

UNIVERSIDAD DE CHILE

PROGRAMA DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA



**“DESARROLLO DE NANOVEHÍCULOS CUBIERTOS DE
POLOXÁMERO COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA
SOLUBILIDAD Y PERMEABILIDAD DE LOPERAMIDA COMO
MODELOS DE FÁRMACO LIPOSOLUBLE Y SUSTRATO DE
GLICOPROTEÍNA P”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctora en Farmacología**

Por:

JOHANNA FRANCESCA CATALÁN FIGUEROA

Directores de Tesis

DRA. JENNY LUCY FIEDLER.

DR. JAVIER OCTAVIO MORALES.

SANTIAGO- CHILE

2019

UNIVERSIDAD DE CHILE

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

Tesis de Doctorado

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de la Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día:

Directores de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler T.

Dr. Javier O. Morales

Comisión Informante:

Dra. Soledad Bollo Dragnic (Presidente)

Dr. Luis Constandil Córdova

Dr. José Manuel Pérez-Donoso

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ASOCIADAS

- **ARTÍCULOS ORIGINALES**

1. **“A mechanistic approach for the optimization of loperamide loaded nanocarriers characterization: diafiltration and mathematical modeling advantages”**. Johanna Catalan-Figueroa; Constanza B. Boisset; Miguel O. Jara; Mario E. Flores; Jenny L. Fiedler; Ignacio Moreno-Villoslada; Javier O. Morales (2018). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 125, 215-222.

2. **“Finding key nanoprecipitation variables for achieving uniform polymeric nanoparticles using neurofuzzy logic technology”**. Miguel O. Jara M.O; Johanna Catalan-Figueroa; Mariana Landin; Javier O. Morales. *Drug Delivery and Translational Research*, (2018). *Drug delivery and translational research*, 1-10.

- **REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS**

1. **“Nanomedicine and nanotoxicology: the pros and cons for neurodegeneration and brain cancer”**. Johanna Catalan-Figueroa; Sujei Palma-Florez; Gonzalo Alvarez; Hans F. Fritz; Miguel O. Jara; Javier O. Morales (2016). *Nanomedicine*, 11(2), 171-187.

- **CAPÍTULOS DE LIBRO**

1. **“Safety and nanotoxicity aspects of nanomedicines for brain-targeted drug delivery”**. En *Nanomedicines for brain drug delivery*, 1^a ed. (Invitación). *Neuromethods*, Springer Nature. New York, NY (Por publicar).

- **CONGRESOS**

1. **“Determination of Drug Loading Efficiency and Drug Release of Loperamide from Polymeric Nanocarriers”** (Poster). Johanna Catalan-Figueroa; Mario E. Flores; Miguel O. Jara; Jenny L. Fiedler; Ignacio Moreno-Villoslada; Javier O. Morales. Annual Meeting and Exposition, American Association of Pharmaceutical Scientist. Denver, Estados Unidos. Noviembre 2016.

2. **“Loperamide Incorporation into Monodisperse Polycaprolactone Nanoparticles by Antisolvent Nanoprecipitation Method”** (Poster). Miguel O. Jara; Johanna Catalan-Figueroa; Javier O. Morales. Annual Meeting and Exposition, American Association of Pharmaceutical Scientist. Denver, Estados Unidos. Noviembre 2016.

