

Contribución al desarrollo de formulaciones micelares de anfotericina B, con miras a su aplicación en sistemas de liberación modificada

Michael Alejandro Güiza Suárez

Facultad de Ciencias
Área Curricular de Farmacia
Sede Bogotá, Colombia
2025

Contribución al desarrollo de formulaciones micelares de anfotericina B, con miras a su aplicación en sistemas de liberación modificada

Michael Alejandro Güiza Suárez

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de:
Magíster en Ciencias (MSc.) Farmacéuticas

Directora:
Q.F. MSc. PhD. Yolima Baena Aristizábal
Profesora Titular - Área Curricular de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Codirector:
PhD. León Darío Pérez Pérez
Profesor Titular - Área Curricular de Química
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Línea de investigación:
Sistemas micro y nanoparticulados
Grupo de investigación:
Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas - SILICOMOBA
Grupo de Investigación en Macromoléculas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Área Curricular de Farmacia
2025

A mi madre, mi padre y mi hermana.

Declaración

Me permito afirmar que he realizado ésta tesis de manera autónoma y con la única ayuda de los medios permitidos y no diferentes a los mencionados el presente texto. Todos los pasajes que se han tomado de manera textual o figurativa de textos publicados y no publicados, los he reconocido en el presente trabajo. Ninguna parte del presente trabajo se ha empleado en ningún otro tipo de tesis.

Sede Bogotá., abril 11 de 2025

Michael Alejandro Güiza Suárez

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que, de una u otra forma, hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi familia, particularmente a mis padres, por su amor incondicional, comprensión y apoyo constante a lo largo de este tiempo; su confianza en mí ha sido una fuente continua de motivación y fortaleza. De manera especial, agradezco a Daniela, quien ha sido un pilar fundamental en este proceso. Su presencia, en cada etapa del trabajo, tanto en los momentos de incertidumbre como en los de logro, ha sido un aliento constante que me ha permitido llevar este proyecto hasta su culminación.

A la Universidad Nacional de Colombia, por haberme formado y proporcionado las bases necesarias para afrontar y concluir este reto académico. De igual manera, mi agradecimiento a los profesores Yolima Baena y León Pérez, por su apoyo invaluable durante la elaboración y desarrollo de esta investigación.

A Laboratorio Vitalis, cuya generosa donación hizo posible realizar los estudios y experimentos necesarios para el avance de este trabajo.

A Jessica, Nataly, Ingrid, Andrea y Jimmy, quienes, con su apoyo incondicional y sus constantes palabras de aliento, siempre me recordaron la importancia de disfrutar del proceso, sin importar las dificultades.

A Maicoll, Liseth Andrea, Andrea Milena, Juan Camilo y Arturo, quienes, con sus ideas, consejos, y esa capacidad única para hacerme sonreír incluso en los momentos más difíciles, me llenaron de la fortaleza necesaria para continuar.

Y a Jors, Juan, Laura, Lina, David, Juan José y Sandra, por sus enseñanzas, apoyo y risas, que estuvieron presentes en cada paso del camino, especialmente en los días más complicados. Su compañía ha sido un verdadero regalo en este proceso.

Finalmente, reitero mi agradecimiento a todas las personas de una forma u otra me ayudaron a llegar a concluir este logro tan importante; el desarrollo de esta tesis ha sido un proceso largo y complejo, pero cada uno, con su apoyo y dedicación, ha contribuido de manera significativa a que este trabajo sea posible. Este logro no es solo el resultado de un esfuerzo individual, sino de una colaboración continua, cuyo valor trasciende más allá de lo académico.

Listado de símbolos y abreviaturas

Tabla de Abreviaturas

Abreviatura	**Significado**
AmB	Anfotericina B
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DSPE	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina
DxNa	Desoxicolato de sodio
EAM	Espectro de absorción molecular
EFI	Enfermedad fúngica invasiva
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IV	Intravenoso
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MeOH	Metanol
mPEG	Metoxi-poli(etilenglicol)
NHS	N-hidroxisuccinimida
PCL	poli-Caprolactona
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

Resumen

Contribución al desarrollo de formulaciones micelares de anfotericina B, con miras a su aplicación en sistemas de liberación modificada

La anfotericina B (AmB) es un antifúngico macrólido de amplio espectro, utilizado como tratamiento de primera línea en infecciones fúngicas invasivas (EFI), especialmente en pacientes inmunosuprimidos. No obstante, su empleo clínico se encuentra severamente restringido por su elevada toxicidad, particularmente la nefrotoxicidad, así como por su escasa biodisponibilidad oral, lo que obliga a una administración intravenosa exclusiva en contextos hospitalarios. Aunque en las últimas décadas han surgido formulaciones lipídicas, incluyendo liposomas y complejos lipídicos, que han logrado reducir significativamente estos efectos adversos, estas estrategias presentan limitaciones importantes relacionadas con su alto costo, dificultades de producción, estabilidad limitada y accesibilidad restringida.

Ante esta problemática, numerosas investigaciones se han enfocado en desarrollar alternativas farmacéuticas que reduzcan la toxicidad, mejoren la estabilidad y permitan vías alternativas de administración, particularmente la vía oral. En este contexto, el presente estudio aborda el desarrollo y evaluación de formulaciones nanoparticuladas utilizando copolímeros biodegradables conjugados con fosfolípidos de varios bloques para encapsular AmB. La metodología implicó la síntesis y caracterización de micelas poliméricas cargadas con AmB, incluyendo técnicas analíticas para su estudio como espectroscopía UV-Visible, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica, entre otras.

Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios de estabilidad de los sistemas nanoparticulados en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, evaluando su resistencia frente a la degradación en fluidos gástricos e intestinales simulados, y su comportamiento de liberación en estas condiciones. Los resultados indicaron que las micelas desarrolladas proporcionan mejoras en la estabilidad química de la AmB, favorecen perfiles de liberación sostenida que pueden llegar a prolongar los tiempos de acción terapéutica y reducir potencialmente los efectos tóxicos característicos de este antifúngico. Estos hallazgos resaltan el potencial de estas formulaciones para constituir la base de futuras formas farmacéuticas orales más seguras, efectivas y accesibles, ampliando el alcance clínico del tratamiento antifúngico con

AmB.

Palabras clave: Anfotericina B; formulaciones micelares; sistemas de liberación modificada; nanopartículas poliméricas; biodisponibilidad; estabilidad.

Abstract

Contribution to the development of micellar formulations of amphotericin B, with a view to its application in modified release systems

Amphotericin B (AmB) is a broad-spectrum macrolide antifungal agent used as a first-line treatment for invasive fungal infections (IFIs), particularly in immunocompromised patients. However, its clinical use is severely restricted due to its high toxicity, especially nephrotoxicity, as well as its poor oral bioavailability, which necessitates exclusive intravenous administration in hospital settings. Although lipid-based formulations, including liposomes and lipid complexes, have emerged in recent decades, significantly reducing these adverse effects, these strategies present notable limitations such as high cost, production difficulties, limited stability, and restricted accessibility.

In response to these issues, numerous studies have focused on developing pharmaceutical alternatives that reduce toxicity, improve stability, and enable alternative routes of administration, particularly the oral route. In this context, the present study addresses the development and evaluation of nanoparticulate formulations using biodegradable copolymers conjugated with multi-block phospholipids for encapsulating AmB. The methodology involved the synthesis and characterization of polymeric micelles loaded with AmB, employing analytical techniques such as UV-Visible spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC), dynamic light scattering (DLS), and electron microscopy, among others.

Additionally, stability studies of the nanoparticulate systems were conducted under simulated gastrointestinal tract conditions, evaluating their resistance to degradation in simulated gastric and intestinal fluids, as well as their release behavior under these conditions. The results indicated that the developed micelles provide improvements in the chemical stability of AmB, promote sustained release profiles that may extend therapeutic action times, and potentially reduce the toxic effects typically associated with this antifungal agent. These findings highlight the potential of these formulations to serve as the basis for future, safer, more effective, and accessible oral pharmaceutical forms, thereby expanding the clinical reach of AmB antifungal treatment.

Keywords: Amphotericin B; micellar formulations; modified-release systems; polymeric nanoparticles; bioavailability; stability.

Contenido

Agradecimientos II

Listado de símbolos y abreviaturas III

Resumen IV

Abstract VI

Contenido VII

Lista de figuras X

Lista de tablas XII

Introducción 1

Objetivos 3
Objetivo general . . . 3
Objetivo específicos . . . 3

1 Aspectos teóricos 4
1.1 Enfermedad fúngica invasiva . . . 4
1.2 Anfotericina B . . . 5
1.2.1 Características de la anfotericina B . . . 5
1.2.2 Formulaciones con anfotericina B . . . 8
1.3 Sistemas nanoparticulados . . . 10
1.3.1 Generalidades . . . 10
1.3.2 Nanopartículas poliméricas . . . 12
1.3.3 Estabilidad frente a fluidos biológicos simulados . . . 12
1.3.4 Liberación de un fármaco desde sistemas nanoparticulados . . . 13
1.3.5 Modelos cinéticos de liberación de fármacos . . . 14
1.4 Sistemas Nanoparticulados de AmB . . . 19

2 Materiales y métodos 25
2.1 Materiales y reactivos . . . 25

2.2 Métodos . . . 26
2.2.1 Síntesis de los copolímeros . . . 26
2.2.2 Caracterización de los copolímeros por resonancia magnética nuclear de protones ^{1}H-RMN . . . 27
2.2.3 Obtención de sistemas nanoparticulados con la AmB . . . 27
2.2.4 Caracterización de los sistemas nanoparticulados . . . 27
2.2.5 Estudios de liberación . . . 29
2.2.6 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas de AmB . . . 32

3 Resultados y discusión **34**
3.1 Elaboración y caracterización de los copolímeros . . . 34
3.2 Elaboración y caracterización de las nanopartículas de AmB . . . 38
3.2.1 Evaluación por espectroscopía de infrarrojo FTIR . . . 39
3.2.2 Microscopía electrónica de barrido - SEM . . . 43
3.2.3 Tamaño y distribución de tamaño de partícula y potencial ζ . . . 46
3.2.4 Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación . . . 47
3.3 Evaluación de la estabilidad y el comportamiento de liberación de la AmB a partir de los sistemas nanoparticulados . . . 48
3.3.1 Determinación de condiciones sumidero o *sink* . . . 48
3.3.2 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas de AmB . . . 53
3.3.3 Evaluación de los perfiles de liberación en fluidos biológicos simulados 57

4 Conclusiones y recomendaciones **66**
4.1 **Conclusiones** . . . 66
4.2 **Recomendaciones** . . . 67

A Apéndice A: Síntesis química para la obtención de materiales poliméricos y sistemas nanoparticulados **68**
A.1 Síntesis de copolímeros . . . 68
A.1.1 Síntesis de copolímeros de PEG-PCL . . . 68
A.1.2 Síntesis de copolímeros de PEG-PCL-COOH . . . 69
A.1.3 Conjugación de copolímeros de PEG-PCL-DSPE . . . 69
A.2 Síntesis de nanopartículas . . . 71

B Apéndice B: Validación de una metodología analítica para la cuantificación de AmB **73**
B.1 Condiciones cromatográficas . . . 73
B.2 Preparación de las muestras . . . 74
B.3 Idoneidad del sistema . . . 74
B.4 Características de desempeño . . . 75
B.4.1 Linealidad . . . 75
B.4.2 Selectividad . . . 77
B.4.3 Especificidad . . . 78
B.4.4 Precisión . . . 78
B.4.5 Exactitud . . . 80

B.4.6 Limites de detección y cuantificación 81

C Apéndice C: Soportes espectrales complementarios **83**
C.1 Soportes espectrales FTIR complementarios 83
C.2 Soportes espectrales UV/VIS complementarios 85
C.3 Soportes espectrales ^{1}H-RMN complementarios 86

Referencias Bibliográficas **89**

Lista de figuras

1-1 Estructura química de la anfotericina B. 6
1-2 Mecanismos de acción propuestos para la AmB. 7
1-3 Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas. 10

3-1 Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros primera fase de síntesis 35
3-2 Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros obtenidos como precursores para la conjugación 36
3-3 Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros conjugados con DSPE 37
3-4 Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-PCL-AmB y PEG-PCL-vacío. 39
3-5 Aspecto nanopartículas vacías sin conjugar con DSPE, visualizadas por microscopía electrónica de barrido - SEM 43
3-6 Aspecto nanopartículas vacías conjugadas con DSPE, visualizadas por microscopía electrónica de barrido - SEM 44
3-7 Aspecto nanopartículas cargadas con AmB visualizadas por microscopía electrónica de barrido - SEM 45
3-8 Solubilidad de la AmB en función del porcentaje de DMSO en el medio FIS a 37°C. 51
3-9 Solubilidad de la AmB en función del porcentaje de DxNa en el medio FIS a 37°C. 52
3-10 Variaciones en espectros UV/VIS de sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH 1,2 54
3-11 Espectro UV/VIS de la anfotericina B en solución. 55
3-12 Perfiles de liberación de nanopartículas cargadas con AmB en FGS a 37°C. . . 57
3-13 Perfiles de liberación de nanopartículas cargadas con AmB en FIS a 37°C. . . 61
3-14 Perfiles de liberación de nanopartículas cargadas con AmB con recambio de medio de FGS a FIS a 37°C. 64

A-1 Reacción de síntesis de copolímeros PEG-PCL. 69
A-2 Reacción de síntesis de copolímeros PEG-PCL-COOH 69
A-3 Reacción de síntesis de copolímeros PEG-PCL-DSPE. 70
A-4 Certificado de análisis anfotericina B. 71
A-5 Proceso de nanoprecipitación 72

B-1 Perfil cromatográfico de AmB. 74
B-2 Curvas de calibración para sistema y método. 76
B-3 Cromatogramas de la evaluación de especificidad 1 79

B-4 Cromatogramas de la evaluación de especificidad 2 79

C-1 Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-vacío. 83
C-2 Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-PCL-DSPE-AmB y PEG-PCL-DSPE-vacío. 84
C-3 Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-vacío. 84
C-4 Variaciones en espectros UV/VIS de sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH 6,8 85
C-5 Variaciones en espectros UV/VIS de sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH 7,4 86
C-6 Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros primera fase de síntesis 87
C-7 Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros obtenidos como precursores para la conjugación87
C-8 Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros conjugados con DSPE 88

