fármacos HABP con diferentes concentraciones de agregación crítica “cac”, permitirá determinar la influencia de esta propiedad en el desarrollo de los nanomedicamentos propuestos, específicamente en términos del atrapamiento y la posterior liberación de la molécula hacia el medio. Para ello se incorporará al final de esta investigación un cuarto fármaco HABP de interés: clorfenamina (CPM) (**Fig. 8**), un antihistamínico de primera generación que se utiliza en el tratamiento de afecciones alérgicas como la rinitis y la urticaria [102] y que presenta características físico-químicas similares a los fármacos ya seleccionados (hidrofílica, aromática y con carga positiva) pero con menor capacidad de autoasociación. El análisis de los resultados se realizará junto con los resultados de los tres fármacos (AMI, PMZ, CQ) descritos previamente.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de fármacos HABP con relevancia terapéutica, esta propuesta podría ser la base para elaborar una serie de sistemas de administración de fármacos con liberación controlada.

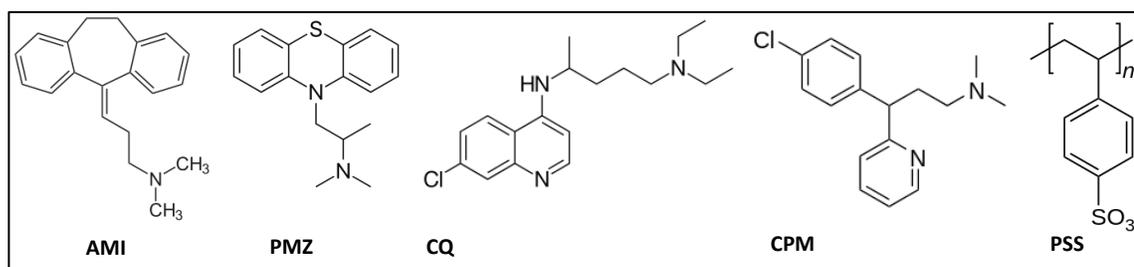


Figura 8. Estructuras moleculares de los fármacos HABP seleccionados: amitriptilina (AMI), prometazina (PMZ), cloroquina (CQ), clorfenamina (CPM) y del polímero aromático poli (4-estirensulfonato de sodio) (PSS).

III. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar nanomedicamentos mediante la mezcla en medio acuoso de los fármacos hidrofílicos, aromáticos y de bajo peso molecular (HABP), y el polímero aromático poli(4-estirensulfonato de sodio) (PSS). Esta estrategia generará nanomedicamentos con bajo índice de polidispersión, alta carga de fármaco y una prolongada liberación de éste.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Diseñar, desarrollar y caracterizar nuevos potenciales nanomedicamentos basados en los fármacos HAPB, y el polímero poli(4-estirensulfonato de sodio), componentes susceptibles de generar interacciones π - π .

IV.2. Objetivos específicos

IV.2.1. Diseñar y desarrollar nanovehículos de los fármacos HAPB con el polímero poli(4-estirensulfonato de sodio) que presenten alta eficiencia de asociación, carga de fármaco y rendimiento.

IV.2.2. Elucidar la naturaleza de las interacciones establecidas y caracterizar el tipo de atrapamiento del fármaco en el nanovehículo (cinético y/o termodinámico).

IV.2.3. Estudiar el perfil de liberación de los nanovehículos utilizando diálisis y aparato de disolución USP 4 y determinar el mecanismo de liberación.

IV.2.4. Estudiar la influencia de la concentración de agregación crítica “cac” en el atrapamiento y liberación de los fármacos HAPB desde los nanosistemas.

V. METODOLOGÍA

V.1. Diseño y desarrollo de los nanovehículos de los fármacos HABP con el polímero poli(4-estirensulfonato de sodio) que presenten alta eficiencia de asociación, carga de fármaco y rendimiento.

V.1.1. Preparación de las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS:

La formación de nanovehículos se exploró mediante el estudio de formulaciones fármaco/polímero a partir de la mezcla directa de los fármacos catiónicos AMI (313.8 g/mol, Sigma Aldrich, USA), PMZ (320.8 g/mol, Sigma Aldrich, USA) y CQ (515.8 g/mol, Sigma Aldrich, USA) con el polímero aniónico PSS (unidad monomérica: 206.2 g/mol, Sigma Aldrich, USA). La concentración de las formulaciones se definió para obtener diferentes relaciones molares = [fármaco catiónico]/[polímero aniónico]. La concentración del polímero PSS fue constante en todas las formulaciones, mientras que la concentración de los fármacos se seleccionó para obtener una relación final entre 0.1 y 1.2. Brevemente, se añadieron 5.0 mL de una solución acuosa que contiene el fármaco catiónico (6.6×10^{-4} - 7.9×10^{-3} M) a 5.0 mL de una solución acuosa que contiene el polímero PSS (6.6×10^{-3} M), ambos a pH 7, temperatura ambiente y bajo agitación continua durante 5 min para permitir una completa estabilización.

V.1.2. Determinación de tamaño, potencial zeta, concentración de nanopartículas y morfología:

Las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS obtenidas se analizaron inicialmente mediante turbidimetría en un espectrofotómetro Agilent 8453 (Agilent, EE. UU.). Se midió la absorbancia de las formulaciones en una longitud de onda ($\lambda = 650 \text{ nm}$) en la que ninguno de los dos compuestos (fármaco y polímero) absorbiera. El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanoformulaciones se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y anemometría láser Doppler (LDA) utilizando un ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido). La determinación de la concentración de nanopartículas se realizó en un NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras se diluyeron de 5 a 10 veces con agua Milli-Q para lograr un rango de concentración óptimo para la medición (10^7 - 10^9 partículas/mL). Un mínimo de cinco videos (un minuto cada uno) capturaron el movimiento browniano de las partículas. Posteriormente, los videos fueron analizados para determinar la distribución de tamaño y la concentración de partículas utilizando el software NTA v3.0 (Malvern, Reino Unido). La caracterización morfológica se realizó en un microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM), modelo Inspect F-50 (FEI, Holanda). Las imágenes STEM se obtuvieron agregando una gota ($20 \mu\text{L}$) de la formulación a una rejilla de cobre (malla 200, cubierta con Formvar) durante 2 minutos, luego se retiró la gota con papel de filtro evitando que el papel toque la rejilla, luego se lavó la rejilla dos veces con una gota de

agua Milli-Q durante 1 minuto y se retiró la gota con papel de filtro. Posteriormente, la muestra se tiñó con una solución de ácido fosfotúngstico al 1% (p/v) agregando una gota de esta solución a la rejilla durante 2 minutos y luego retirándola con papel de filtro. Finalmente, la rejilla se secó a temperatura ambiente durante al menos 1 h antes de ser analizada.

V.1.3. Estudios de estabilidad:

La estabilidad de las nanoformulaciones se evaluó en términos del diámetro hidrodinámico y potencial zeta en presencia de sal, variaciones de pH, variaciones de temperatura, procesos de liofilización y reconstitución, y en función del tiempo utilizando un ZetaSizer NanoZS. La concentración de sal en el medio (NaCl entre 0–200 mM) fue controlada con un titulador automático (MPT-2, Malvern Instruments, Reino Unido). Para las variaciones de pH (entre 2 y 10), se seleccionaron soluciones de HCl (0.25-0.01 M) y NaOH (0.25-0.01 M) y su concentración en el medio fue controlada con el titulador automático. La temperatura de las formulaciones se modificó directamente en el instrumento ZetaSizer NanoZS (20-50 °C, con un tiempo de equilibrio térmico de 15 minutos) para cada medición de diámetro hidrodinámico y potencial zeta. Para los estudios de liofilización y reconstitución, se congeló 2 mL de cada formulación seleccionada (AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS) a -20 °C con el crioprotector trehalosa (5 % y 10 %). El proceso de liofilización se realizó en el equipo de liofilización FreeZone 1 (Labconco, USA) con una bomba de alto vacío (50 mTorr)

durante 24 h. Las formulaciones liofilizadas fueron reconstituidas añadiendo 2 mL de agua Milli-Q, seguido por agitación en vórtex. Finalmente, se logró determinar la variación de diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las formulaciones en períodos determinados de tiempo.

V.1.4. Determinación de los parámetros de asociación:

La eficiencia de asociación (% EA) se determinó indirectamente cuantificando el fármaco que no interactúa con los componentes de la formulación, es decir, que está libre en el medio. La separación entre las nanoformulaciones y el fármaco libre en el medio se realizó mediante ultrafiltración utilizando tubos Vivaspin 6 (MWCO 3 KDa, 5000 G x 40 min). La cuantificación se realizó por espectroscopía UV-vis (espectrofotómetro Agilent 8453, USA) para determinar la concentración no asociada de los fármacos AMI ($\lambda = 239$ nm), PMZ ($\lambda = 250$ nm) y CQ ($\lambda = 343$ nm). La curva estándar de AMI en agua fue lineal ($R^2 > 0.997$) en el rango de concentraciones entre 7×10^{-5} M y 7×10^{-7} M (el coeficiente de extinción molar fue $12712 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La curva estándar de PMZ en agua fue lineal ($R^2 > 0.999$) en el rango de concentraciones entre 3.5×10^{-5} M y 5×10^{-6} M (el coeficiente de extinción molar fue $24921 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La curva estándar de CQ en agua fue lineal ($R^2 > 0.995$) en el rango de concentraciones entre 4×10^{-5} M y 3×10^{-6} M (el coeficiente de extinción molar fue $30449 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La eficiencia de asociación (% EA) se determinó de la siguiente forma:

$$\% EA = \frac{[\text{de fármaco inicial}] - [\text{de fármaco no ligado}]}{[\text{de fármaco inicial}]} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Posteriormente se determinó la carga de fármaco o *drug loading* (% p/p) dividiendo la masa de fármaco asociado en la formulación por la masa total de los nanosistemas. Para el cálculo de la masa total de las NPs se liofilizaron 2 mL de cada formulación en viales de vidrio, que se masaron antes de agregar la formulación y después de la liofilización para evaluar la masa sólida total (viales de vidrio + formulación). El rendimiento y la carga se calcularon de la siguiente forma:

$$\% Carga = \frac{\text{masa de fármaco asociado}}{\text{masa de NPs (experimental)}} \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$\% Rendimiento = \frac{\text{masa de NPs (experimental)}}{\text{masa de NPs (teórica)}} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

V.2. Elucidación la naturaleza de las interacciones establecidas y caracterización del tipo de atrapamiento del fármaco en el nanovehículo (cinético y/o termodinámico).

V.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN):

Los análisis de RMN se realizaron en D₂O en un equipo AVANCE300 (Bruker, EE. UU.), utilizando tubos de vidrio de 5 mm de diámetro (volumen de

solución típicamente de 0.7 mL). Las concentraciones seleccionadas para los experimentos de RMN-¹H y NOESY fueron [fármaco] = 1×10^{-3} M y [PSS] = 1×10^{-2} M; para ello se liofilizó un volumen de 750 μ L de cada compuesto y se reconstituyó en D₂O antes de los análisis. Finalmente, todos los espectros obtenidos fueron analizados con el software MestReC 4.7.

V.2.2. Estudios de diafiltración:

A fin de estudiar y caracterizar las interacciones presentes en las formulaciones obtenidas a distintas relaciones molares entre 0.1-1.2 (AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS) se realizaron estudios de diafiltración según el método descrito por Moreno-Villoslada y cols. [76, 78-81, 94-98].

Para este objetivo, la diafiltración se ha modelado como un sistema de dos compartimentos donde se mantiene un suministro continuo de líquido desde la cámara del donante (depósito), manteniendo un volumen constante dentro de la celda de diafiltración. La unidad utilizada para los análisis de diafiltración consistió en una celda de diafiltración (10 mL, Amicon 8010), una membrana de celulosa regenerada (MWCO 5000 Dalton, Merck, Alemania), un depósito, un selector y una fuente de presión (Merck-Millipore, Alemania) (**Figura A1**, ver **Anexo 1**). Para los experimentos se agregaron alícuotas de 10 mL de las formulaciones a la celda de diafiltración y luego se filtraron a 3 bar de presión y bajo agitación magnética. El volumen en la celda de filtración se mantuvo constante durante el experimento, creando un flujo continuo de líquido (agua Milli-Q, pH 7) a través de

la celda de diafiltración, desde el depósito hasta el tubo colector. Finalmente, un total de 8 muestras filtradas (lavadas) son recolectadas (≈ 5 mL) y la concentración de cada fármaco (AMI, PMZ y CQ) en cada muestra se determinó mediante espectrofotometría UV-vis (espectrofotómetro Agilent 8453, USA).

En general, la teoría para la diafiltración considera que dentro de la celda de diafiltración se pueden diferenciar tres estados del fármaco HABP: i) fármaco HABP libre en solución (sin interactuar con la formulación), ii) fármaco HABP con unión al polímero dependiente de equilibrios termodinámicos (atrapamiento termodinámico), y iii) fármaco HABP con unión al polímero independiente de equilibrios termodinámicos (atrapamiento cinético) (**Figura A2**, ver **Anexo 1**). En ese sentido, siguiendo el método descrito previamente [76, 78-81, 94-98], fue posible determinar el tipo de atrapamiento (termodinámico “TB” y/o cinético “KB”), y en consecuencia la eficiencia de asociación (EA) mediante el análisis de los parámetros y el uso de las ecuaciones descritas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Parámetros descritos para la técnica de diafiltración según el modelo propuesto por Moreno-Villoslada y cols. Los parámetros j_0 y u_0 , corresponden a los experimentos blancos (fármaco HABP en ausencia de polímero).

Parámetro	Descripción	Ecuación
C_{HABP}^{libre}	Concentración de fármaco HABP libre en la celda de diafiltración	$C_{HABP}^{filtrado}$
$C_{HABP}^{filtrado}$	Concentración de fármaco HABP en el filtrado	$C_{HABP}^{filtrado-inic} e^{-jF}$
$C_{HABP}^{unida\ en\ eq.}$	Concentración de fármaco HABP unida a la formulación mediante equilibrio termodinámico	$C_{HABP}^{celda-inic} (j_0 - j/j_0) v e^{-jF}$
F	Factor de diafiltración: fracción de filtrado	Volumen ^{filtrado} /Volumen ^{celda}
j	Fuerza de las interacciones presentes entre el fármaco HABP y la formulación	Pendiente de la curva: $Ln C_{HABP}^{filtrado}$ vs. F
v	Fracción de fármaco HABP unida a la formulación dependiente del equilibrio	$\frac{< C^{filtrado\ inic} > \Delta F}{C^{celda\ inic} [1 - e^{j\Delta F}]}$
u	Fracción de fármaco HABP unida a la formulación (u otro componente de la celda) independiente del equilibrio	$1 - v$
K_{dis}	Constante de disociación aparente	$j/(1 - j) \leq K_{dis} \leq j_0 j / j_0 - j$
% TB	Control termodinámico (dependiente del equilibrio)	$v(j_0 - j)/j$
% KB	Control cinético (independiente del equilibrio)	$u - u_0$
% EA	Eficiencia de asociación	% TB + % KB

V.3. Estudio del perfil de liberación de los nanovehículos utilizando diálisis y aparato de disolución USP 4 y determinación del mecanismo de liberación.

V.3.1. Diálisis convencional:

Los estudios de liberación *in vitro* de los fármacos seleccionados (AMI, PMZ y CQ) fueron analizados inicialmente por diálisis convencional. En resumen, se transfirieron 5 mL de las formulaciones seleccionadas AMI/PSS ([fármaco]/[polímero]= 0.6 y 0.8), PMZ/PSS ([fármaco]/[polímero]= 0.6 y 0.8) y CQ/PSS ([fármaco]/[polímero] = 0.4) a una membrana de diálisis SnakeSkin® (MWCO 10 KDa, ThermoScientific, USA). La membrana que contenía las nanoformulaciones se sumergió en 95 mL de medio de liberación (agua Milli-Q a pH 7), y se mantuvo a 37 °C y 100 rpm en un agitador orbital (LSI-3016R, LabTech, Daihan LabTech, Kyonggi-Do, Korea). Una alícuota de 500 µL del medio de liberación fue tomado a determinados intervalos de tiempo (hasta 20 días) y reemplazado con un volumen igual de medio fresco. La cantidad de fármaco liberado se determinó midiendo la absorbancia de cada alícuota a las longitudes de ondas seleccionadas (AMI, $\lambda = 239$ nm; PMZ, $\lambda = 250$ nm; y CQ, $\lambda = 343$ nm) en un espectrofotómetro UV-vis (Agilent 8453, EE. UU.). Se realizaron experimentos blancos con los fármacos libres en solución bajo las mismas condiciones. Finalmente, se construyeron las curvas de liberación “% de fármaco HABP liberado *versus* Tiempo”.

V.3.2. Celda de flujo continuo aparato USP 4:

Cada formulación fue evaluada utilizando un equipo de disolución Aparato USP 4 (Sotax CE 6, Sotax AG, Suiza). Para ello, se transfirieron 5 mL de las nanoformulaciones seleccionadas AMI/PSS ([fármaco]/[polímero] = 0.6 y 0.8), PMZ/PSS ([fármaco]/[polímero]= 0.6 y 0.8) y CQ/PSS ([fármaco]/[polímero] = 0.4) a una membrana de diálisis SnakeSkin® (MWCO 10 KDa, ThermoScientific, USA). La membrana que contiene las nanoformulaciones se sumergió en la celda de flujo continuo de 12.5 mL de capacidad. El equipo de disolución se operó en configuración cerrada, con 250 mL de agua Milli-Q (pH 7) como medio de disolución a 37 °C y con un flujo de 4 mL/min aproximadamente. El experimento se llevó a cabo en un periodo de 6 horas, durante los cuales se extrajeron alícuotas (500 µL) de la solución cada 30 minutos y se reemplazaron con un volumen igual de medio de liberación [103-105]. Posteriormente, la cantidad de fármaco liberado se determinó midiendo la absorbancia de cada alícuota a las longitudes de ondas seleccionadas (AMI, $\lambda = 239$ nm; PMZ, $\lambda = 250$ nm; y CQ, $\lambda = 343$ nm) en un espectrofotómetro UV-vis (Agilent 8453, EE. UU.). Finalmente, se construyeron las curvas de liberación “% de fármaco HABP liberado *versus* Tiempo”.

V.3.3. Determinación del mecanismo de liberación:

Para identificar el mecanismo de liberación (tanto en diálisis como en los datos del aparato USP 4), se evaluó el ajuste de los datos a distintos modelos matemáticos (*i.e.* orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas) utilizando el programa *DDSolver* [106]. El coeficiente de determinación (R^2), el criterio de información Akaike (AIC) y el criterio de selección de modelo (MSC) fueron los parámetros evaluados para seleccionar el mejor ajuste de los datos [104].

V.4. Estudio de la influencia de la concentración de agregación crítica “cac” en el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP desde los nanosistemas.

Para corroborar la capacidad de autoasociación de los fármacos HABP, se estudió la autoagregación del fármaco AMI mediante RMN. Para ello, los análisis se realizaron en D_2O en un equipo AVANCE400 (Bruker, EE. UU.), utilizando tubos de vidrio de 5 mm de diámetro (volumen de solución típicamente de 0.7 mL) en colaboración de la Universidad de Santiago de Chile. Siguiendo el método descrito por Laplante y cols. [107], se realizaron espectros a diferentes concentraciones (1 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 50 μM y 100 μM), los cuales fueron analizados con el software MestReC 4.7.

Posteriormente, con el fin de determinar la influencia de la *cac* en el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP en la matriz polimérica, se incorporó (exclusivamente para el desarrollo de este objetivo) una cuarta molécula HABP [clorfenamina maleato (CPM)], con *cac* superior a las previamente estudiadas (**Tabla 2**) y se desarrolló un estudio comparativo del atrapamiento y liberación de los fármacos en función de las diferentes *cac*. Adicionalmente, con el fin de evitar falsas interpretaciones, se consideraron sólo aquellos fármacos HABP que al pH de trabajo (pH 7) poseen una sola carga positiva (AMI y PMZ) de manera similar a CPM.

Tabla 2. Algunos parámetros fisicoquímicos de los fármacos HABP seleccionados.

Fármacos	pKa	Polarizabilidad (Å ³)	Coefficiente de partición teórico (<i>log P</i>)	Concentración de agregación crítica (<i>cac</i>) (mM)
Amitriptilina	9.7	35.25	4.81	36
Prometazina	9.1	34.15	4.29	36
Clorfenamina	4.0 y 9.4	31.55	3.58	69.5

Considerando que los complejos AMI/PSS y PMZ/PSS han sido estudiados en los primeros objetivos de este trabajo, en esta sección nos concentraremos en explorar la formación de nanosistemas con CPM (390.9 g/mol, Sigma Aldrich, USA) y comparar los resultados obtenidos con los nanosistemas previamente desarrollados. Para la cuantificación de CPM, se determinó la absorbancia a $\lambda = 262$ nm. La curva estándar en agua fue lineal ($R^2 > 0.999$) en el rango de

concentraciones entre 1.4×10^{-4} M y 2×10^{-5} M (el coeficiente de extinción molar fue $5781 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Interpretación estadística de los resultados: los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* RStudio. Para determinar qué resultados son significativamente diferentes ($p\text{-value} < 0.05$) se utilizó el *t-test* para comparaciones entre los grupos de datos

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Diseño y desarrollo de los nanovehículos de los fármacos HABP con el polímero poli(4-estirensulfonato de sodio) que presenten alta eficiencia de asociación, carga de fármaco y rendimiento.

VI.1.1. Desarrollo de las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS:

Las formulaciones fármaco/polímero (AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS) se sintetizaron como se describe en la sección V.1. mediante la mezcla simple de dos soluciones acuosas (una que contiene al fármaco y otra que contiene al polímero) a temperatura ambiente. Las variables de las mezclas se exploraron en función de distintas relaciones molares entre los fármacos catiónicos AMI, PMZ y CQ con el polímero polianiónico aromático PSS. Para ello, se variaron las concentraciones de los fármacos entre 3.3×10^{-4} y 4.0×10^{-3} M, mientras que la concentración del PSS se mantuvo constante a 3.3×10^{-3} M. Una vez mezcladas las soluciones, se evidenció un comportamiento visual diferente en las distintas formulaciones, y que van desde disoluciones, pasando por suspensiones coloidales y llegando hasta la formación de precipitados (**Fig. 9A-C**). Con el fin de caracterizar los sistemas obtenidos, cada formulación se analizó en un espectrofotómetro UV-vis a $\lambda = 650$ nm (longitud de onda donde ninguno de los componentes absorbe individualmente); la absorbancia alcanzada, y que se mantiene estable en el tiempo, es una medida directa de la turbidez de los sistemas, y por ende, de la formación y/o presencia de nanopartículas estables

en las formulaciones. En la **Figura 9D** se presenta la absorbancia obtenida en función de la relación molar [fármaco]/[polímero], en ella es posible distinguir las tres tendencias (y que se correlacionan claramente con las **Fig. 9A-C**): una primera zona de "ausencia de turbidez" (absorbancia cercana a cero) atribuible a la ausencia de interacciones y/o presencia de complejos solubles; una segunda zona de "turbidez y ausencia de precipitados" (apreciable por un aumento de la absorbancia) que podrían obedecer a la presencia de estructuras coloidales estables en el medio; y, finalmente, una tercera zona de "turbidez y presencia de precipitados" (disminución de la absorbancia) que es atribuible a la desestabilización del comportamiento coloidal. El comportamiento descrito, se presenta para las tres HABP analizadas. Sin embargo, y a pesar de que en los tres fármacos estudiados se puede apreciar la misma tendencia, las relaciones molares en las que se distinguen las "tres zonas" presentan ciertas variaciones, lo cual se puede atribuir a las diferencias estructurales entre los fármacos y que influenciarían su perfil de interacción con el polímero.

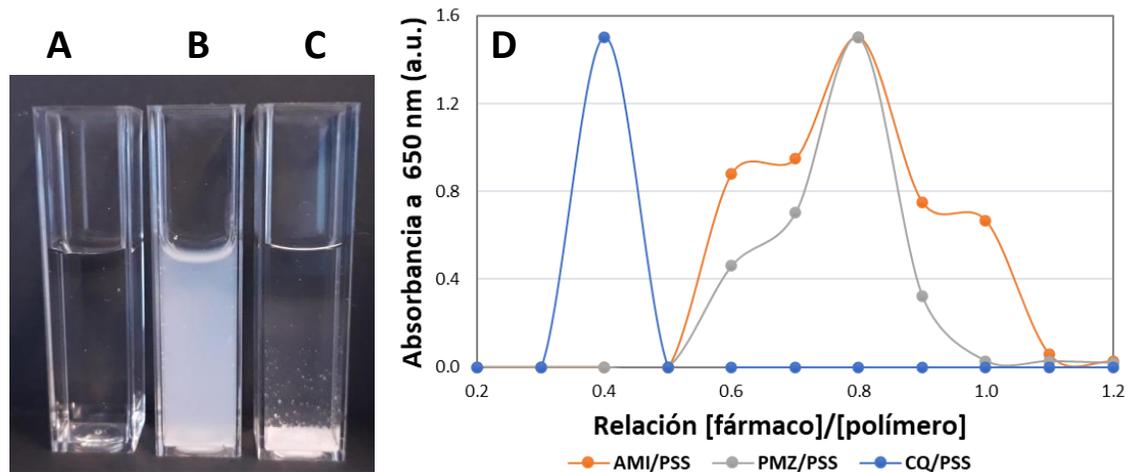


Figura 9. Imagen visual representativa: **A)** complejos solubles y/o ausencia de interacciones, **B)** sistemas coloidales, y **C)** precipitados. **D)** turbidimetría de los complejos AMI/PSS (línea naranja), PMZ/PSS (línea gris) y CQ/PSS (línea azul) en relación molar entre 0.1 hasta 1.2.

Interesantemente, la formación de sistemas coloidales mediados por interacciones electrostáticas se evidencia frecuentemente entre dos moléculas de alto peso molecular (o polielectrolitos) de cargas opuestas. De manera contraria, cuando un polielectrolito (como el PSS) y una molécula de bajo peso molecular (como los fármacos HABP) de cargas opuestas se encuentran en solución, no se espera la formación de sistemas coloidales. Esto de acuerdo con la teoría de Manning, donde se indica que la interacción entre iones y polielectrolitos de carga complementaria es “sitio no-específica”. Por lo tanto, durante la interacción, ambas especies conservan su esfera de hidratación y los contraiones pueden moverse libremente a lo largo de la cadena del polielectrolito [97, 108]. En ese sentido, este tipo de interacciones (electrostáticas de largo alcance), no son adecuadas para la formación de sistemas de administración de fármacos debido a que son altamente sensibles a la presencia de sales, cambios

en el pH, entre otros [78, 79] y que afectarían la estabilidad y el perfil de cesión del fármaco desde la formulación. Interesantemente, la presencia de turbidez evidenciada entre el polímero aromático (PSS) y los fármacos HABP (AMI, PMZ y CQ) sugiere la formación de partículas coloidales que pudieran corresponder a nanovehículos fármaco-polímero. Por otra parte, en la **Figura 9D** también se evidencia que el punto de máxima agregación o "colapso" de las formulaciones $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] < 1$ (0.8 para AMI/PSS y PMZ/PSS, y 0.4 para CQ/PSS). En general, este punto crítico en complejos interpoliméricos ocurre en sistemas donde la carga electrostática total tiende a cero y la relación de carga es cercana a 1 [109, 110]. El comportamiento general observado sugiere la presencia de interacciones adicionales que estarían promoviendo la formación, estabilización y colapso de los sistemas y/o formulaciones. La determinación de las interacciones presentes en los sistemas en estudio será abordada en la sección VI.2.

VI.1.2. Determinación de tamaño, potencial zeta, concentración de nanopartículas y morfología:

Con el fin de caracterizar los coloides obtenidos, se procedió a determinar el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersión (PDI) de las formulaciones mediante DLS, y el potencial zeta mediante LDA. Como puede verse en la **Figura 10**, la formación de NPs se produce en rangos muy estrechos de relaciones $[\text{fármaco}]/[\text{polímero}]$ y se correlaciona de buena manera con el análisis

turbidimétrico. En el caso de las formulaciones AMI/PSS y PMZ/PSS, la formación de NPs ocurre a partir de relaciones [fármaco]/[polímero] de 0.6 a 0.8 (120-180 nm), con bajo Pdl (de 0.20-0.36) y potencial zeta negativo (desde -40 mV a -60 mV). Los valores obtenidos de potencial zeta (en términos absolutos) dan cuenta de la alta estabilidad de las formulaciones. Además, es posible observar un aumento en el tamaño de las NPs a medida que aumentan las relaciones [fármaco]/[polímero] lo cual puede obedecer a una mayor inclusión del fármaco en el sistema. Los sistemas CQ/PSS se obtienen en una relación [fármaco]/[polímero] específica significativamente menor (igual a 0.4), con un tamaño hidrodinámico de 169 nm, índice de polidispersión de 0.20 y potencial zeta de -47 mV. La presencia de NPs CQ/PSS exclusivamente en relaciones [fármaco]/[polímero] = 0.4, difiere al comportamiento observado en las formulaciones AMI/PSS y PMZ/PSS, donde la formación de NPs se evidencia en puntos más cercanos a la electroneutralidad y en un rango más amplio ([fármaco]/[polímero] = 0.6 a 0.8). Lo anterior podría explicarse en términos de las propiedades fisicoquímicas de la CQ [111]. A diferencia que AMI y PMZ, al pH de trabajo CQ es una base débil diprotonada (pK_{a1} : 8.4 y pK_{a2} : 10.3), favoreciendo la interacción entre los dos átomos protonados del fármaco y el polímero aniónico (carga positiva 2:1 carga negativa), lo que concluye en la formación de NPs en menores relaciones [fármaco]/[polímero]. Nótese que si se normaliza la formación de NPs en términos de carga (carga positiva 1:1 carga negativa), la formación de NPs CQ/PSS se desplaza a relación 0.8.