3. **“Estabilidad y eficiencia de encapsulación de nanotransportadores cargados con loperamida”** (Poster). Johanna Catalan-Figueroa; Miguel O. Jara; Mario E. Flores; Jenny L. Fiedler; Ignacio Moreno-Villoslada; Javier O. Morales. IV Congreso Nacional de Nanotecnología. Olmué-Chile. Septiembre 2016.
4. **“Incorporación de Loperamida en Nanopartículas Monodispersas de Policaprolactona por el Método de Nanoprecipitación”** (Presentación oral). Miguel O. Jara; Johanna Catalan-Figueroa; Javier O. Morales. IV Congreso Nacional de Nanotecnología. Olmué-Chile. Septiembre 2016.
5. **“A Systematic Analysis of the Manufacture of Polymeric Nanoparticles by Solvent Shifting Nanoprecipitation”** (Poster). Miguel O. Jara; Johanna Catalan-Figueroa; Javier O. Morales. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Glasgow, Scotland. Abril 2016.
6. **“Análisis sistemático de la producción de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación de Eudragit® RS en distintas condiciones experimentales”** (Presentación oral). Miguel O. Jara; Johanna Catalan-Figueroa; Javier O. Morales. 32° Congreso Latinoamericano de Química. XXXI Jornadas Chilenas de Química, Concepción-Chile. Enero, 2016.
7. **“Desarrollo de Nanotransportadores para la entrega de fármacos de manera preferencial al Sistema Nervioso Central: Expandiendo el rol de los poloxámeros”** (Presentación oral). Johanna Catalan-Figueroa (Invitación). Seminario Anual para la Industria Farmacéutica: Una Mirada hacia el futuro de la Industria Farmacéutica. Organizado por BASF y Reutter, Santiago, Chile. 5 de noviembre, 2015
8. **“Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery: Improving Physicochemical Parameters”** (Poster). Johanna Catalan-Figueroa; Miguel O. Jara; Ulises Gajardo-López; Javier O. Morales. XIII International Nanomedicine & Drug Delivery Symposium. Seattle, Estados Unidos. 2015
9. **“Desarrollo de Nanotransportadores para entrega de Fármacos al Sistema Nervioso Central”** (Presentación oral). Johanna Catalan-Figueroa & Javier Morales Montencinos. IV Escuela de Nanomedicinas, Asociación Argentina de Nanomedicina, 2014.

*Quisiera agradecer a mis padres, a quienes amo con locura y sin ellos yo no estaría
acá: nos costó, pero lo logramos mamá y papá.*

*Mi paso por la Universidad de Chile puedo decir fue una experiencia sanadora y de
crecimiento, además de haberme formado desde cero en la investigación. Orgullosa
de haber sido parte de “las Marielas” y haber conocido a quienes serían mis amigas y
directoras no oficiales de esta tesis: Constanza, Maro y Gaby.*

*También darles las gracias a mis amigas eternas, Carola, Angélica y Chamy: ustedes
saben que son mis hermanas de corazón; gracias por levantarme y alentarme a no
rendirme, gracias por verme y quererme por quien soy. Las quiero al infinito.*

*Esto no hubiera sido posible si no hubiera tenido el apoyo de mi querida y admirada
Directora, la Dra. Jenny Fiedler, quien me dio la mano, cariño y
su conocimiento como investigador en momentos que fueron puntos de inflexión en mi
vida. En uno de esos momentos también conocí al Dr. Javier O. Morales, alguien que
me ha ayudado a crecer como investigador, y se transformó en mi Director. Gracias a
ambos por haberme acompañado hasta este momento.*

*Además, quiero agradecer al Dr. Ignacio Moreno-Villoslada, quien es un modelo de
persona e investigador y me abrió las puertas de su laboratorio y su amistad sin
conocerme, e hizo que esta tesis sea lo que leerán.*

*Finalmente, agradecer a las personas que he conocido en Argentina: Eli, Fer, Giuli,
Alan, Alexis y Facu, quienes, aunque conozco hace poco, me dieron la fuerza para el
último impulso en mi vida “acontecida”.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado gracias a los proyectos FONDECYT Regular 1181689 y CONICYT 21120192.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	12
LISTA DE ABREVIACIONES	16
INTRODUCCIÓN	17
I. PROBLEMA: ADMINISTRACIÓN ORAL DE FÁRMACOS	17
1. ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL.....	19
<i>DETERMINANTES FISIOLÓGICOS: MECANISMOS DE PERMEACIÓN Y EFLUJO</i>	19
<i>DETERMINANTES FÍSICOQUÍMICOS DE LA FORMA FARMACÉUTICA: SOLUBILIDAD Y TIEMPO DE RESIDENCIA GASTROINTESTINAL</i>	21
2. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> PARA LA ABSORCIÓN DE FÁRMACOS.....	23
II. SOLUCIÓN: NANOVEHÍCULOS PARA LA ENTREGA DE FÁRMACOS	26
1. DISPERSIÓN EN MEDIO ACUOSO Y TIEMPO DE RESIDENCIA GASTROINTESTINAL: EUDRAGIT RS.....	27
2. AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD APARENTE: POLOXÁMERO 188.....	29
HIPÓTESIS DE TRABAJO	32
OBJETIVOS	32
1. OBJETIVO GENERAL.....	32
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIALES	33
MÉTODOS	33
1. SÍNTESIS DE NANOVEHÍCULOS.....	33
<i>NANOPRECIPITACIÓN</i>	33
<i>ENCAPSULACIÓN DE LOPERAMIDA</i>	34
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOVEHÍCULOS.....	34
<i>ESTIMACIÓN DE TAMAÑO, FORMA Y POTENCIAL Z</i>	35
3. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN.....	35
<i>SEPARACIÓN POR CENTRIFUGACIÓN</i>	35