Lista de tablas

1-1 Propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de la AmB. . . 6
1-2 Características formulaciones liposomal y complejo lipídico de AmB. 9
1-3 Técnicas de obtención de nanopartículas. 11
1-4 Trabajos de investigación encaminados al desarrollo y estudio de sistemas nanoparticulados de AmB. 20

2-1 Copolímeros base y conjugados para la obtención de sistemas nanoparticulados.. 26
2-2 Formulaciones de nanopartículas cargadas con AmB. 28
2-3 Composiciones de los medios estudiados para la determinación de las condiciones *sink*. 30
2-4 Tiempos de muestreo ensayos de liberación. 32

3-1 Señales importantes en los espectros FTIR de los sistemas nanoparticulados. . . 42
3-2 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial ζ de los sistemas nanoparticulados.. 46
3-3 Porcentajes de rendimiento, DLC y DLE en los diferentes sistemas nanoparticulados. 47
3-4 Solubilidad de la AmB en un medio FIS que incluye desoxicolato de sodio (DxNa) y dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C. 50
3-5 Determinación de concentraciones de AmB en sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH de 1,2.. 53
3-6 Determinación de concentraciones de AmB en sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH de 6,8.. 56
3-7 Determinación de concentraciones de AmB en sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH de 7,4.. 56
3-8 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para los sistemas nanoparticulados en FGS a 37°C. 59
3-9 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para los sistemas nanoparticulados en FIS a 37°C.. 62
3-10 Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para los sistemas nanoparticulados con recambio de medio de FGS a FIS a 37°C. 65

B-1 Parámetros de idoneidad del sistema. 75

B-2 Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la linealidad del sistema. 76
B-3 Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la linealidad del método. 77
B-4 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad en sistema y método. 77
B-5 Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la selectividad. 78
B-6 Parámetros estadísticos test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad en determinación de AmB en el sistema y método.. 80
B-7 Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la precisión intermedia en sistema y método. 80
B-8 Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica. 81
B-9 Determinación de límites de cuantificación y detección de AmB en el sistema y método. 82

Introducción

La enfermedad fúngica invasiva (EFI) se considera una infección oportunista de alta morbimortalidad, que afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos o en estado crítico [1, 2, 3]. Su incidencia ha aumentado de manera proporcional al incremento en la expectativa de vida de esta población, como consecuencia de los avances en medicina y atención clínica [4]. Este escenario plantea retos significativos, tanto en el diagnóstico —frecuentemente dificultado por la inespecificidad de la sintomatología y la complejidad para identificar al agente etiológico— como en la selección de un tratamiento adecuado, eficaz, seguro y accesible.

En este contexto, se hace indispensable contar con agentes antifúngicos de amplio espectro y baja tasa de generación de resistencias, que puedan emplearse con éxito incluso en ausencia de una identificación certera del patógeno. En este sentido, la anfotericina B (AmB) se ha consolidado como uno de los fármacos más efectivos disponibles, gracias a sus propiedades farmacodinámicas y la escasa aparición de resistencia [5, 6]. Sin embargo, su aplicación clínica se ve limitada por su elevada nefrotoxicidad y su necesidad de administración por vía intravenosa, lo cual restringe su uso al entorno hospitalario.

Aunque en el mercado se encuentran disponibles formulaciones liposomales y lipídicas que reducen significativamente la toxicidad de la AmB [7], estas alternativas no resultan costo-efectivas dentro de los sistemas de salud en muchos países, lo que dificulta su acceso y sostenibilidad en la práctica clínica habitual [8]. Esta situación motiva la necesidad de investigar nuevas estrategias terapéuticas, ya sea mediante el desarrollo de moléculas novedosas o a través de la reformulación de fármacos existentes, con el fin de mejorar su perfil farmacológico y facilitar su uso clínico.

Una de las alternativas que ha ganado mayor interés en los últimos años es la formulación de sistemas de liberación modificada, particularmente mediante el uso de sistemas nanoparticulados, que permiten encapsular fármacos hidrofóbicos como la AmB. Estos sistemas pueden modular su liberación, aumentar su estabilidad en medios biológicos, reducir su toxicidad y mejorar su eficacia terapéutica. A esto se suma la posibilidad de emplear materiales poliméricos biodegradables de bajo costo, lo que representa una ventaja significativa en términos de escalabilidad y accesibilidad clínica [9, 10, 11, 12].

De esta manera, la investigación y desarrollo de nuevas formas de administración de la AmB que resulten costo-efectivas, accesibles y seguras, constituye una prioridad en la búsqueda de soluciones terapéuticas sostenibles para la EFI. Este enfoque no solo representa un avance científico en el campo de la nanotecnología farmacéutica, sino que también tiene un importante potencial de impacto social, al facilitar el acceso a tratamientos antifúngicos eficaces para poblaciones vulnerables.

Con base en lo anterior, el presente proyecto propone el desarrollo de sistemas nanoparticulados cargados con AmB, utilizando matrices poliméricas biodegradables conjugadas con fosfolípidos, como una alternativa terapéutica para el tratamiento de la EFI. Para ello, se plantea la caracterización de nanopartículas micelares, diseñadas con diferentes composiciones y arquitecturas poliméricas, con el fin de evaluar la influencia de estas variables sobre la estabilidad del principio activo en fluidos biológicos simulados y su comportamiento de liberación. La información obtenida permitirá seleccionar uno o más sistemas con propiedades adecuadas, que puedan ser empleados en el futuro como base para el desarrollo de formas farmacéuticas de administración peroral, capaces de modificar favorablemente los esquemas actuales de tratamiento.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al desarrollo de formulaciones micelares de anfotericina B con precursores poliméricos conjugados con fosfolípidos, con miras a su aplicación en sistemas de liberación modificada de administración peroral.

Objetivos específicos

- Evaluar la influencia que tienen medios biológicos del tracto gastrointestinal simulados sobre la estabilidad de la anfotericina B incluida en sistemas micelares.
- Estudiar la influencia de los diferentes polímeros en el comportamiento de la liberación de la anfotericina B, desde los sistemas micelares.

1 Aspectos teóricos

1.1 Enfermedad fúngica invasiva

La Enfermedad fúngica invasiva (EFI) se refiere a infecciones graves causadas por hongos que invaden tejidos profundos, órganos o sistemas del cuerpo. Estos patógenos pueden causar infecciones severas y potencialmente mortales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Los hongos más comúnmente implicados en EFI incluyen *Aspergillus spp., Candida spp., y Cryptococcus spp*; se considera una infección oportunista, estando asociada a una gran morbimortalidad [1]. El aumento de la incidencia de este tipo de micosis se encuentra estrechamente relacionada con las condiciones de inmunodepresión, aumento de inmunosupresión de los pacientes, así como el uso inadecuado de dispositivos médicos para uso parenteral [2, 3]. Entre los factores de riesgo asociados a la adquisición de EFI destacan la infección por VIH, pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer (principalmente de tipo hematológico), sometidos a quimioterapias y pacientes con historial de terapia biológica y trasplantados [3]. Las EFI se clasifican de acuerdo con el agente etiológico causante de la infección oportunista, destacando la candidiasis invasiva, aspergilosis invasiva y criptococosis como principales micosis debido a su alta incidencia [13, 14].

La levadura *Candida albicans*, pese a hacer parte de la microbiota de piel y mucosa humana normalmente, en pacientes inmunocomprometidos representan la principal causa de infecciones oportunistas en cualquier localización, incluso llegando a producir infecciones multiorgánicas, de alto riesgo en estos pacientes. Otras especies del género *Candida* son responsables de casos clínicos de enfermedades fúngicas invasivas, entre estas se encuentran: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, las cuales tienden a desarrollar resistencias más rápidamente a los antifúngicos en comparación con la primera [15].

Los hongos filamentosos del género Aspergillus presentan amplia distribución y un gran número de especies, entre las cuales algunas se relacionan con enfermedades humanas, estas

son: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* [2]. Los casos de Criptococosis con alta incidencia y generación de EFI, se dan por las especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* principalmente [3], agentes microbianos con especial inclinación por el sistema nervioso central, manifestándose principalmente en casos de meningitis.

El tratamiento de las EFI en clínica se ve afectado por la limitada cantidad de agentes terapéuticos disponibles de acuerdo con el agente oportunista responsable de la infección que, debido a sus rápidos avances y dificultades en un rápido diagnóstico e identificación, ponen en riesgo la integridad del paciente al no contar con un esquema terapéutico de uso inmediato que pueda mejorar la condición tratada. Entre los grupos terapéuticos disponibles se encuentran los azoles, con amplios espectros de actividad (donde destaca el fluconazol), pero con gran cantidad de interacciones en terapias combinadas con otros medicamentos; los polienos, macrólidos con amplios espectros de actividad antifúngica, pero baja biodisponibilidad por vía oral, que se ve afectada por la baja solubilidad en agua, además de una elevada toxicidad (siendo la anfotericina B representante de este grupo); y las equinocandinas, que son las de aprobación más reciente, presentan buena actividad frente a algunas especies micóticas, pero presentan problemas de resistencia relativamente elevada [16]. Factores como el desarrollo de resistencia y toxicidad de los antifúngicos disponibles limitan su uso y presentan una barrera para el tratamiento efectivo de la EFI en clínica. Ante tal escenario, nuevas formulaciones de fármacos con amplios espectros y bajas tasas de generación de resistencia, como la anfotericina B, que hagan su uso más seguro en la práctica clínica, presentan una opción a seguir.

1.2 Anfotericina B

1.2.1 Características de la anfotericina B

La anfotericina B (AmB) es un ingrediente farmacéutico activo (IFA) que funciona como antifúngico macrocíclico de amplio espectro, obtenido a partir de cultivos de *Streptomyces nodosus*; su uso clínico se remonta a 1959 cuando fue aprobado por la FDA [6]. En la actualidad, se sigue considerando el fármaco de elección en el tratamiento de micosis sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, debido a su amplio espectro de acción; sin embargo, su solubilidad en agua es extremadamente baja y su tiempo de vida media bastante largo (aproximadamente 15 días)[17], por lo que se acumula en tejidos como el hígado, pulmones y riñones, siendo estos últimos los más afectados por sus efectos tóxicos [18, 19, 20]. Estructuralmente corresponde a un macrólido heptaeno, con una porción hidrófila de carbonos hidroxilados, una hidrófoba constituida por carbonos que se unen mediante siete enlaces dobles y una cadena lateral de aminodesoxihexosa. La Figura 1-1 muestra la estructura

química de la AmB [21].

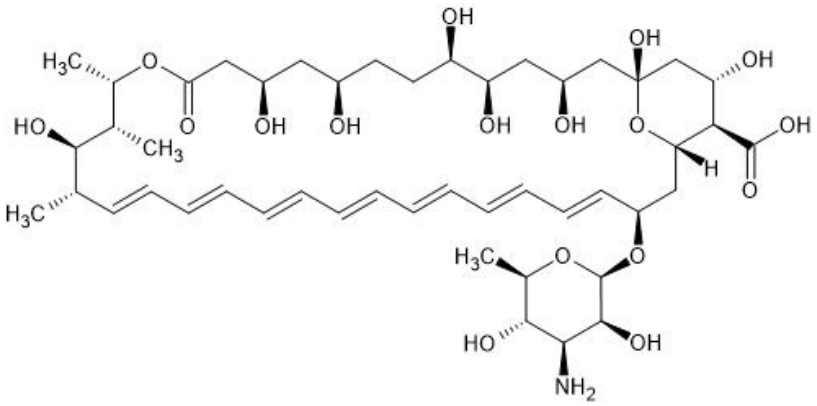


Figura 1-1: Estructura química de la anfotericina B [22]. Elaborada con el software ACD/ChemSketch®Freeware.

La Tabla 1-1 resume algunas propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas importantes de la AmB reportadas en la literatura.

Tabla 1-1: Propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de la AmB.

Propiedad	**Valor reportado**	**Ref.**
Peso molecular	924,079 g/mol	[23]
Fórmula química	$C_{47}H_{73}NO_{17}$	[23]
Solubilidad (a pH fisiológico)	<0,001 mg/L	[24]
Punto de fusión	170,0 °C	[23]
pK_a	5,5 y 10,0	[23]
Log P (experimental)	0,8	[23]
Vía de administración	Intravenosa (IV)	[23]
Vía de eliminación	Renal	[25]
Tiempo de vida media de eliminación	Aproximadamente 15 días	[25]
Modelo farmacocinético que sigue	No lineal-multicompartimental	[25]
Clasificación biofarmacéutica	Clase IV	[12]

El mecanismo de acción de la AmB no está completamente elucidado al día de hoy, pese a esto existen varios modelos que pretenden explicar sus efectos antifúngicos. Un primer modelo habla de la formación de poros tipo barril que permean la doble capa de la membrana de las células del hongo, donde los segmentos hidrofóbicos de la molécula se orientan al exterior del poro mientras que los grupos hidroxilos al interior, generando una pérdida de iones y moléculas de carácter polar indispensable para la vida celular; estos poros y su formación dependen de los procesos de complejación de los esteroles presentes en la membrana de los

hongos con las moléculas de AmB; también se afirma que la complejación de los esteroles desestabilizan la bicapa presente en las células ocasionándoles la muerte. Otro modelo plantea que el daño celular causado por la AmB, es debido a la generación de estrés oxidativo al interior de la célula, ya que la presencia de este agente induce la formación de especies reactivas de oxígeno que oxidan los componentes lipídicos de las membranas. La Figura 1-2 A esquematiza los mecanismos de acción propuestos para la AmB [26]. Un último modelo propone la formación de una esponja de esteroles, según el cual la anfotericina B forma agregados que se localizan cerca al hongo y absorben las moléculas de ergosterol presentes en su membrana (Figura 1-2 B), desestabilizándola y causando la muerte celular [27].