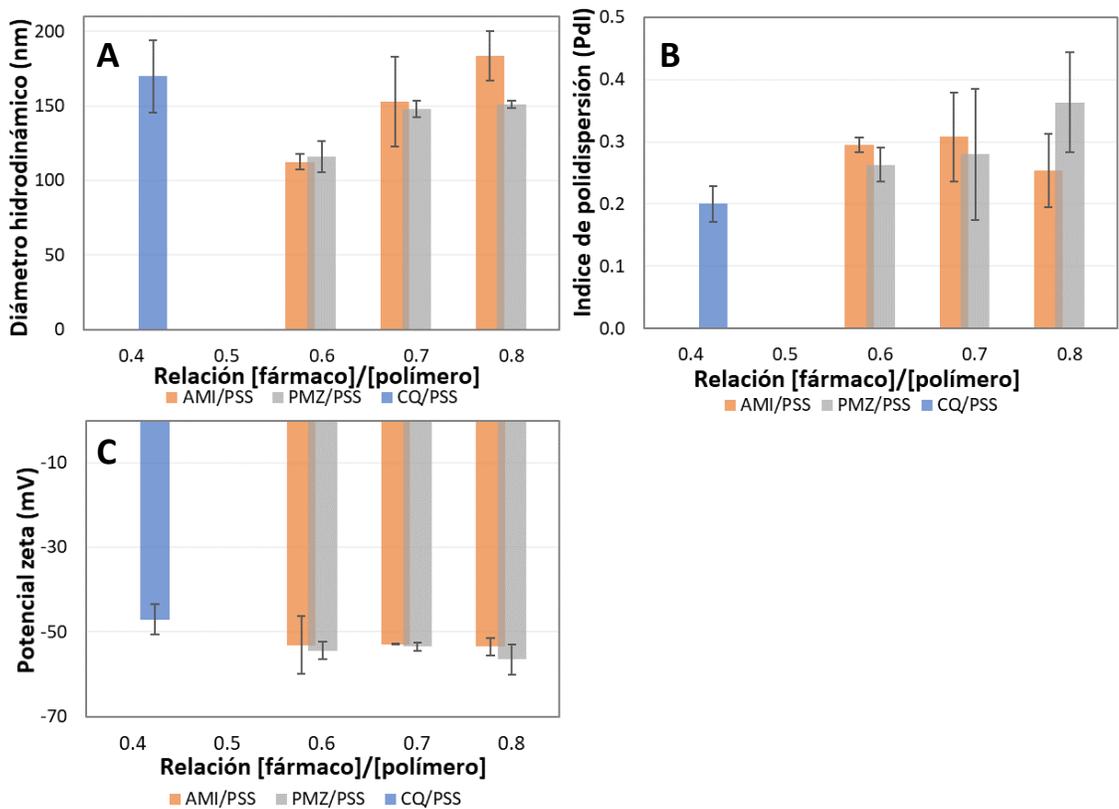


Figura 10. Representación gráfica de: **A)** diámetro hidrodinámico (nm), **B)** índice de polidispersión y **C)** potencial zeta (mV) de las NPs AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) y CQ/PSS (azul) (promedio \pm d.e., n = 3).

Con el propósito de estudiar la relación entre la concentración de los componentes y el número de NPs obtenidas (NPs/mL), se seleccionó la técnica de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). El método consiste en la determinación del coeficiente de difusión de cada partícula, el cual se registra en un video de 60 segundos [112]. Para la presente investigación fueron capturados un total de 3 videos para cada formulación. Los resultados obtenidos se aprecian en la **Figura 11**, y se aprecia que el número de NPs formadas se mantuvo en el rango de 2.6×10^{10} - 15.1×10^{10} NPs/mL para las formulaciones de AMI/PSS (**Fig.**

11A), de 1.2×10^{10} - 11.4×10^{10} NPs/mL para las formulaciones de PMZ/PSS (Fig. 11B) y de 0.9×10^{10} - 6.6×10^{10} NPs/mL para las formulaciones de CQ/PSS (Fig. 11C). Es interesante destacar que en la **Figura 11** se observa una relación directa entre la concentración de las NPs y la turbidez observada por espectrofotometría, corroborando que un sencillo análisis de turbidimetría (absorbancia en el rango visible) puede ser considerado como una medida proporcional de la concentración de NPs en las formulaciones. La información anterior es de gran utilidad ya que, en ausencia del equipo NTA, un simple análisis de absorbancia podría usarse como un parámetro relativo a la concentración de las NPs.

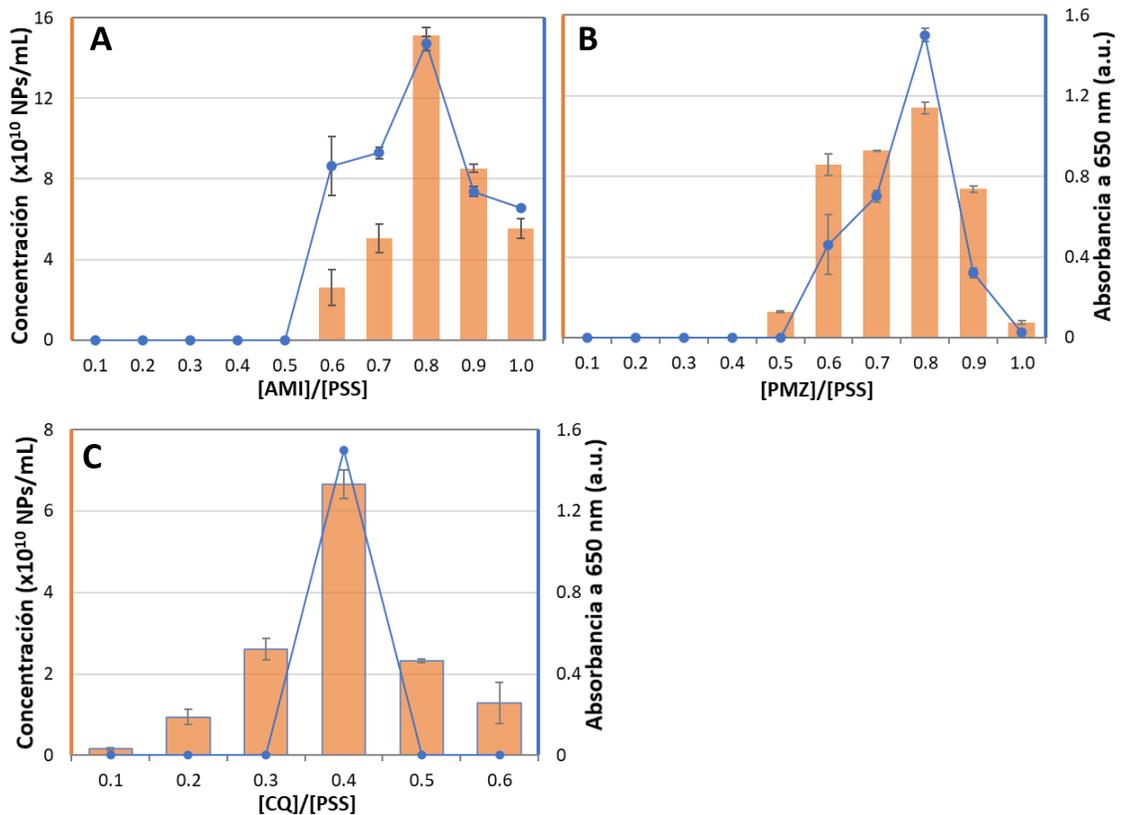


Figura 11. Concentración en NPs/mL (columna naranja) y turbidimetría expresada en unidades de absorbancia a 650 nm (línea azul) para las formulaciones: **A)** AMI/PSS, **B)** PMZ/PSS, y **C)** CQ/PSS (promedio \pm d.e., n=3).

El análisis de rastreo de partículas (NTA) también sirve para determinar el tamaño de las NPs. En este sentido, los tamaños obtenidos por NTA no difieren significativamente de los obtenidos por DLS ($p\text{-value} > 0.05$, **Fig. 12**). La similitud observada permite inferir una alta homogeneidad de las muestras, ya que para el ensayo de NTA se utiliza un volumen muy pequeño de la formulación (~56 picolitros). Pequeños cambios en el número de partículas por cuadro pueden conducir a grandes diferencias en los resultados del análisis [113, 114].

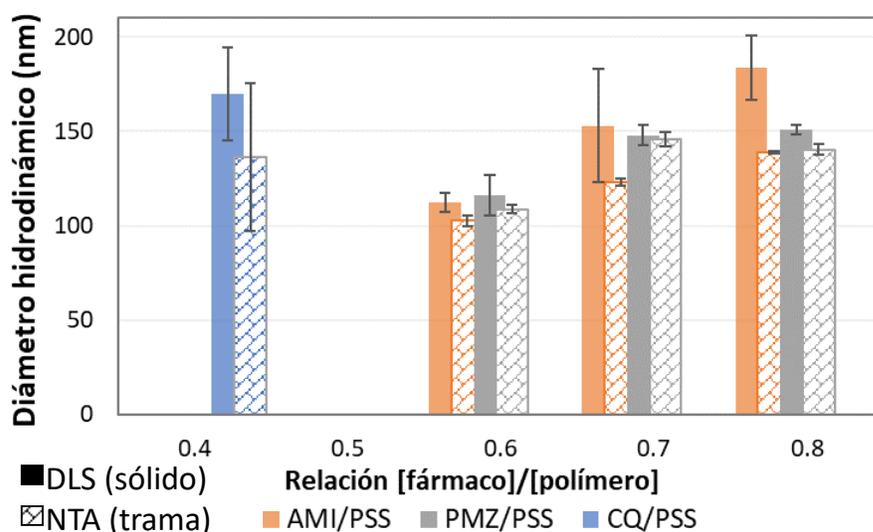


Figura 12. Diámetro hidrodinámico de las NPs AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) y CQ/PSS (azul), mediante DLS (relleno sólido) y NTA (trama) ($p\text{-value} > 0.05$, promedio \pm d.e, n=3).

Para complementar los estudios de caracterización, se analizó la morfología de las NPs mediante STEM. Como se observa en la **Figura 13**, las NPs muestran una forma esférica y un tamaño para AMI/PSS de 125.1 ± 15.2 nm, para PMZ/PSS de 123.4 ± 7.4 nm y para CQ/PSS de 115.1 ± 14.4 nm, magnitudes que son similares a las reportadas por DLS y NTA. Interesantemente, en estudios

similares, los tamaños de las NPs observadas en STEM suelen ser más pequeños que en DLS, esto debido a que se pierde el agua durante el proceso de secado en la preparación de la muestra. La similitud de tamaños observada (STEM *versus* DLS *versus* NTA) podría reflejar la baja cantidad/ausencia de moléculas de agua en el interior de las NPs estudiadas. Adicionalmente, es interesante observar que las micrografías obtenidas sugieren que las NPs estudiadas estarían compuestas por subunidades, y las que se asociarían para formar las estructuras de mayor tamaño. En este sentido destacamos que las formulaciones también presentan patrones de agregación similares a los descritos en los modelos de agregación *cluster-cluster* [115]. Este comportamiento es típico de las suspensiones coloidales [116] y puede interpretarse como el resultado de la disminución de las fuerzas repulsivas entre las subunidades formadoras de NPs (según la teoría del DLVO) [117]. El tipo de agregación descrito no solo se observa en la formación de NPs, sino que también se logra apreciar cuando se obtienen macroprecipitados ([fármaco]/[polímero] = 1.2 en el caso de AMI/PSS y PMZ/PSS, y [fármaco]/[polímero] 0.6 para CQ/PSS) como se muestra en la **Figura 14**.

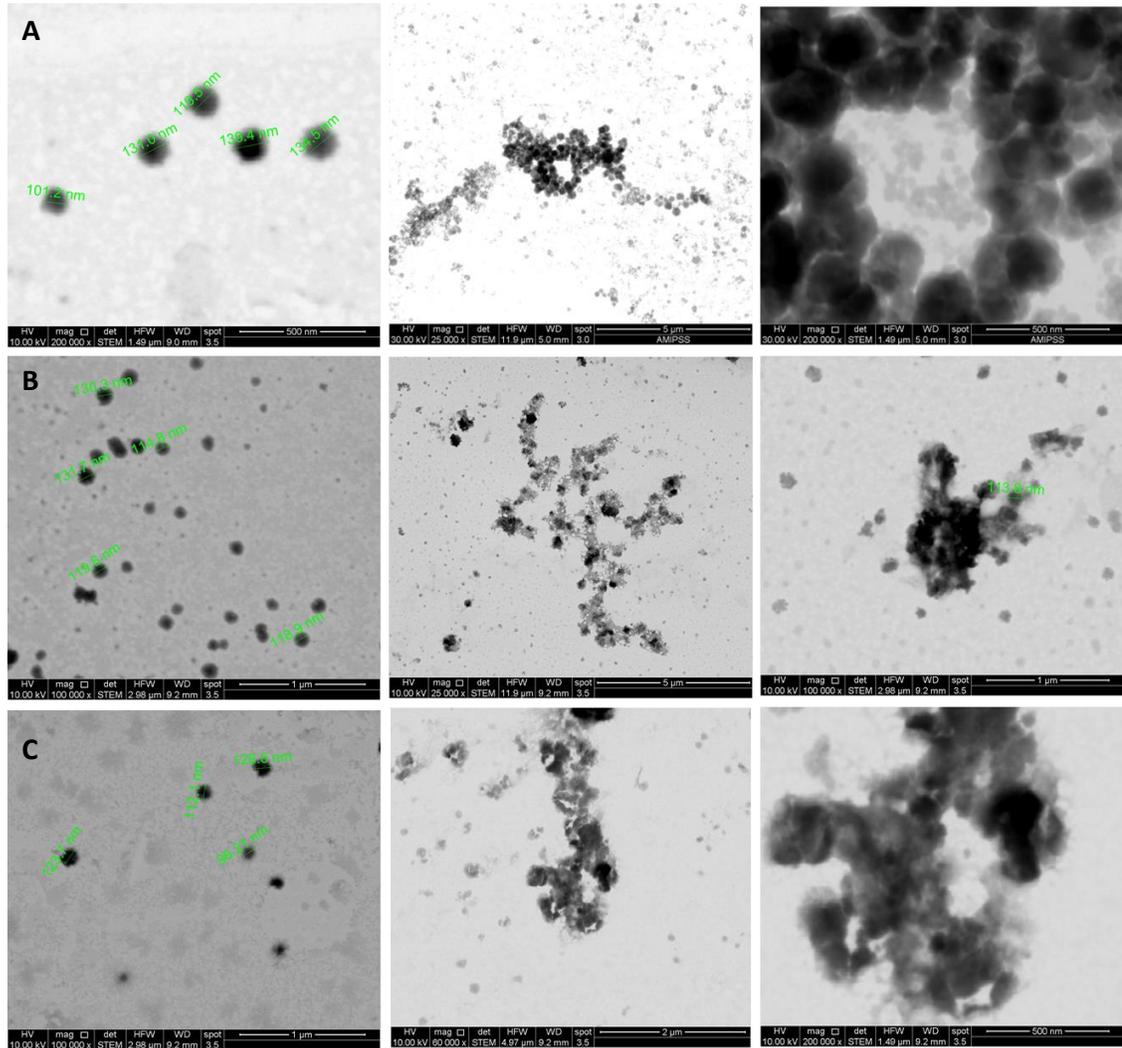


Figura 13. Micrografías STEM para las NPs: **A)** AMI/PSS 0.6, **B)** PMZ/PSS 0.6, y **C)** CQ/PSS 0.4 (las micrografías para cada NP corresponden a diferentes regiones en la misma muestra).

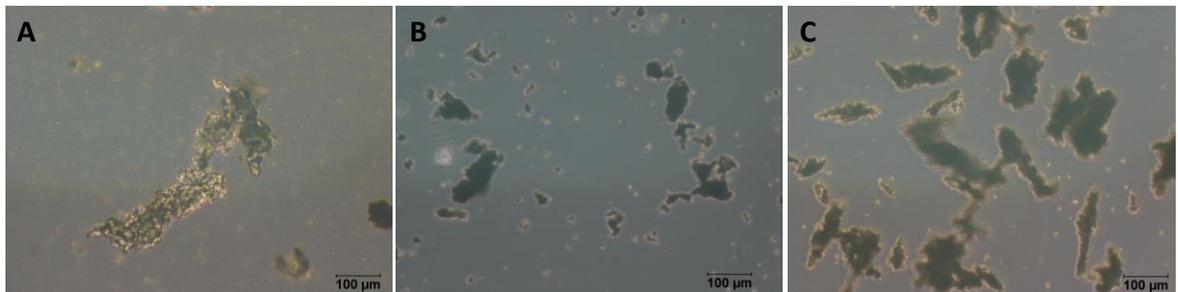


Figura 14. Microscopía óptica (10x) para las formulaciones: **A)** AMI/PSS 1.2, **B)** PMZ/PSS 1.2, y **C)** CQ/PSS 0.6.

VI.1.3. Estudios de estabilidad:

Una vez caracterizadas las formulaciones, se procedió a realizar estudios de estabilidad simulando condiciones de almacenamiento y biológicas en función del diámetro hidrodinámico y el potencial zeta. Para ello, se evaluaron diferentes rangos de concentración de sal, pH y temperatura. En estos estudios se evidenció que el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta se mantuvieron estables en todas las condiciones ensayadas (**Fig. 15-17**). Es importante destacar que los rangos seleccionados para las variables analizadas (NaCl: 0-200 mM, pH 2-10 y temperatura: 20-50 °C) superan enormemente las encontradas en el cuerpo humano o en condiciones de almacenamiento, demostrando así su gran potencial para el desarrollo de medicamentos. Por otra parte, las formulaciones también demostraron alta estabilidad en el tiempo; el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta se mantuvieron prácticamente inalteradas por al menos 50 días (**Fig. 18**). Dicha estabilidad puede ser atribuida a la magnitud del potencial zeta de las NPs, generando alta repulsión entre los sistemas y previniendo su coalescencia/precipitación. Finalmente, las formulaciones también fueron estables a los procesos de liofilización y reconstitución en agua (**Fig. 19**). El método ensayado se usa con frecuencia para preservar las propiedades de las suspensiones de NPs durante el almacenamiento y/o transporte durante largos períodos de tiempo [118]. Esta estrategia, debido a la eliminación total del agua, evita la contaminación por microorganismos y genera un producto con menor masa, facilitando el transporte. En general, los resultados indican que se logra

una resuspensión óptima del producto seco, sin alterar significativamente el tamaño y el potencial zeta de las formulaciones originales (frescas).

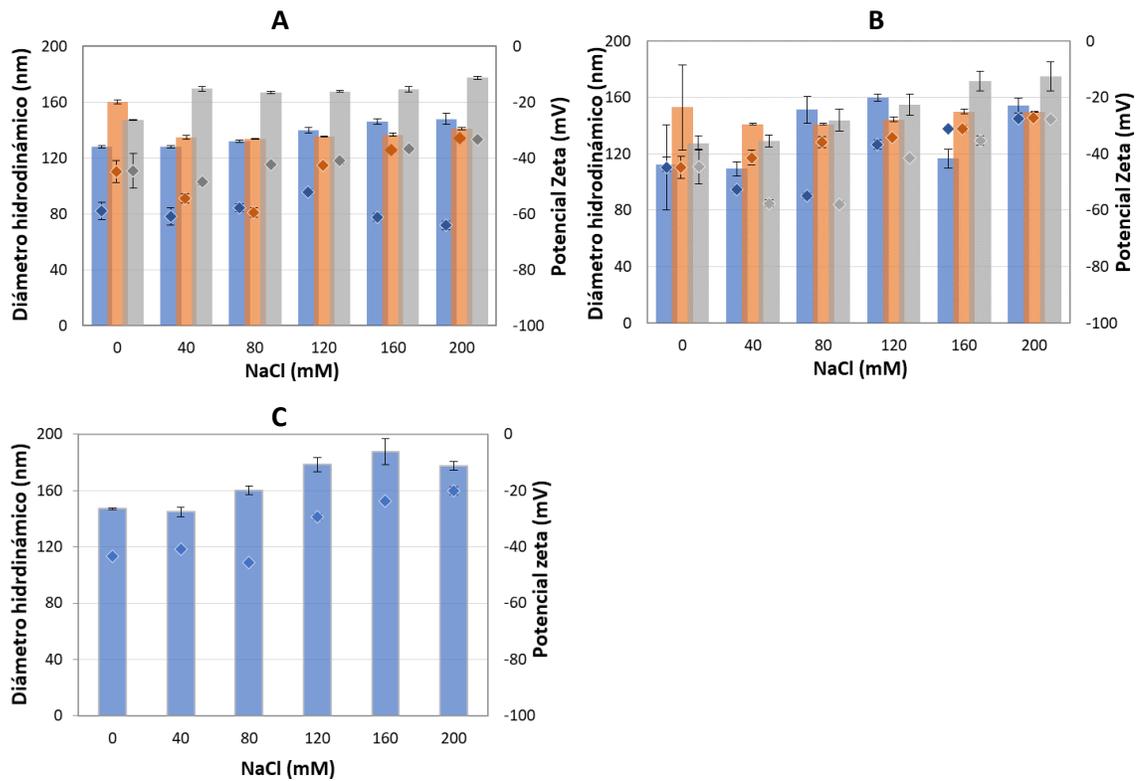


Figura 15. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A)** AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B)** PMZ/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C)** CQ/PSS 0.4 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (promedio \pm d.e., n=3).

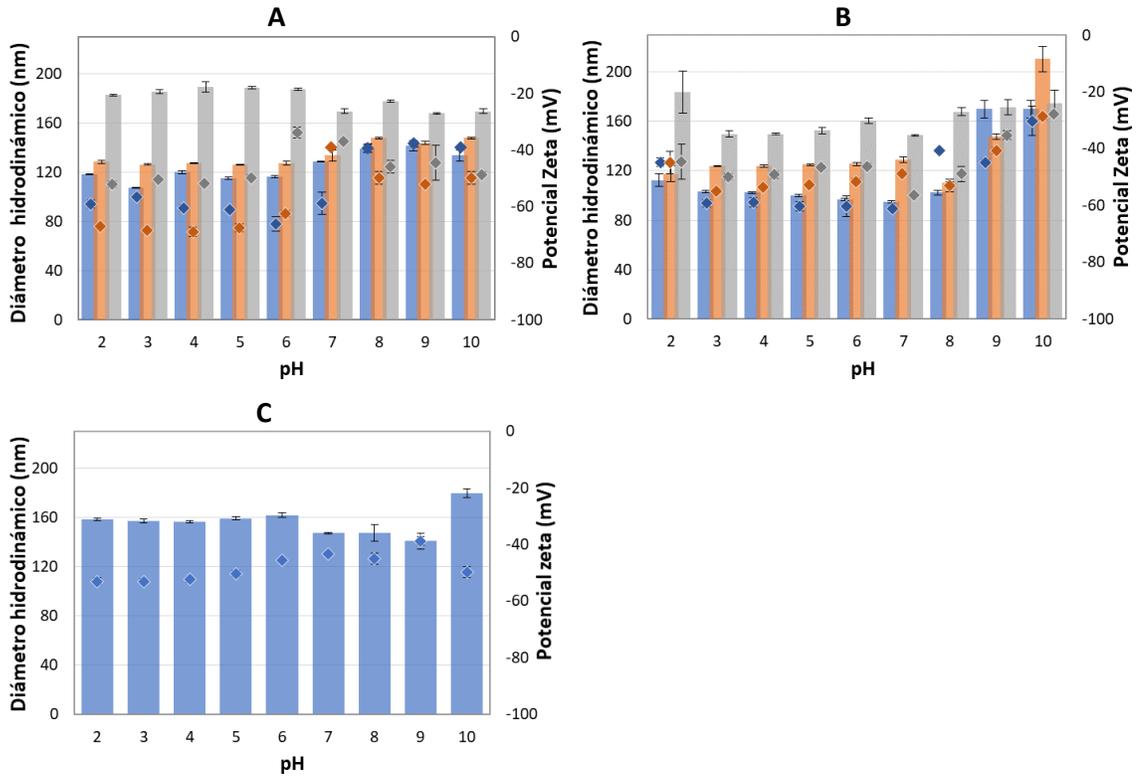


Figura 16. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A)** AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B)** PMZ/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C)** CQ/PSS 0.4 a diferentes pHs (promedio \pm d.e., n=3).

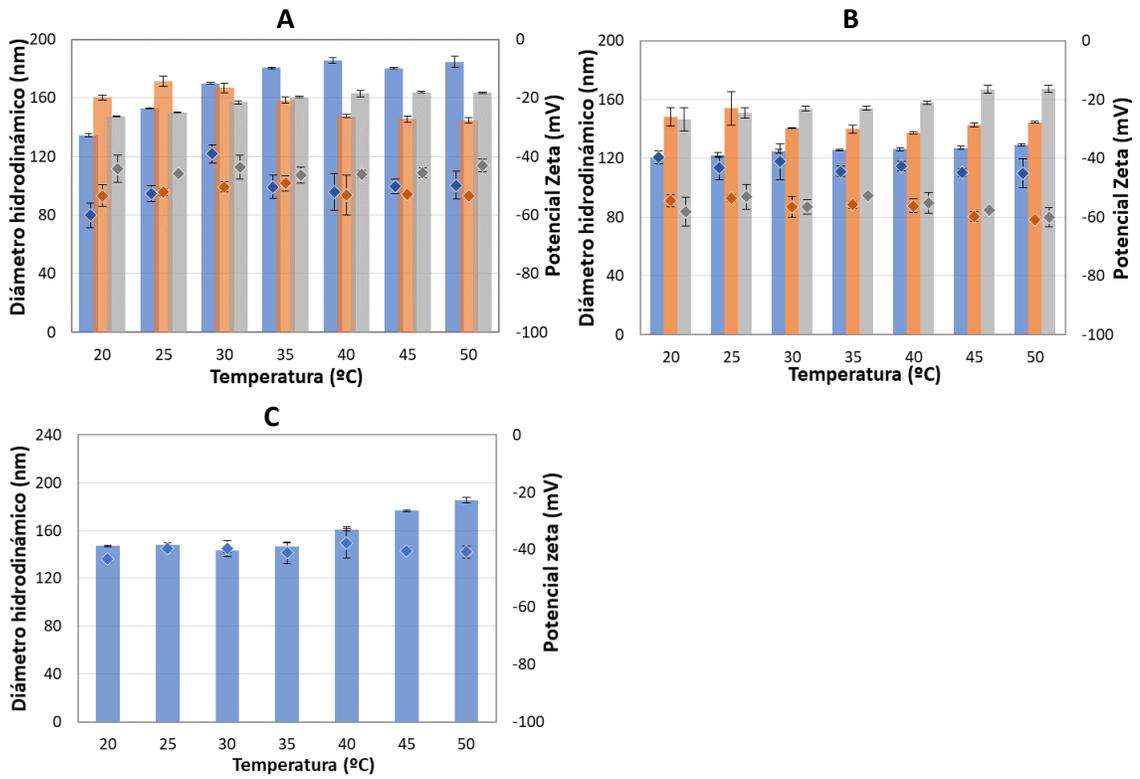


Figura 17. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A**) AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B**) PMZ/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C**) CQ/PSS 0.4 a diferentes temperaturas (promedio \pm d.e., n=3).

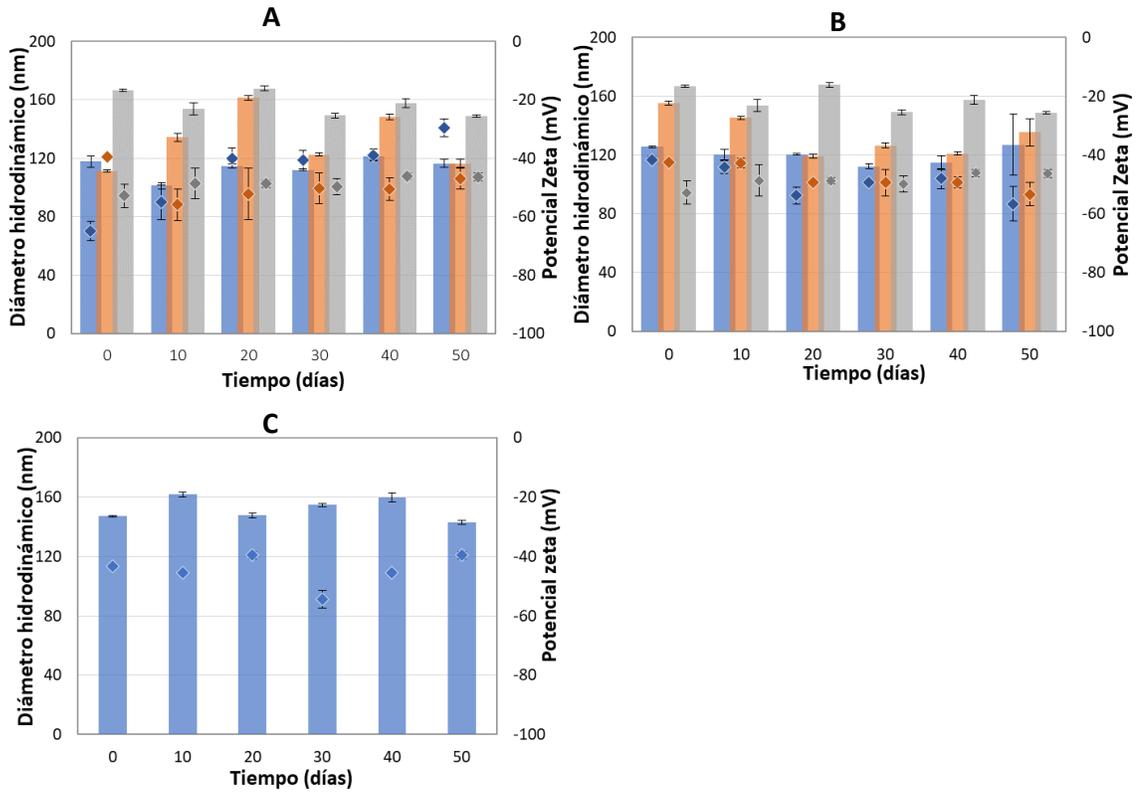


Figura 18. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A)** AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B)** PMZ/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C)** CQ/PSS 0.4 durante el tiempo (promedio \pm d.e, n=3).