<i>SEPARACIÓN POR ULTRAFILTRACIÓN</i>	36
<i>SEPARACIÓN POR FILTRACIÓN AL VACÍO</i>	36
<i>SEPARACIÓN POR DIAFILTRACIÓN</i>	37
4. PERFIL DE LIBERACIÓN.....	35
5. DETERMINANTES DE LA INCORPORACIÓN INTRACELULAR Y RAZONES DE EFLUJO DE LOPERAMIDA EN ENSAYOS CELULARES.....	41
<i>CULTIVO CELULAR</i>	41
<i>EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA CELULAR</i> ,,,.....	41
<i>ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE LOPERAMIDA DENTRO DE LA MONOCAPA CELULAR</i>	42
<i>ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE GLICOPROTEÍNA P</i>	43
<i>ENSAYOS DE TRANSPORTE DE LOPERAMIDA A TRAVÉS DE LA MONOCAPA CELULAR</i>	44
<i>DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD APARENTE Y RAZÓN DE EFLUJO DE LOPERAMIDA EN ENSAYOS CELULARES</i>	45
6. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	46
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
RESULTADOS	50
1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS NANOVEHÍCULOS.....	50
2. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE LOPERAMIDA.....	54
3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE LOPERAMIDA DESDE LOS NANOVEHÍCULOS.....	58
4. EVALUACIÓN CAPACIDAD DE LOS NANOVEHÍCULOS DE AUMENTAR LA PERMEABILIDAD DE LOPERAMIDA A TRAVÉS DE UNA MONOCAPA CELULAR.....	64
DISCUSIÓN	68
1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOVEHÍCULOS.....	68
<i>TAMAÑO, FORMA Y POTENCIAL Z</i>	68
<i>ESTABILIDAD COLOIDAL EN EL TIEMPO DE LOS NANOVEHÍCULOS</i>	70
<i>EFFECTOS DEL PH DE LA FASE ACUOSA SOBRE LA SÍNTESIS DE NANOVEHÍCULOS</i>	72
2. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE LOPERAMIDA EN LOS NANOVEHÍCULOS.....	73

3. PERFIL DE LIBERACIÓN DE LOERAMIDA DESDE LOS NANOVEHÍCULOS.....	78
4. CAPACIDAD DE LOS NANOVEHÍCULOS DE AUMENTAR LA INCORPORACIÓN INTRACELULAR DE LOPERAMIDA A TRAVÉS DE UNA MONOCAPA CELULAR.....	80
<i>ENSAYOS DE INCORPORACIÓN CELULAR Y RECUPERACIÓN DE LOPERAMIDA.....</i>	<i>80</i>
<i>ENSAYOS DE TRANSPORTE DE LOPERAMIDA A TRAVÉS DE UNA MONOCAPA CELULAR.....</i>	<i>82</i>
CONCLUSIONES.....	84
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
REFERENCIAS.....	87
ANEXO.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: DIAGRAMA SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE FÁRMACOS.....	18
FIGURA 2: ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA P ESQUEMATIZADA.....	20
FIGURA 3: ESQUEMA DE LAS CARÁCTERÍSTICAS DE LA BIOFASE ASOCIADA A LA MONOCAPA EPITELIAL DE CÉLULAS ABSORBENTES.....	21
FIGURA 4: ESTRUCTURA DE LOPERAMIDA CLORHIDRATO.....	26
FIGURA 5: ESTRUCTURA DE EUDRAGIT RS.....	28
FIGURA 6: ESTRUCTURA GENERAL DE POLÍMEROS POLOXÁMEROS.....	29
FIGURA 7: DIAGRAMA RESUMEN DEL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE EXCIPIENTES.....	30
FIGURA 8: ESQUEMA DE NANOVEHÍCULOS DE ERS, CUBIERTOS DE POLOXÁMERO 188.....	31
FIGURA 9: ESQUEMA SISTEMA DE DIAFILTRACIÓN.....	38
FIGURA 10: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CÁLCULO DE LOS LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METODOLOGÍA HPLC-DAD.....	43