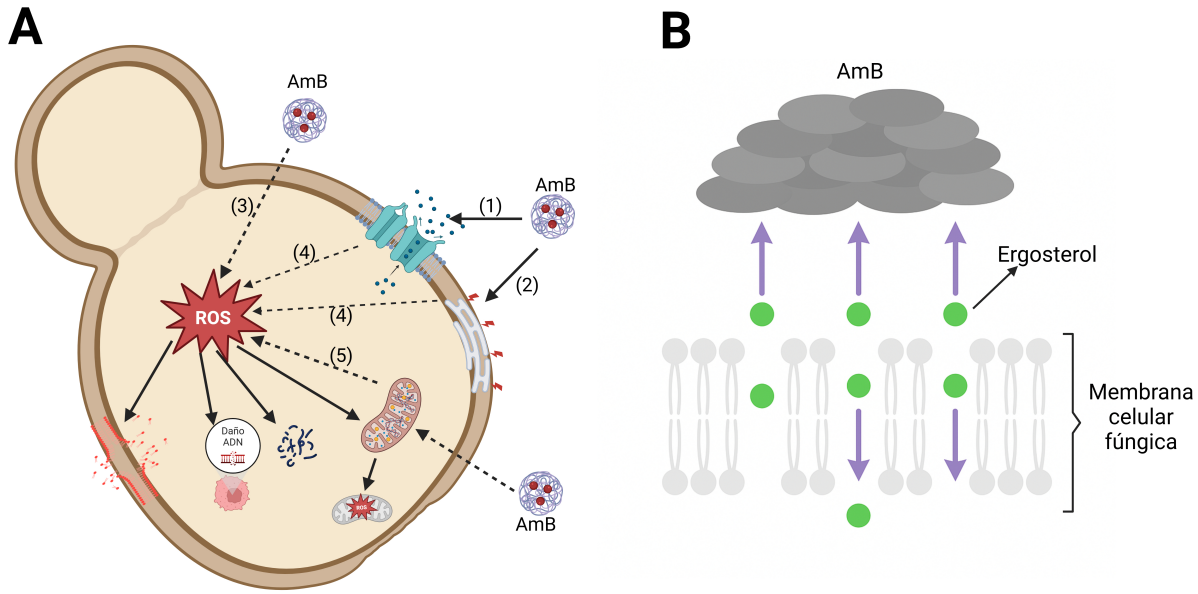


Figura 1-2: Mecanismos de acción propuestos para la AmB. A) A la izquierda, (1) poros tipo barril que permean la doble capa de la membrana de las células del hongo; (2) adsorción de moléculas de AmB en la superficie de las células secuestrando los esteroles. Generación de estrés oxidativo (3, 4, 5) [26]. B) A la derecha, modelo esponja de esteroles sobre la membrana [27].Elaborada con el software BioRender®.

Aunque la AmB cuenta con un amplio espectro de acción y una tasa de resistencia relativamente baja [28], presenta una elevada toxicidad, principalmente a nivel renal, la cual se atribuye a la habilidad de AmB de complejar los esteroles presentes en las membranas celulares. Su mecanismo de toxicidad es similar al que explica su actividad antifúngica, debido a las similitudes estructurales entre las moléculas de colesterol y ergosterol, y por ende a la naturaleza de su unión; esta toxicidad es dosis dependiente, lo que limita el uso de la AmB en clínica [5].

1.2.2 Formulaciones con anfotericina B

Todas las formulaciones disponibles de AmB en el mercado actual son de administración IV. La AmB convencional (desoxicolato), es la que mayores reportes de efectos adversos tiene; y la AmB liposómica y el complejo lipídico de AmB, desarrolladas con el fin de disminuir los síntomas relacionados con la infusión y causar una menor nefrotoxicidad en comparación a la AmB desoxicolato. Ninguno de estos sistemas es intercambiable entre sí debido a las diferencias en composición que modifican su comportamiento de distribución y eliminación, por lo que se debe asegurar una correcta verificación de la forma farmacéutica correspondiente en la práctica clínica [7].

La AmB desoxicolato es la formulación clásica o convencional de este antifúngico, ampliamente utilizada para tratar infecciones micóticas sistémicas; esta formulación corresponde a una mezcla de AmB con desoxicolato de sodio, el cual funciona como un agente solubilizante [6]. Debido a su baja absorción a nivel gastrointestinal, este fármaco se administra por vía IV; presenta una fuerte unión a proteínas plasmáticas (90-95 %) y se distribuye ampliamente en el organismo, aunque es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica [29]. La formulación que incluye al desoxicolato tiene un estrecho margen terapéutico, con lo que dosis cercanas a las necesarias para generar un efecto terapéutico, pueden también provocar efectos tóxicos graves; por tal motivo se han desarrollado formulaciones lipídicas y liposomales de AmB con el fin de reducir la toxicidad asociada a la AmB desoxicolato y mejorar su perfil de seguridad, así como mejorar su eficacia terapéutica. En la Tabla 1-2 se resumen las principales características de estas formulaciones [6].

Debido a la inexistencia de presentaciones de AmB de administración diferentes a la vía IV, los pacientes sometidos a estos tratamientos deben permanecer hospitalizados hasta finalizarlos, lo cual no solo está asociado a los efectos propios de la toxicidad de la AmB, sino también a la exposición a otros agentes patógenos que pueden infectarlos dado su estado de inmunocompromiso [3]. La generación de alternativas, que atenúen estas limitaciones, son temas de interés actual y de impacto directo sobre los tratamientos y calidad de vida de los pacientes sometidos a ellos; en este sentido, investigaciones encaminadas al desarrollo de formulaciones alternativas cobran especial importancia.

Entre las opciones para el tratamiento con AmB, está la generación de formulaciones para administración peroral, en las que se debe tener en cuenta [11]:

- Un incremento considerable en la solubilidad de la anfotericina B en el tracto gastrointestinal, dada su escasa solubilidad en medios acuosos.
- Un incremento en la permeabilidad de la molécula, la cual se ve seriamente afectada por su carácter anfifílico y el balance hidrofílico-lipofílico que pueda presentarse, impidiendo una adecuada absorción en el intestino delgado.
- Estrategias que aseguren la estabilidad química del fármaco frente a medios susceptibles

Tabla 1-2: Características formulaciones liposomal y complejo lipídico de AmB.

Propiedad	**AmB liposomal**	**AmB complejo lipídico**
Estructura	Encapsulada en liposomas	Complejo lipídico en láminas o cintas
Tamaño	80-100 nm	300-500 nm
Distribución	Buena distribución en tejidos afectados, con una mayor concentración en sitios de infección y menor en órganos como los riñones.	Presenta un perfil de distribución mas favorable en comparación con las formas desoxicolato, sin embargo, también presenta una mayor retención a nivel renal en comparación con la forma liposomal.
Toxicidad	Menor toxicidad renal y sistémica	Menos tóxica que las formas desoxicolato, pero más que la liposomal
Indicaciones	Infecciones micóticas graves, especialmente en pacientes de alto riesgo inmunocomprometidos y con compromiso renal significativo.	Infecciones micóticas graves cuando otras formulaciones o tratamientos no han sido efectivos o no son bien tolerados

de degradarla, considerando los valores de pH de cada medio y las variaciones que puedan presentarse en el tracto gastrointestinal.

- Adaptaciones que mejoren el tránsito intestinal y en conjunto con las anteriores consideraciones, las concentraciones absorbidas de AmB sean las óptimas para lograr los efectos terapéuticos deseados.

- Un patrón de liberación adecuado, que garantice la disponibilidad de la AmB para que ejerza su función, sin que esta genere efectos tóxicos asociados a la interacción con los componentes que puedan encontrarse a nivel celular.

Entre las tecnologías actuales capaces de reunir los requisitos planteados y generar estrategias para la obtención de medicamentos con estas características se encuentra la nanotecnología, específicamente la implementación de sistemas poliméricos capaces de encapsular el fármaco deseado y vehiculizarlo de manera eficiente para lograr un producto de administración oral. De manera específica, el desarrollo de sistemas nanoparticulados cargados con AmB, representa una posible alternativa para lograr un preparado farmacéutico antifúngico seguro, económico y de gran efectividad [30].

1.3 Sistemas nanoparticulados

1.3.1 Generalidades

Las técnicas de nanoencapsulación de agentes terapéuticos pueden incrementar su eficacia y especificidad, así como protegerlos frente a determinadas condiciones que pueden producir su degradación [31]. La nanoencapsulación es un proceso por el cual pequeñas partículas de los materiales del núcleo se empaquetan dentro de un material de pared para formar nanopartículas. El rango de tamaños en los cuales se habla de nanopartículas comprende entre 10 y 1000 nm, y se expresan como nanoesferas y nanocápsulas; donde las primeras corresponden a un sistema matricial en donde el compuesto activo de interés se dispersa uniformemente, mientras en el segundo caso se habla de sistemas vesiculares en las que el compuesto activo se encuentra en una cavidad definida y rodeada por una membrana de polímero (Figura 1-3) [32].

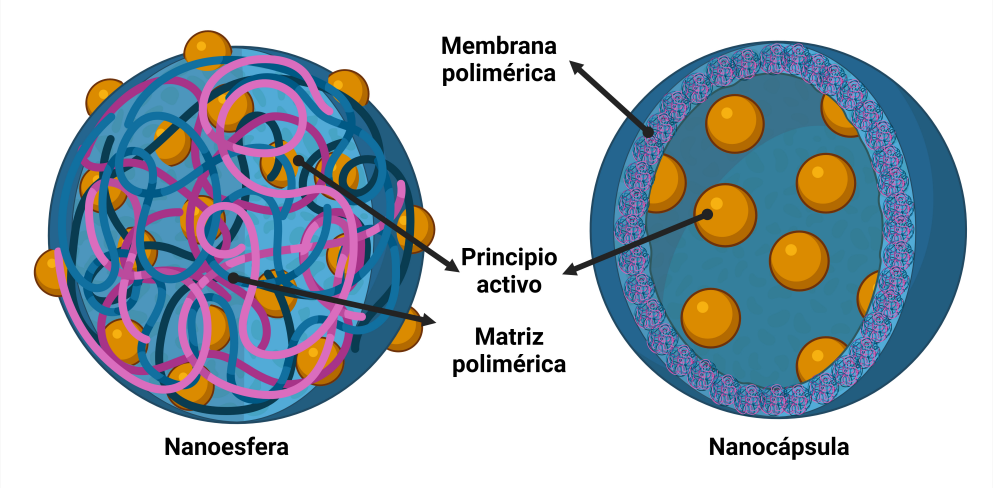


Figura 1-3: Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas [33].Elaborada con el software BioRender®.

Entre las técnicas de obtención de nanopartículas se encuentran: nanoemulsificación, coacervación, formación de complejos de inclusión, emulsificación con evaporación de solvente y nanoprecipitación. En la Tabla 1-3 se muestran algunas de las características y aplicaciones reportadas para cada una de ellas [34, 32]. Los objetivos comunes del empleo de estas técnicas son:

- Control de la liberación del principio activo.
- Disminución de efectos adversos.
- Mejora de la solubilidad y por ende de la biodisponibilidad del principio activo.

- Mejora de la capacidad de penetración en tejidos de complejo acceso.
- Protección frente a inestabilidades químicas y físicas del activo.
- Empleo de múltiples rutas de administración optimizando la elección en función de las características del principio activo y de la forma farmacéutica.

Tabla 1-3: Técnicas de obtención de nanopartículas.

Técnica	Características
Nanoemulsificación	Se utiliza en la encapsulación de compuestos bioactivos en soluciones acuosas mediante la formación de dispersiones coloidales en los que el líquido inmiscible queda en la fase interna de la nanoemulsión [32]. De manera particular, optimiza las condiciones operativas e impide fenómenos de coalescencia [32]
Coacervación	Implica la separación de fases de una mezcla de un polímero no soluble en el medio de solución y la posterior deposición del coacervado recién formado alrededor del ingrediente activo en presencia de agitación continua [32]
Formación de complejos de inclusión	Se refiere a la encapsulación de una asociación supramolecular de un ligando (ingrediente encapsulado) en un sustrato con cavidad hueca (agente complejante como las ciclodextrinas) a través de enlaces de hidrógeno, fuerza de Van der Waals, o un efecto hidrofóbico impulsado por la entropía [32].
Nanoprecipitación	En este método, moléculas bioactivas y el polímero que va a encapsular, se disuelven en un solvente orgánico y se añade una solución acuosa que contiene tensioactivos, el solvente orgánico es evaporado y las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa [32]. Al controlar de manera exhaustiva las condiciones experimentales, es posible la obtención de nanopartículas con estructuras cristalinas definidas [35].

1.3.2 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas, son agregados poliméricos insolubles en agua con tamaños hasta los 500 nm, empleadas para vehiculizar y liberar principios activos que de manera intrínseca presentan problemas en estos aspectos [36]. De manera particular, son una opción viable para la vehiculización de AmB, confiriéndole propiedades que posibilitarían su inclusión en nuevas formulaciones. La funcionalidad de las nanopartículas cargadas con un principio activo dependerá tanto de la encapsulación efectiva y sus respectivas características fisicoquímicas, como del comportamiento que estas presenten una vez finalizado el proceso de encapsulación [32]. Para caracterizar nanopartículas es común la evaluación de las siguientes propiedades:

- **Análisis de tamaño y morfología de partícula:** para determinar el tamaño de partícula y su morfología se prefieren técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS), la microscopia electrónica de barrido (SEM) y la microscopia electrónica de transmisión (TEM) [37].
- **Evaluación de la estructura cristalina:** la estructura cristalina puede ser determinada haciendo uso de técnicas de difracción de rayos x, dicha determinación resulta útil para analizar el comportamiento de solubilidad que presentarán las nanoparticulas [37].
- **Evaluación de potencial electrocinético (ζ):** es la medida de la carga total que una partícula adquiere en un determinado medio y da una indicación de la estabilidad física de un sistema coloidal. Se evalúa mediante técnicas de microelectroforésis [38].
- **Evaluación térmica del material:** permite determinar propiedades asociadas a cambios producidos por fluctuaciones de temperatura sobre el material analizado, así mismo, permite determinar temperaturas de transición vítrea y realizar análisis de polimorfismo; su evaluación se da mediante el empleo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) [39].
- **Análisis de propiedades funcionales:** aplica para preparados destinados a hacer parte de formulaciones para administración oral u otras que requieran considerar la evaluación de la estabilidad del principio activo encapsulado frente a medios ácidos y básicos; así como el comportamiento de liberación desde los sistemas farmacéuticos al medio [40, 41].

1.3.3 Estabilidad frente a fluidos biológicos simulados

Una de las consideraciones a tener en cuenta en la generación de un preparado con proyección a administrarse por vía oral, es la de garantizar la estabilidad física y química del fármaco

cargado en las nanopartículas frente a medios susceptibles de degradarlo, como los presentes en el tracto gastrointestinal. Se hace necesaria la implementación de estrategias que permitan evaluar la estabilidad frente a tales fluidos, mediante el uso de medios simulados cuyas características se aproximen y constituyan un reflejo del comportamiento que presentarán las partículas cargadas con fármaco en medios gastrointestinales reales [42, 43].