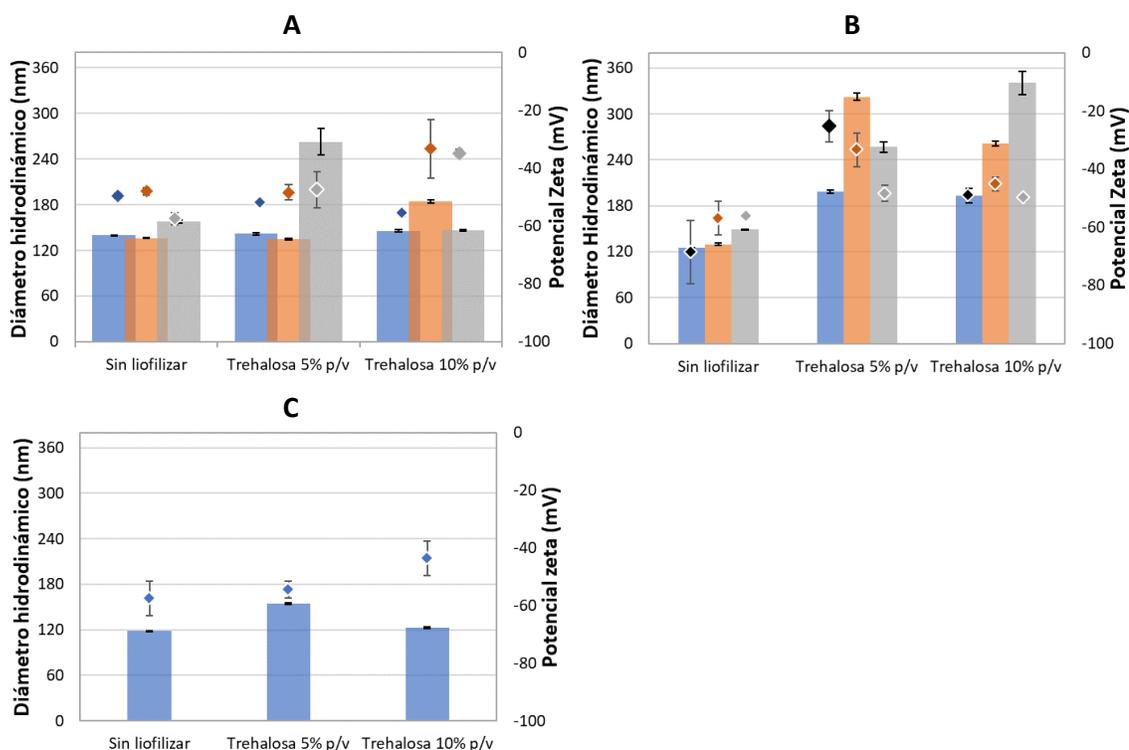


Figura 19. Estudio de la variación del diámetro hidrodinámico (columna, leyenda izquierda) y potencial zeta (rombo, leyenda derecha) de las nanopartículas: **A)** AMI/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); **B)** PMZ/PSS 0.6 (azul), 0.7 (naranja) y 0.8 (gris); y **C)** CQ/PSS 0.4 después del proceso de liofilización y reconstitución en agua (como control se seleccionaron las formulaciones sin liofilizar) (promedio \pm d.e., $n=3$).

V.1.4. Determinación de los parámetros de asociación:

Para finalizar con la sección V.1., se prosiguió con la determinación de los parámetros de asociación del fármaco a las formulaciones. La eficiencia de asociación (% EA), la carga de fármaco y el rendimiento de las formulaciones obtenidas son aspectos químicos y farmacéuticos claves para el desarrollo exitoso de una formulación. Su importancia en la industria farmacéutica se sustenta en que dichos parámetros están relacionados tanto con la eficiencia del proceso, como con los costos asociados a los insumos (fármaco y excipientes) y

procedimientos, lo que afecta transversalmente el desarrollo. Por lo tanto, la alta eficiencia de asociación, la alta carga de fármaco y el alto rendimiento representan menores costos que podrían ser factores críticos en la toma de decisión de adoptar una tecnología y/o ser competitivos con otras tecnologías y productos.

Para la determinación de los parámetros de asociación se seleccionaron dos técnicas: centrifugación (tubos Eppendorf) y ultrafiltración (tubos VivaSpin®). Los ensayos mediante centrifugación fueron infructuosos, esto debido a que presentaron una serie de desventajas:

- a. Imposibilidad de determinación de asociación [fármaco]/[polímero] en relaciones molares <0.6: Debido a la ausencia de NPs en relaciones de [fármaco]/[polímero] inferiores a 0.6 (zona de complejos solubles), no era posible obtener dos fases a separar. De esta manera, cualquier “sobrenadante” que se intentaba medir a través de UV-vis correspondía al complejo fármaco/polímero y no al fármaco no asociado.
- b. Imprecisión en la determinación de las masas: Las masas obtenidas (post-liofilizado) presentaban grandes desviaciones debido a la pérdida de masa del tubo Eppendorf, causado por la naturaleza del material (plástico), y debido al poco volumen de muestra (1500 µL).

Por lo antes mencionado, se decidió continuar la caracterización utilizando el método de ultrafiltración con tubos VivaSpin® (separación por exclusión de

tamaño). En ese sentido, el método seleccionado es capaz de determinar los parámetros de asociación entre los fármacos HABP y el polímero PSS, en todo el rango de relaciones [fármaco]/[polímero] estudiadas (entre 0.1 y 1.2). En la **Figura 20** se observan valores de EA superiores al 90 % entre el rango [fármaco]/[polímero] = 0.1-1.0; mientras que en rangos superiores ([fármaco]/[polímero] > 1.0) se observa que la EA disminuye, esto posiblemente debido a la falta de sitios de unión disponibles entre los fármacos HABP y el PSS al superar la electroneutralización. Por lo tanto, se puede considerar que la unión entre el fármaco y el polímero es cuantitativa. De manera interesante, se observan altos porcentajes de EA en los complejos solubles (AMI/PSS < 0.6, PMZ/PSS < 0.6 y CQ/PSS < 0.4). Este comportamiento señala que, si bien no existen NPs que “encapsulen” la molécula de bajo molecular, las interacciones que se están formando son lo suficientemente fuertes para mantener las moléculas íntimamente unidas.

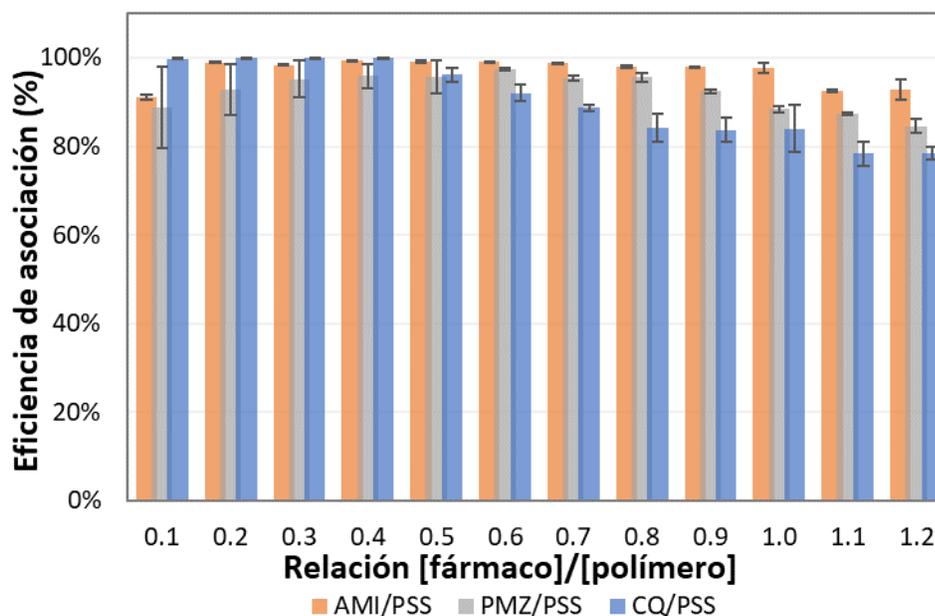


Figura 20. Eficiencia de asociación de las formulaciones AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) y CQ/PSS (azul) en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

Por su parte, la carga de fármaco o *drug loading* en las formulaciones se encuentra en el rango de 12-61 % para las formulaciones ensayadas (relaciones [fármaco]/[polímero] de 0.1-1.2, **Fig. 21A**). Si nos centramos en el rango donde se forman NPs (es decir para AMI/PSS entre 0.6 y 0.8, PMZ/PSS entre 0.6 y 0.8 y CQ/PSS 0.4) podemos observar que la carga de fármaco se encuentra en magnitudes \approx 50 %. Estos resultados son muy importantes puesto que en trabajos anteriores donde se utilizan fármacos y polímeros con cargas opuestas, y donde muchas veces los componentes (fármaco y polímeros) son macromoleculares, la carga reportada de fármaco o *drug loading* es típicamente <25 % [119]; esto debido, entre otras cosas, a que la interacción no es tan eficiente y/o porque se utilizan un gran número de excipientes para lograr un atrapamiento exitoso.

Adicionalmente, se obtuvieron rendimientos de producción muy altos (72-99 %) para las NPs AMI/PSS entre 0.6 y 0.8, PMZ/PSS entre 0.6 y 0.8 y CQ/PSS 0.4 (Fig. 21B). Los parámetros de asociación obtenidos, especialmente las altas magnitudes de carga de fármaco sugieren que el activo estaría uniéndose cuantitativamente al sistema, y formarían parte estructural de las NPs (actuando como una molécula reticulante para la formulación).

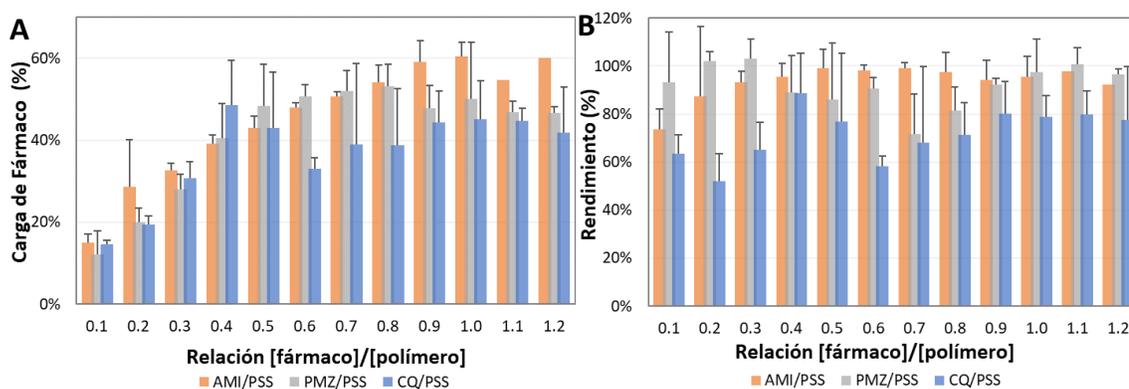


Figura 21. Representación gráfica de: **A)** carga de fármaco y **B)** rendimiento de las formulaciones AMI/PSS (naranja), PMZ/PSS (gris) CQ/PSS (azul) relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

VI.2. Elucidación de la naturaleza de las interacciones establecidas y caracterización del tipo de atrapamiento del fármaco en el nanovehículo (cinético y/o termodinámico).

La elucidación del tipo de interacciones y atrapamiento de los fármacos HABP en las nanoformulaciones es un factor crítico para comprender la formación de los sistemas y su comportamiento, y así ser capaces de proyectar nuevas formulaciones y usos. Con este fin, la resonancia magnética nuclear permitió identificar las interacciones aromático-aromático presente entre las

especies; y la diafiltración permitió determinar el tipo de atrapamiento cinético (fracción de moléculas unidas al polímero independientes de equilibrios termodinámicos) y/o termodinámico (fracción de moléculas unidas de manera dependiente a equilibrios termodinámicos con constantes de disociación). Los resultados obtenidos se describen a continuación:

VI.2.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN):

Con el fin de profundizar en el estudio de las interacciones presentes en la formación de las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS se realizaron estudios por RMN. La RMN- H^1 es una poderosa técnica que permite identificar interacciones entre componentes que producen cambios en el entorno químico que rodea a los protones de las moléculas. En particular, las interacciones aromático-aromático (o π - π *stacking*) se detectan fácilmente por RMN ya que la esfera de hidratación de los reactivos cambia (debido a la íntima interacción entre los grupos funcionales involucrados), y los campos magnéticos producidos por las corrientes electrónicas de los grupos aromáticos afectan el ambiente químico de los protones de las moléculas vecinas [120-122]. En los experimentos de 1H -RMN mostrados en las **Figuras 22-24** podemos ver el comportamiento de los protones en la región aromática (desplazamiento químico (δ) entre 6.0 y 8.0 ppm) de los fármacos AMI, PMZ y CQ en ausencia y en presencia del polímero aromático PSS. Los espectros completos y la asignación de las señales se muestran de manera detallada en el **Anexo 2**.

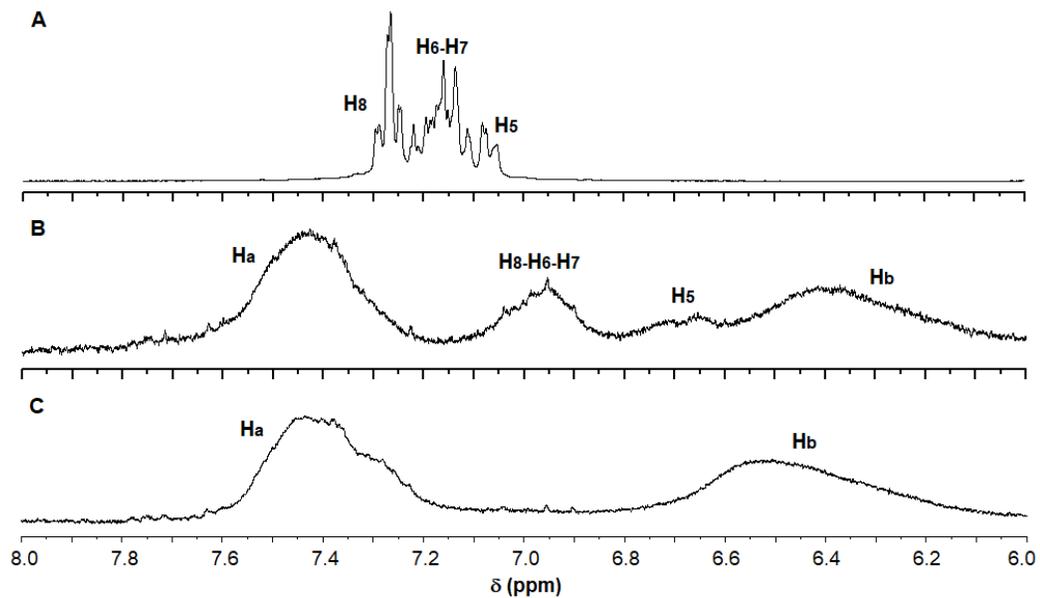


Figura 22. Espectro de RMN- ^1H en la región aromática de: **A)** AMI 1×10^{-3} M, **B)** AMI 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M, y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

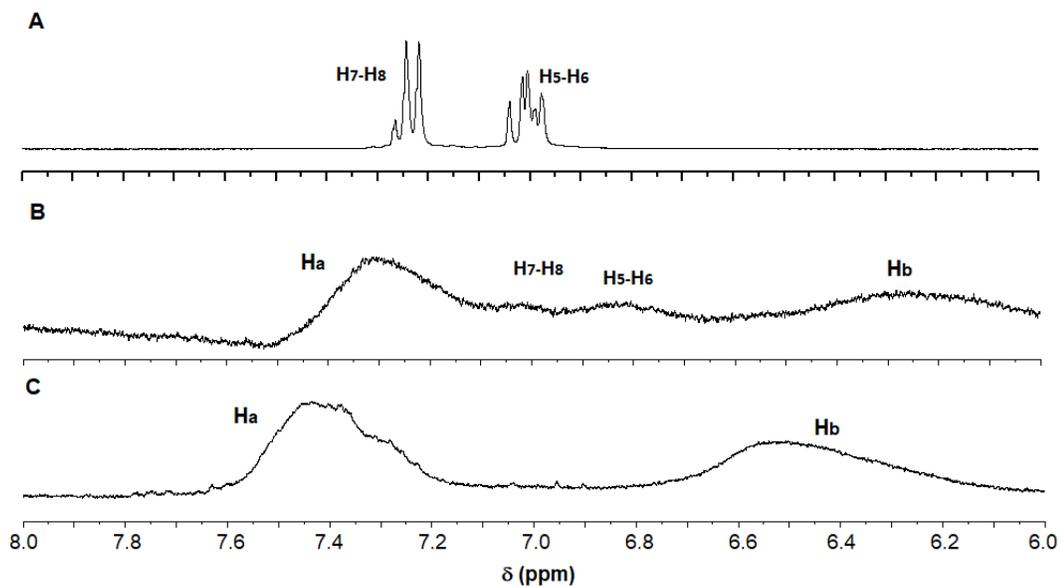


Figura 23. Espectro de RMN- ^1H en la región aromática de: **A)** PMZ 1×10^{-3} M, **B)** PMZ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

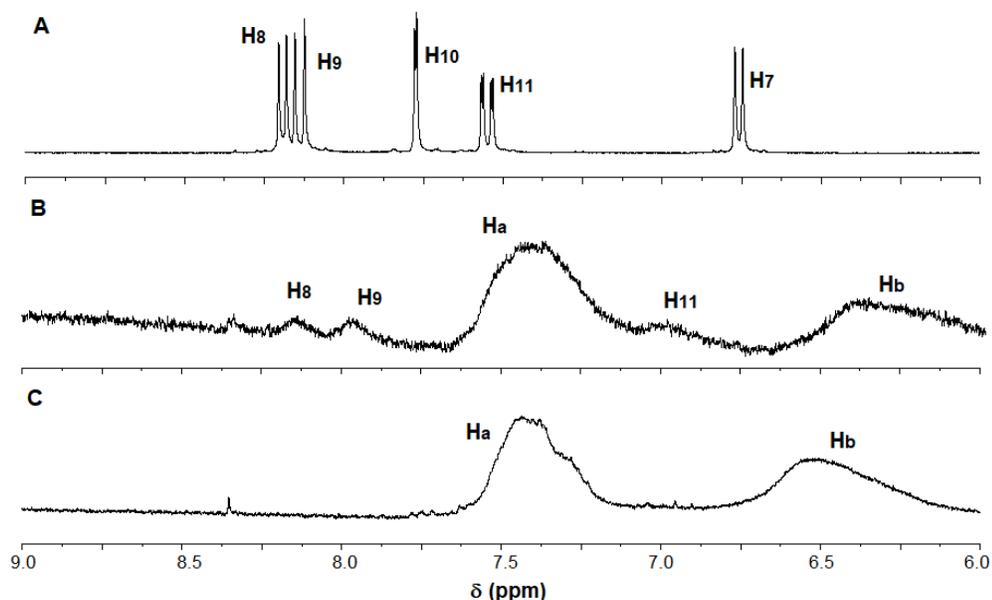


Figura 24. Espectro de RMN- ^1H en la región aromática de: **A)** CQ 1×10^{-3} M, **B)** CQ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M, y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

Como se puede observar, las señales de los fármacos catiónicos presentan desplazamientos químicos significativos a campo alto (δ menor) en presencia del polímero PSS (**Fig. 22B-23B-24B**). Investigaciones anteriores describen el desplazamiento químico de las señales en dirección del campo alto para moléculas aromáticas en presencia de PSS [77], en donde el cambio en las señales se debe al apantallamiento químico causado cuando un protón se encuentra cerca de un anillo aromático. Las características descritas son similares a las observadas en el presente estudio, y se asocian con interacciones de tipo aromático-aromático de corto alcance generadas entre el PSS y las especies de bajo peso molecular. Estas interacciones aromático-aromático se originan por la atracción entre la nube π negativamente cargada de un anillo aromático y un esqueleto σ adyacente cargado positivamente de otro anillo

aromático colindante. El acercamiento de ambas estructuras genera un ambiente altamente hidrófobo que conduce a la expulsión de moléculas de agua aumentando la entropía del medio; aunado a esto, los puentes de hidrógeno que las moléculas generan sobre sí mismas disminuyen la entalpía del medio, ambas condiciones provocan que la formación de interacciones aromático-aromático sean energéticamente favorables [123].

Adicionalmente, se realizaron experimentos NOESY (acrónimo de “espectroscopia de efecto nuclear de Overhauser bidimensional”). Con esta técnica es posible obtener un diagrama que permite determinar cuáles átomos de hidrógeno, de una o varias moléculas, se aproximan de manera apreciable entre sí debido al acoplamiento de señales en el espacio. La presencia de picos cruzados en las **Figuras 25-26**, entre los protones aromáticos de las moléculas AMI/PSS y PMZ/PSS corrobora la presencia de interacciones π - π entre el polímero y los fármacos HABP estudiados. Por otro lado, en el complejo CQ/PSS los picos cruzados entre los protones de ambas moléculas son bastante débiles, **Figura 27**. En este caso, la ausencia de picos cruzados en el estudio NOE no necesariamente es evidencia de la ausencia de interacciones entre los componentes estudiados, la ausencia puede obedecer a señales de RMN muy débiles que se esconden en el ruido. Al respecto, es necesario aclarar que los efectos NOE entre una molécula de bajo peso molecular y una macromolécula no son siempre fáciles de detectar; “idealmente son necesarias cantidades significativas de molécula libre que esté en equilibrio (muy rápido) con su estado

asociado”. Finalmente, las interacciones aromático-aromático de corto alcance identificadas mediante RMN estarían corroborando la formación de interacciones adicionales a las electrostáticas de largo alcance ya presentes entre los fármacos HABP (AMI, PMZ, CQ) y el polímero PSS. Las interacciones mencionadas estarían generando una componente adicional que da paso a la formación y estabilización de las nanoformulaciones planteadas en esta investigación.

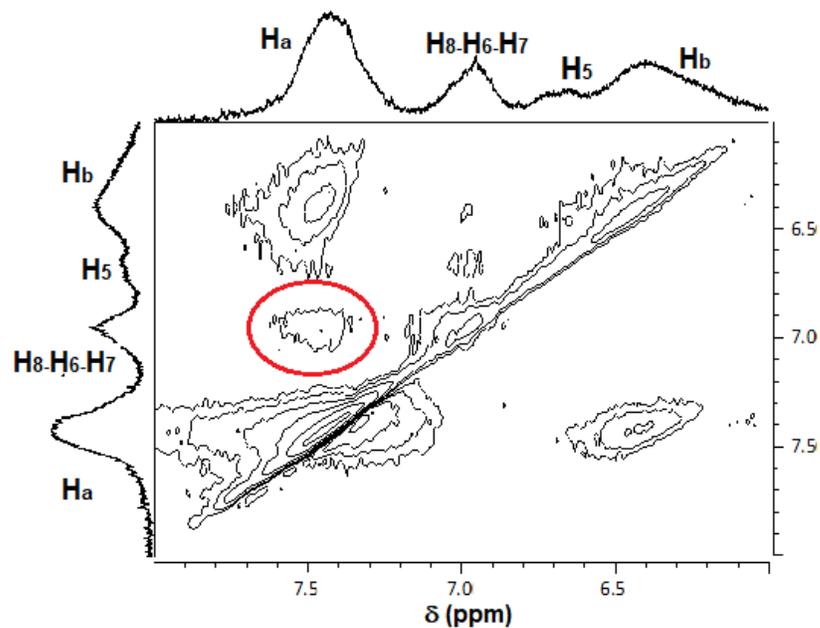


Figura 25. Espectro de RMN-¹H NOESY en la región aromática de AMI 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M.

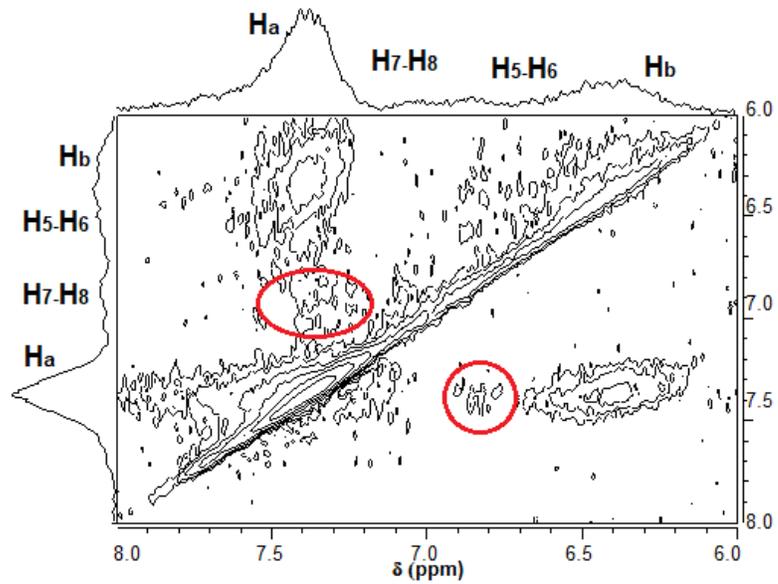


Figura 26. Espectro de RMN- ^1H NOESY en la región aromática de PMZ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M.

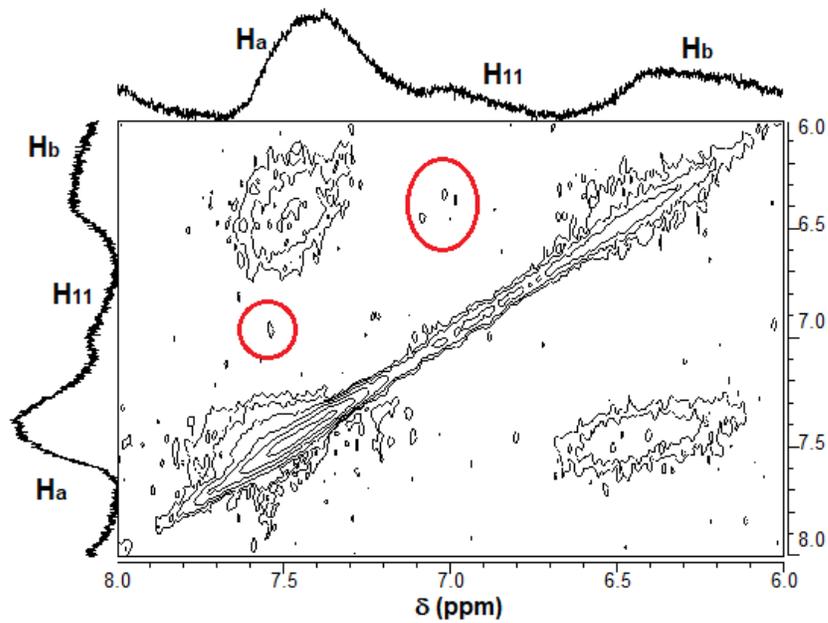


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H NOESY en la región aromática de CQ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M.

VI.2.2. Diafiltración:

El tipo de atrapamiento (cinético y/o termodinámico) entre los fármacos (AMI, PMZ y CQ) y el PSS determina críticamente la eficiencia del proceso de formación de los sistemas y podría influir de manera significativa en la estabilidad y en el perfil de liberación del/los fármaco/s. Los estudios de diafiltración (DF) representan una metodología estratégica para proporcionar de manera sencilla la distribución de fármacos termodinámicamente (% TB) y/o cinéticamente (% KB) unidos a las NPs. Para ello, en la teoría de DF se asume que dentro de la celda de DF existen en equilibrio dos componentes, en este caso “las moléculas de fármaco HABP libres en solución (no asociadas)” y “la formulación (compuesta por el fármaco HABP y el polímero)”. Durante la DF, sólo las moléculas de fármaco HABP libres en solución podrán atravesar la membrana; por lo tanto, al iniciar la DF se filtrarán aquellas moléculas no asociadas al polímero. En consecuencia, las moléculas unidas al polímero, ubicadas en la parte más externa de la formulación en contacto directo con la solución (entorno altamente hidrofílico), podrán ser liberadas según el principio de *Le Chatelier*. Por otro lado, aquellas moléculas de fármaco HABP unidas al polímero, pero que se ubican en la parte interna de la formulación (entorno altamente hidrófobo), permanecerán asociadas durante mayor tiempo. El principio de la DF considera que las moléculas cuya atracción es dependiente de equilibrios (intercambio rápido con la solución) exhiben una liberación controlada termodinámicamente, mientras que las moléculas cuya atracción es independiente del equilibrio (pues no está

en contacto directo con la solución) exhiben una liberación controlada cinéticamente (**Figura A2**, ver **Anexo 1**). De esta manera, formulaciones con un mayor componente cinético (% KB) están asociadas a un perfil más prolongado de liberación y mayor estabilidad coloidal.