FIGURA 11: CURVA DE CALIBRACIÓN USADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PRECISIÓN Y EXACTITUD DE LA TÉCNICA HPLC-DAD.....	43
FIGURA 12: DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LOS NANOVEHÍCULOS, TRAS LA INCORPORACIÓN PRE-SÍNTESIS DE LA SOLUCIÓN DE LOPERAMIDA A LA FASE ACUOSA (FA) O FASE ORGÁNICA (FO).....	45
FIGURA 13: TAMAÑO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN DE LOS NANOVEHÍCULOS	51
FIGURA 14: RESULTADOS PRELIMINARES EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE LOPERAMIDA.....	52
FIGURA 15: ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE TAMAÑO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN DE LOS NANOVEHÍCULOS.....	53
FIGURA 16: PERFIL DE DIAFILTRACIÓN	57
FIGURA 17: PERFIL DE LIBERACIÓN DE LOPERAMIDA EN MEDIO GÁSTRICO E INTESTINAL SIMULADOS.....	59
FIGURA 18: MICROGRAFÍA POR TRASMISIÓN ELECTRÓNICA DE NANOVEHÍCULOS.....	61
FIGURA 19: ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE LIBERACIÓN MEDIANTE DDSOLVER.....	62
FIGURA 20: ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE LOPERAMIDA.....	64
FIGURA 21: COMPARACIÓN PERMEABILIDAD DE LOPERAMIDA: EN SOLUCIÓN; EN PRESENCIA DE INHIBIDOR DE PGP; MEZCLA FÍSICA CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE POLOXÁMERO; Y LOPERAMIDA NANOVEHICULADA.....	65
FIGURA 22: RAZONES DE EFLUJO DE LOERAMIDA, CALCULADAS PARA LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS APLICADOS, CON Y SIN AGITACIÓN.....	67
FIGURA 23: REGIÓN PROTONABLE EN ESTRUCTURA DE LOPERAMIDA Y CONTRAIÓN DE EUDRAGIT RS.....	74
FIGURA 24: ESQUEMA RESUMEN DE LOS FACTORES QUE INFLUIRÍAN EN EL TRANSPORTE DE LOPERAMIDA A/B Y B/A.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CONCENTRACIONES TEÓRICAS DE LOPERAMIDA...	48
TABLA 2: TAMAÑO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN Y POTENCIAL Z COMPARATIVOS DE NP-LOP/FO, SINTETIZADAS A DIFERENTES CONDICIONES DE pH DE LA FASE ACUOSA.....	54
TABLA 3: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS PARA LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DETERMINADA POR DIFERENTES TÉCNICAS: CENTRIFUGACIÓN; ULTRAFILTRACIÓN; Y FILTRACIÓN AL VACÍO.....	55
TABLA 4: EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE NANOVEHÍCULOS OBTENIDOS POR DIAFILTRACIÓN CON DIFERENTES CONDICIONES DE pH DE LA FASE ACUOSA.....	56
TABLA 5: MODELOS MATEMÁTICOS DE LIBERACIÓN.....	59
TABLA 6: PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL AJUSTE A MODELOS MATEMÁTICOS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE LOS NANOVEHÍCULOS.....	55
TABLA 7: PARÁMETROS ASOCIADOS AL MODELO DE MAKOID-BANAKAR, SIN NORMALIZAR.....	63

ANEXO

FIGURA A1: CONTROL DE INTEGRIDAD DE MONOCAPA CELULAR EN LOS INSAYOS DE INCORPORACIÓN DE LOPERAMIDA	95
FIGURA A2: PERMEABILIDADES A/B Y B/A DE LOPERAMIDA OBTENIDA EN ENSAYOS DE TRANSPORTE	96
FIGURA A3: CORRELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE LOPERAMIDA Y PERMEABILIDAD	97
FIGURA A4: CONTROL DE INTEGRIDAD DE MONOCAPA CELULAR EN ENSAYOS DE TRANSPORTE DE LOPERAMIDA	98