En este sentido, es posible realizar la evaluación del efecto que tienen medios gastrointestinales sobre este tipo de sistemas empleando medios simulados con adición de enzimas, que asemejan las condiciones de pH y componentes presentes en el tracto gastrointestinal, en condiciones de temperatura y agitación controlados [42, 44].

1.3.4 Liberación de un fármaco desde sistemas nanoparticulados

La liberación efectiva del fármaco desde los sistemas nanoparticulados debe realizarse y evaluarse a fin de conocer las condiciones óptimas de liberación y asegurar la entrega del fármaco desde el sistema en los puntos deseados. Tal liberación debe evaluarse en condiciones controladas y semejantes a aquellas donde se espera que se realice biológicamente. Entre los factores a considerar durante la evaluación de liberación de fármacos desde sistemas nanoparticulados se encuentran [45]:

- Desorción del fármaco de la superficie del sistema nanoparticulado.
- Difusión del fármaco a través de la matriz polimérica y la pared de esta.
- Erosión de la matriz polimérica que compone el sistema.
- Combinación de los procesos de difusión y erosión que se esperan tener de manera simultánea.
- Coeficiente de difusión de la sustancia cargada en las nanopartículas.
- Velocidad de degradación de la matriz polimérica en las condiciones evaluadas.

Existen diversas técnicas para la evaluación del comportamiento de liberación de fármacos desde sistemas nanoparticulados, entre las cuales se encuentran: ultracentrifugación, celda de difusión empleando membranas de diálisis y en algunos casos filtración a presión reducida [45, 46]. La comprensión del comportamiento y mecanismos por los cuales se efectúa la liberación de fármacos cargados en sistemas nanoparticulados comprende no solo características propias de los fármacos y polímeros que allí se encuentran como componentes, sino también de las interacciones presentes entre ellos y las características morfológicas y fisicoquímicas propias de las partículas, por lo que su evaluación constituye parte fundamental de la caracterización de las mismas, más si se piensa en estas como posibles componentes de productos de mayor complejidad.

1.3.5 Modelos cinéticos de liberación de fármacos

Como parte de la evaluación del comportamiento de liberación de un fármaco desde un sistema nanoparticulado, resulta importante determinar el modelo cinético que sigue, la comprensión de este permite entender y predecir cómo un fármaco se libera a lo largo del tiempo desde una matriz nanoparticulada. Estos modelos se dividen en convencionales (empíricos) y no convencionales (mecanísticos o basados en teorías específicas); a continuación se describen algunos modelos, incluyendo los más empleados:

Modelo de orden cero

Es uno de los modelos más simples en cinética de liberación de fármacos, es útil para describir sistemas en los que la cantidad de fármaco liberado por unidad de tiempo es constante, lo que significa que la velocidad de liberación es independiente de la concentración del fármaco presente en la formulación; explica sistemas donde se tiene una liberación sostenida y controlada del fármaco a lo largo del tiempo, sin variaciones en la tasa de liberación [47]. La ecuación que describe la liberación del fármaco en un proceso de orden cero es la siguiente:

$$C = C_0 + kt \tag{1-1}$$

Donde:

- C es la cantidad de fármaco presente en el sistema en un tiempo t.
- C_0 es la cantidad inicial de fármaco en el sistema.
- k es la constante de liberación (cantidad de fármaco liberado por unidad de tiempo).
- t es el tiempo.

En el modelo de orden cero, la liberación de fármaco es lineal con respecto al tiempo, lo que implica una velocidad constante de liberación hasta que el sistema entrega la totalidad del fármaco presente.

Modelo de primer orden

Es un modelo cinético en el que la velocidad de liberación del fármaco es proporcional a la cantidad restante en el sistema, lo que significa que, a medida que disminuye la cantidad

de fármaco disponible, la velocidad de liberación también disminuye; este modelo describe el comportamiento de sistemas en donde la liberación se da por un proceso de difusión esencialmente [47]. La ecuación que describe la liberación de un fármaco que se ajusta a un modelo de primer orden es la siguiente:

$$C = C_0(1 - e^{-kt}) \tag{1-2}$$

Donde:

- C_0 es la concentración inicial de fármaco.
- C es la concentración del fármaco liberada en el tiempo t.
- k es la constante de liberación de primer orden.
- t es el tiempo.

Este modelo describe cómo la concentración del fármaco disminuye exponencialmente a lo largo del tiempo, resultando particularmente útil para explicar el comportamiento de formas farmacéuticas de liberación prolongada.

Modelo de Higuchi

Es un modelo cinético utilizado para describir la liberación de fármacos desde matrices sólidas en las cuales el mecanismo principal es la difusión unidimensional; fue desarrollado en 1961 por Takeru Higuchi y es uno de los modelos más ampliamente utilizados en el ámbito farmacéutico, especialmente en sistemas de liberación controlada y formulaciones tópicas o transdérmicas [47]. La ecuación que describe la liberación de un fármaco desde un sistema que se ajusta a un modelo de Higuchi es la siguiente:

$$Q_t = k_H\sqrt{t} \tag{1-3}$$

Donde:

- Q es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t.

- k_H es la constante de Higuchi, que depende de las propiedades del sistema, así como de la solubilidad del fármaco, las características de los poros de la matriz, y el coeficiente de difusión.
- t es el tiempo.

Este modelo muestra que la cantidad de fármaco liberado es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, lo que significa que la tasa de liberación disminuye con el tiempo a medida que el fármaco se difunde desde la matriz al medio.

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Es un modelo empírico utilizado para describir la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos donde los mecanismos de liberación no siguen patrones lineales simples; este explica procesos de liberación de fármacos que pueden estar influenciados por múltiples mecanismos simultáneos, como la difusión y la relajación de la matriz polimérica [48, 47]. La ecuación que describe la liberación de un fármaco desde un sistema que se ajusta a un modelo de Korsmeyer-Peppas es la siguiente:

$$F = kt^n \tag{1-4}$$

Donde:

- F es la fracción del fármaco liberado en el tiempo t.
- k es una constante directamente relacionada con las propiedades estructurales y geométricas del sistema.
- t es el tiempo.
- n es un exponente que indica el mecanismo de liberación que sigue el sistema.

Para la interpretación del exponente n se tiene:

- $n \leq 0{,}5$: indica que el mecanismo que sigue es la difusión Fickiana, es decir, el fármaco se libera principalmente por difusión a través de la matriz.
- $0{,}5 < n < 1$: sugiere que la liberación está controlada por un mecanismo de difusión anómalo o no Fickiano (combinación de difusión y relajación de la matriz).

- *n=1*: corresponde a un proceso de relajación de la matriz o hinchamiento controlado, típico de sistemas donde el fármaco se libera a una tasa constante.
- *n>1*: constituye una forma extrema de transporte en donde durante el proceso de sorción la tensión aumenta y ocurre una ruptura del polímero por acción del medio.

Modelo de Korsmeyer-Peppas es particularmente útil cuando el proceso de liberación no sigue el patrón habitual de una difusión simple o cuando no se tiene certeza del mecanismo predominante.

Modelo de Ritger-Peppas

Este modelo es una generalización del modelo de Korsmeyer-Peppas, utilizado para describir la liberación de fármacos desde sistemas de matrices poliméricas, es especialmente útil cuando el mecanismo de liberación del fármaco involucra procesos difusivos y/o de relajación de la matriz, sin estar completamente dominado por un solo mecanismo. Ritger y Peppas desarrollaron este modelo para casos en los que la geometría y otros factores estructurales del sistema de liberación juegan un papel relevante en la cinética. El modelo de Ritger-Peppas sigue la ecuación descrita por el modelo de Korsmeyer-Peppas, sin embargo, el primero se utiliza tanto para sistemas donde el fármaco se libera por difusión como por otros mecanismos, y tiene un alcance más amplio para describir sistemas de liberación no convencionales, aplicándose a una gama más amplia de sistemas de liberación controlada [47].

Modelo de Peppas-Sahlin

De manera similar que el modelo de Ritger-Peppas, el modelo de Peppas-Sahlin es una extensión del modelo de Korsmeyer-Peppas, diseñado para describir la liberación de fármacos desde matrices poliméricas cuando coexisten dos mecanismos: difusión Fickiana y relajación de la matriz polimérica; siendo este un modelo semimecanístico que ofrece una mayor precisión al considerar ambos procesos de manera simultánea[47]. La ecuación que describe la liberación de un fármaco desde un sistema que se ajusta a un modelo de Peppas-Sahlin es la siguiente:

$$F_{(t)} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \tag{1-5}$$

Donde:

- $F_{(t)}$ es la fracción del fármaco liberado en el tiempo t.
- k_1 es la constante que describe el proceso de difusión Fickiana.

- k_2 es la constante que describe el proceso de relajación de la matriz polimérica.
- m es un exponente que indica la cinética de liberación.
- t es el tiempo.

Para su interpretación se tiene:

- Si $k_1 > k_2$: la liberación está predominantemente controlada por difusión.
- Si $k_1 < k_2$: la relajación de la matriz tiene un mayor impacto en la liberación del fármaco.
- Si $m = 0{,}5$: la liberación es controlada por difusión Fickiana pura.
- Si $m > 0{,}5$: hay un efecto significativo de relajación de la matriz.

El uso del modelo de Peppas-Sahlin resulta particularmente útil en sistemas donde los mecanismos de liberación no se limitan a la difusión o relajación de la matriz, sino que son una combinación de ambos.

Modelo de Weibull

Es un modelo empírico que se utiliza para describir la cinética de liberación de fármacos en sistemas complejos; es un modelo flexible que puede ajustarse a una amplia gama de mecanismos como la difusión, la erosión o la combinación de ambos. Fue originalmente desarrollado para describir la confiabilidad de sistemas físicos, pero se ha adaptado para describir la liberación de fármacos en ámbitos farmacéuticos [47]. La ecuación general del modelo de Weibull es:

$$F_{(t)} = 1 - \exp\left(-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)^{\beta}\right) \tag{1-6}$$

Donde:

- $F_{(t)}$ es la fracción del fármaco liberado en el tiempo t.
- t_0 es el tiempo de retardo, que refleja el inicio de la liberación del fármaco (0 si no hay retardo).
- τ es el tiempo característico de la liberación (constante de escala), que define la velocidad a la que ocurre la liberación.

- β es el parámetro de forma o pendiente, que indica la naturaleza del mecanismo de liberación.
- t es el tiempo.

Para la interpretación de β se tiene:

- Si $\beta<1$: la liberación es retardada o difusiva.
- Si $\beta=1$: la liberación sigue un modelo de primer orden.
- Si $\beta>1$: el fármaco se libera más rápido con el tiempo, lo que sugiere procesos de erosión o desintegración.

Es un modelo muy flexible que se ajusta a diferentes tipos de liberación de fármacos y puede aplicarse tanto a sistemas simples como a sistemas complejos con cinéticas no lineales, proporcionando información útil en relacionada con la velocidad y mecanismo de liberación.

Modelo de Monte Carlo

Es un método estadístico estocástico utilizado para simular y predecir el comportamiento de liberación de un fármaco desde sistemas complejos donde el comportamiento depende de múltiples variables y condiciones aleatorias. A diferencia de los modelos deterministas, este emplea la aleatoriedad y la probabilidad para simular el comportamiento de un sistema a lo largo del tiempo, realizando múltiples simulaciones para obtener un rango de posibles resultados, permitiendo analizar la interacción de múltiples mecanismos de manera simultánea. Sin embargo, su implementación está sujeta a disponer de una gran potencia computacional para ejecutar simulaciones repetitivas, especialmente en sistemas con muchas variables, así como de la calidad de las distribuciones de probabilidad seleccionadas para las variables estudiadas [49].

1.4 Sistemas Nanoparticulados de AmB

Teniendo en cuenta que la elevada toxicidad de la AmB es la principal responsable de las limitaciones de su uso en la práctica clínica, en los últimos años se han incrementado esfuerzos en materia de investigación con el objetivo de desarrollar formulaciones con este IFA que atenúen sus efectos nocivos, aplicando tecnologías para la obtención de nanopartículas. En

la Tabla 1-4 se presentan algunas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años con este fin, describiendo de manera resumida los objetivos y aportes generados a partir de cada investigación.

Tabla 1-4: Trabajos de investigación encaminados al desarrollo y estudio de sistemas nanoparticulados de AmB.

Título del estudio	**Objetivo/Aporte**	**Ref.**
Unleashing Fungicidal Forces: Exploring the Synergistic Power of Amphotericin B-Loaded Nanoparticles and Monoclonal Antibodies	Investigar el potencial de las nanopartículas poliméricas cargadas con AmB (AmB-NP) combinadas con anticuerpos monoclonales murinos (mAb) (CC5 y DD11) como una estrategia para superar problemas relacionados con generación de resistencias y toxicidad.	[50]
Synergistic activity of gold nanoparticles with amphotericin B on persister cells of *Candida tropicalis* biofilms	La combinación de nanopartículas de oro y AmB mostró una sinergia para eliminar biofilms de *Candida tropicalis*, mejorando la actividad antifúngica.	[51]
DSPC based polymeric micelles loaded with Amphotericin B: synthesis, characterization, and *in vitro* study	El estudio se centra en el diseño y desarrollo de micelas que contienen AmB para disminuir la toxicidad y mejorar la actividad antifúngica, analizando la influencia de diferentes composiciones poliméricas y disolventes sobre las características de las micelas.	[52]
One Platform Comparison of Polymeric and Lipidic Nanoparticles for the Delivery of Amphotericin B	Estudiar el estado de agregación de la AmB en dos nanoformulaciones diferentes, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y nanopartículas basadas en zeína (PNP), con el objetivo de mejorar la fracción de la forma menos tóxica de la AmB.	[53]
Fabrication of Amphotericin-B-loaded Sodium Alginate Nanoparticles for Biomedical Applications	Este estudio se centra en la fabricación de nanopartículas de AmB encapsuladas en alginato de sodio, utilizando la técnica de electrospray. Las nanopartículas mostraron una mayor biodisponibilidad y seguridad en comparación con las formas tradicionales de administración.	[54]
Cyclodextrin-based Pickering nanoemulsions containing amphotericin B: Part II. Formulation, antifungal activity, and chemical stability	Las nanopartículas basadas en ciclodextrina mejoraron la actividad antifúngica de la AmB, aumentando su solubilidad y biodisponibilidad.	[55]

Continúa en la siguiente página...