En la **Figura 28** se muestra la concentración de AMI liberada desde la celda de DF " $\text{Ln}C_{\text{AMI}}^{\text{filtrado}}$ " (en escala logarítmica, con el fin de linealizar la caída exponencial de la concentración del fármaco) *versus* cada fracción de filtrado (F). Estas representaciones lineales, conocidas como perfiles de DF, permiten determinar la fuerza de interacción (pendiente de la curva) entre el fármaco AMI (o cualquier otra especie HAPB) y el polímero aromático PSS (o cualquier otro polímero hidrosoluble).

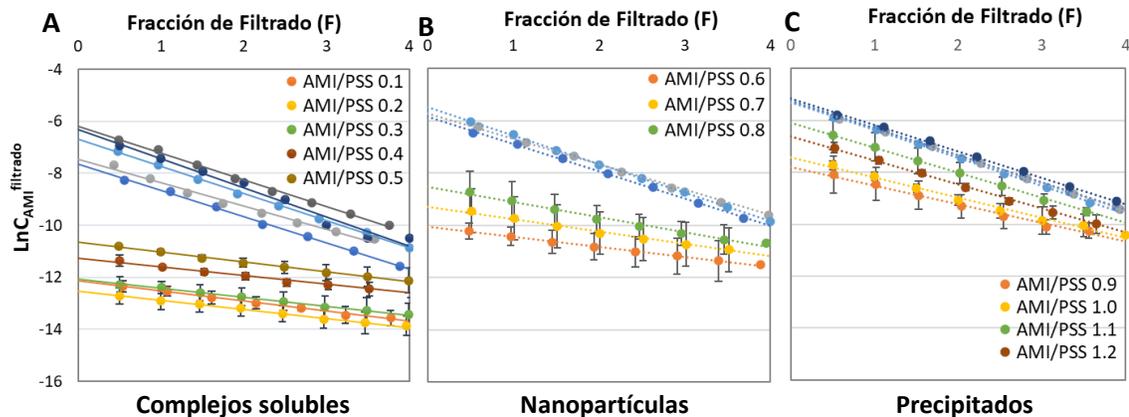


Figura 28. Perfiles de DF de las formulaciones AMI/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles ($[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.1-0.5$); **B)** nanopartículas ($[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.6-0.8$); y **C)** precipitados ($[\text{fármaco}]/[\text{polímero}] = 0.9-1.2$). Experimentos control: AMI en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., $n=3$).

Posteriormente, a partir de la fuerza de interacción (pendiente de la curva $\ln C_{AMI}^{filtrado}$ vs. F), y siguiendo el modelo descrito en la sección V.2., es posible determinar los parámetros de interés. Los resultados obtenidos para las formulaciones se muestran y discuten de manera detallada en el **Anexo 3**, y los parámetros de constante de disociación (K_{dis}), control cinético (% KB), control termodinámico (% TB) y eficiencia de asociación (% EA) se muestran en la **Tabla 3**. En general, se detalla que la mayoría de las formulaciones en la zona de los complejos solubles y nanopartículas presentan K_{dis} bajas, reflejando la alta capacidad de los sistemas para retener el fármaco. Además, es posible observar que a relaciones molares [fármaco]/[polímero] superiores a 1 (precipitados) existe un aumento de la K_{dis} , como evidencia de una disminución de la fuerza de interacción entre el fármaco HABP y PSS, lo cual podría atribuirse a la falta de sitios de unión en la matriz polimérica. Adicionalmente, se observa que la liberación del fármaco desde las formulaciones poliméricas está sujeta mayormente a un control cinético (% KB) con magnitudes desde el 63 al 98%. Lo anterior conlleva a eficiencias de asociación que van desde el 72 al 100%.

Tabla 3. Parámetros de DF de las formulaciones AMI/PSS en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n = 3).

AMI/PSS	AMI ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	K_{dis}	KB (%)	TB (%)	EA (%)
0.1	0.3	3.3	0.72 ± 0.42	86.1 ± 8.8	2.1 ± 0.8	88.2 ± 1.5
0.2	0.7	3.3	0.55 ± 0.05	93.6 ± 0.5	0.8 ± 0.3	94.4 ± 0.2
0.3	1.0	3.3	0.52 ± 0.13	94.0 ± 0.7	1.3 ± 0.6	95.2 ± 0.1
0.4	1.3	3.3	0.50 ± 0.15	89.1 ± 0.6	2.3 ± 0.6	91.4 ± 0.1
0.5	1.7	3.3	0.66 ± 0.29	97.9 ± 1.5	2.0 ± 0.16	99.9 ± 0.1
0.6	2.0	3.3	0.66 ± 0.33	93.6 ± 5.9	6.2 ± 5.7	99.8 ± 0.2
0.7	2.3	3.3	0.89 ± 0.07	84.5 ± 9.5	5.9 ± 5.0	90.4 ± 4.5
0.8	2.6	3.3	1.84 ± 1.29	94.9 ± 10.2	5.0 ± 2.0	99.9 ± 8.4
0.9	3.0	3.3	5.08 ± 5.06	94.0 ± 13.3	5.2 ± 0.5	99.2 ± 12.9
1.0	3.3	3.3	6.21 ± 4.89	76.6 ± 3.8	5.6 ± 3.3	82.2 ± 1.7
1.1	3.6	3.3	4.16 ± 1.72	63.4 ± 15.8	9.7 ± 3.0	73.1 ± 12.8
1.2	4.0	3.3	$\rightarrow \infty$	70.4 ± 5.4	1.7 ± 1.7	72.1 ± 6.3

Los hallazgos descritos anteriormente confirman la alta capacidad de interacción entre los componentes (fármaco AMI y polímero PSS), lo que genera un sistema estable capaz de inmovilizar el fármaco HABP. En la **Figura 29** se presenta la retención de AMI dentro de la celda de DF por cada fracción de filtrado (% Retención AMI *versus* F). Es interesante observar la liberación lenta y controlada desde las formulaciones en presencia del polímero PSS (complejos solubles > nanopartículas > precipitados) y comparada con los fármacos solos.

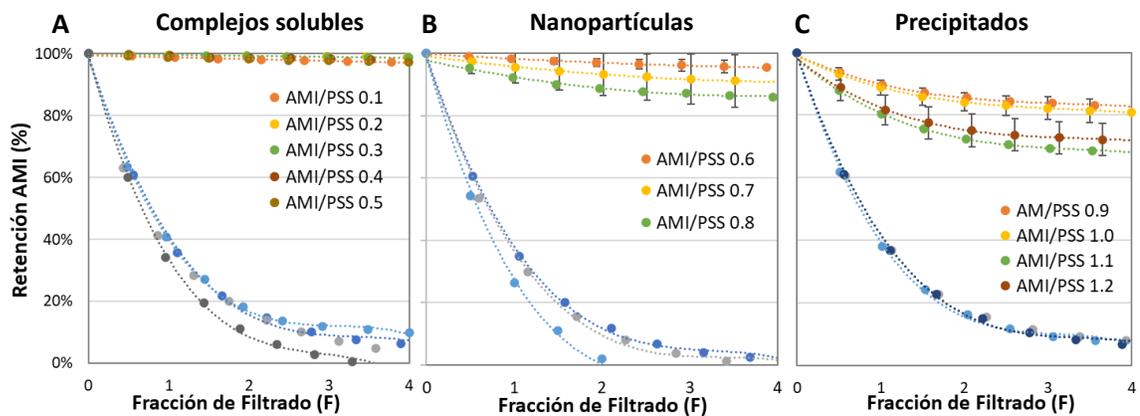


Figura 29. Perfiles de retención de las formulaciones AMI/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles, [fármaco]/[polímero] = 0.1-0.5; **B)** nanopartículas, [fármaco]/[polímero] = 0.6-0.8; y **C)** precipitados [fármaco]/[polímero] = 0.9-1.2. Experimentos control: AMI en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).

En cuanto a las formulaciones PMZ/PSS, se puede mencionar que los perfiles y los parámetros de DF son similares a los obtenidos para la formulación AMI/PSS. La **Figura 30** representa la concentración de PMZ liberada desde la celda de DF por cada fracción de filtrado ($\ln C_{PMZ}^{filtrado}$ versus F). El detalle de los resultados (parámetros de DF) que se obtienen a partir de la pendiente de esta curva se muestran y discuten de manera detallada en el **Anexo 3**.

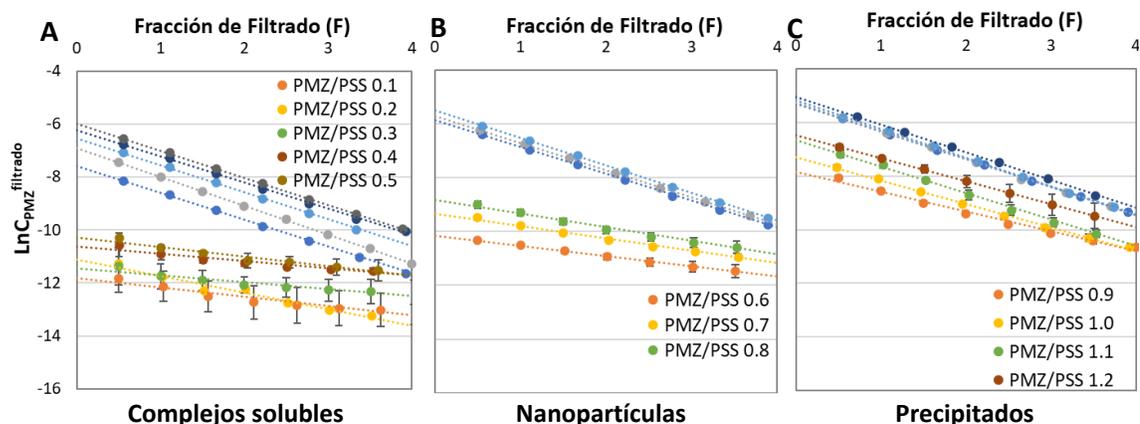


Figura 30. Perfiles de DF de las formulaciones PMZ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles, [fármaco]/[polímero] = 0.1-0.5; **B)** nanopartículas, [fármaco]/[polímero] = 0.6-0.8; y **C)** precipitados [fármaco]/[polímero] = 0.9-1.2. Experimentos control: PMZ en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e, n=3).

En la **Tabla 4** se observan la constante de disociación (K_{dis}), el control cinético (% KB), el control termodinámico (% TB) y la eficiencia de asociación (% EA) para las formulaciones PMZ/PSS ([fármaco]/[polímero] entre 0.1 y 1.2). Nuevamente, se observa una alta interacción entre los componentes de carga complementaria con bajas K_{dis} , y donde la liberación de fármaco es mayormente controlada cinéticamente en la zona de los complejos solubles y nanopartículas (KB = 89 % - 94 %). Estos resultados sustentan la alta capacidad del polímero para atrapar el fármaco (EA entre 95 % y 100 %). Interesantemente, de manera similar a las formulaciones AMI/PSS, se observa que a relaciones [fármaco]/[polímero] superiores a 1 existe un aumento de la K_{dis} como reflejo de una menor fuerza de interacción entre las especies. Este comportamiento se sustenta en menores valores de atrapamiento cinético y menor eficiencia de asociación (ej. % KB = 65 % y % EA = 72 % para PMZ/PSS 1.2). Lo descrito se aprecia claramente en la

Figura 31C, donde se observa una mayor liberación de PMZ a partir de PMZ/PSS > 0.9, en comparación a los complejos solubles y nanopartículas (**Figura 31A-B**). Las semejanzas descritas entre PMZ y AMI se pueden atribuir a la similitud en las propiedades fisicoquímicas entre ambos fármacos (peso molecular, solubilidad, LogP, pKa), lo que conduce a un comportamiento químico similar.

Tabla 4. Parámetros de DF de las formulaciones PMZ/PSS en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

PMZ/PSS	PMZ ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	K_{dis}	KB (%)	TB (%)	EA (%)
0.1	0.3	3.3	0.27 \pm 0.07	94.1 \pm 4.55	4.9 \pm 3.50	99.7 \pm 1.08
0.2	0.7	3.3	0.65 \pm 0.10	94.7 \pm 1.66	1.2 \pm 0.43	96.0 \pm 1.72
0.3	1.0	3.3	0.20 \pm 0.12	89.4 \pm 3.18	5.1 \pm 3.41	94.6 \pm 0.68
0.4	1.3	3.3	0.21 \pm 0.12	93.2 \pm 2.94	6.0 \pm 3.40	99.2 \pm 0.47
0.5	1.7	3.3	0.32 \pm 0.18	93.3 \pm 2.49	4.4 \pm 2.66	97.8 \pm 0.25
0.6	2.0	3.3	0.31 \pm 0.08	91.2 \pm 0.71	2.9 \pm 0.69	94.1 \pm 0.07
0.7	2.3	3.3	0.42 \pm 0.04	95.3 \pm 0.25	4.0 \pm 0.30	99.4 \pm 0.12
0.8	2.6	3.3	0.50 \pm 0.07	89.9 \pm 1.37	5.1 \pm 1.00	95.0 \pm 0.46
0.9	3.0	3.3	1.32 \pm 0.05	93.6 \pm 1.23	4.6 \pm 0.43	98.3 \pm 0.82
1.0	3.30	3.3	3.04 \pm 1.15	86.9 \pm 0.85	4.2 \pm 1.00	91.1 \pm 1.31
1.1	3.60	3.3	4.55 \pm 1.54	75.3 \pm 1.39	4.1 \pm 1.78	79.5 \pm 1.89
1.2	4.0	3.3	15.91 \pm 1.31	64.6 \pm 4.95	7.0 \pm 6.38	71.7 \pm 2.54

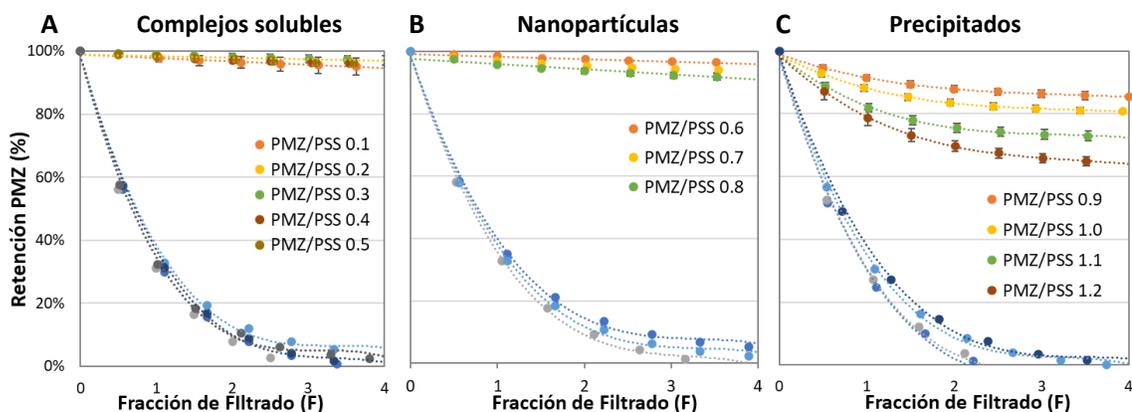


Figura 31. Perfiles de retención de las formulaciones PMZ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** complejos solubles, [fármaco]/[polímero] = 0.1-0.5; **B)** nanopartículas, [fármaco]/[polímero] = 0.6-0.8; y **C)** precipitados [fármaco]/[polímero] = 0.9-1.2. Experimentos control: PMZ en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).

En el caso de las formulaciones CQ/PSS, se pueden distinguir importantes diferencias en comparación con las otras formulaciones y donde la formación de los sistemas ocurre en relaciones [fármaco]/[polímero] significativamente inferiores que para el caso de AMI y PMZ (complejos solubles ≤ 0.3 , NPs = 0.4 y precipitados ≥ 0.5) lo que identifica una aún mayor interacción entre los componentes. En este sentido, destacamos de manera particular que no se evidencia liberación de CQ en la zona de complejos solubles, indicando una intensidad máxima de interacción (y una EA del 100%). En la **Figura 32** se muestra la concentración de CQ liberada desde la celda de DF por cada fracción de filtrado recolectado que contenía CQ ($\ln C_{CQ}^{filtrado}$ versus F), estos resultados corresponden a nanopartículas y precipitados. En todos los casos queda en evidencia una mayor resistencia a la liberación de CQ en comparación con AMI y PMZ. El detalle de los resultados (parámetros de DF) que se obtienen a partir

de la pendiente de esta curva se muestran y se discuten de manera detallada en el **Anexo 3**.

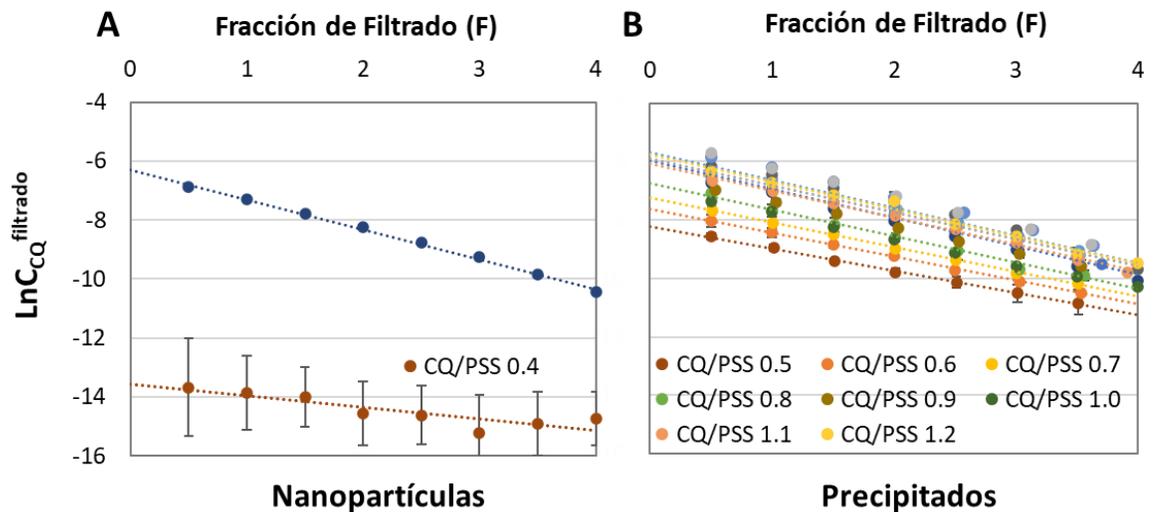


Figura 32. Perfiles de DF de las formulaciones CQ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** nanopartículas, [fármaco]/[polímero] = 0.4 y **B)** precipitados [fármaco]/[polímero] = 0.5-1.2. Experimentos control: CQ en ausencia de polímero a las distintas concentraciones ensayadas (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).

En la **Tabla 5** se observan las constantes de disociación (K_{dis}), el control cinético (% KB), el control termodinámico (% TB) y las eficiencias de asociación (% EA) para las formulaciones CQ/PSS ([fármaco]/[polímero] entre 0.4 y 1.2). Para las NPs en relación molar 0.4 se observan magnitudes muy elevadas de KB (99.3 %) y EA (99.8 %), como respuesta a la alta interacción entre los componentes (CQ y PSS) y que corresponden con una constante de disociación (K_{dis}) muy baja. Para las formulaciones CQ/PSS > 0.5, se observan valores mayores de K_{dis} , como respuesta a la disminución de la fuerza de interacción entre los componentes. Este comportamiento se observa claramente en la **Figura 33**, donde se aprecia la mayor liberación de la concentración de CQ a partir de

CQ/PSS > 0.5. La evidencia de una mayor fuerza de interacción/atrapamiento entre el fármaco CQ y el polímero PSS, frente a las formulaciones AMI/PSS y PMZ/PSS, guarda relación con un mayor grado de empaquetamiento. Como se explicó en la sección VI.1., el comportamiento observado puede tener explicación en las propiedades fisicoquímicas de la cloroquina [111]. Esto debido a que la doble protonación en la molécula de CQ al pH de trabajo (pK_{a1} : 8.4 y pK_{a2} : 10.3) favorece la interacción con el polímero aniónico.

Tabla 5. Parámetros de DF de las formulaciones CQ/PSS en relaciones [fármaco]/[polímero] desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

CQ/PSS	CQ ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	K_{dis}	KB (%)	TB (%)	EA (%)
0.1	0.3	3.3	-	-	-	-
0.2	0.7	3.3	-	-	-	-
0.3	1.0	3.3	-	-	-	-
0.4	1.3	3.3	0.7 ± 0.7	99.3 ± 0.3	0.5 ± 0.3	99.8 ± 0.1
0.5	1.7	3.3	7.8 ± 9.7	81.7 ± 0.9	4.1 ± 2.6	85.8 ± 3.5
0.6	2.0	3.3	3.2 ± 1.3	75.4 ± 3.6	4.2 ± 1.3	79.6 ± 4.8
0.7	2.3	3.3	3.9 ± 1.6	70.5 ± 2.1	4.6 ± 1.3	75.1 ± 3.6
0.8	2.6	3.3	12.5 ± 9.3	59.8 ± 9.1	3.7 ± 1.0	63.3 ± 10.3
0.9	3.0	3.3	11.8 ± 4.1	53.4 ± 0.5	7.9 ± 5.5	61.3 ± 5.8
1.0	3.3	3.3	7.2 ± 6.3	57.5 ± 15.1	4.2 ± 1.0	62.7 ± 12.4
1.1	3.6	3.3	37.7 ± 7.7	45.7 ± 6.8	3.2 ± 1.7	48.8 ± 5.6
1.2	4.0	3.3	9.1 ± 5.2	33.4 ± 1.6	4.5 ± 2.0	37.9 ± 1.5

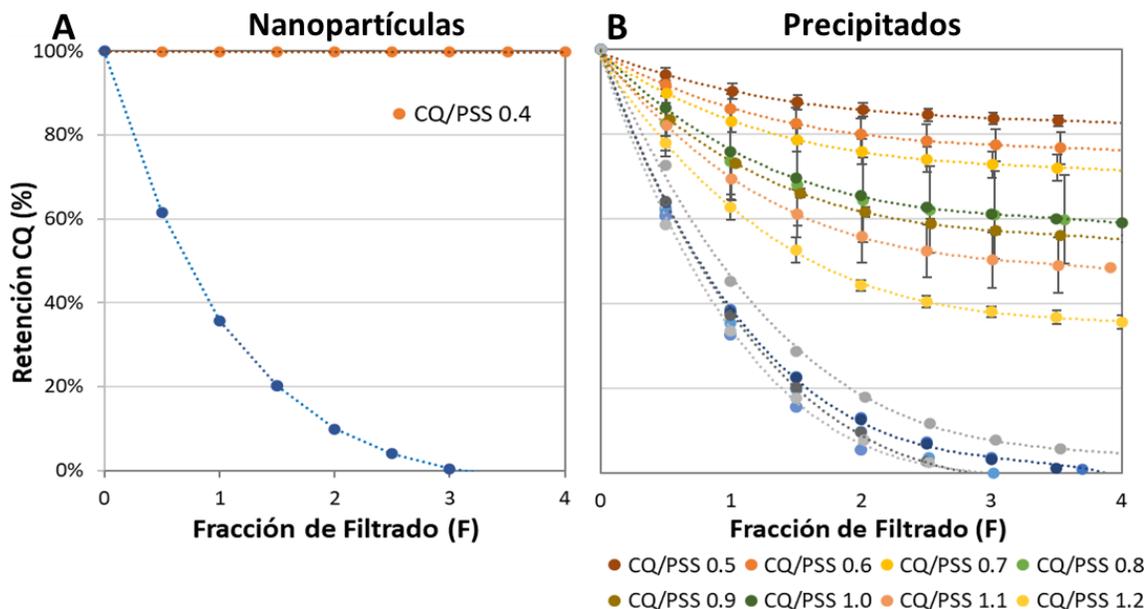


Figura 33. Perfiles de retención de las formulaciones CQ/PSS (líneas multicolor) en: **A)** nanopartículas, [fármaco]/[polímero] 0.4 y **B)** precipitados [fármaco]/[polímero] 0.5-1.2. Experimentos control: CQ en ausencia de polímero (líneas en escala de azules) (promedio \pm d.e., n=3).

Si bien los fármacos HABP seleccionados (AMI, PMZ y CQ) presentan diferencias en cuanto a las componentes cinéticas y termodinámicas, queda claro que previo al colapso de los sistemas y la aparición de precipitados, las formulaciones obtenidas presentan un alto grado de empaquetamiento, con eficiencias de asociación superiores al 90 %. Adicionalmente, se demostró que un gran porcentaje de estas moléculas asociadas están unidas de manera independiente del equilibrio, es decir, su liberación está cinéticamente controlada (% KB), promoviendo la estabilidad de las formulaciones desarrolladas y suponiendo una liberación prolongada de los fármacos HABP desde las formulaciones.

Es interesante comparar la técnica de DF *versus* ultrafiltración como métodos para determinar la eficiencia de asociación. En la **Figura 34** se observa que las

EA obtenidas por diafiltración se ajustan con las reportadas por el método de ultrafiltración (sección VI.1.) para todas las formulaciones AMI/PSS y PMZ/PSS. Sin embargo, para las formulaciones CQ/PSS ≥ 0.7 los métodos empiezan a presentar diferencias significativas ($p\text{-value} < 0.001$, **Fig. 34C**). Las diferencias observadas pueden ser atribuidas a las diferencias conceptuales entre ambas técnicas. La ultrafiltración es un método donde las formulaciones (reactivos) se concentran durante el proceso. De esta manera, se promueve la interacción entre los reactivos (debido a la disminución paulatina del medio acuoso, producto del proceso de concentración), aumentando la asociación en el transcurso del ensayo. Por su parte, la DF es un método de lavado dinámico, la formulación se va diluyendo durante el experimento, pero el volumen de medio acuoso es constante (debido al reemplazo del medio durante el proceso de filtrado). Por lo tanto, durante el proceso de DF no existe mecanismo alguno que promueva y/o aumente la interacción entre los componentes que conlleve a falsas interpretaciones. La EA determinada por DF, y que contempla la sumatoria de las moléculas de HABP cinéticamente (KB) y termodinámicamente (TB) unidas al polímero, es la más adecuada. Adicionalmente, como se observa en la **Figura 34**, la diferencia entre ambas técnicas aumenta a medida que se acrecienta la presencia de precipitados en las formulaciones, (siendo más evidente para CQ/PSS ≥ 0.7) y que podría explicarse por la saturación de la membrana (impidiendo el paso de la molécula libre en solución). Al ser la diafiltración un proceso dinámico y que ocurre en mayor tiempo (duración diafiltración ≈ 180 min,

duración ultrafiltración =20 min), se permite el paso del fármaco. Además de esto, debemos resaltar la capacidad del método de diafiltración para aportar con parámetros de mucha importancia a la hora de concebir y comprender una formulación como son las proporciones de fármaco atrapados cinética y/o termodinámicamente en la formulación.

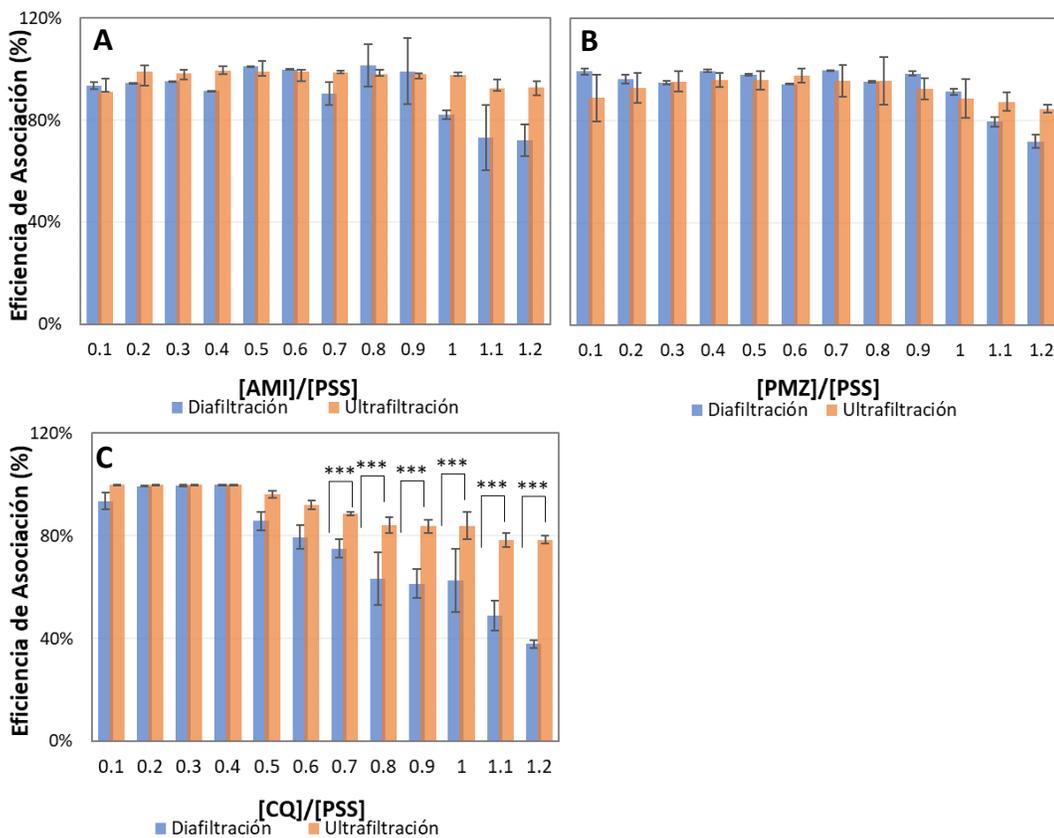


Figura 34. Eficiencia de asociación determinada por las técnicas de diafiltración (azul) y ultrafiltración (naranja) de las formulaciones: **A)** AMI/PSS 0.1-1.2, **B)** PMZ/PSS 0.1-1.2, y **C)** CQ/PSS 0.1-1.2 (promedio \pm d.e., n=3, ***p-value < 0.001).