Título del estudio	**Objetivo/Aporte**	**Ref.**
Comparative Efficacy of Amphotericin B-loaded Chitosan Nanoparticles Against *Leishmania tropica*	Se evaluaron nanopartículas de quitosano cargadas con AmB, que demostraron mayor eficacia en la lucha contra *Leishmania tropica*.	[56]
Phospholipid-Conjugated PEG-b-PCL Copolymers as Precursors of Micellar Vehicles for Amphotericin B	Este estudio se mejoró el rendimiento de micelas poliméricas (PMs) como vehículos de transporte para la anfotericina B (AmB). Se estudió el efecto de modificar copolímeros de PEG-b-PCL con DSPE, lo que permitió aumentar la capacidad de carga de AmB, mejorar la estabilidad de las micelas en medios acuosos, reducir la toxicidad del fármaco encapsulado y mantener o mejorar su acción antifúngica.	[57]
Development of amphotericin B-loaded fibroin nanoparticles: a novel approach for topical ocular application	Se desarrollaron nanopartículas de fibroína cargadas con AmB para aplicaciones oculares, mostrando mejoras en la biodisponibilidad y reducción de la irritación ocular.	[58]
Development of Amphotericin B Micellar Formulations Based on Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(ϵ-caprolactone) Conjugated with Retinol	Se desarrollaron sistemas de liberación micelares para la anfotericina B (AmB) con menor toxicidad y alta efectividad antifúngica, utilizando copolímeros anfifílicos conjugados con retinol (RET). Estos sistemas permitieron mejorar la capacidad de encapsulación y reducir la agregación de AmB, lo que disminuyó su toxicidad, como el efecto hemolítico.	[59]
In situ gelling amphotericin B nanofibers: a new option for the treatment of keratomycosis	El uso de nanofibras de AmB demostró ser efectivo en el tratamiento de la queratomicosis, mejorando la liberación del fármaco y su estabilidad.	[60]
Lipid systems for the delivery of amphotericin B in antifungal therapy	Este estudio revisa los sistemas basados en lípidos para la administración de AmB, destacando las formulaciones no parenterales que buscan mejorar la solubilidad y reducir los efectos adversos asociados a la administración intravenosa.	[61]
Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with Amphotericin B and Paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis	En este estudio, las nanopartículas lipídicas sólidas encapsularon AmB y paromomicina para tratar leishmaniasis visceral murina, mostrando una mayor eficacia y menor toxicidad en comparación con los tratamientos convencionales.	[62]

Continúa en la siguiente página...

Título del estudio	**Objetivo/Aporte**	**Ref.**
Amphotericin B Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Parenteral Delivery: Characterization, Antifungal and *In vitro* Toxicity Assessment.	Se desarrollaron transportadores lipídicos nanostructurados para la administración parenteral de AmB, mostrando mejores perfiles de seguridad y eficacia antifúngica.	[63]
Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis.	Estudiaron el comportamiento que presentan nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para reducir la toxicidad del fármaco y facilitar el suministro localizado durante un tiempo prolongado	[64]
Evaluation of macrophage injury and activation by amphotericin B-loaded polymeric nanoparticles.	Prepararon nanoformulaciones solubles en agua, mediante polimerización radical usando N-isopropilacrilamida-ácido acrílico y vinil pirrolidona para lograr una entrega dirigida y minimizar la toxicidad en condiciones experimentales controladas.	[65]
Design of mannosylated oral amphotericin B nanoformulation: efficacy and safety in visceral leishmaniasis.	Evaluaron nanotransportadores preparados, basados en quitosano tiolado anclado en manosa, para mejorar la permeabilidad, la biodisponibilidad oral y el potencial antiparasitario de la anfotericina B.	[66]
Novel formulations for Amphotericin B delivery.	Tesis doctoral desarrollada con el fin de obtener formulaciones innovadoras de AmB para el tratamiento de micosis sistémicas y tópicas empleando sistemas poliméricos tipo PEG conjugados con moléculas de tipo colesterol.	[67]
Oral administration of amphotericin B nanoparticles: antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats.	Se estudió la actividad antifúngica, biodisponibilidad y toxicidad en ratas, de nanopartículas con copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico PEGilado (PLGA-PEG).	[68]
Assessment of *in vitro* antifungal efficacy and in vivo toxicity of Amphotericin B-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles.	Estudiaron los comportamientos de formulaciones con nanopartículas con el fin de disminuir la toxicidad del fármaco y proponer una ruta de entrega oral del mismo.	[69]

Continúa en la siguiente página...

Título del estudio	**Objetivo/Aporte**	**Ref.**
Reformulation of Fungizone by PEG-DSPE Micelles: Deaggregation and Detoxification of Amphotericin B.	Redujeron la toxicidad de la formulación mediante la administración conjunta de anfotericina B monomérica y suplementos de sodio junto con PEG-DSPE, para la formación de micelas que dio como resultado un fármaco menos tóxico con actividad antifúngica mantenida.	[9]
Characterization of a Polyethylene Glycol-Amphotericin B Conjugate Loaded with Free AMB for Improved Antifungal Efficacy.	Desarrollaron formulaciones de AmB-PEG que mejoraron la solubilidad y eficacia antifúngica del fármaco.	[70]
A novel performing PEG-cholane nanoformulation for Amphotericin B delivery.	Desarrollaron formulaciones de nanopartículas de AmB para el tratamiento de micosis sistémicas utilizando biopolímeros que mejoraran su solubilidad y algunas de sus propiedades biofarmacéuticas.	[40]
Design of Micelle Nanocontainers Based on PDMAEMA-b-PCL-bPDMAEMA Triblock Copolymers for the Encapsulation of Amphotericin B.	Lograron la encapsulación de AmB en micelas obtenidas del autoensamblaje de copolímeros tribloque, evaluando propiedades tales como la eficiencia de encapsulación, hemotoxicidad, y se estableció la actividad biológica.	[71]
Enhanced Antifungal Activity by Ab-Modified Amphotericin B-Loaded Nanoparticles Using a pHResponsive Block Copolymer.	Se desarrolló una formulación de nanopartículas sensible al pH que mejorara la vehiculización del fármaco hasta las células diana.	[72]
Physical characterization and in vivo pharmacokinetic study of self-assembling amphotericin B-loaded lecithin-based mixed polymeric micelles.	Desarrollaron y caracterizaron un novedoso sistema de administración de micelas poliméricas de autoensamblaje basado en lecitina y combinado con polímeros anfifílicos que mejoraron su escasa solubilidad en agua y la nefrotoxicidad.	[73]

Continúa en la siguiente página...

Título del estudio	**Objetivo/Aporte**	**Ref.**
Synthesis and micellization properties of triblock copolymers PDMAEMA-bPCL-b-PDMAEMA and their applications in the fabrication of amphotericin B-loaded nanocontainers.	Establecieron relaciones entre la composición y el peso molecular de los copolímeros tribloque PDMAEMA-b-PCL-b-PDMAEMA con las propiedades coloidales de las micelas obtenidas de su ensamblaje en medio acuoso.	[10]

Con base en la revisión presentada en la Tabla 1-4, se evidencia un interés creciente y sostenido en el desarrollo de sistemas nanoparticulados para la administración de AmB, con el propósito principal de reducir su elevada toxicidad sin comprometer su potente actividad. Las estrategias abordadas abarcan una amplia gama de tecnologías, incluyendo nanopartículas poliméricas, lipídicas, micelas autoensambladas, nanofibras, conjugados con polímeros funcionales y sistemas sensibles al pH, entre otros. Estas investigaciones han explorado diferentes rutas de administración, así como la optimización de parámetros como solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad química, eficiencia de encapsulación y perfiles de liberación controlada, todo ello enmarcado en una búsqueda por mejorar la seguridad y efectividad del tratamiento con AmB. Sin embargo, pese al avance significativo en la formulación y caracterización de estos sistemas, persisten vacíos relacionados con la estandarización de metodologías comparativas, el traslado efectivo de los hallazgos a modelos clínicos robustos y la comprensión integral de los mecanismos farmacocinéticos y toxicológicos *in vivo*. En este contexto, el presente estudio contribuye al campo al integrar un análisis de las formulaciones más prometedoras, evaluando críticamente sus aportes desde una perspectiva biofarmacéutica. Además, se plantea una propuesta innovadora de formulación basada en criterios racionales de diseño y caracterización, que busca no solo mejorar la eficiencia terapéutica, sino también aportar evidencia científica útil para la futura implementación clínica de tecnologías nanoparticuladas de AmB.

A pesar de los problemas de solubilidad y toxicidad que presenta la AmB, sigue siendo un antimicótico de elección para el tratamiento de micosis sistémicas y otras enfermedades como la leishmaniasis, por lo que aun en la actualidad se sigue estudiando, requiriéndose nuevas formas que faciliten su administración y uso en el ámbito clínico.

2 Materiales y métodos

En este apartado se describen los materiales, equipos y metodologías empleadas en el presente trabajo de investigación.

2.1 Materiales y reactivos

A continuación se presentan los reactivos y materiales empleados en la obtención y caracterización de los diferentes copolímeros utilizados en la preparación de sistemas micelares nanoparticulados, los reactivos empleados fueron de calidad grado reactivo, se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EE. UU.): Metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG) con un peso molecular de 5,31 kDa, ϵ caprolactona (CL, 98 %), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (DSPE ≥99 %)), octanoato de estaño ($Sn(Oct)_2$, 98 %), tolueno, dietil éter, dioxano, anhídrido succinico (98 %), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 99 %), trietilamina (TEA, 99 %), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 98 %) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 98 %).

En la obtención y caracterización de los diferentes sistemas nanoparticulados, además de los materiales y reactivos mencionados, se emplearon: anfotericina B (AmB) grado farmacéutico, donada por el laboratorio Vitalis, cumpliendo con los requerimientos de grado farmacéutico (en el apéndice A-2 se puede consultar el certificado de análisis correspondiente), metanol-MeOH (≥ 99,5 %) grado reactivo de PanReac AppliChem, dimetilsulfóxido-DMSO (≥ 99,0 %) de Sigma-Aldrich, tetrahidrofurano-THF (≥ 99,8 %) de Merck, pancreatina de páncreas porcino, ≥3 especificaciones USP de Sigma-Aldrich, pepsina de mucosa gástrica porcina (≥400 units/mg) de Sigma-Aldrich, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio anhidro en escamas, fosfato de potasio monobásico Merck, cloruro de potasio Chemi, cloruro de sodio J.T Baker y fosfato de sodio dibásico Chemi.

2.2 Métodos

En el presente apartado se describen los procedimientos correspondientes con cada una de las etapas involucradas.

2.2.1 Síntesis de los copolímeros

Las formulaciones desarrolladas y estudiadas se basaron en investigaciones previas realizadas al interior del Grupo de Investigación de Macromoléculas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Se siguió una metodología similar a la de Arias [22] con algunas modificaciones: los materiales poliméricos se sintetizaron empleando polimerización por apertura de anillo (ROP), usando mPEG de 5kDa como iniciador. Estos materiales se modificaron con biomoléculas aplicando diversas estrategias sintéticas; para obtener los conjugados PEG-PCL-DSPE/DSPE-PCL-PEG-PCL-DSPE, el copolímero carboxilado se activó por amidación carbodiimídica disolviendo copolímero, DCC y NHS en diclorometano (1:1:1 molar) y añadiendo TEA (2 equiv. respecto al copolímero); la mezcla se mantuvo 16 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno; posteriormente se adicionó DSPE (1 equiv. respecto al copolímero carboxilado) y se dejó reaccionar 24 h adicionales; el producto de esta fase se concentró y posteriormente se precipitó con éter dietílico a 0 °C, se filtró y secó al vacío. En el Apéndice A.1 se detallan los procesos de síntesis de cada uno de los copolímeros utilizados en la presente investigación. De esta manera se obtuvieron los polímeros posteriormente empleados en la síntesis de los diferentes sistemas nanoparticulados cargados con AmB, siendo estos los presentados en la Tabla 2-1. Para pesar los materiales requeridos se utilizó una balanza analítica (sensibilidad de 0,0001 g) marca Ohaus® serie Pioneer PA214 y para la toma de los volúmenes necesarios de acuerdo con cada caso se hizo uso de micropipetas (10-100 µL y 100-1000 µL) marca Select BioProducts®.

Tabla 2-1: Copolímeros base y conjugados para la obtención de sistemas nanoparticulados.

Copolímero base	**Copolímero conjugado**
PEG-PCL	PEG-PCL-DSPE
PEG-PCL-COOH*	N/A
PCL-PEG-PCL	DSPE-PCL-PEG-PCL-DSPE

*Empleado como precursor intermedio

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), COOH: grupo carboxilo

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

2.2.2 Caracterización de los copolímeros por resonancia magnética nuclear de protones ^{1}H-RMN

Con el fin de confirmar las estructuras de cada uno de los copolímeros sintetizados en cada etapa y como producto final para ser empleados en los procesos de síntesis de los sistemas nanoparticulados, estos se sometieron a estudios de resonancia magnética nuclear de protones (^{1}H-NMR), la cual se usó para confirmar la composición de cada sistema, mediante la evaluación de señales características que fueran atribuibles a grupos estructurales específicos, así como para verificar la presencia del DSPE en los casos que correspondiera. Los espectros de ^{1}H-NMR se obtuvieron con un espectrómetro Bruker a 400 MHz, para su análisis, las muestras se disolvieron en cloroformo ($CDCl_3$) deuterado y los desplazamientos químicos (σ) fueron expresados en partes por millón (ppm) con respecto a las señales.

2.2.3 Obtención de sistemas nanoparticulados con la AmB

Las nanopartículas que se prepararon y se estudiaron, se basaron en desarrollos obtenidos en investigaciones previas con algunas modificaciones [22], mediante la metodología de nanoprecipitación. En primer lugar, se obtuvo una fase orgánica que contenía AmB en MeOH (1 mg/2 mL) y otra fase con el copolímero correspondiente en THF (2 mg/1 mL), una vez ambas mezclas se encontraron completamente disueltas, fueron puestas en contacto con agitación constante; la solución resultante se añadió a 25 mL de agua destilada mediante goteo, en presencia de agitación fuerte y constante empleando un equipo de dispersión Ultra Turrax® IKA T18 promoviendo la formación de nanopartículas dispersas tras la evaporación de los disolventes orgánicos; la suspensión resultante se centrifugó a 4400 rpm durante 30 min en una ultracentrífuga Thermo Scientific®, Heraeus® Megafuge® 16 para eliminar la AmB no encapsulada y el sobrenadante se recuperó, se congeló y liofilizó. Se prepararon sistemas sin carga de AmB (vacíos) con la finalidad de ser evaluados como blancos en cada etapa de la investigación.

En el Apéndice A.2 se detallan los procesos de síntesis de cada uno de los sistemas nanoparticulados empleados en la presente investigación. De esta manera se obtuvieron las diferentes formulaciones de nanopartículas cargados con AmB, que se presentan en la Tabla 2-2.

2.2.4 Caracterización de los sistemas nanoparticulados

Los sistemas nanoparticulados se caracterizaron en cuanto a su identificación por espectroscopía de infrarrojo, morfología, tamaño y distribución de tamaño de partícula, potencial ζ y eficiencia de de encapsulación.

Tabla 2-2: Formulaciones de nanopartículas cargadas con AmB.

Sistema nanopartículado	**Sistema blanco**
PEG-PCL-AmB	PEG-PCL-Vacío
PEG-PCL-DSPE-AmB	PEG-PCL-DSPE-Vacío
PEG-$(PCL)_2$-AmB	PEG-$(PCL)_2$-Vacío
PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB	PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-Vacío
PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	

Evaluación por espectroscopía de infrarrojo FTIR

Cada uno de los sistemas sintetizados se evaluaron mediante barrido en el espectro infrarrojo desde 400 a 4000 cm^{-1} empleando un espectrofotómetro (SHIMADZU, FTIR 8400S, Japón), lo que permitió identificar las principales bandas de absorción de los componentes involucrados en la formación de las nanopartículas, así como sus posibles interacciones.

Microscopía electrónica de barrido - SEM

Con el fin de caracterizar los sistemas nanoparticulados en términos de su morfología de superficie, se usó un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 con una magnificación de 20000X, siendo esta la que mayor información aportó en cuanto a la visualización de las estructuras y morfologías presentes en los sistemas nanoparticulados; para ello la superficie de las nanopartículas fue recubierta con oro utilizando un sistema combinado de recubrimiento por sputter y por evaporación de carbón, Quorum Technologies Q150R ES.

Tamaño de partícula y potencial ζ

A cada uno de los sistemas nanoparticulados estudiados se les determinó su tamaño de partícula, su índice de polidispersidad (PDI) y el potencial electrocinético, para lo cual se empleó un equipo Zeta Sizer Nano ZS; para la determinación del tamaño y su distribución, un miligramo de cada una de las nanopartículas se dispersaron en 1,5 mL de agua desionizada y se realizaron medidas a 25°C por triplicado, reportando los valores promedio de las réplicas, así como su respectivo valor de PDI evaluando la dispersión presentada; para la determinación del potencial ζ, se empleó una celda DTS1070, a la cual se transfirió la dispersión y de igual manera que para las lecturas de tamaño, se realizaron triplicados a 25°C. Los datos fueron procesados mediante el software Zetasizer® versión 7.11.

Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

Con el fin de determinar las propiedades de cada una de las nanopartículas en términos de su capacidad de carga de fármaco (Drug Loading Capacity, DLC) y eficiencia de carga de fármaco (Drug Loading Efficiency, DLE), se prepararon sistemas cargados con AmB de la siguiente manera: se pesó de manera exacta 1 mg de nanopartículas en tubos Eppendorf de 2 mL, a los cuales se les agregó 1,5 mL de una mezcla 50:50 MeOH:DMSO, cada uno se llevó a agitación durante 5 minutos y posteriormente se sometieron a ultrasonido durante 60 minutos en un equipo Cole-Parmer®, modelo 8891, con el fin de romper la totalidad de las nanopartículas. Finalmente, cada muestra fue centrifugada durante 5 minutos a 6000 RPM, tomando 100 µL del sobrenadante, el cual se llevó a volumen de 1,0 mL con MeOH (los equipos empleados fueron los mismos descritos anteriormente); todas las mediciones se hicieron por triplicado, y se siguó el mismo procedimiento con las nanopartículas vacías de cada sistema como blanco. El análisis de estas muestras se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), para lo cual se desarrolló y validó una metodología para la determinación de AmB (Apéndice B); para los cálculos se emplearon las siguientes ecuaciones [74]:

$$DLC(\,\%) = \left(\frac{\text{Peso del fármaco en las nanopartículas}}{\text{Peso total de las nanopartículas}}\right) \times 100 \tag{2-1}$$

$$DLE(\,\%) = \left(\frac{\text{Peso del fármaco encapsulado}}{\text{Peso total del fármaco añadido}}\right) \times 100 \tag{2-2}$$

2.2.5 Estudios de liberación

Para el desarrollo de este estudio se emplearon fluidos biológicos simulados como medios para la evaluación del comportamiento de liberación de AmB desde las nanopartículas. Dichos fluidos son soluciones acuosas que están diseñados para reproducir la composición y propiedades de un fluido natural del cuerpo humano [75]; en este estudio se emplearon fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS), que fueron preparados de acuerdo con lo que se indica en la farmacopea USP-NF en el apartado *"Soluciones Reactivo y Soluciones Indicadoras"*, a continuación se citan textualmente las preparaciones propuestas por la USP 41-NF36 [76]:

- ***"Fluido Gástrico Simulado SR:** Disolver 2,0 g de cloruro de sodio y 3,2 g de pepsina purificada, obtenida de mucosa gástrica porcina, con una actividad de 800 a 2500 unidades por mg de proteína, en 7,0 mL de ácido clorhídrico y agua suficiente para obtener 1000 mL. Esta solución reactivo tiene un pH de aproximadamente 1,2."*

- *"**Fluido Intestinal Simulado SR:** Disolver 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en 250 mL de agua, mezclar y agregar 77 mL de hidróxido de sodio 0,2 N y 500 mL de agua. Agregar 10,0 g de pancreatina, mezclar y ajustar la solución resultante con hidróxido de sodio 0,2 N o con ácido clorhídrico 0,2 N a un pH de 6,8 ± 0,1. Diluir con agua hasta 1000 mL."*

La AmB es un antimicótico macrocíclico insoluble en medios acuosos [23], por lo que realizar los estudios de liberación directamente en los fluidos biológicos simulados descritos anteriormente no es lo adecuado; se hace necesario garantizar las condiciones de no saturabilidad para la AmB, de tal manera que exista un gradiente de concentración que no limite la difusión del activo en el medio. Por este motivo, a estos medios se les efectuaron modificaciones mediante la adición de desoxicolato de sodio (DxNa) y dimetilsulfóxido (DMSO), pasando a ser medios biorrelevantes, los cuales se caracterizan por tener una composición más compleja y por simular las condiciones bajo las cuales un fármaco se disolvería y distribuiría en el cuerpo [77].

Determinación de condiciones sumidero o *sink*

Previo a la realización de los estudios de liberación, se determinaron las condiciones que garantizaran que la concentración de AmB disuelta en el medio no limitara su disolución lo que se conoce como condiciones sumidero o condiciones *sink* [78].

Para la determinación de las condiciones *sink*, fueron preparados FGS y FIS con diferentes proporciones de DMSO y desoxicolotato de sodio, como se ilustra en la Tabla 2-3. Se determinó la solubilidad en equilibrio para la AmB, en cada una de estas composiciones, siguiendo una metodología similar a la realizada en investigaciones previas con algunas modificaciones [79, 80]: a 3 mL de cada medio preparado se adicionó un exceso de AmB (5 mg), se llevó un equipo de agitación con temperatura controlada (FONSONING modelo FSY8025H1ABL) con agitación vertical y baño termostatado a 37°C por 8 horas, posteriormente se dejaron en reposo a esta misma condición para evidenciar que se alcanzaba el equilibrio y precipitara el exceso de AmB (en todos los casos se observó AmB sin disolver y una fase en solución saturada del activo). De cada sobrenadante se tomaron 50 µL que se llevaron a 100 µL con MeOH, las muestras se analizaron por HPLC-DAD y se determinó la cantidad disuelta expresada en µg de AmB por mL de medio evaluado. El procedimiento se realizó por triplicado.

Tabla 2-3: Composiciones de los medios estudiados para la determinación de las condiciones *sink*.

Medio evaluado	% DxNa	% DMSO
FIS	0,0	0,0
FIS	0,1	0,0
FIS	0,3	0,0

Continúa en la siguiente página

Medio evaluado	% DxNa	% DMSO
FIS	0,5	0,0
FIS	1,0	0,0
FIS	1,5	0,0
FIS	2,0	0,0
FIS	0,0	0,1
FIS	0,0	0,3
FIS	0,0	0,5
FIS	0,0	1,0
FIS	0,0	1,5
FIS	0,0	2,0
FGS	0,0	0,0
FGS	0,1	0,0
FGS	0,3	0,0
FGS	0,5	0,0
FGS	1,0	0,0
FGS	1,5	0,0
FGS	2,0	0,0
FGS	0,0	0,1
FGS	0,0	0,3
FGS	0,0	0,5
FGS	0,0	1,0
FGS	0,0	1,5
FGS	0,0	2,0

FIS: fluido intestinal simulado, FGS: fluido gástrico simulado, DxNa: desoxicolato de sodio, DMSO: dimetilsulfóxido

Comportamiento de liberación en fluidos gastrointestinales simulados

Para la determinación del comportamiento de liberación de la AmB a partir de cada uno de los sistemas nanoparticulados se pesó 1 mg de cada uno por triplicado en un tubo Eppendorf de 2 mL, que se suspendieron en 1,5 mL de medio biorrelevante (FIS o FGS modificado según correspondiera). Estas muestras se pusieron en un agitador orbital (Select Bioproducts SBS550) y se llevaron a calentamiento a 37±1°C en una estufa universal UN 55, (Memmert GmbH + Co. KG) con agitación constante. Se estudiaron varios escenarios en donde se evaluó de manera individual el comportamiento de liberación de la AmB en cada fluido (FIS o FGS) y un tercer escenario en donde se realizó un recambio completo de medio sustituyendo

el FGS inicial por FIS, buscando simular en este último caso, los cambios de ambiente a los cuales se puede someter *in vivo* una sustancia que atraviese el tracto gastrointestinal. Los tiempos de muestreo se definieron en función de lo que tarda el bolo alimenticio en transitar por el tracto gastrointestinal, lo que se detalla en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4: Tiempos de muestreo ensayos de liberación.

Tiempo (h)	**0,0***	**0,5**	**1,0**	**2,0**	**3,0**	**4,0**	**5,0**	**6,0**	**7,0**	**9,0**
FGS	X	X	X	X						
FIS	X	X	X	X		X		X		
FGS/FIS	X	X	X	X	X	X	X		X	X

FIS: fluido intestinal simulado, FGS: fluido gástrico simulado

El cambio de medio de FGS a FIS se dio para el muestreo de las 3 h.

*Se realiza toma de muestra 5 minutos posterior al contacto de los sistemas con los medios.

En cada tiempo de recolección, las muestras fueron centrifugadas a 6000 RPM por 5 min; del sobrenadante se tomaron 50 µL que se llevaron a 100 µL con MeOH, para ser analizadas mediante la metodología HPLC-DAD para la determinación de la concentración de AmB; se hizo reposición de medio en cada muestreo.

Para el análisis de los datos, se analizaron los perfiles de liberación de los sistemas en cada una de las condiciones planteadas, evaluando el ajuste de los datos a diferentes modelos cinéticos descritos en el apartado 1.3.5 con el fin de dilucidar el comportamiento que presenta cada sistema en las condiciones estudiadas.

2.2.6 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas de AmB

Se evaluó la estabilidad de la AmB en cada uno de los sistemas nanoparticulados, a diferentes condiciones de pH a temperatura constante (37±1°C para simular condiciones fisiológicas), para lo cual se prepararon soluciones buffer a pH 1,2, 6,8 y 7,4 siguiendo los lineamientos establecidos por la farmacopea USP[76]. Se pesaron 5,0 mg de cada sistema nanoparticulado, los cuales se dispersaron en 3 mL de solución tampón, y posteriormente llevadas a un agitador rotativo con baño termostatado a 37±1°C con agitación constante. Los muestreos se realizaron tomando 100 µL que se llevaron a un tubo Eppendorf de 2 mL, sometidas a ultrasonido durante 10 min, y centrifugadas a 6000 RPM por 5 min. La cuantificación de AmB, a cada tiempo de muestreo (0, 0,5, 1, 2 y 3 h), se realizó por HPLC-DAD. El procedimiento se realizó por triplicado.

De manera complementaria, cada muestra fue analizada mediante espectrofotometría UV/VIS empleando un Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1800, en el rango entre 300 y 500 nm con el fin de observar cambios en los patrones de los espectros UV de la AmB; para ello se compararon los espectros UV a cada tiempo de muestreo observando si se detectaban cambios

significativos que pudieran relacionarse con cambios en la estabilidad del IFA encapsulado. Los datos fueron procesados con el software UVProbe® 2.42.

3 Resultados y discusión

3.1 Elaboración y caracterización de los copolímeros

Históricamente se han empleado diversos poliésteres biodegradables para la obtención de copolímeros utilizados en la preparación de sistemas micelares nanoparticulados. Las metodologías para su obtención dependerá en gran medida de las características fisicoquímicas deseadas del sistema nanoparticulado, y del IFA estudiado en cada caso [81]; la unión de estas características influirá de manera importante en las propiedades finales del sistema micelar desarrollado.

Uno de los aspectos iniciales a considerar para la obtención del tipo de nanopartículas que se estudiaron, es la síntesis de los polímeros, para lo cual se partió de metodologías desarrolladas en estudios previos[22, 57]. Se sintetizaron dos copolímeros de base que incluían moléculas de PCL y PEG y además otros dos conjugados con grupos DSPE, que se caracterizaron por resonancia magnética nuclear de protones ^{1}H-RMN. Esta técnica analítica permite conocer la disposición de los átomos de hidrógeno dentro de una molécula, en este sentido, corresponde a protones en un entorno químico específico, lo que permite inferir la estructura de la molécula [82]. A continuación, se presentan los espectros ^{1}H-RMN de cada sistema evaluado.