VI.3. Estudio del perfil de liberación de los nanovehículos utilizando diálisis y aparato de disolución USP 4 y determinación del mecanismo de liberación.

Con el objetivo de identificar los perfiles de liberación de las formulaciones obtenidas se realizaron estudios de liberación *in vitro*. Para ello, seleccionamos la diálisis convencional y el aparato de disolución USP 4 de flujo continuo.

La liberación de los fármacos HABP desde las NPs se realizó inicialmente mediante diálisis (37 °C y agitación continua). En la **Figura 35A** se muestra el perfil de liberación acumulado de AMI en función del tiempo para las formulaciones AMI/PSS en relación de carga 0.6 (línea azul) y 0.8 (línea naranja). Los resultados obtenidos evidencian la capacidad de la nanoformulación para retener el fármaco HABP, con una liberación acumulada que no excede el 20 % durante 20 días (en ambos casos). Por su parte, los perfiles de liberación acumulada para las formulaciones PMZ/PSS en relación de carga 0.6 (línea gris) y 0.8 (línea amarilla) se muestran también en la **Figura 35A**, y presentan un comportamiento similar al observado en las nanoformulaciones de AMI/PSS.

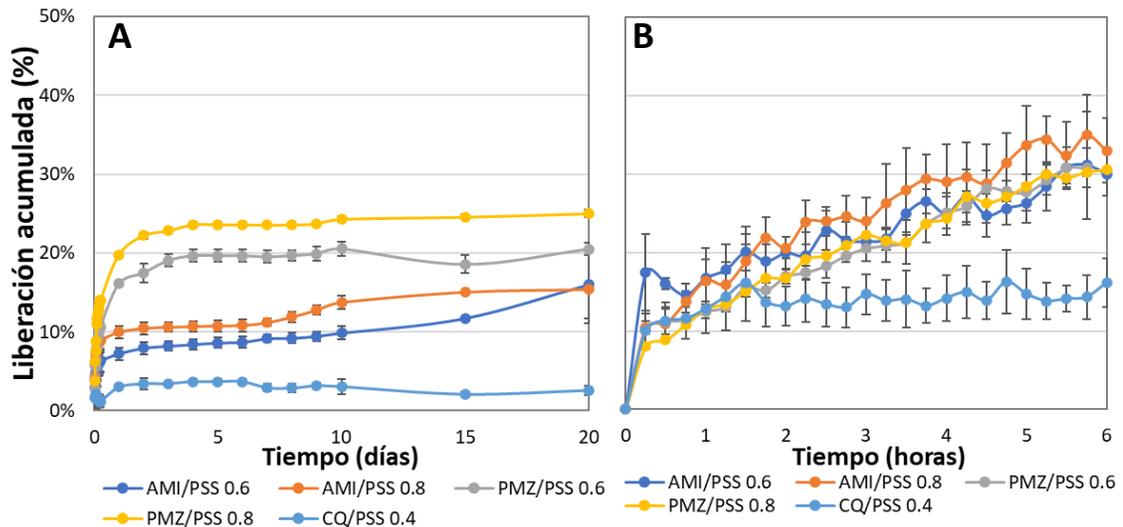


Figura 35. Liberación acumulada (%) de las formulaciones AMI/PSS 0.6 (línea azul), AMI/PSS 0.8 (línea naranja), PMZ/PSS 0.6 (línea gris), PMZ/PSS 0.8 (línea amarilla) y CQ/PSS 0.4 (línea roja) evaluado mediante diálisis **(A)**, y celda de flujo continuo aparato USP 4 **(B)** (promedio \pm d.e., n=3).

Interesantemente, el comportamiento de las nanoformulaciones dentro del dispositivo de diálisis (bolsa con una membrana semipermeable) comparte similitudes con las bases teóricas de la técnica de diafiltración (sección V.2.) y que se muestran con detalle en la **Figura A2 (Anexo 1)**: dentro de la bolsa de diálisis ocurre un proceso similar al expuesto dentro de la celda de diafiltración “una vez que una molécula de fármaco HABP libre en solución atraviesa la membrana, una molécula unida al polímero y que es dependiente de equilibrios termodinámicos será obligada a romper su interacción con el polímero para ocupar el lugar de la que se acaba de filtrar (según el principio de Le Chatelier)”. Esto quiere decir que, inicialmente en el proceso de liberación del fármaco HABP, se estarían liberando del polímero únicamente aquellas moléculas controladas termodinámicamente (% TB). En la **Figura 35A**, se observa que la formulación

con menor fracción de moléculas unidas al polímero dependientes de la termodinámica (CQ/PSS 0.4, % TB = 0.5 %), es aquella que presenta menor porcentaje de liberación (6 % en 20 días). Sin embargo, según los experimentos de diálisis, pareciera que existe un máximo de liberación permitida (*plateau*). Si se observa la **Figura 35A**, las formulaciones AMI/PSS y PMZ/PSS no liberan más del 20 % en un periodo de 20 días, de hecho, se acercaron bastante a ese máximo desde el día 1, presentando un “estancamiento en la liberación”. El mismo comportamiento se observa para la nanoformulación CQ/PSS 0.4. Tomando en cuenta que: i) la diálisis es un proceso estático (donde la bolsa de diálisis está suspendida en un volumen constante de medio de liberación), de manera contraria al organismo (proceso dinámico), y ii) la liberación a través de la membrana depende significativamente de la fracción del medio que se extrae (muestra para cuantificar) como de la fracción de fármaco contenida en él (solo así se favorece el desplazamiento del equilibrio del fármaco HABP); es poco probable tener un acercamiento al comportamiento biológico de la nanoformulación utilizando diálisis convencional. Un estudio de liberación *in vitro* más adecuado, y que simula de mejor manera la dinámica del organismo (aunque de manera mucho más acelerada), es la celda de flujo continuo del aparato USP 4; esta última fue la otra metodología seleccionada para estudiar la liberación. Para ello, se ocupó el sistema en configuración cerrada, a 37 °C y con un flujo de 4 mL/min (agua Milli-Q a pH 7). En la **Figura 35B** se detallan los perfiles de liberación para las cinco formulaciones (AMI/PSS 0.6, AMI/PSS 0.8, PMZ/PSS

0.6, PMZ/PSS 0.8 y CQ/PSS 0.4). De manera similar a lo observado por diafiltración, la celda de flujo continuo permite un análisis de liberación dinámica y constante de los fármacos HABP hacia el medio, **Figura A9, Anexo 4**.

Con el fin de identificar el mecanismo de liberación de las nanoformulaciones, se evaluó el ajuste de los datos a distintos modelos matemáticos (i.e. orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas). El coeficiente de determinación (R^2), el criterio de información Akaike (AIC) y el criterio de selección de modelo (MSC) fueron los parámetros evaluados para seleccionar el mejor ajuste. En la **Tabla 6** se muestran los resultados obtenidos de las cinco formulaciones estudiadas (AMI/PSS 0.6, AMI/PSS 0.8, PMZ/PSS 0.6, PMZ/PSS 0.8 y CQ/PSS 0.4). Basado en el mejor ajuste, se determinó que todas las formulaciones evaluadas (fármaco HABP/PSS) presentan un mejor ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas (un ejemplo del ajuste se muestra en el **Anexo 5**). El modelo mencionado utiliza el exponente de liberación “n” para caracterizar diferentes mecanismos de liberación. Si el valor de “n” es menor de 0.5, el mecanismo de liberación es mediado por difusión Fickiana. Sin embargo, se ha demostrado que el valor exponencial de “n” está directamente relacionado con el tamaño/estructura de la partícula, así como a la naturaleza de sus componentes. Brevemente, un exponente de difusión $n = 0.5$ se asocia a estructuras tipo *films*, $n = 0.45$ a estructuras cilíndricas y $n = 0.43$ a estructuras esferoidales. Sin embargo, los valores más bajos de $n = 0.43$ todavía no se han asociado con ningún tipo de estructura. Como se observa en la **Tabla 6**, los valores del

exponencial de difusión “n” oscilan entre 0.13 y 0.42. Considerando que las NPs descritas en nuestra investigación surgen de la agregación entre moléculas hidrofílicas (fármaco HABP y el polímero PSS), el proceso de hinchamiento podría conducir a cambios estructurales, incluidos cambios en la conformación macromolecular y la movilidad de las cadenas, en la extensión de la hidratación de los agregados, en el tamaño y distribución de las áreas hinchadas, y finalmente en el confinamiento cinético de los fármacos [124]. En consecuencia, y considerando que el fármaco HABP es una parte estructural de las NPs, no es factible garantizar la difusión Fickiana como el único mecanismo involucrado en el proceso de liberación. En lugar de esto, se espera una contribución importante de la reorganización de la matriz de polímero y la hidratación molecular, de modo que el bajo valor del exponente “n” en la ecuación de Korsmeyer-Peppas pueda surgir del comportamiento dinámico del sistema en su conjunto. Estos hallazgos respaldan nuestro análisis previo en los experimentos de diafiltración: el mecanismo de liberación sigue un proceso complejo que está altamente relacionado con la estructura de las NPs, la naturaleza de sus componentes y el comportamiento dinámico del sistema durante el lavado.

Tabla 6. Análisis de datos según los modelos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas (diálisis y aparato USP 4) para las NPs AMI/PSS, PMZ/PSS y CQ/PSS de acuerdo con los perfiles de liberación.

Formulación	Modelo	Diálisis				Aparato USP 4			
		R ²	AIC	MSC	n	R ²	AIC	MSC	n
AMI/PSS 0.6	Orden Cero	0.817	88.00	1.53	-	0.705	-81.98	0.48	-
	Primer Orden	0.817	87.95	1.53	-	0.705	-81.98	0.48	-
	Higuchi	0.807	87.83	1.54	-	0.736	-84.78	0.59	-
	Korsmeyer-Peppas	0.809	78.94	1.91	0.17	0.833	-94.63	0.99	0.21
AMI/PSS 0.8	Orden Cero	0.755	92.44	1.32	-	0.851	-85.98	1.40	-
	Primer Orden	0.759	91.96	1.34	-	0.851	-86.00	1.40	-
	Higuchi	0.775	90.31	1.41	-	0.909	-99.43	1.94	-
	Korsmeyer-Peppas	0.809	85.44	1.61	0.13	0.945	-110.05	2.37	0.37
PMZ/PSS 0.6	Orden Cero	0.519	121.83	0.53	-	0.922	-108.97	2.20	-
	Primer Orden	0.536	121.12	0.57	-	0.922	-108.99	2.20	-
	Higuchi	0.544	120.77	0.59	-	0.922	-108.04	2.16	-
	Korsmeyer-Peppas	0.834	102.24	1.51	0.24	0.909	-106.81	2.11	0.37
PMZ/PSS 0.8	Orden Cero	0.536	126.58	0.57	-	0.922	-106.63	2.11	-
	Primer Orden	0.555	125.75	0.61	-	0.922	-106.66	2.11	-
	Higuchi	0.563	125.36	0.63	-	0.974	-134.82	3.24	-
	Korsmeyer-Peppas	0.856	102.24	1.65	0.22	0.968	-127.79	2.95	0.42
CQ/PSS 0.4	Orden Cero	0.634	55.23	0.88	-	0.237	-94.24	-0.88	-
	Primer Orden	0.637	54.98	0.90	-	0.237	-94.24	-0.88	-
	Higuchi	0.668	52.13	1.04	-	0.230	-94.15	-0.88	-
	Korsmeyer-Peppas	0.798	44.02	1.44	0.16	0.777	-126.54	0.41	0.10

De acuerdo con lo anteriormente discutido, proponemos un mecanismo de liberación que combina los hallazgos encontrados por diafiltración y por el aparato USP 4. En este sentido, proponemos que luego de la liberación del fármaco unido termodinámicamente a la formulación (más disponible para la liberación y supuestamente localizado en la superficie de la formulación), procede la penetración de agua (hinchamiento) hacia la matriz polimérica de las NPs. Teniendo en cuenta que el fármaco HABP es un componente estructural de las NPs, existirá un desprendimiento simultáneo del polímero (reestructuración), exponiendo el material subyacente a la liberación (o sea, la fracción de fármaco que antes estaba atrapado cinéticamente ahora está termodinámicamente disponible). Lo anterior haría mención a una formulación de liberación controlada y prolongada del fármaco, y que depende sensiblemente de los componentes estructurales y del tipo de atrapamiento (cinético y/o termodinámico) en la formulación (**Figura 36**). Hasta donde sabemos, el mecanismo de liberación observado aquí no se ha descrito para otros nanosistemas.

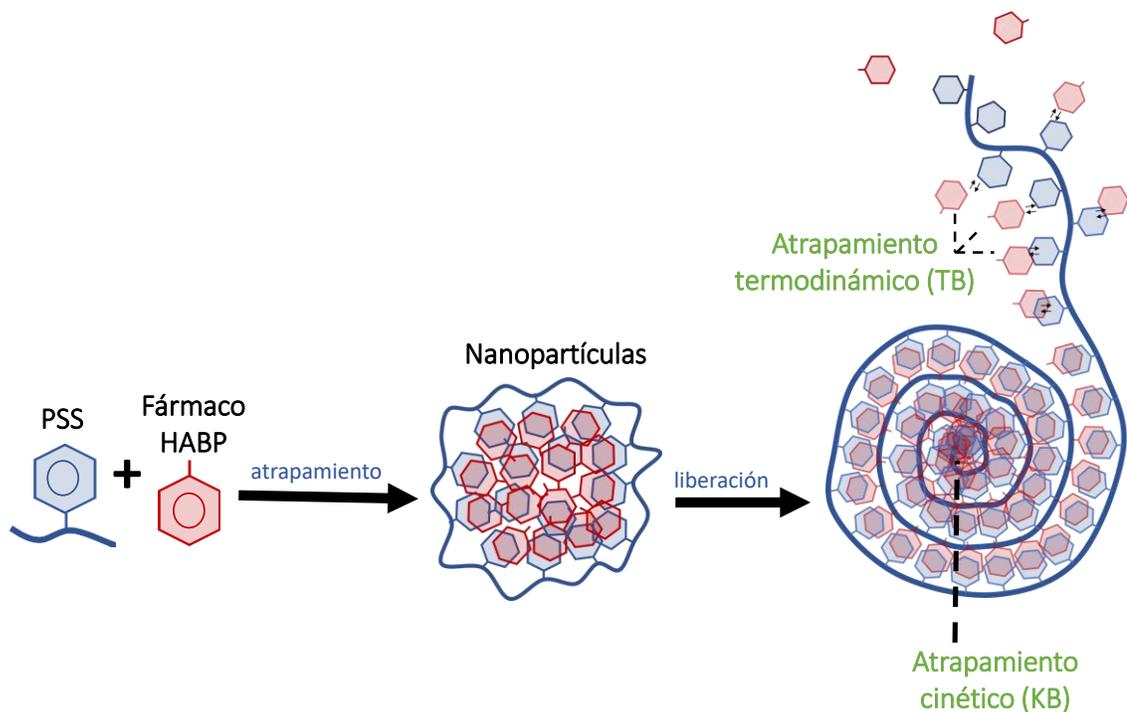


Figura 36. Mecanismo de liberación propuesto para los nanovehículos desarrollados.

VI.4. Estudio de la influencia de la concentración de agregación crítica “cac” en el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP desde los nanosistemas.

Es conocido que las moléculas HABP son capaces de autoasociarse y sus valores autoasociación se encuentran descritos para varias especies [89]. En ese sentido, para corroborar la capacidad de auto asociación de las moléculas seleccionadas, se realizaron experimentos adicionales para AMI siguiendo el método propuesto por LaPlante y cols. [107]. El método describe el monitoreo de los espectros de RMN- H^1 en función de la concentración. Sí la molécula de

interés se autoasocia, se esperan cambios y características de RMN inusuales debido a cambios en los entornos locales. Por lo tanto, la concentración de agregación crítica (*cac*) será aquella donde se evidencien cambios con respecto a los espectros característicos, tales como variación en el número de señales, ensanchamiento de señales y/o desplazamientos químicos. Como se observa en la **Figura 37**, la autoasociación de AMI se encuentra entre 30 mM y 50 mM, evidenciado por un fuerte desplazamiento de las señales a campo alto (δ menor), coincidiendo con lo reportado en la literatura (*cac* \approx 36 mM) [125].

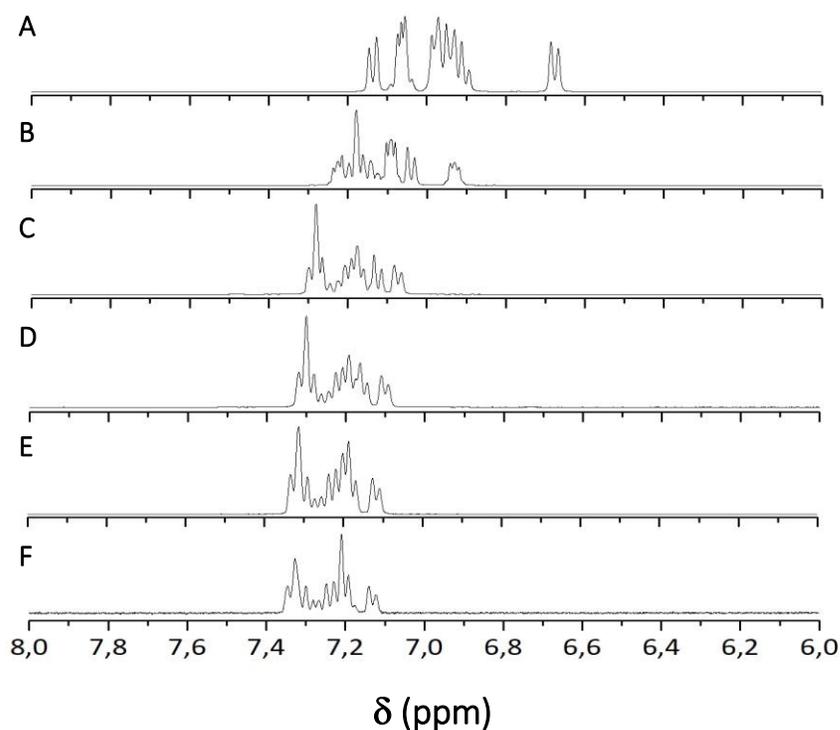


Figura 37. Espectro de RMN-¹H en la región aromática de: AMI **A)** 100 $\times 10^{-3}$ M, **B)** 50 $\times 10^{-3}$ M, **C)** 30 $\times 10^{-3}$ M, **D)** 20 $\times 10^{-3}$ M, **E)** 10 $\times 10^{-3}$ M, **F)** 1 $\times 10^{-3}$ M.

Interesantemente, las NPs desarrolladas en nuestra investigación ocurren en concentraciones de fármacos HABP muy por debajo de las *cac* reportadas. De manera preliminar, se puede pensar que la capacidad de autoasociación de los fármacos seleccionados (formando un polímero cuyos monómeros no se encuentran asociados covalentemente), aunado a la presencia de interacciones aromático-aromático con el polímero PSS, generarían un efecto sinérgico que produce el acoplamiento íntimo observado promoviendo la formación de NPs (a concentraciones de fármaco HABP menores que la *cac*). Para ello, se realizó un estudio comparativo entre diferentes fármacos HABP, dos de ellos con la misma *cac*, en el caso de AMI y PMZ (*cac* \approx 36 mM [88, 126]), y clorfenamina (CPM) con *cac* significativamente mayor (*cac* \approx 69.5 mM [88, 89]). Considerando que los complejos AMI/PSS, PMZ/PSS han sido bien descritos en los objetivos previos, en el presente apartado nos concentramos en explorar la formación de los complejos CPM/PSS y comparar los resultados con los obtenidos previamente (específicamente con las NPs AMI/PSS 0.6, AMI/PSS 0.8, PMZ/PSS 0.6 y PMZ/PSS 0.8).

Inicialmente, la formación de las formulaciones CPM/PSS fue monitoreada por turbidimetría en relaciones molares [fármaco]/[polímero] entre 0.1 y 2.0. Para ello, siguiendo con el procedimiento descrito en la sección V.1., se prepararon soluciones del fármaco CPM y el polímero PSS a pH 7.0, aumentando la concentración de CPM (monoprotonada al pH de trabajo; pKa₁: 4.0 y pKa₂: 9.4), mientras se mantuvo constante la concentración de PSS (3.3×10^{-3} M, misma

concentración ocupada para los sistemas AMI/PSS y PMZ/PSS). Interesantemente, durante este estudio no se observó la presencia de turbidez en ninguna de las relaciones molares estudiadas ([fármaco]/[polímero] entre 0.1 y 2.0). Debido al comportamiento descrito, se aumentó la concentración de polímero PSS (hasta 4.95×10^{-3} M), y a partir de allí, se realizó un nuevo estudio de relaciones molares. En la **Figura 38A**, se observa que la aparición turbidez ocurre en relaciones [fármaco]/[polímero] muy superiores (CPM/PSS 1.4 y CPM/PSS 1.6). **Influencia cac:** considerando que la formación de NPs AMI/PSS y PMZ/PSS ocurre en concentraciones de fármaco que van entre 1.3×10^{-3} M y 2.6×10^{-3} M y de PSS de 3.3×10^{-3} M, mientras que la formación de NPs CPM/PSS ocurre en concentraciones de fármaco que van entre 6.9×10^{-3} M y 7.9×10^{-3} M y de PSS de 4.95×10^{-3} M; se puede pensar que mayores cac requieren mayor concentración de fármaco HABP para formar NPs. La teoría propuesta se confirma observando que la obtención de NPs a bajas relaciones molares ([fármaco]/[polímero] entre 0.6 y 0.8) ocurre para los fármacos HABP con menor cac (AMI y PMZ).

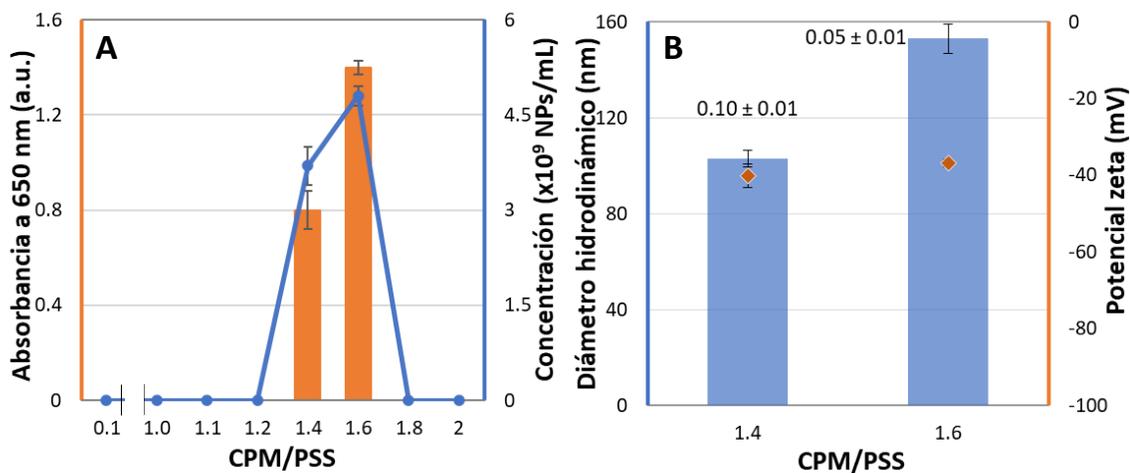


Figura 38. Representación gráfica de: **A)** concentración de NPs (partículas/mL) versus turbidimetría (a.u.), **B)** diámetro hidrodinámico (columna), potencial zeta (rombo), e índice de polidispersión (número) de las nanopartículas CPM/PSS (promedio \pm d.e., n=3).

Adicionalmente, en la **Figura 38A** también es posible observar una correlación directa entre el análisis turbidimétrico y el número de NPs/mL obtenidos por NTA.

Influencia cac: curiosamente, el número de NPs formadas es similar para todas las formulaciones AMI/PSS, PMZ/PSS y CPM/PSS (entre 10^9 y 10^{10} NPs/mL), aun cuando las concentraciones requeridas para formar los nanosistemas difieren significativamente, lo que apoya firmemente nuestra hipótesis del papel crucial de la capacidad de autoagregación del fármaco para la obtención eficiente de estos nanosistemas.

Adicionalmente, en las **Figuras 38B** se puede evidenciar que las NPs obtenidas poseen tamaños entre 100 y 160 nm, índice de polidispersión alrededor de 0.1 y potencial zeta negativo (-37 mV y -41 mV) los cuales son similares a los sistemas con AMI y PMZ. Los parámetros de asociación para las NPs CPM/PSS se

analizaron por ultrafiltración. Como era de esperarse, se obtuvieron altos porcentajes de eficiencia de asociación (83-89 %), carga de fármaco (54-67 %) y rendimiento (≈ 94 %) (**Tabla 7**). Las magnitudes obtenidas coinciden con las previamente estudiadas para los sistemas AMI/PSS y PMZ/PSS, especialmente la alta carga de fármaco la que supera hasta en 300 % las reportadas por otras nanopartículas que contienen fármacos HABP (1.3-27.2 %) [127-129].

Tabla 7. Parámetros de asociación de las NPs CPM/PSS estudiadas.

CPM/PSS	EA (%)	Carga de fármaco (%)	Rendimiento (%)
1.4	82.7 \pm 2.6	59.4 \pm 1.0	93.7 \pm 3.9
1.6	88.3 \pm 1.0	67.2 \pm 0.4	94.0 \pm 6.3

Una vez formadas y caracterizadas las NPs CPM/PSS ([fármaco]/[polímero] entre 1.4 y 1.6) se procedió a identificar las interacciones formadas entre CPM y el polímero aromático PSS. Como se explicó anteriormente, la RMN permite identificar las interacciones entre los grupos aromáticos del fármaco HABP y el PSS mediante el desplazamiento y/o ensanchamiento de sus señales. La **Figura 39** corresponde a los estudios de ^1H -RMN en la región aromática (6-8 ppm) para CPM, a la misma concentración que se realizaron los estudios para AMI y PMZ: 1×10^{-3} M, en ausencia y presencia del polímero aromático PSS (el espectro completo y la asignación de las señales se muestra detalladamente en el **Anexo 6**). En ella se observan desplazamientos en los protones aromáticos de CPM hacia campo alto (δ menor) debido a su interacción con los grupos benceno sulfonatos del PSS como evidencia del comportamiento previamente descrito.

Influencia cac: de manera contrastante con los sistemas ya estudiados AMI/PSS y PMZ/PSS (donde las señales presentan gran ensanchamiento y tienden a desaparecer casi por completo), el espectro de CPM en presencia de PSS muestra señales con menor desplazamiento hacia campo alto y señales más definidas; estos hallazgos pueden ser interpretados como evidencia de un mayor intercambio molecular de CPM con el medio, y que se refleja como una menor interacción entre los protones aromáticos de las moléculas presentes (recordar que todos los experimentos de RMN se hacen en las mismas condiciones para todas las formulaciones). Por lo tanto, las diferencias observadas podrían corresponder a los diferentes grados de autoasociación de los fármacos HABP en el medio que dan paso a la interacción con el polímero PSS.

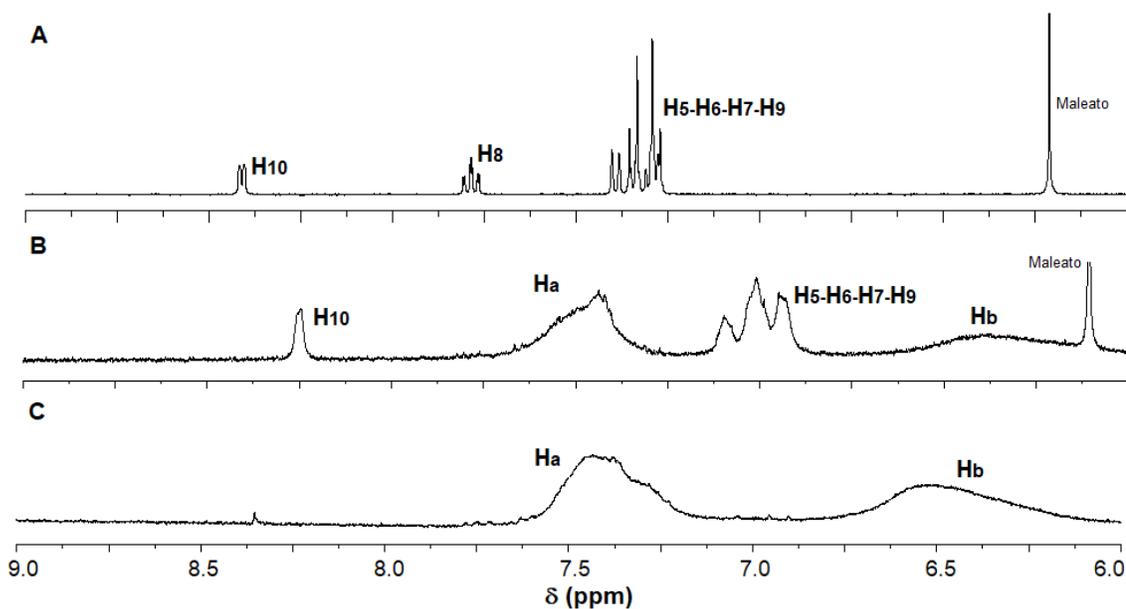


Figura 39. Espectro de RMN-¹H en la región aromática: **A)** de CPM 1×10^{-3} M en ausencia del polímero PSS, **B)** CPM 1×10^{-3} M en presencia de 1×10^{-2} M del polímero PSS y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

En el **Anexo 7** se muestra los parámetros de DF para las NPs CPM/PSS 1.4 y 1.6 obtenidos según el tratamiento de los datos aplicando las ecuaciones descritas en la sección V.2. De manera interesante, como se observa la **Figura 40**, existe un menor grado de interacción/atrapamiento entre el fármaco CPM y el polímero PSS. Lo dicho anteriormente, coincide con una caída exponencial en la retención de CPM (**Figura 40B**) congruente con un atrapamiento cinético menor ($K_B \approx 50\%$, **Tabla 8**). **Influencia cac:** de acuerdo con los resultados previamente discutidos, en el caso de las moléculas con menor *cac* (AMI y PMZ), el atrapamiento del fármaco se atribuye casi por completo a asociaciones cinéticas ($\geq 90\%$) en comparación con CPM ($\approx 50\%$).