La Figura 3-1 muestra el espectro de ^{1}H-RMN del copolímero PEG–PCL. En este se observa una señal intensa en la región de 3,65 ppm (singulete), atribuido a los protones oximetileno (–CH_2–O–) de la fracción polioxietilénica –O–CH_2–CH_2– característica del PEG, lo que confirma su incorporación estructural como bloque central. Esta señal es una huella espectroscópica típica de los grupos éter del PEG y su intensidad elevada corresponde a la repetición de estas unidades en la cadena polimérica. Adyacente a esta región, en 4,06 ppm (triplete), aparece una señal que se asocia con los protones metilénicos del grupo terminal, indicando la presencia de una funcionalización terminal en los extremos de la cadena de PEG. Esto es coherente con la química de polimerización empleada, especialmente en estrategias de crecimiento desde un extremo y refuerza la presencia de grupos amínicos terminales

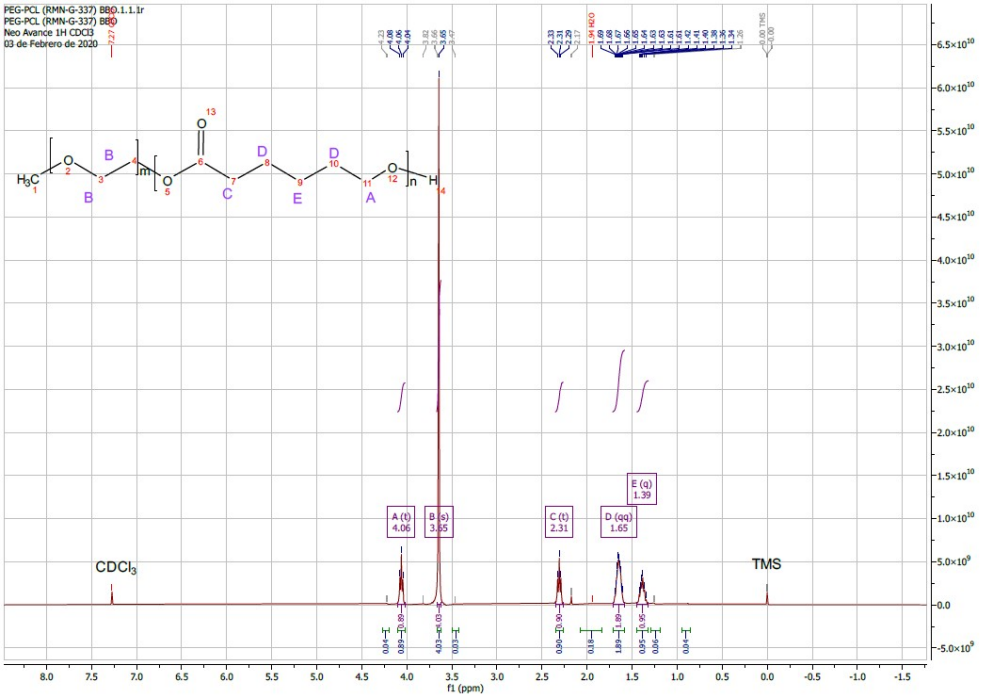


Figura 3-1: Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros primera fase de síntesis. Espectro ^{1}H-RMN de copolímero PEG-PCL. Datos procesados con el software MestReNova®.

funcionales en los polímeros sintetizados.

En cuanto a la porción correspondiente al bloque de PCL, se identifican varias señales características: una señal bien definida 2,31 ppm (triplete), correspondiente a los protones metilénicos adyacentes al grupo carbonilo (–CO–CH_2–) del monómero PCL, que constituye una región diagnóstica fundamental para confirmar la presencia del bloque PCL; otras señales aparecen en 1,65 y 1,39– 1,40 ppm (multipletes), que se asignan a los protones metilénicos internos de la cadena de PCL –(CH_2)–, los cuales son responsables de la característica señal en el rango de 1,2 a 1,6 ppm, correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas apolares del poliéster.

Todos los materiales que se sintetizaron, fueron caracterizados y los espectros complementarios se encuentran consignados en el Anexo C.3. Es destacable que en el espectro correspondiente al copolímero PCL–PEG–PCL (Figura C-6) se observa un incremento notable en la intensidad de las señales de los grupos metileno en comparación con el copolímero dibloque PEG–PCL. Este fenómeno indica una mayor proporción relativa del segmento PCL, lo cual es coherente con la arquitectura tribloque y fue también reportado en estudios previos del grupo de investigación de Macromoléculas [57, 22]. Dicho aumento en intensidad también se correlaciona con la mayor cantidad de unidades repetitivas de caprolactona en la estructura tribloque. La relación entre las áreas integradas de los picos correspondientes a PEG y PCL permitió, además, confirmar la proporción entre ambos bloques, validando la composición esperada.

Para conjugar los copolímeros iniciales con DSPE es necesario la formación de precursores

intermedios que adicione espacios de reacción adecuados, correspondiendo estos a grupos carboxilo (-COOH). La Figura 3-2 muestra el espectro ^{1}H-RMN del copolímero PEG-PCL-COOH.

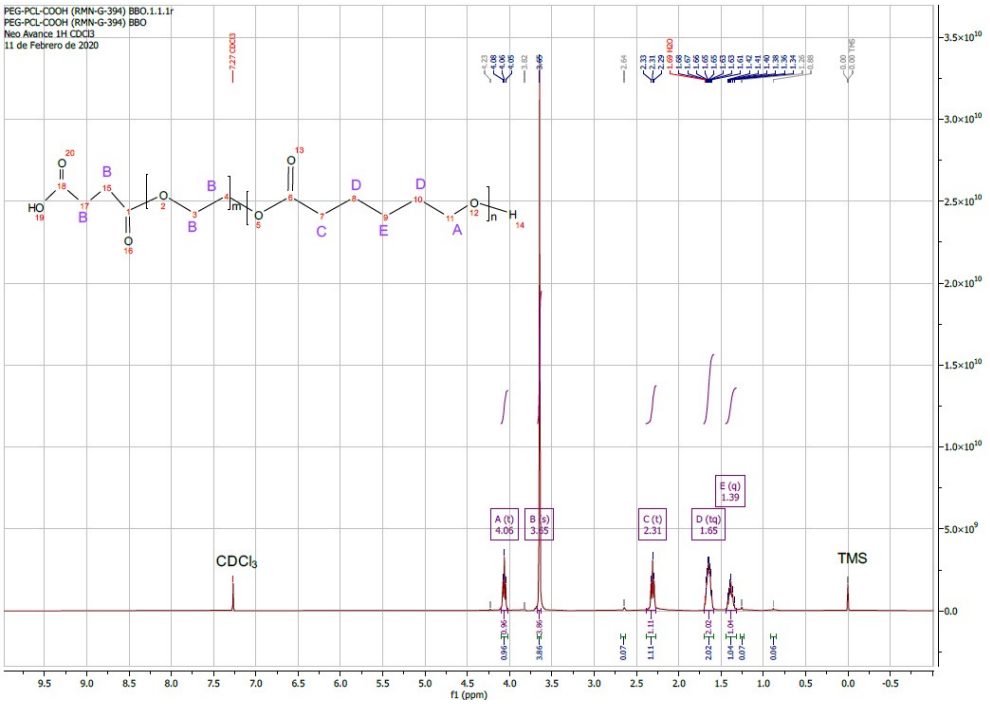


Figura 3-2: Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros obtenidos como precursores para la conjugación. Espectro ^{1}H-RMN de copolímero PEG-PCL-COOH. Datos procesados con el software MestReNova®.

En el espectro de la Figura 3-2, se identifican varias señales que confirman la presencia de los bloques constituyentes y su disposición estructural esperada. En la región de 3,65–4,06 ppm, se observa una señal intensa característica de los protones metilénicos del grupo éter (–CH_2–O–) del PEG, que actúa como bloque central en ambas estructuras. Esta región representa la huella espectral del PEG y está presente en todos los copolímeros basados en este polímero hidrofílico. Las señales en 2,31 ppm y en 1,65–1,39 ppm corresponden a los protones metilénicos del segmento de PCL, siendo consistentes con los ambientes químicos esperados: los protones adyacentes al grupo éster (–CO–CH_2–) y los grupos metileno internos de la cadena alifática. Estas señales están presentes en ambos espectros, aunque en el caso del copolímero COOH–PCL–PEG–PCL–COOH (Figura C-7) se observa un aumento considerable en su intensidad relativa. Este incremento está directamente relacionado con la mayor proporción de unidades de PCL en el copolímero tribloque; la elevada intensidad de las señales asociadas a los grupos metileno del PCL, junto con el patrón de integración observado, permiten confirmar la presencia extendida de estos bloques hidrofóbicos, en coherencia con la arquitectura propuesta. En este ultimo también se distingue una señal aislada a 7,26 ppm atribuida al protón del ácido carboxílico (–COOH), el cual no aparece claramente en el espectro del copolímero lineal PEG–PCL–COOH, probablemente debido a menor concentración relativa o al intercambio con trazas de agua residuales; asimismo,

señales adicionales como las observadas a 1,08 ppm y 0,97 ppm son consistentes con los extremos terminales del copolímero y pueden relacionarse con grupos metilo o fragmentos residuales de los iniciadores o terminadores utilizados en la síntesis

Los precursores carboxilados funcionaron como punto de partida para la conjugación con DSPE, este es un fosfolípido que pertenece a la familia de los fosfatidiletanolaminas, compuesto por dos ácidos grasos de ácido esteárico (C18) y una molécula de fosfatidiletanolamina, muy utilizado en la formulación de sistemas de liberación de fármacos, especialmente en la formación de liposomas y nanopartículas. Es biocompatible y seguro, lo que significa que es adecuado para su uso en aplicaciones biomédicas, ya que no induce respuestas inmunológicas adversas en el cuerpo humano; tiene una gran capacidad de autoensamblaje en micelas y liposomas cuando se combina con otros polímeros como PEG o PCL, resultando en estructuras ideales para encapsular fármacos hidrofóbicos dentro de su núcleo y permitir que la parte externa del copolímero interactúe favorablemente con el medio acuoso, mejorando la biodisponibilidad del fármaco encapsulado, entre otras propiedades [83, 84].

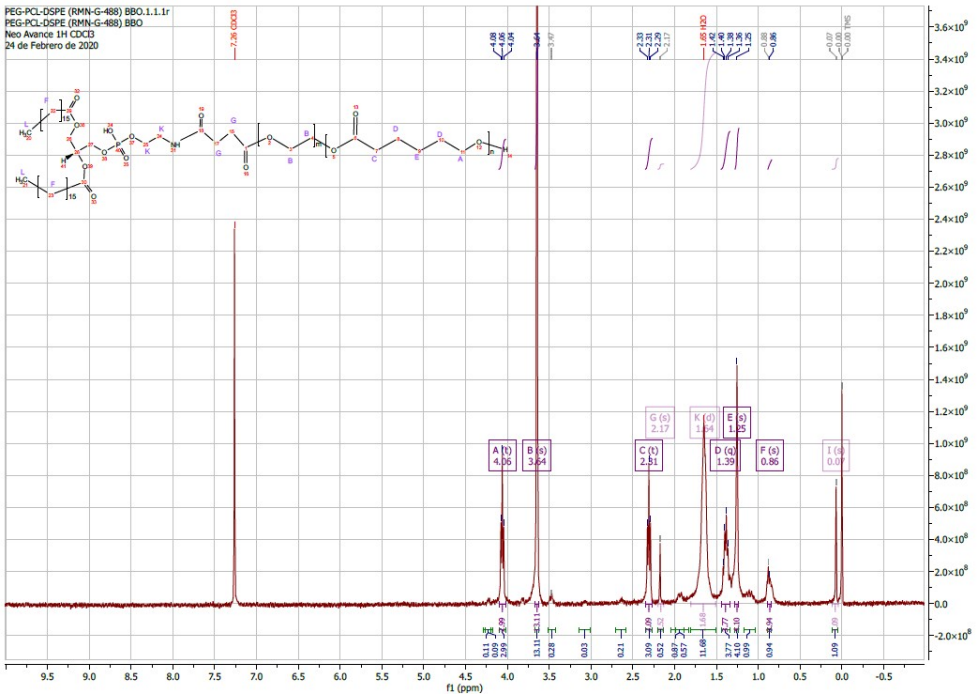


Figura 3-3: Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros conjugados con DSPE. Espectro ^{1}H-RMN de copolímero PEG-PCL-DSPE. Datos procesados con el software MestReNova®.

La Figura 3-3 muestra el espectros de ^{1}H-RMN correspondiente al copolímero PEG–PCL–DSPE; este presenta señales características atribuibles a los bloques constitutivos de PEG y PCL, principalmente en la región comprendida entre 3,4 y 4,1 ppm. Estas señales corresponden a protones metilénicos adyacentes a átomos de oxígeno (–CH_2–O–), tanto en las unidades repetitivas de PEG como en las de PCL. Su presencia en ambos espectros confirma la integración estructural de estos bloques hidrofílicos y lipofílicos en los copolímeros obtenidos. En particular, las señales alrededor de 4,06 ppm (triplete) y 3,94–3,96 ppm (singulete) corresponden al PEG; por otro lado, la señal en 2,81 ppm (triplete)

es indicativa de los protones metilénicos adyacentes al grupo carbonilo en la unidad de PCL. A su vez, las señales en 2,17, 1,65, 1,39 y 1,25–1,27 ppm corresponden a los diferentes metilenos alifáticos del segmento PCL. Estas señales también están presentes en espectro del copolímero DSPE-PCL-PEG-PCL-DSPE (Figura C-8), confirmando la conservación de la arquitectura base del copolímero tras la conjugación.