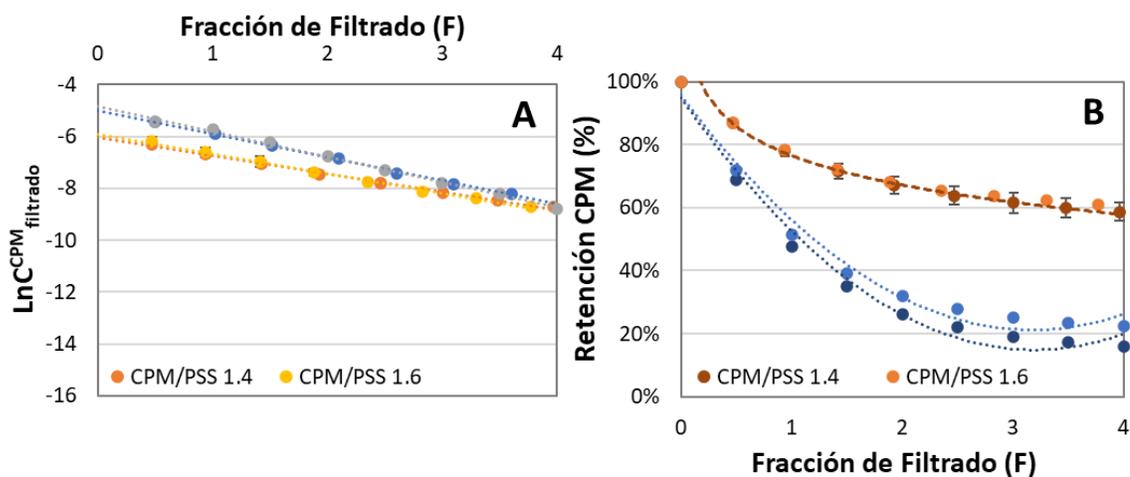


Figura 40. Perfiles de DF **A)** y perfiles de retención de las formulaciones **B)** CPM/PSS 1.4 y 1.6 (líneas multicolor). Experimentos blancos: CPM en ausencia de polímero (líneas en escala azules), (promedio \pm d.e., $n=3$).

Tabla 8. Parámetros de diafiltración para las nanopartículas CPM/PSS 1.4 y 1.6 (promedio \pm d.e., n=3).

CPM/PSS	[CPM] ($\times 10^{-3}M$)	PSS ($\times 10^{-3}M$)	K_{dis}	KB%	TB%	EA%
1.4	6.93	4.90	3.31 ± 0.94	49.85 ± 2.14	5.52 ± 3.02	55.37 ± 1.74
1.6	7.92	4.90	3.27 ± 0.99	49.72 ± 8.69	6.48 ± 4.85	56.21 ± 3.85

Interesantemente, la % EA determinada por DF para las NPs CPM/PSS es significativamente inferior (CPM/PSS 1.4 = 55.4 % y CPM/PSS 1.6 = 56.2%, **Tabla 8**) que los valores obtenidos por ultrafiltración (CPM/PSS = 82.7 % y CPM/PSS = 88.3 %, **Tabla 7**), lo que no ocurre con las NPs con menores cac (AMI/PSS y PMZ/PSS, ver sección VI.2.2.). **Influencia cac:** La diferencia observada coincide con nuestra hipótesis de que mayores cac requieren de más fármaco HBP para formar y estabilizar las NPs. Al ser la DF un método de “lavado”, la concentración de fármaco HBP va disminuyendo dinámicamente durante el experimento. De esta manera, la concentración óptima necesaria para mantener estables las NPs CPM/PSS (y que depende también de la autoagregación entre las especies moleculares) se pierde durante el proceso y ocurre la rápida desestructuración de las NPs (lo que puede verse confirmado por el evidente cambio óptico en el interior de la celda, pasando desde una suspensión altamente turbia a una solución translúcida a medida que se filtra el fármaco a través de la membrana, **Anexo 8**). Esta desestabilización “no se observa en la ultrafiltración” ya que el método no contempla una “dilución” de las NPs (al contrario, ocurre un proceso de concentración donde el solvente es filtrado junto con las moléculas no asociadas a través de la membrana).

Finalmente, en los estudios de liberación *in vitro* (diálisis y aparato USP 4) para CPM/PSS 1.4 y 1.6 se observó una liberación de hasta el $\approx 55\%$ durante las primeras 6 horas (**Fig. 41A-B**). En el estudio de liberación prolongada (20 días) se alcanzó una liberación casi total de CPM ($\approx 90\%$) (inserto **Fig. 41A**). Adicionalmente, en base a los criterios estadísticos R^2 , AIC y MSC (descritos en la sección V.4.) se determinó que el mecanismo de liberación se ajusta al modelo de Korsmeyer-Peppas (un ejemplo de ajuste se muestra en el **Anexo 9**), con un valor de $n < 0.43$, evidenciando que la liberación ocurre mediada por procesos de difusión [124]. **Influencia de cac:** de acuerdo con lo discutido anteriormente, la liberación de fármaco HABP más prolongada se logró para aquellas especies con *cac* más baja (AMI/PSS 0.6 $\approx 16.5\%$, AMI/PSS 0.8 $\approx 15.8\%$, PMZ/PSS 0.6 $\approx 20.5\%$ y PMZ/PSS 0.8 $\approx 25\%$, durante 20 días) mientras que una liberación significativamente más rápida fue obtenida para CPM (CPM/PSS 1.4 $\approx 80.0\%$ y CPM/PSS 1.6 $\approx 98.0\%$, durante 20 días). El comportamiento observado está estrechamente relacionado con los valores de las constantes de disociación (K_{dis}) obtenidos por diafiltración. El análisis de los datos evidenció que el mecanismo de liberación de los fármacos HABP ensayados ocurre por difusión, según el ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas y la determinación del parámetro “n” (**Tabla 9**). Como ya se mencionó el mecanismo propuesto sugiere que los fármacos HABP ensayados se encuentran atrapados en el polímero aromático, y la liberación ocurre bajo la influencia de una gradiente de concentración [124]. Este comportamiento está directamente relacionado con el tipo de atrapamiento

observado previamente por DF. Los fármacos HABP que presentan mayor asociación cinética (% KB) (AMI, PMZ) se liberan más lentamente de las NPs versus los fármacos con mayor asociación termodinámica (% TB) (CPM) que se liberan con mayor rapidez. Estos resultados evidencian la correlación directa entre la *cac* de los fármacos HABP seleccionados y el tiempo de liberación después de formar las NPs con el polímero aromático PSS.

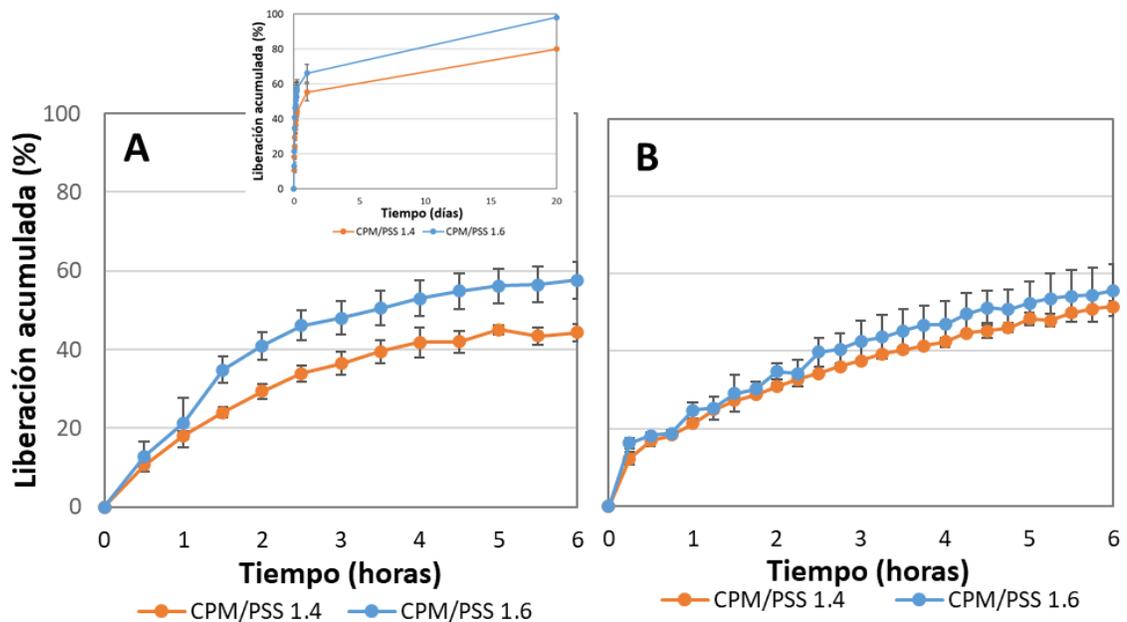


Figura 41. Liberación acumulada (%) de CPM/PSS 1.4 (línea azul) y CPM/PSS 1.6 (línea naranja) mediante: **A)** diálisis por 6 horas y durante 20 días (inserto), y **B)** celda de flujo continuo aparato USP 4 durante 6 horas (promedio \pm d.e., n=3).

Tabla 9. Ajuste de datos (diálisis y aparato USP 4) de nanopartículas CPM/PSS 1.4 y 1.6 a modelos de liberación.

Formulación	Modelo	Diálisis				Aparato USP 4			
		R ²	AIC	MSC	n	R ²	AIC	MSC	n
CPM/PSS 1.4	Orden Cero	0.40	-20.15	-0.20	-	0.91	-77.68	1.94	-
	Primer Orden	0.40	-20.15	-0.20	-	0.91	-77.74	1.95	-
	Higuchi	0.41	-20.45	-0.18	-	0.98	-119.03	3.60	-
	Korsmeyer-Peppas	0.87	-39.78	1.20	0.20	0.99	-133.78	4.19	0.42
CPM/PSS 1.6	Orden Cero	0.34	-12.24	-0.34	-	0.89	-69.21	1.77	-
	Primer Orden	0.34	-12.24	-0.34	-	0.89	-69.26	1.77	-
	Higuchi	0.33	-12.24	-0.34	-	0.96	-96.98	2.88	-
	Korsmeyer-Peppas	0.83	-31.22	1.02	0.24	0.98	-103.51	3.14	0.40

En resumen, en este objetivo fue posible observar una tendencia directa que relaciona el atrapamiento y liberación de los fármacos HABP seleccionados (todos destinados al tratamiento de enfermedades crónicas) con el polímero aromático PSS en función de la *cac*. En general, los fármacos seleccionados presentan diferente grado de autoasociación ($AMI \approx PMZ < CPM$) y que influyen directamente en el grado de interacción con el polímero aromático PSS. Por lo tanto, las concentraciones necesarias para formar NPs ocurren en el mismo orden de la *cac* ($AMI \approx PMZ < CPM$). Interesantemente, y a pesar de las diferencias en las concentraciones se obtiene un número de partículas en una magnitud similar. En consecuencia, es lógico esperar que a mayor asociación y/o atrapamiento, menor sea la capacidad de liberación de los fármacos HABP desde la matriz polimérica. Por su parte, los estudios de diafiltración, diálisis y el aparato USP 4 arrojan resultados que corroboran esta teoría, evidenciando una tendencia

a la liberación en el mismo orden ($AMI \approx PMZ < CPM$). Finalmente, con las evidencias obtenidas, se puede concluir que la *cac* juega un rol crítico en el proceso de formación de las NPs, que además es clave en su estabilidad, y por lo tanto, repercute directamente en el tiempo de liberación. Esta información podría ser utilizada como una herramienta potente para el diseño racional de sistemas prolongados de administración de medicamentos para el tratamiento de enfermedades crónicas.

CONCLUSIONES

En la presente investigación, se logró desarrollar una estrategia simple, eficiente y en medio acuoso para la obtención de nanomedicamentos compuestos por fármacos hidrofílicos y aromáticos de bajo peso molecular (HABP), con el polímero aromático PSS, cumpliendo con la hipótesis planteada en esta tesis. La caracterización fisicoquímica identificó que las nanopartículas (NPs) presentan tamaños en un rango entre 120-180 nm, bajo índice de polidispersión (0.2-0.3) y potencial zeta negativo (-60 a -80 mV). Estos sistemas son estables frente a diferentes estímulos (concentración de sales, pH, temperatura y tiempo) y se pueden transformar en un polvo reconstituible manteniendo sus características iniciales (tamaño hidrodinámico y potencial zeta). Adicionalmente, la estrategia utilizada fue exitosa en generar NPs con alta eficiencia de asociación (hasta 100 %) y alta carga de fármaco (hasta el 67 %). Por su parte, la obtención de sistemas estables, con altos parámetros de asociación, se atribuyó a la presencia de interacciones aromático-aromático entre los fármacos HABP y el PSS; siendo el atrapamiento en su mayoría cinéticamente controlado (% KB) con constantes de disociación (K_{dis}) bajas, y con perfiles de liberación prolongados que presentaron el mejor ajuste para la ecuación de Korsmeyer-Peppas. El análisis de los resultados obtenidos dejó en evidencia un mecanismo de atrapamiento/liberación que contempla la contribución de fenómenos dinámicos tales como difusión, hinchazón, hidratación molecular, cambios conformacionales en la matriz polimérica, cambios en la

movilidad molecular de las macromoléculas y un cambio en la naturaleza de la unión del fármaco al polímero. Finalmente, se comprobó que la capacidad de autoasociación (concentración de agregación crítica, *cac*) de cada fármaco juega un rol crítico en el proceso de formación y liberación del fármaco desde las NPs. Considerando la gran cantidad de fármacos HABP con importancia terapéutica, y la simplicidad de la estrategia presentada, consideramos que estos resultados pueden ser la base para elaborar una serie de sistemas de administración prolongada de fármacos con aplicaciones en diferentes patologías.

PROYECCIONES

La presente investigación, establece las bases para el desarrollo de nuevos nanomedicamentos de administración controlada y prolongada que contenga fármacos hidrofílicos y aromáticos de bajo peso molecular (HABP) con el polímero poli (4-estirensulfonato de sodio). Si bien, los resultados obtenidos apuntan a un comportamiento similar entre los fármacos seleccionados, queda claro que el mayor número de cargas disponibles en el fármaco HABP cloroquina tiene un efecto en la formación, estabilización y posterior liberación del fármaco. El comportamiento observado sugiere la contribución de otros componentes químicos que están influyendo en la formación de los nanovehículos; por lo que, el estudio sistemático de nuevas variables (número de cargas, número de anillos aromáticos, LogP, entre otros) que hipotéticamente inciden en el colapso polimérico se hace necesario. La espectroscopía de flujo detenido (stopped flow) podría ser una herramienta útil para este proceso determinando la cinética de formación. Por su parte, evaluar los nanovehículos obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) permitirían elucidar si efectivamente el atrapamiento de los fármacos HABP con el polímero PSS es cinéticamente controlado, además de determinar/confirmar las constantes de disociación. Los estudios propuestos permitirían otorgar más información respecto a la fuerza de interacción entre los fármacos HABP y el polímero aromático. Adicionalmente, es importante considerar las posibles interacciones que tienen las NPs con el medio que las rodea, específicamente con medios biológicos simulados, que pueden

incidir directamente en los resultados obtenidos; así como la determinación de la seguridad mediante estudios de viabilidad celular. Finalmente, considerando la naturaleza no biodegradable del polímero PSS, se propone la inclusión de las NPs en un sistema implantable subcutáneo y removible tipo “host” (con un tamaño de poro específico que permita la salida exclusiva del fármaco HABP). De esa manera, el polímero PSS se mantendría atrapado de forma segura mientras se libera el fármaco HABP desde el sistema.

REFERENCIAS

1. Lu, B. and A. Atala, *Chapter 6 - Small Molecules: Controlling Cell Fate and Function*, in *In Situ Tissue Regeneration*, S.J. Lee, J.J. Yoo, and A. Atala, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 87-110.
2. Tomar, V., et al., *Small Molecule Drug Design*, in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, S. Ranganathan, et al., Editors. 2019, Content Repository Only!: Oxford. p. 741-760.
3. Badri, W., et al., *Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016. **515**(1): p. 757-773.
4. Weggen, S., M. Rogers, and J. Eriksen, *NSAIDs: small molecules for prevention of Alzheimer's disease or precursors for future drug development?* *Trends in Pharmacological Sciences*, 2007. **28**(10): p. 536-543.
5. Chen, Y., et al., *Small molecule therapeutics for inflammation-associated chronic musculoskeletal degenerative diseases: Past, present and future*. *Experimental Cell Research*, 2017. **359**(1): p. 1-9.
6. Price, R.D., et al., *Advances in small molecules promoting neurotrophic function*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007. **115**(2): p. 292-306.
7. Zhang, T.-T., et al., *Network-based drug repositioning: A novel strategy for discovering potential antidepressants and their mode of action*. *European Neuropsychopharmacology*, 2018.

8. Puras, P. and P.B. Mitchell, *Chapter 2 - Antidepressant drugs*, in *Side Effects of Drugs Annual*, J.K. Aronson, Editor. 2014, Elsevier. p. 27-39.
9. Traylor, K., H. Gurgle, and J. Brockbank, *Antihypertensive Drugs*, in *Side Effects of Drugs Annual*. 2018, Elsevier.
10. Cheng, B., et al., *Recent advances in small molecule based cancer immunotherapy*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. **157**: p. 582-598.
11. Arpicco, S., et al., *Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016. **32**: p. 298-312.
12. Mehtani, D., et al., *Chapter 4 - Biomaterials for Sustained and Controlled Delivery of Small Drug Molecules*, in *Biomaterials and Bionanotechnology*, R.K. Tekade, Editor. 2019, Academic Press. p. 89-152.
13. Lévesque, H. and O. Lafont, *[Aspirin throughout the ages: a historical review]*. *Rev Med Interne*, 2000. **21 Suppl 1**: p. 8s-17s.
14. Mao, F., et al., *Chemical Structure-Related Drug-Like Criteria of Global Approved Drugs*. *Molecules*, 2016. **21**(1): p. 75.
15. Lee, R.F. and J.W. Anderson, *Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills*. *Mar Pollut Bull*, 2005. **50**(7): p. 705-23.

16. Mallinson, S.J.B., et al., *A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 2487.
17. Bathelt, C.M., et al., *Mechanism and structure–reactivity relationships for aromatic hydroxylation by cytochrome P450*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2004. **2**(20): p. 2998-3005.
18. Oláh, J., A.J. Mulholland, and J.N. Harvey, *Understanding the determinants of selectivity in drug metabolism through modeling of dextromethorphan oxidation by cytochrome P450*. 2011. **108**(15): p. 6050-6055.
19. Choe, H., et al., *A novel hypothesis for the binding mode of HERG channel blockers*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(1): p. 72-8.
20. Macdonald, L.C., et al., *Probing the molecular basis of hERG drug block with unnatural amino acids*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 289.
21. Ritchie, T. and S. Macdonald, *The impact of aromatic ring count on compound developability--are too many aromatic rings a liability in drug design?* Drug discovery today, 2009. **14**: p. 1011-20.
22. Sudlow, G., D.J. Birkett, and D.N. Wade, *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*. Mol Pharmacol, 1975. **11**(6): p. 824-32.
23. Trainor, G.L., *The importance of plasma protein binding in drug discovery*. Expert Opin Drug Discov, 2007. **2**(1): p. 51-64.

24. Alex, A.A. and R. Ian Storer, *Chapter 1 Drugs and their Structural Motifs*, in *Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET*. 2010, The Royal Society of Chemistry. p. 1-60.
25. Dutkiewicz, Z. and R. Mikstacka, *Structure-Based Drug Design for Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018. **2018**: p. 3924608.
26. Schneider, C., et al., *Applications of ethylene vinyl acetate copolymers (EVA) in drug delivery systems*. *J Control Release*, 2017. **262**: p. 284-295.
27. Zhou, H.Y., et al., *Design and evaluation of chitosan- β -cyclodextrin based thermosensitive hydrogel*. *Biochemical Engineering Journal*, 2016. **111**: p. 100-107.
28. Lim, H.-P., et al., *Controlled delivery of oral insulin aspart using pH-responsive alginate/ κ -carrageenan composite hydrogel beads*. *Reactive and Functional Polymers*, 2017. **120**: p. 20-29.
29. Gritsch, L., et al., *Crosslinked gelatin hydrogels as carriers for controlled heparin release*. *Materials Letters*, 2018. **228**: p. 375-378.
30. Chen, Y., et al., *Heparin-mimetic polyurethane hydrogels with anticoagulant, tunable mechanical property and controllable drug releasing behavior*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017. **98**: p. 1-11.

31. Wu, C., et al., *Redox-responsive supramolecular hydrogel based on 10-hydroxy camptothecin-peptide covalent conjugates with high loading capacity for drug delivery*. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **76**: p. 196-202.
32. Wei, L., et al., *Thermo-sensitive polypeptide hydrogel for locally sequential delivery of two-pronged antitumor drugs*. *Acta Biomaterialia*, 2017. **58**: p. 44-53.
33. Goonoo, N., et al., *Naltrexone: A review of existing sustained drug delivery systems and emerging nano-based systems*. *Journal of Controlled Release*, 2014. **183**: p. 154-166.
34. Ramazani, F., et al., *Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016. **499**(1): p. 358-367.
35. Han, F.Y., et al., *Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading*. *Frontiers in pharmacology*, 2016. **7**: p. 185-185.
36. Ruel-Gariepy, E., et al., *Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs*. *Int J Pharm*, 2000. **203**(1-2): p. 89-98.
37. Chen, C.-H., et al., *Thermosensitive Injectable Hydrogel for Simultaneous Intraperitoneal Delivery of Doxorubicin and Prevention of Peritoneal Adhesion*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(5): p. 1373.

38. Liu, Z., et al., *A study of doxorubicin loading onto and release from sulfopropyl dextran ion-exchange microspheres*. *Journal of Controlled Release*, 2001. **77**(3): p. 213-224.
39. Prasad, M., et al., *Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. **97**: p. 1521-1537.
40. Jain, K., N.K. Mehra, and N.K. Jain, *Potentials and emerging trends in nanopharmacology*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014. **15**: p. 97-106.
41. Stevanović, M., *Chapter 11 - Polymeric micro- and nanoparticles for controlled and targeted drug delivery A2 - Andronescu, Ecaterina*, in *Nanostructures for Drug Delivery*, A.M. Grumezescu, Editor. 2017, Elsevier. p. 355-378.
42. Crommelin, D.J.A., P. van Hoogevest, and G. Storm, *The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what?* *Journal of Controlled Release*, 2020. **318**: p. 256-263.
43. Alven, S., et al., *Polymer-drug conjugates containing antimalarial drugs and antibiotics*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019. **53**: p. 101171.
44. Kesharwani, S.S., et al., *Multifunctional approaches utilizing polymeric micelles to circumvent multidrug resistant tumors*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. **173**: p. 581-590.

45. Sur, S., et al., *Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system*. Nano-Structures & Nano-Objects, 2019. **20**: p. 100397.
46. Oyarzun-Ampuero, F.A., et al., *Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma*. Int J Pharm, 2009. **381**(2): p. 122-9.
47. Oyarzun-Ampuero, F.A., et al., *A potential nanomedicine consisting of heparin-loaded polysaccharide nanocarriers for the treatment of asthma*. Macromol Biosci, 2012. **12**(2): p. 176-83.
48. George, A., P.A. Shah, and P.S. Shrivastav, *Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review*. Int J Pharm, 2019. **561**: p. 244-264.
49. Dalmoro, A., et al., *Hydrophilic drug encapsulation in shell-core microcarriers by two stage polyelectrolyte complexation method*. Int J Pharm, 2017. **518**(1-2): p. 50-58.
50. Vasvári, G., et al., *Matrix systems for oral drug delivery: Formulations and drug release*. Drug Discovery Today: Technologies, 2018. **27**: p. 71-80.
51. Segura-Ibarra, V., et al., *Nanotherapeutics for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. Frontiers in Physiology, 2018. **9**.
52. Li, J., et al., *Polymeric drugs: Advances in the development of pharmacologically active polymers*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2015. **219**: p. 369-382.

53. Ekladios, I., Y.L. Colson, and M.W. Grinstaff, *Polymer–drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects*. Nature Reviews Drug Discovery, 2019. **18**(4): p. 273-294.
54. Babazada, H., et al., *Self-assembling lipid modified glycol-split heparin nanoparticles suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4–NF- κ B signaling*. Journal of Controlled Release, 2014. **194**: p. 332-340.
55. Tang, J., et al., *Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **134**: p. 107-116.
56. Zhang, Y., et al., *Ionic-crosslinked polysaccharide/PEI/DNA nanoparticles for stabilized gene delivery*. Carbohydrate Polymers, 2018. **201**: p. 246-256.
57. Morán, M.C., et al., *Efficient encapsulation and release of RNA molecules from gelatin-based nanoparticles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017. **516**: p. 226-237.
58. Ito, F., et al., *Technique to encapsulate a low molecular weight hydrophilic drug in biodegradable polymer particles in a liquid–liquid system*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. **384**(1): p. 368-373.
59. Wang, X., et al., *Enhanced delivery of doxorubicin to the liver through self-assembled nanoparticles formed via conjugation of glycyrrhetic acid to*

- the hydroxyl group of hyaluronic acid*. Carbohydr Polym, 2018. **195**: p. 170-179.
60. Akhlaghi, S.P., et al., *Comparative release studies of two cationic model drugs from different cellulose nanocrystal derivatives*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, 2014. **88**(1): p. 207-215.
61. Son, K.D. and Y.-J. Kim, *Anticancer activity of drug-loaded calcium phosphate nanocomposites against human osteosarcoma*. Biomaterials research, 2017. **21**: p. 13-13.
62. Shi, Y., et al., *Pi-pi stacking increases the stability and loading capacity of thermosensitive polymeric micelles for chemotherapeutic drugs*. Biomacromolecules, 2013. **14**(6): p. 1826-37.
63. Li, Y., et al., *Non-covalent interactions in controlling pH-responsive behaviors of self-assembled nanosystems*. Polymer Chemistry, 2016. **7**(38): p. 5949-5956.
64. Paolino, M., et al., *π -Stacked polymers in drug delivery applications*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2016. **32**: p. 142-166.
65. Zhuang, W.-R., et al., *Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2019. **294**: p. 311-326.

66. Paolino, M., et al., *π -Stacked polymers in drug delivery applications*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2015. **32**.
67. Moreno-Villoslada, I., et al., *Binding of Methylene Blue to Polyelectrolytes Containing Sulfonate Groups*. 2009. **210**(13-14): p. 1167-1175.
68. Karabiyik, H., R. Sevinçek, and H. Karabiyik, *π -Cooperativity effect on the base stacking interactions in DNA: is there a novel stabilization factor coupled with base pairing H-bonds?* Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(29): p. 15527-15538.
69. Hunter, C.A. and J.K.M. Sanders, *The nature of π - π interactions*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(14): p. 5525-5534.
70. Zhang, Y., H.F. Chan, and K.W. Leong, *Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 104-20.
71. Headen, T.F., et al., *Structure of π - π Interactions in Aromatic Liquids*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(16): p. 5735-5742.
72. Meyer, E.A., R.K. Castellano, and F. Diederich, *Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(11): p. 1210-50.
73. Chris Howard, N.S. *Neutron Scattering Unravels the Structure of Aromatic " π - π " Interactions*. 2010; Available from: <https://www.london-nano.com/research/neutron-scattering-unravels-structure-aromatic-pi-pi-interactions>.

74. Pei, X., et al., *PEGylated nano-graphene oxide as a nanocarrier for delivering mixed anticancer drugs to improve anticancer activity*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 2717.
75. Wang, C., et al., *Cyclic RGD-modified chitosan/graphene oxide polymers for drug delivery and cellular imaging*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2014. **122**: p. 332-340.
76. Fuenzalida, J.P., et al., *Immobilization of hydrophilic low molecular-weight molecules in nanoparticles of chitosan/poly(sodium 4-styrenesulfonate) assisted by aromatic-aromatic interactions*. J Phys Chem B, 2014. **118**(32): p. 9782-91.
77. Moreno-Villoslada, I., et al., *Tuning the pKa of the antihistaminic drug chlorpheniramine maleate by supramolecular interactions with water-soluble polymers*. Polymer, 2007. **48**(3): p. 799-804.
78. Moreno-Villoslada, I., et al., *Comparison between the binding of chlorpheniramine maleate to poly(sodium 4-styrenesulfonate) and the binding to other polyelectrolytes*. Polymer, 2005. **46**(18): p. 7240-7245.
79. Moreno-Villoslada, I., et al., *Binding of chlorpheniramine maleate to pharmacologically important alginic acid, carboxymethylcellulose, κ -carageenan, and ι -carrageenan as studied by diafiltration*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. **98**(2): p. 598-602.
80. Moreno-Villoslada, I., et al., *Interactions of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride with poly(sodium 4-styrenesulfonate) studied by diafiltration and*

- UV-vis spectroscopy*. Journal of Membrane Science, 2004. **244**(1-2): p. 205-213.
81. Orellana, S.L., et al., *Association Efficiency of Three Ionic Forms of Oxytetracycline to Cationic and Anionic Oil-In-Water Nanoemulsions Analyzed by Diafiltration*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **104**(3): p. 1141-1152.
 82. Hollander-Rodriguez, J.C. and J.F. Calvert, Jr., *Hyperkalemia*. Am Fam Physician, 2006. **73**(2): p. 283-90.
 83. Mistry, M., et al., *Evaluation of Sodium Polystyrene Sulfonate Dosing Strategies in the Inpatient Management of Hyperkalemia*. Ann Pharmacother, 2016. **50**(6): p. 455-62.
 84. Herold, B., et al., *Poly(Sodium 4-Styrene Sulfonate): An Effective Candidate Topical Antimicrobial for the Prevention of Sexually Transmitted Diseases*. The Journal of infectious diseases, 2000. **181**: p. 770-3.
 85. Bourne, N., et al., *Poly(sodium 4-styrene sulfonate): evaluation of a topical microbicide gel against herpes simplex virus type 2 and Chlamydia trachomatis infections in mice*. Clinical Microbiology and Infection, 2003. **9**(8): p. 816-822.
 86. Zairov, R., et al., *Polystyrenesulfonate-coated nanoparticles with low cytotoxicity for determination of copper(II) via the luminescence of Tb(III) complexes with new calix[4]arene derivatives*. Microchimica Acta, 2018. **185**.

87. Pranti, A., et al., *PEDOT: PSS Coating on Gold Microelectrodes with Excellent Stability and High Charge Injection Capacity for Chronic Neural Interfaces*. Sensors and Actuators B Chemical, 2018.
88. Attwood, D. and A.T. Florence, *Surface activity and colloidal properties of drugs and naturally occurring substances*, in *Surfactant Systems: Their chemistry, pharmacy and biology*, D. Attwood and A.T. Florence, Editors. 1983, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 124-228.
89. Srivastava, A., W. Qiao, and K. Ismail, *Physicochemical Interactions of Chlorpheniramine Maleate with Sodium Deoxycholate in Aqueous Solution*. 2018. **21**(6): p. 879-887.
90. Alam, M.S., D. Kabir ud, and A.B. Mandal, *Thermodynamics of Some Amphiphilic Drugs in Presence of Additives*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2010. **55**(7): p. 2630-2635.
91. Kumar, D. and M.A. Rub, *Effect of anionic surfactant and temperature on micellization behavior of promethazine hydrochloride drug in absence and presence of urea*. Journal of Molecular Liquids, 2017. **238**: p. 389-396.
92. Ahnfelt, E., et al., *Single bead investigation of a clinical drug delivery system - A novel release mechanism*. J Control Release, 2018.
93. Al-Tikriti, Y. and P. Hansson, *Drug-Eluting Polyacrylate Microgels: Loading and Release of Amitriptyline*. The Journal of Physical Chemistry B, 2020. **124**(11): p. 2289-2304.

94. Moreno-Villoslada, I., et al., *Comparative study of the self-aggregation of rhodamine 6G in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate), poly(N-phenylmaleimide-co-acrylic acid), poly(styrene-alt-maleic acid), and poly(sodium acrylate)*. J Phys Chem B, 2010. **114**(37): p. 11983-92.
95. Moreno-Villoslada, I., et al., *Aromatic-aromatic interaction between 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and poly(sodium 4-styrenesulfonate)*. J Phys Chem B, 2007. **111**(22): p. 6146-50.
96. Moreno-Villoslada, I., et al., *π -Stacking of rhodamine B onto water-soluble polymers containing aromatic groups*. Polymer, 2006. **47**(19): p. 6496-6500.
97. Moreno-Villoslada, I., et al., *Simultaneous interactions between a low molecular-weight species and two high molecular-weight species studied by diafiltration*. Journal of Membrane Science, 2006. **272**(1–2): p. 137-142.
98. Moreno-Villoslada, I., et al., *Stacking of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride onto polyelectrolytes containing 4-styrenesulfonate groups*. J Phys Chem B, 2008. **112**(36): p. 11244-9.
99. Kandil, E.A., et al., *Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of Parkinson's disease in rats*. Neuroscience, 2016. **332**: p. 26-37.
100. Akram, M., S. Anwar, and D. Kabir ud, *Biophysical investigation of promethazine hydrochloride binding with micelles of biocompatible gemini surfactants: Combination of spectroscopic and electrochemical analysis*.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019. **215**: p. 249-259.

101. Scholar, E., *Chloroquine*, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna and D.B. Bylund, Editors. 2007, Elsevier: New York. p. 1-7.
102. Azmi, S., et al., *Development and validation of fluorescence spectrophotometric method: Quantitation of chlorpheniramine maleate in pharmaceutical formulations*. Journal of Molecular Liquids, 2017. **243**.
103. Nothnagel, L. and M.G. Wacker, *How to measure release from nanosized carriers?* Eur J Pharm Sci, 2018. **120**: p. 199-211.
104. Catalan-Figueroa, J., et al., *A mechanistic approach for the optimization of loperamide loaded nanocarriers characterization: Diafiltration and mathematical modeling advantages*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **125**: p. 215-222.
105. Shen, J. and D.J. Burgess, *In Vitro Dissolution Testing Strategies for Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Developments and Challenges*. Drug Deliv Transl Res, 2013. **3**(5): p. 409-415.
106. Zhang, Y., et al., *DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles*. The AAPS journal, 2010. **12**(3): p. 263-271.

107. LaPlante, S.R., et al., *Compound Aggregation in Drug Discovery: Implementing a Practical NMR Assay for Medicinal Chemists*. Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(12): p. 5142-5150.
108. Manning, G.S., *Counterion condensation theory constructed from different models*. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 1996. **231**(1): p. 236-253.
109. Moreno-Villoslada, I., et al., *Binding of Methylene Blue to Polyelectrolytes Containing Sulfonate Groups*. Vol. 210. 2009. 1167-1175.
110. Orellana, S.L., et al., *Chitosan/chondroitin sulfate aerogels with high polymeric electroneutralization degree: formation and mechanical properties*. 2018. **90**(5): p. 901.
111. Santos, M., et al., *Binding of chloroquine to ionic micelles: Effect of pH and micellar surface charge*. Journal of Luminescence, 2014. **147**: p. 49–58.
112. Defante, A.P., et al., *Using Image Attributes to Assure Accurate Particle Size and Count Using Nanoparticle Tracking Analysis*. J Pharm Sci, 2018. **107**(5): p. 1383-1391.
113. Krueger, A.B., P. Carnell, and J.F. Carpenter, *Characterization of Factors Affecting Nanoparticle Tracking Analysis Results With Synthetic and Protein Nanoparticles*. J Pharm Sci, 2016. **105**(4): p. 1434-43.
114. Tong, M., et al., *Flow speed alters the apparent size and concentration of particles measured using NanoSight nanoparticle tracking analysis*. Placenta, 2016. **38**: p. 29-32.

115. Thouy, R. and R. Jullien, *A cluster-cluster aggregation model with tunable fractal dimension*. Journal of Physics A: Mathematical and General, 1994. **27**(9): p. 2953-2963.
116. Song, D., et al., *Dynamic Nanoparticle Aggregation for a Flowing Colloidal Suspension with Nonuniform Temperature Field Studied by a Coupled LBM and PBE Method*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017. **56**(38): p. 10886-10899.
117. Demetzos, C., *Fundamentals of Physical Pharmacy: The Biophysics of Nanosystems*. 2016. p. 17-61.
118. Oyarzun-Ampuero, F.A., et al., *Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery*. Eur J Pharm Sci, 2013. **49**(4): p. 483-90.
119. Cheow, W.S. and K. Hadinoto, *Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility*. Journal of Colloid and Interface Science, 2012. **367**(1): p. 518-526.
120. Zhao, L., H. Zhang, and W. Wang, *π - π stacking interaction in mixed surfactant solutions assembled by cationic surfactant and organic salt with a naphthalene nucleus*. Journal of Molecular Liquids, 2017. **240**: p. 14-20.
121. Nageh, H., Y. Wang, and T. Nakano, *Cationic polymerization of dibenzofulvene leading to a π -stacked polymer*. Polymer, 2018. **144**: p. 51-56.

122. Hart, L.R., et al., *Perylene as an electron-rich moiety in healable, complementary π - π stacked, supramolecular polymer systems*. *Polymer*, 2015. **69**: p. 293-300.
123. Meyer, E.A., R.K. Castellano, and F. Diederich, *Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition*. 2003. **42**(35): p. 4120-4120.
124. Korsmeyer, R.W., et al., *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1983. **15**(1): p. 25-35.
125. Al-Muhanna, M.K., et al., *Effect of gelatin on micellization and microstructural behavior of amphiphilic amitriptyline hydrochloride drug solution: A detailed study*. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2015. **89**: p. 112-122.
126. Kabir ud, D., M.A. Rub, and A.Z. Naqvi, *Mixed micelles of amphiphilic drug promethazine hydrochloride and surfactants (conventional and gemini) at 293.15K to 308.15K: Composition, interaction and stability of the aggregates*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011. **354**(2): p. 700-708.
127. Xu, J., et al., *Development of Hydrophilic Drug Encapsulation and Controlled Release Using a Modified Nanoprecipitation Method*. 2019. **7**(6): p. 331.

128. Govender, T., et al., *PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug*. J Control Release, 1999. **57**(2): p. 171-85.
129. Massella, D., et al., *Overcoming the Limits of Flash Nanoprecipitation: Effective Loading of Hydrophilic Drug into Polymeric Nanoparticles with Controlled Structure*. Polymers (Basel), 2018. **10**(10).

ANEXO 1

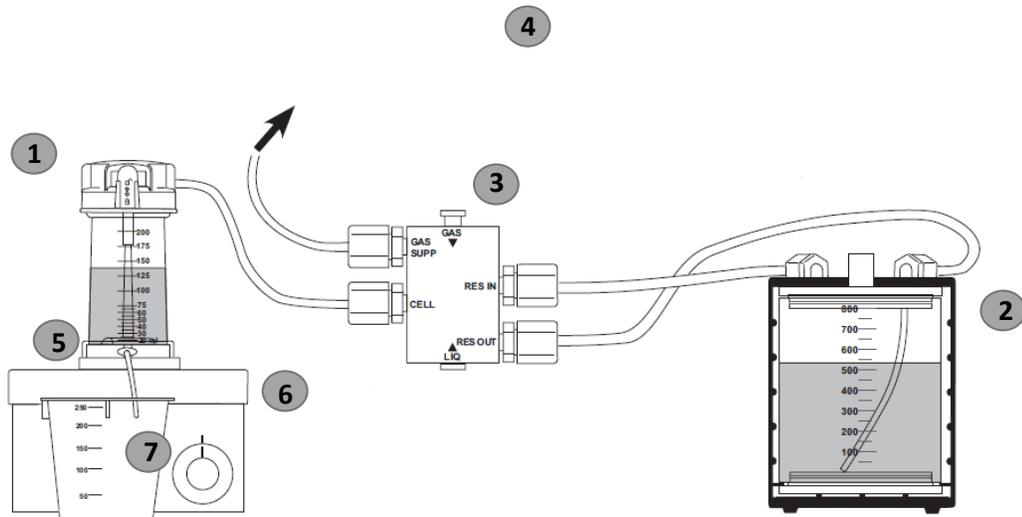


Figura A1. Representación gráfica del equipo de diafiltración conformado por: **1)** celda de diafiltración, **2)** depósito (medio de lavado), **3)** selector (selecciona el paso de gas o líquido), **4)** fuente de presión (nitrógeno), **5)** membrana semipermeable, **6)** equipo de agitación magnética, **7)** filtrado.

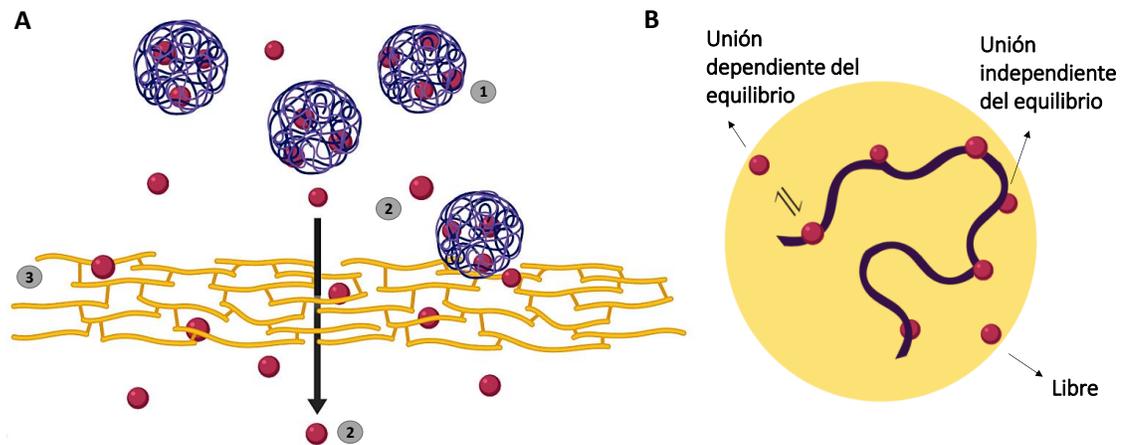


Figura A2. Representación gráfica del principio de la diafiltración: **A)** dentro de la celda de diafiltración tendremos dos componentes: las nanopartículas **(1)** y las moléculas de fármaco HABP libres en solución **(2)**, al iniciar el “lavado” sólo las moléculas libres en solución serán capaces de atravesar la membrana semipermeable **(3)** para ser recolectadas como filtrados. Simultáneamente, **B)** dentro de la nanopartícula una molécula con unión dependiente del equilibrio será liberada (según el principio de LeChatelier) y ocupará el lugar que dejó la molécula libre recién filtrada. Por lo tanto, sólo las moléculas con unión dependiente del equilibrio serán capaces de pasar a la solución (motivadas por equilibrios termodinámicos); mientras que aquellas moléculas HABP con unión independiente del equilibrio permanecerán asociadas a las nanopartículas (o vehículo, matriz, polímero, etc) por tiempos más extendidos. Como su nombre lo indica, NO son susceptibles a equilibrios termodinámicos, son gobernadas por la cinética, y por tal, serán liberadas en largos períodos de tiempo.

ANEXO 2

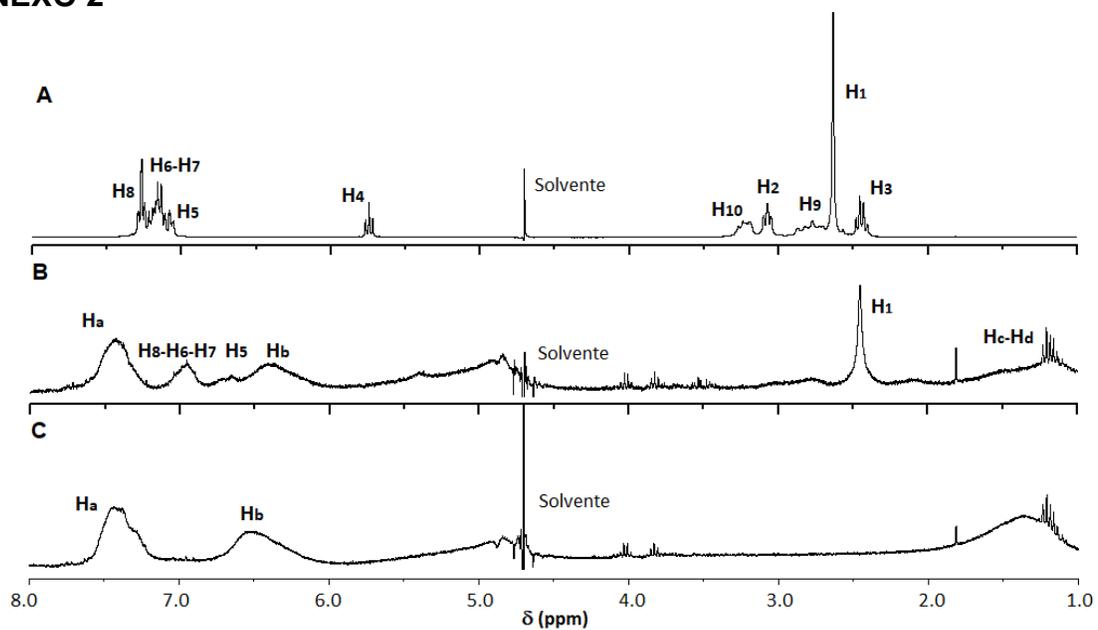


Figura A3. Espectro de RMN-1H de: **A)** AMI 1×10^{-3} M, **B)** AMI 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

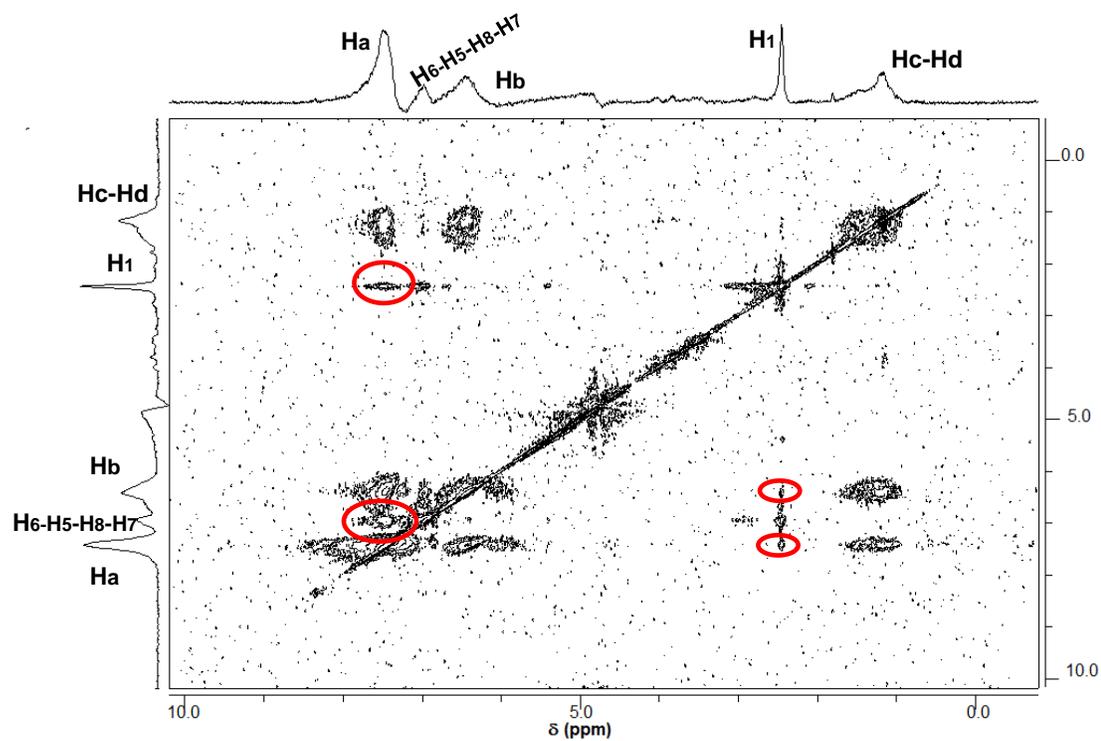
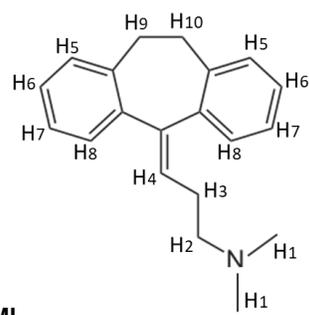


Figura A4. Espectro de RMN-¹H NOESY de AMI 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M.

Tabla A1. Asignación de protones correspondiente a la Figura A3 y Figura A4.

Protón	Desplazamiento químico, δ (ppm)	Área	Multiplicidad	
Amitriptilina (AMI)				 <p style="text-align: right;">AMI</p>
H1	2.57	6	singlete	
H2	3.07	2	triplete	
H3	2.42	2	cuadruplete	
H4	5.74	1	triplete	
H5	7.07	2	doblete	
H6-H7	7.16	4	multiplete	
H8	7.27	2	doblete	
PSS				
Ha	7.41	2	singlete amplio	
Hb	6.5	2	singlete amplio	
Hc-Hd	1.34	3	singlete amplio	
AMI/PSS				
Ha	7.41	2	singlete amplio	
Hb	6.5	2	singlete amplio	
Hc-Hd	1.34	3	singlete amplio	
H1	2.45	6	singlete	
H5	6.69	2	singlete amplio	
H8-H7-H6	6.94	6	singlete amplio	

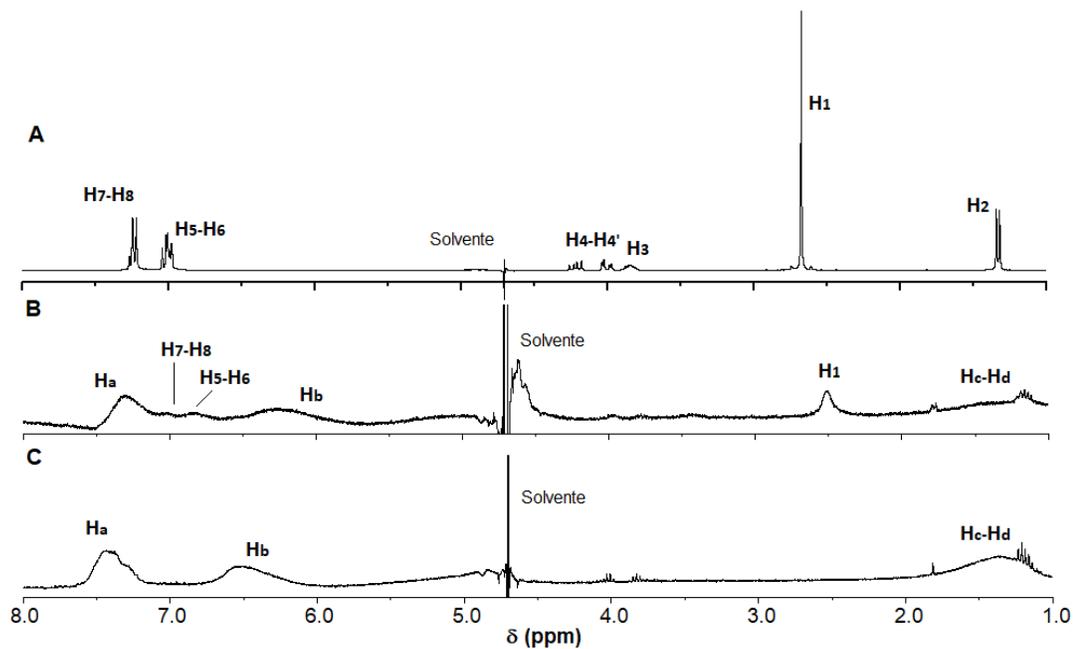


Figura A5. Espectro de RMN- ^1H de: **A)** PMZ 1×10^{-3} M, **B)** PMZ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

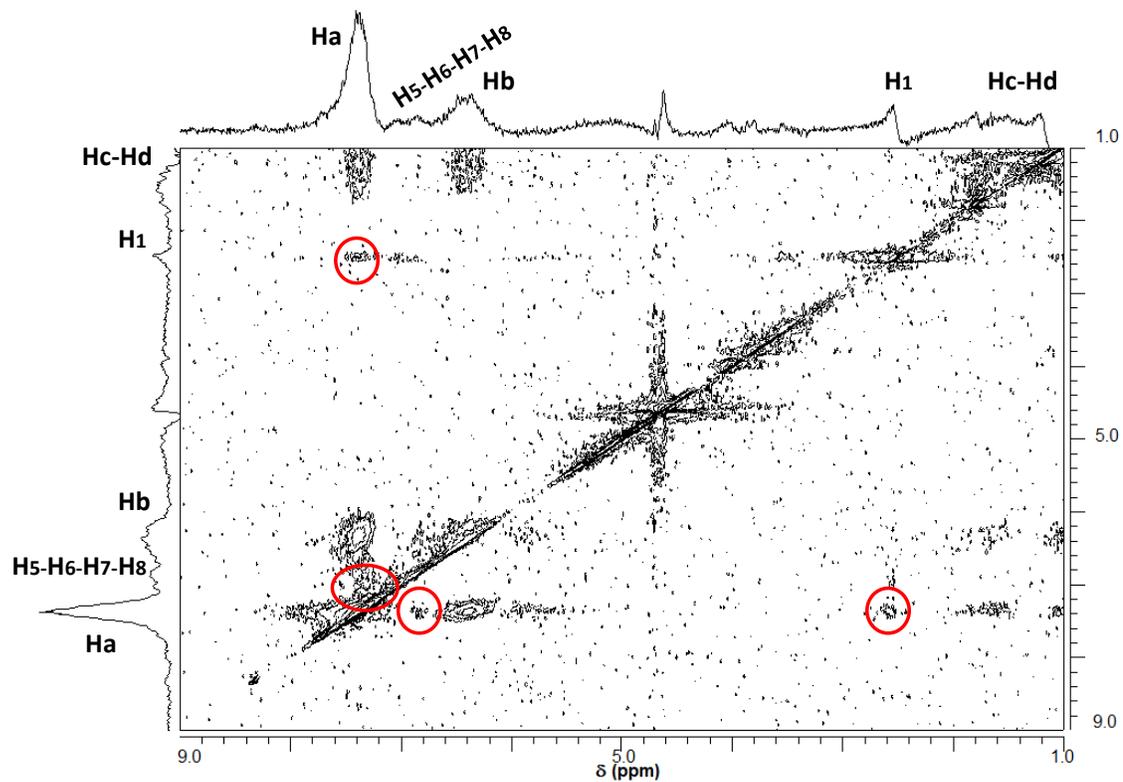
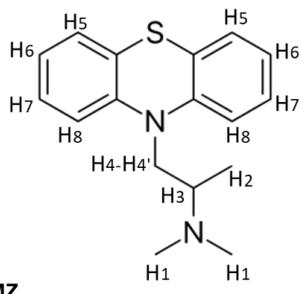
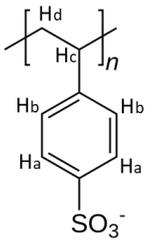


Figura A6. Espectro de RMN- ^1H NOESY de PMZ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M.

Tabla A2. Asignación de protones correspondiente a la Figura A5 y Figura A6.

Protón	Desplazamiento químico, δ (ppm)	Área	Multiplicidad	
Prometazina (PMZ)				 <p style="text-align: right;">PMZ</p>
H1	2.67	6	singlete	
H2	1.31	3	doblete	
H3	3.8	1	multiplete	
H4	4	1	doblete de doblete	
H4'	4.21	1	cuadruplete	
H5-H6	7.05	4	multiplete	
H7-H8	7.24	4	multiplete	
PSS				 <p style="text-align: right;">PSS</p>
Ha	7.41	2	singlete amplio	
Hb	6.5	2	singlete amplio	
Hc-Hd	1.34	3	singlete amplio	
PMZ/PSS				
Ha	7.3	2	singlete amplio	
Hb	6.25	2	singlete amplio	
Hc-Hd	1.34	3	singlete amplio	
H1	2.51	6	singlete	
H5-H6	6.82	4	multiplete	
H7-H8	7.03	4	multiplete	

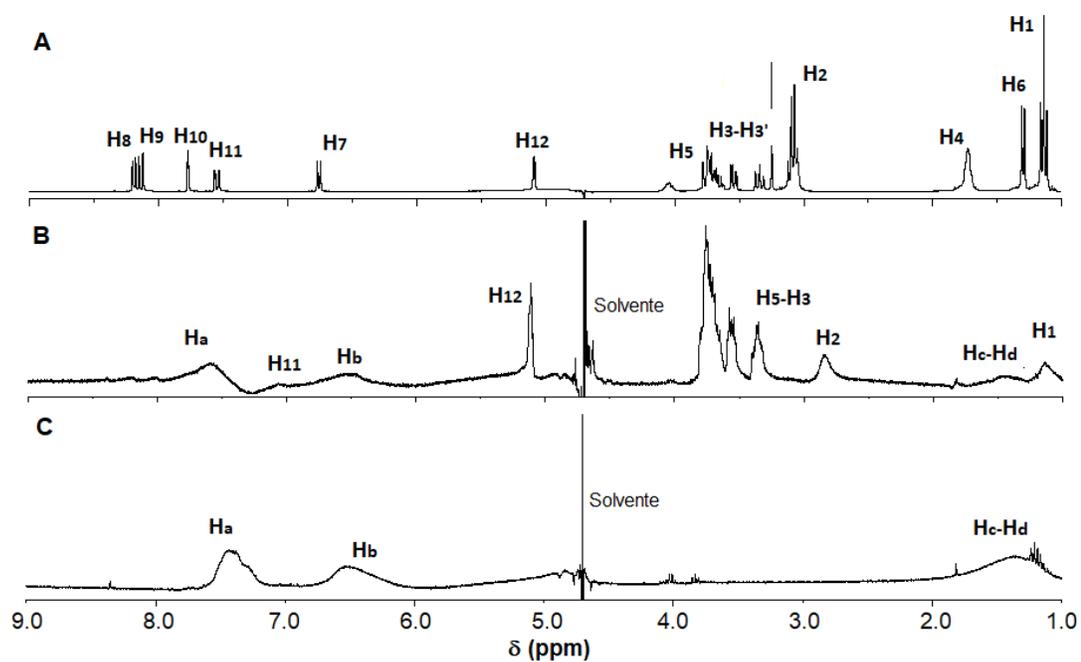


Figura A7. Espectro de RMN- ^1H de: **A)** CQ 1×10^{-3} M, **B)** CQ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

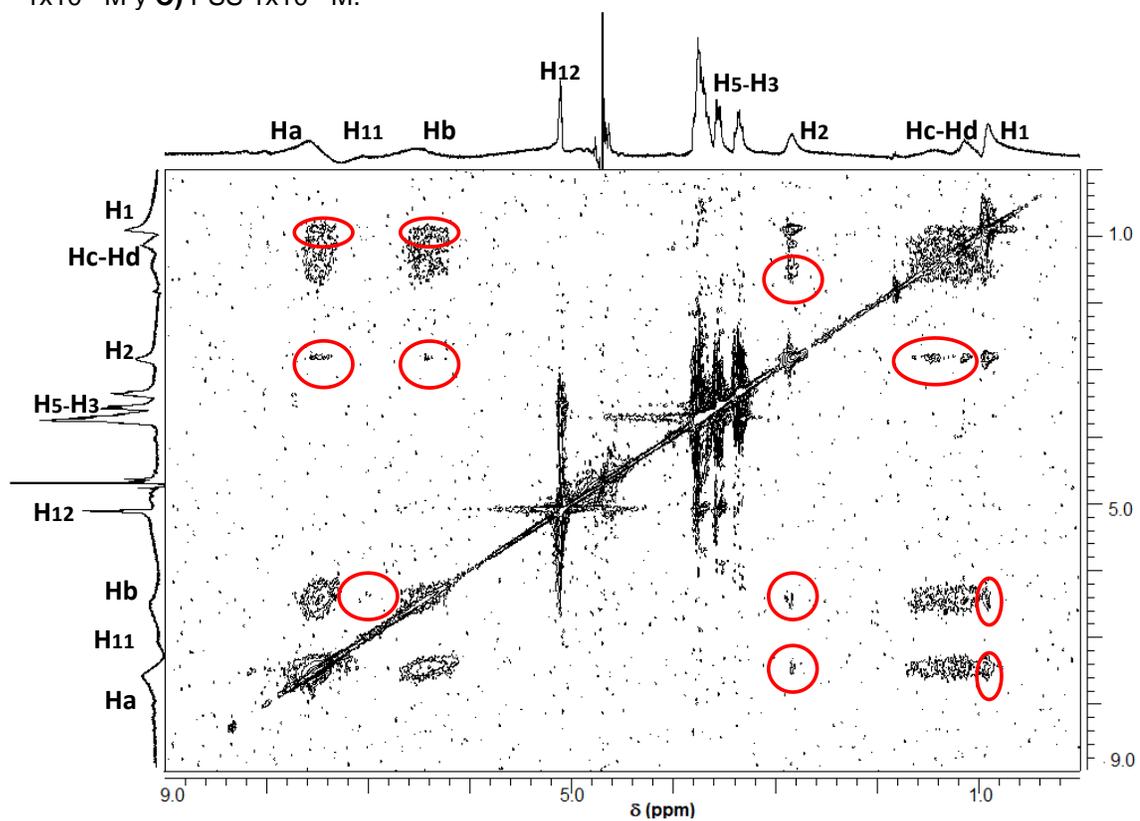
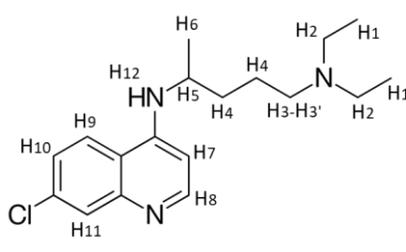
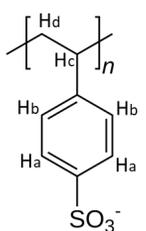


Figura A8. Espectro de RMN- ^1H NOESY de CQ 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M.

Tabla A3. Asignación de protones correspondiente a la Figura A7 y Figura A8.

Protón	Desplazamiento químico, δ (ppm)	Área	Multiplicidad	
Cloroquina (CQ)				
H1	1.14	6	triplete	
H2	3.05	4	cuadruplete	
H3	3.3	1	triplete	
H3'	3.54	1	doblete de doblete	
H4	1.72	4	multiplete	
H5	3.7	1	multiplete	
H6	1.3	3	doblete	
H7	6.75	1	doblete	
H8	8.19	1	doblete	
H9	8.14	1	doblete	
H10	7.77	1	singlete	
H11	7.55	1	doblete	
H12	5.08	1	singlete	CQ
PSS				
Ha	7.41	2	singlete amplio	
Hb	6.5	2	singlete amplio	
Hc-Hd	1.34	3	singlete amplio	
CQ/PSS				
Ha	7.48	2	singlete amplio	
Hb	6.43	2	singlete amplio	
Hc-Hd	1.34	3	singlete amplio	
H1	1.12	5	singlete amplio	
H2	2.82	4	singlete amplio	
H3-H5	3.56	3	multiplete	
H11	7.03	1	singlete amplio	
H12	5.09	1	singlete	PSS

ANEXO 3

Tabla A4. Parámetros de diafiltración de las formulaciones AMI/PSS en relaciones molares desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

AMI/ PSS	AMI ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	j_0 (blanco)	u_0	v	u	j
0.1	0.3	3.3	1.01	0.04	0.10 \pm 0.09	0.90 \pm 0.09	0.39 \pm 0.14
0.2	0.7	3.3	0.90	0.05	0.02 \pm 0.00	0.98 \pm 0.00	0.35 \pm 0.02
0.3	1.0	3.3	1.04	0.04	0.02 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.34 \pm 0.06
0.4	1.3	3.3	1.12	0.08	0.03 \pm 0.01	0.97 \pm 0.01	0.33 \pm 0.07
0.5	1.7	3.3	1.03	0.00	0.04 \pm 0.02	0.96 \pm 0.02	0.38 \pm 0.12
0.6	2.0	3.3	1.05	0.00	0.08 \pm 0.06	0.92 \pm 0.06	0.37 \pm 0.14
0.7	2.3	3.3	1.01	0.05	0.15 \pm 0.10	0.89 \pm 0.10	0.47 \pm 0.02
0.8	2.6	3.3	1.04	0.00	0.20 \pm 0.10	0.85 \pm 0.10	0.59 \pm 0.16
0.9	3.0	3.3	1.04	0.00	0.11 \pm 0.13	0.80 \pm 0.13	0.72 \pm 0.16
1.0	3.3	3.3	1.05	0.05	0.19 \pm 0.04	0.81 \pm 0.04	0.80 \pm 0.12
1.1	3.6	3.3	1.08	0.05	0.32 \pm 0.16	0.68 \pm 0.16	0.81 \pm 0.06
1.2	4.0	3.3	1.01	0.02	0.17 \pm 0.05	0.73 \pm 0.05	0.95 \pm 0.07

Interpretación: Los resultados obtenidos para las formulaciones AMI/PSS que se muestran en la **Tabla A4** se han calculado siguiendo los modelos matemáticos establecidos por Moreno-Villoslada y cols. [76, 78-81, 94-98] . Para ello se realizó una representación gráfica, ($\ln C_{AMI}$ vs. F), de la concentración de AMI en cada fracción de filtrado vs. el factor de filtración. La pendiente de esta curva corresponde a la fuerza de interacción entre los componentes y se denota con la letra “ j ”. En términos de la fuerza de interacción el modelo describe que: a mayor fuerza de interacción: $j = 0$, mientras que a menor fuerza de interacción: $j = 1$. Inicialmente, los valores de j_0 corresponden a la fuerza de interacción en los experimentos blanco, es decir, fármaco HBP en ausencia de polímero. Como

se observa, todas las formulaciones estudiadas presentan valores de " j_0 " que tienden a 1, lo cual evidencia la ausencia de interacciones entre el fármaco AMI y cualquier componente de la celda de diafiltración. Adicionalmente, se puede observar que las magnitudes de las pendientes " j " en relaciones molares entre 0.1 y 0.8 difieren de sus respectivos blancos (j_0), evidenciando el grado de retención del fármaco AMI en la matriz del polímero PSS, incluyendo aquellas formulaciones donde no se observa formación de NPs (complejos solubles: n^+/n^- entre 0.1 y 0.5). Por otra parte, se puede observar que la magnitud del parámetro u (fracción de fármaco con unión independiente del equilibrio) es muy alta en cada formulación (0.85 – 0.98), lo que significa que la fracción de fármaco controlada cinéticamente es elevada. Por su parte, es interesante observar que en la zona de los complejos solubles (relaciones molares entre 0.1 a 0.5) existe un alto grado de interacción. Era de esperarse que al tener pocas moléculas catiónicas (fármaco HABP) en presencia del polímero aniónico (PSS), las moléculas HABP se movieran a lo largo de la cadena del polielectrolito conservando su esfera de hidratación (según la teoría de Manning conocidas como interacciones no-específicas). Sin embargo, las altas magnitudes del parámetro " u " reflejan un alto grado de empaquetamiento entre los componentes presentes. Es interesante observar que, al aumentar la concentración de fármaco en las formulaciones (relaciones molares ≥ 0.9), el grado de retención en la matriz del polímero disminuye, es decir, existe un aumento de las magnitudes de " j " con valores que alcanzan hasta 0.95. Estas magnitudes de " j ", que tienden a 1, se

observan en las formulaciones que presentaron precipitados (relaciones molares ≥ 0.9). Nótese que las magnitudes de “ j ” y “ j_0 ” tienden a ser similares, debido a la disminución en la fuerza de interacción entre los componentes de las formulaciones.

Tabla A5. Parámetros de diafiltración de las formulaciones PMZ/PSS en relaciones molares desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

PMZ/ PSS	PMZ ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	j_0 (blanco)	u_0	v	u	j
0.1	0.3	3.3	1.01	0.00	0.07 \pm 0.06	0.93 \pm 0.05	0.35 \pm 0.06
0.2	0.7	3.3	1.09	0.00	0.02 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.59 \pm 0.05
0.3	1.0	3.3	1.02	0.04	0.06 \pm 0.04	0.94 \pm 0.03	0.26 \pm 0.14
0.4	1.3	3.3	0.98	0.00	0.08 \pm 0.04	0.92 \pm 0.03	0.28 \pm 0.13
0.5	1.7	3.3	1.02	0.00	0.06 \pm 0.03	0.94 \pm 0.02	0.36 \pm 0.14
0.6	2.0	3.3	0.99	0.04	0.05 \pm 0.01	0.95 \pm 0.01	0.38 \pm 0.06
0.7	2.3	3.3	1.01	0.00	0.07 \pm 0.01	0.93 \pm 0.01	0.46 \pm 0.02
0.8	2.6	3.3	1.02	0.00	0.10 \pm 0.02	0.90 \pm 0.01	0.50 \pm 0.04
0.9	3.0	3.3	1.03	0.00	0.15 \pm 0.02	0.85 \pm 0.01	0.74 \pm 0.01
1.0	3.30	3.3	1.05	0.00	0.20 \pm 0.01	0.80 \pm 0.01	0.88 \pm 0.05
1.1	3.60	3.3	1.07	0.00	0.28 \pm 0.02	0.72 \pm 0.01	0.99 \pm 0.06
1.2	4.0	3.3	1.03	0.00	0.40 \pm 0.06	0.60 \pm 0.05	0.89 \pm 0.13

Interpretación: En cuanto a las formulaciones PMZ/PSS, se puede mencionar que los perfiles y los parámetros de diafiltración son similares a los obtenidos para la formulación AMI/PSS. Los valores mostrados en la **Tabla A5**, provienen del análisis de los datos una vez construida la curva $\ln C_{PMZ}$ vs. F . En términos de la fuerza de interacción, los valores de j_0 tienden a 1, evidenciando la ausencia de interacciones entre el fármaco PMZ y cualquier componente de la celda de diafiltración (experimentos blancos en ausencia de polímero). Adicionalmente, se puede observar que el comportamiento de las pendientes “ j ” en relaciones molares entre 0.1 y 0.8 difieren de sus respectivos blancos (j_0). Lo descrito anteriormente evidencia el grado de retención del fármaco PMZ en la matriz del polímero PSS incluyendo aquellas formulaciones donde no se observa formación de NPs (complejos solubles: relaciones molares entre 0.1 y 0.5). Por otra parte,

la fracción de fármaco con unión independiente del equilibrio " u " es muy alta para los complejos solubles y las nanopartículas, mostrando magnitudes entre 0.85 y 0.98. Posteriormente, en la zona de los precipitados se observa una disminución en la fuerza de interacción, con valores de " j " entre 0.74 y 0.99.

Tabla A6. Parámetros de diafiltración de las formulaciones CQ/PSS en relaciones molares desde 0.1 hasta 1.2 (promedio \pm d.e., n=3).

CQ/ PSS	CQ ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	j_0 (blanco)	u_0	v	u	j
0.1	0.3	3.3	-	-	-	-	-
0.2	0.7	3.3	-	-	-	-	-
0.3	1.0	3.3	-	-	-	-	-
0.4	1.3	3.3	1.00	0.00	0.01 \pm 0.00	0.99 \pm 0.00	0.39 \pm 0.31
0.5	1.7	3.3	1.00	0.00	0.18 \pm 0.01	0.82 \pm 0.01	0.76 \pm 0.16
0.6	2.0	3.3	1.00	0.00	0.25 \pm 0.04	0.75 \pm 0.04	0.81 \pm 0.07
0.7	2.3	3.3	1.00	0.00	0.25 \pm 0.04	0.71 \pm 0.03	0.84 \pm 0.05
0.8	2.6	3.3	1.00	0.00	0.40 \pm 0.11	0.60 \pm 0.09	0.91 \pm 0.09
0.9	3.0	3.3	1.03	0.00	0.47 \pm 0.01	0.53 \pm 0.00	0.88 \pm 0.10
1.0	3.3	3.3	0.98	0.00	0.42 \pm 0.18	0.58 \pm 0.15	0.87 \pm 0.06
1.1	3.6	3.3	0.98	0.00	0.54 \pm 0.08	0.46 \pm 0.07	0.92 \pm 0.06
1.2	4.0	3.3	1.00	0.00	0.67 \pm 0.02	0.33 \pm 0.02	0.93 \pm 0.03

Interpretación: En la **Tabla A6** se muestran los parámetros de diafiltración determinados para las formulaciones CQ/PSS a partir del análisis de la curva $\ln C_{CQ}$ vs. F . En el caso de las formulaciones CQ/PSS no fue posible determinar los parámetros de diafiltración en relaciones molares ≤ 0.3 (complejos solubles). Esto debido a que no se observaron absorbancias en las fracciones recolectadas a la longitud de onda seleccionada ($\lambda = 343$ nm). Para las NPs en relación molar 0.4 se observan magnitudes elevadas de u (0.99) como respuesta a la interacción favorecida de los componentes (CQ y PSS) y que corresponden con una constante de disociación baja (0.7). La fuerza de interacción (pendiente de la curva, j) de esta formulación muestra claramente la capacidad del sistema en retener el fármaco CQ, con una pendiente de 0.39 que difiere significativamente de su respectivo blanco ($j_0 = 1$). Adicionalmente, a relaciones de carga mayores

(CQ/PSS ≥ 0.5) el comportamiento es completamente diferente y presenta gran similitud con los experimentos blancos (CQ en ausencia de polímero). En consecuencia, las pendientes “ j ” tienden a tener magnitudes cercanas a 1 como evidencia de la disminución de interacción entre el fármaco catiónico el polímero PSS.

ANEXO 4

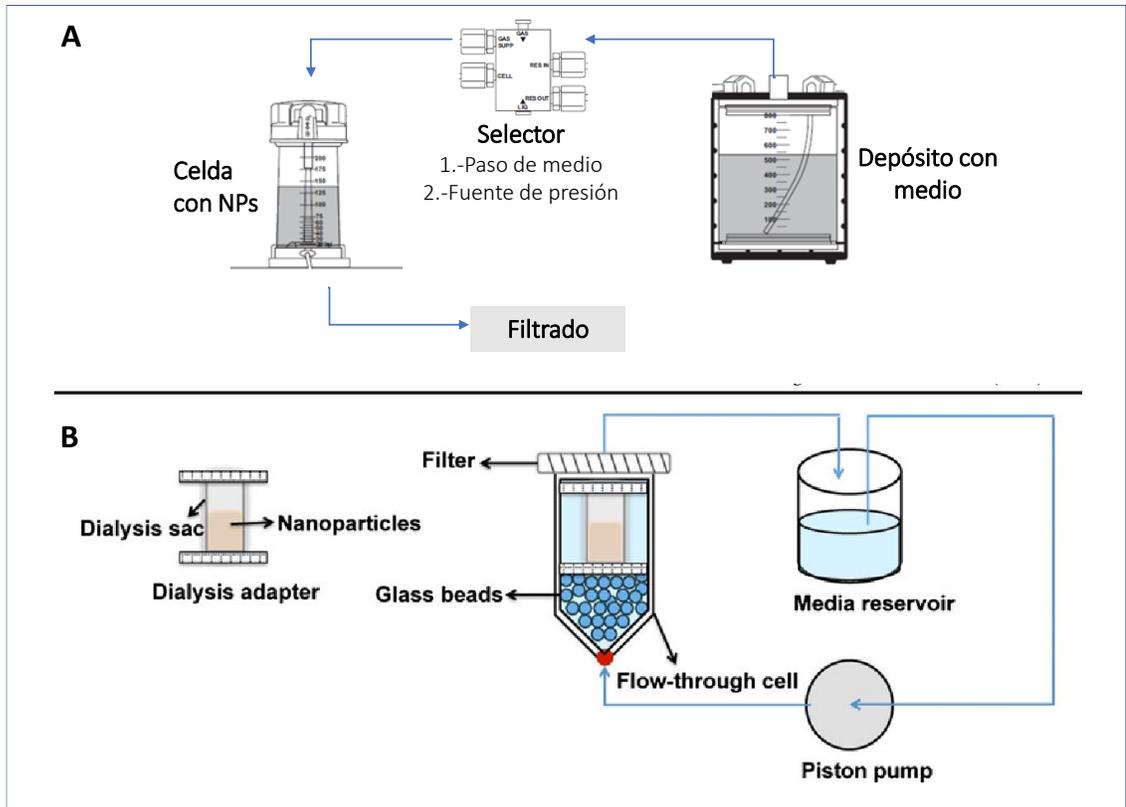


Figura A9. Esquema del funcionamiento del equipo de DF **(A)** y de la celda de flujo continuo o Aparato USP en circuito cerrado y adaptado para nanopartículas **(B)**[105].

ANEXO 5

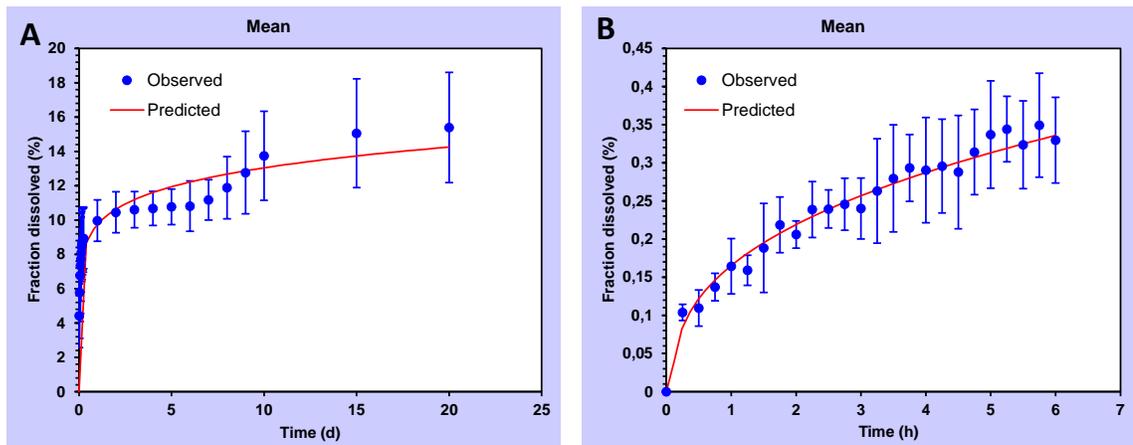


Figura A10. Ajuste de los datos de liberación in vitro de PMZ/PSS 0.8 mediante: **A)** diálisis y **B)** aparato USP 4 al modelo Korsmeyer-Peppas en el programa *DDsolver*. Los puntos azules corresponden a los datos experimentales y las líneas rojas corresponden a los datos pronosticados por el programa según el modelo estudiado (promedio \pm d.e., $n = 3$).

ANEXO 6

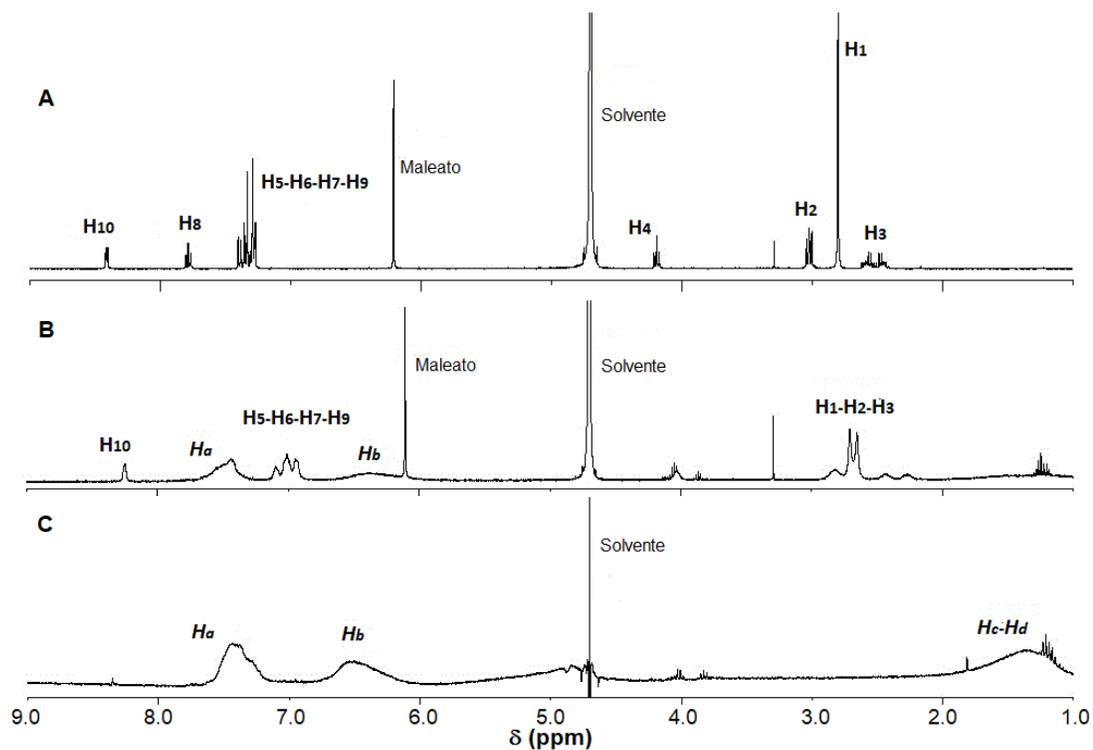


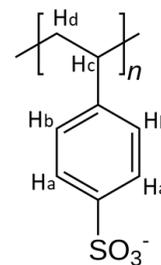
Figura A11. Espectro de RMN-¹H de: **A)** CPM 1×10^{-3} M, **B)** CPM 1×10^{-3} M en presencia de PSS 1×10^{-2} M y **C)** PSS 1×10^{-2} M.

Tabla A7. Asignación de protones correspondiente a la Figura A11.

Protón	Desplazamiento químico, δ (ppm)	Área	Multiplicidad
Clorfenamina (CPM)			
H1	2.8	6	singlete
H2	3.02	2	triplete
H3	2.42	1	multiplete
H3'	2.56	1	multiplete
H4	4.19	1	triplete
H5	7.34	2	doblete
H6	7.3	2	multiplete
H7	7.39	1	doblete
H8	7.78	1	triplete
H9	7.27	1	doblete
H10	8.4	1	doblete
ión maleato	6.21	2	singlete

CPM

PSS			
Ha	7.41	2	singlete ampio
Hb	6.5	2	singlete ampio
Hc-Hd	1.34	3	singlete ampio
CPM/PSS			
Ha	7.45	2	singlete ampio
Hb	6.35	2	singlete ampio
Hc-Hd	1.24	3	singlete ampio
H1	2.68	6	doblete
H2	2.83	2	singlete
H3	2.26	1	singlete
H3'	2.43	1	singlete
H5-H6-H7-H9	7	6	multiplete
H10	8.25	1	singlete



PSS

ANEXO 7

Tabla A8. Parámetros de diafiltración para las nanopartículas CPM/PSS 1.4 y 1.6 (promedio \pm d.e., n =3).

CPM/ PSS	[CPM] ($\times 10^{-3}$ M)	PSS ($\times 10^{-3}$ M)	j_0 (blanco)	u_0	v	u	j
1.4	6.93	4.90E	0.91	0.16	0.42 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.72 ± 0.06
1.6	7.92	4.90	0.96	0.18	0.38 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.72 ± 0.06

ANEXO 8

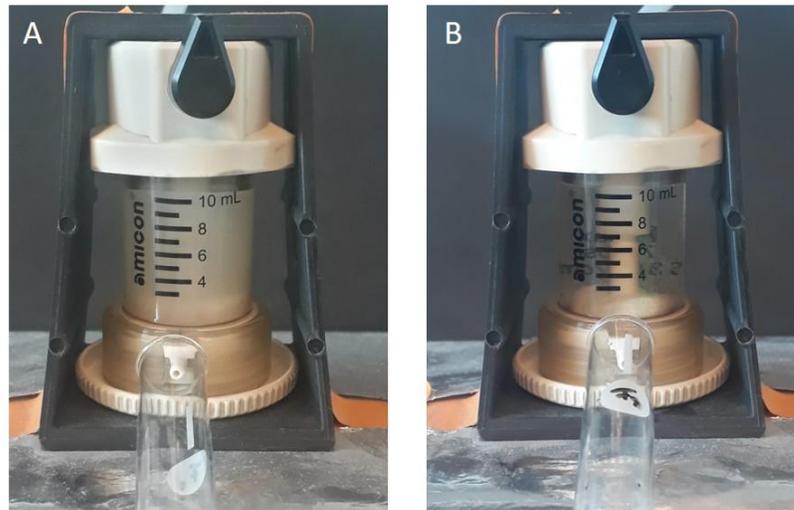


Figura A12. Imágenes ópticas de la nanopartícula CPM/PSS 1.4 en: **A)** comienzo del estudio de diafiltración y **B)** al final del estudio, donde se observa la “desaparición” de las nanopartículas durante el proceso de diafiltración.

ANEXO 9

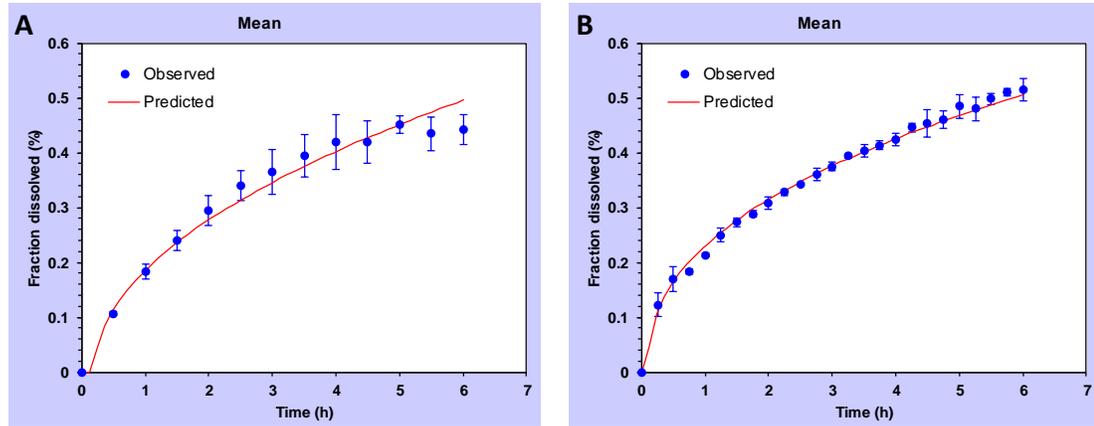


Figura A13. Ajuste de los datos de liberación *in vitro* de CPM/PSS 1.4 mediante: **A)** diálisis y **B)** aparato USP 4 al modelo Korsmeyer-Peppas en el programa *DDsolver*. Los puntos azules corresponden a los datos experimentales y las líneas rojas corresponden a los datos pronosticados por el programa según el modelo estudiado (promedio \pm d.e., $n = 3$).