La presencia del fosfolípido DSPE introduce nuevas señales notoriamente diferenciables en el espectro, especialmente en la región de 0,86 y 0,97 ppm, correspondientes a los grupos metilo terminales y las largas cadenas lipídicas alifáticas derivadas del ácido esteárico. Además, el grupo fosfatidiletanolamina introduce una mayor complejidad en el entorno químico, lo cual se traduce en una mayor dispersión de señales, particularmente en el espectro del copolímero DSPE–PCL–PEG–PCL–DSPE (Figura C-8). Este último muestra una multiplicidad aumentada y un mayor número de señales superpuestas en la región de los alifáticos, lo que se asocia directamente a la presencia de múltiples unidades DSPE en ambos extremos del copolímero tribloque. Esta estructura confiere una mayor longitud molecular, incremento en la cantidad de protones con acoplamientos múltiples, y mayor densidad de protones móviles, lo que resulta en un espectro más complejo. Tal complejidad espectral es un reflejo directo de la mayor interacción entre los protones vecinos, particularmente en las zonas de las cadenas lipídicas, lo cual también podría incidir en las propiedades de autoensamblaje del polímero. En conjunto, los resultados obtenidos de los espectros ^{1}H-RMN permitieron confirmar de manera exitosa la estructura de los copolímeros sintetizados, lo que concuerda con lo esperado de los procesos ejecutados.

3.2 Elaboración y caracterización de las nanopartículas de AmB

El uso de nanopartículas poliméricas se remonta a la década de 1970 con el empleo de polímeros biodegradables como el PCL y el PLGA (poliácido láctico-co-glicólico), en la obtención de sistemas de liberación controlada de fármacos [85]. A medida que avanzaron los descubrimientos en este campo, se empezó a observar que la funcionalización con otras moléculas como PEG y DSPE proveían otras propiedades de interés farmacéutico a los sistemas, además de que mantenían su condición de biodegradabilidad tan importante en el campo clínico. Diversos estudios demostraron que materiales como PEG y DSPE podían combinarse en diferentes proporciones para crear sistemas más eficientes de administración de fármacos, minimizando la degradación prematura de los agentes terapéuticos y permitiendo diferentes perfiles de liberación que se adaptaban a las necesidades de cada sistema [86, 87]. En este orden de ideas, en esta investigación se elaboraron sistemas cagados con AmB de PEG-PCL, PEG-$(PCL)_2$, PEG-PCL-DSPE y PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$ con rendimientos por encima del 60 % para cada uno de ellos, los cuales se detallan en el apartado 3.2.4. Estos fueron caracterizados en cuanto a su identificación por espectroscopía de infrarrojo, morfología,

tamaño y distribución de tamaño de partícula, potencial ζ y eficiencia de encapsulación.

3.2.1 Evaluación por espectroscopía de infrarrojo FTIR

La capacidad para identificar grupos funcionales y enlaces químicos dentro de las estructuras moleculares de la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) la convierte en una herramienta útil en el análisis estructural de materiales poliméricos, recubrimientos, y sistemas de liberación de fármacos, ya que permite confirmar la funcionalización de superficies o la interacción entre polímeros y fármacos encapsulados [88, 89]; su aplicación permite confirmar la formación de enlaces específicos y monitorizar posibles cambios estructurales que lleguen a afectar los comportamientos exhibidos por los sistemas nanoparticulados.

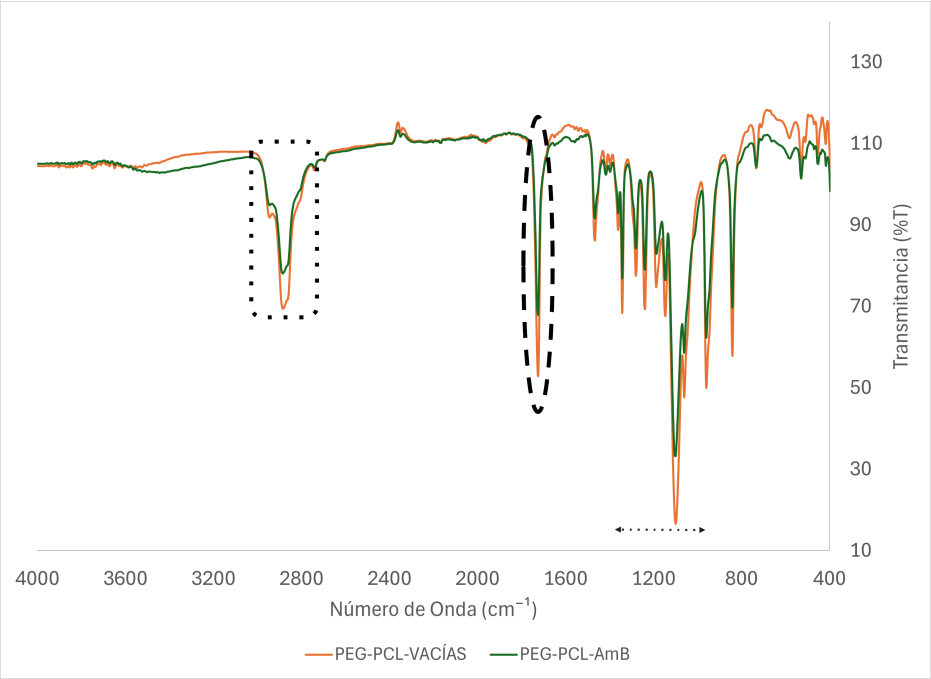


Figura 3-4: Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-PCL-AmB y PEG-PCL-vacío.

La Figura 3-4 muestra de manera comparativa los espectros FTIR de los sistemas nanoparticulados elaborados con PEG-PCL cargados con AmB y vacíos, en donde se aprecian las señales generadas, permitiendo confirmar las interacciones y estructura de las nanopartículas comparadas, resaltando los siguientes aspectos:

- La región comprendida en el rango entre 2800-3000 cm^{-1} presenta señales relacionadas con estiramientos de tipo C-H en cadenas alifáticas que corresponden a los segmentos propios de la PCL, las cuales si bien son similares en ambos casos, presentan un ligero desplazamiento y una mayor intensidad en el espectro del sistema cargado con AmB, lo cual se puede relacionar con una ligera interacción que se esté dando entre la estructura del copolímero empleado y el IFA.

- Se observa una banda fuerte en la región cercana a 1700 cm^{-1}, la cual es típica del grupo carbonilo (C=O) en el PCL y de mayor intensidad en el espectro correspondiente a las nanopartículas cargadas con AmB, pudiendo ser esto una señal de interacciones entre los grupos carbonilo del copolímero y el IFA, sugiriendo la encapsulación de este en el sistema correspondiente.

- Se evidencian bandas correspondientes a estiramientos de tipo C-O-C características del PEG en la región entre 1100-1300 cm^{-1}, en el espectro del sistema cargado con AmB se observa una pequeña diferencia en la intensidad, que está relacionada con cambios conformacionales en la estructura del copolímero debido a la incorporación del fármaco; estas interacciones resultan de gran importancia ya que podrían asociarse a mejoras en la solubilidad aparente atribuida al efecto del PEG en el sistema.

De manera análoga, cada uno de los sistemas elaborados con PEG-$(PCL)_2$ fue estudiado y analizado, obteniendo los respectivos espectros FTIR, a continuación se detallan los hallazgos; los espectros pueden ser consultados en detalle en el Apéndice C.1. Los resultados de estos sistemas nanoparticulados cargados con AmB y vacíos tambien fueron estudiados, permitiendo analizar las estructuras obtenidas de la siguiente manera:

- Similar a lo observado en el sistema presentado en la Figura 3-4 en la región comprendida en el rango entre 2800-3000 cm^{-1}, las bandas de los enlaces C-H no muestran grandes diferencias en las frecuencias de los picos, pero difieren en intensidad, sugiriendo una reorganización estructural ligera al incluir el fármaco al interior del modelo nanoparticulado.

- Las señales obtenidas alrededor de 1700 cm^{-1} correspondiente a las generadas por los grupos C=O del PCL, hacen más evidente la interacción entre el fármaco y el copolímero ya que las intensidades mayores sugieren que el PCL presente está actuando como un agente encapsulante eficaz, lo cual es consistente con hallazgos previos reportados [22].

- Se evidencian señales de diferentes intensidades en la región correspondiente al rango entre 1300-1000 cm^{-1}, las cuales pueden asociarse con el grupo éter (C-O) del PEG y a su vez pueden estar directamente asociadas a la presencia de la AmB en el sistema cargado, siendo un indicador de que la estructura del copolímero puede eventualmente afectar el comportamiento de liberación del fármaco.

Siguiendo el mismo patrón, se analizaron los espectros FTIR de los sistemas nanoparticulados elaborados con PEG-PCL-DSPE cargados con AmB y vacíos (ver Apéndice C.1), de estos resultados se sugiere la inclusión del DSPE como parte de las nanopartículas, así como su respectiva interacción con el IFA de donde se destacan los siguientes aspectos:

- Se mantiene las presencia de bandas correspondientes a enlaces C-H alifáticos en la región entre 2800-3000 cm^{-1} las cuales son consistentes con la estructura del PCL y a su vez con la del DSPE; si bien la intensidad de las bandas sugiere que el DSPE no

altera significativamente la estructura del PCL en presencia de AmB en el sistema nanoparticulado, su inclusión y presencia en este permitiría la formación de estructuras como micelas o vesículas, que facilitan la encapsulación del fármaco.

- Las señales cercanas a 1700 cm^{-1} sugieren una interacción entre el fármaco y los grupos carbonilo del polímero en el caso del sistema cargado, ya que la intensidad es mayor en este espectro, siendo consistente este hallazgo con el hecho de que el DSPE esté proporcionando una barrera hidrofóbica que facilita la retención del fármaco en el interior de la nanopartícula.

- La región entre 1100-1300 cm^{-1} presenta estiramientos de C-O-C atribuidos a la presencia de PEG, las diferencias en las intensidades en esta región podrían ser indicativas de cambios conformacionales en la estructura del copolímero debido a la presencia del DSPE en comparación con los espectros previamente analizados.

Finalmente, el análisis de los espectros FTIR de los sistemas nanoparticulados elaborados con PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$, tanto vacíos como cargados con AmB (ver Apéndice C.1), muestra señales y bandas en los mismos rangos descritos para la Figura 3-4. Esto refuerza los hallazgos previos sobre las estructuras obtenidas, evidenciando variaciones principalmente en la intensidad de las señales, más que en la aparición o desaparición de bandas indicativas de enlaces de diferente tipo. En particular, en este último espectro FTIR se observa una señal en la región comprendida entre 3300-3500 cm^{-1}, atribuible a estiramientos O-H/N-H, lo que sugiere la presencia de las cabezas polares del fosfolípido DSPE. Además, no se evidencia que la incorporación de AmB afecte la estabilidad estructural de la molécula. Esta misma señal también está presente en los espectros FTIR del sistema PEG-PCL-DSPE cargado con AmB, aunque con una intensidad menor.

En la Tabla 3-1 se resumen las principales señales presentes en los espectros FTIR evidenciados en los diferentes sistemas que se estudiaron.

De manera general, el análisis estructural realizado a partir de los espectros FTIR permite resaltar algunos puntos clave como: los sistemas que incluyen DSPE en su estructura muestran una mejor estabilidad estructural frente al encapsulamiento de AmB, con menores variaciones en las señales del carbonilo en comparación con los sistemas sin el fosfolípido. Así mismo, los copolímeros con mayor cantidad de segmentos de PCL tienden a mostrar una mayor interacción con AmB, lo que se refleja en la alteración de las señales de C=O y de los enlaces éter (C-O-C); esto puede estar directamente asociado con una mayor superficie de interacción disponible para el fármaco en estos polímeros. En conjunto, se observa que el encapsulamiento de AmB parece afectar principalmente las regiones correspondientes a los grupos carbonilo y los enlaces éter de PEG, lo que indica que estas zonas son clave para las interacciones intermoleculares entre el IFA y el polímero.

Tabla 3-1: Señales importantes en los espectros FTIR de los sistemas nanoparticulados.

Región - Número de onda de la banda (cm^{-1})	**Transición vibracional asociada**	**Descripción**
3300-3500	Estiramiento O-H o N-H	Señal presente solo en los sistemas nanoparticulados cuyos copolímeros tienen DSPE en su composición; está relacionada con los enlaces O-H (alcoholes o grupos hidroxilo), los cuales son amplios debido al puente de hidrógeno, o N-H (amidas o aminas), que suelen ser más definidos. Estos estiramientos sugieren la presencia de las cabezas polares del fosfolípido DSPE.
2800-3000	Estiramiento asimétrico y simétrico de C-H (alifático)	Estas señales corresponden a los enlaces C-H en las cadenas alifáticas presentes en el PCL y DSPE que componen los diferentes copolímeros de los sistemas nanoparticulados. Estas vibraciones corresponden al movimiento de elongación del enlace C-H, en el que el hidrógeno y el carbono se acercan y se alejan entre sí.
1700-1750	Estiramiento del carbonilo (C=O)	Señales correspondientes al estiramiento de los grupos carbonilo (C=O) presentes en el PCL y DSPE. En el caso de las nanopartículas sintetizadas, el desplazamiento de esta señal indica interacciones entre el carbonilo del copolímero y la AmB.
1100-1300	Estiramiento de éter (C-O-C)	Corresponde a una señal característica de los enlaces éter presentes en el PEG. En este estiramiento, dos átomos de carbono unidos al oxígeno se alejan y se acercan. Los cambios en la intensidad de esta señal sugieren cambios conformacionales en la cadena de PEG conforme la composición de cada sistema.
800-1200	Deformación fuera del plano de C-H (aromáticos o alifáticos) y estiramientos de enlaces C-O	Estas señales están asociadas con deformaciones fuera del plano de enlaces C-H en anillos aromáticos o enlaces alifáticos, presentes en los diferentes componentes de los copolímeros empleados. Su presencia e intensidad se mantienen en las diferentes nanopartículas, lo que sugiere que la inclusión de AmB no altera estas estructuras de manera significativa.

3.2.2 Microscopía electrónica de barrido - SEM

La microscopia electrónica de barrido (SEM) cuenta con una gran capacidad para proporcionar imágenes de alta resolución y detalles de la morfología superficial de las partículas a escala nanométrica, permitiendo de esta manera analizar la forma, el tamaño y la distribución de las nanopartículas; aspectos que resultan cruciales y que, por ejemplo, pueden modificar patrones de liberación [90].

En las Figuras 3-5 y 3-6 se aprecia el aspecto de las nanopartículas vacías y en la Figura 3-7 el aspecto de aquellas cargadas con AmB, es de anotar que los sistemas elaborados no fueron analizados de inmediato por SEM debido a situaciones logísticas, obligando a los productos a permanecer almacenados en condiciones de congelación por periodos prolongados antes de su caracterización por SEM.

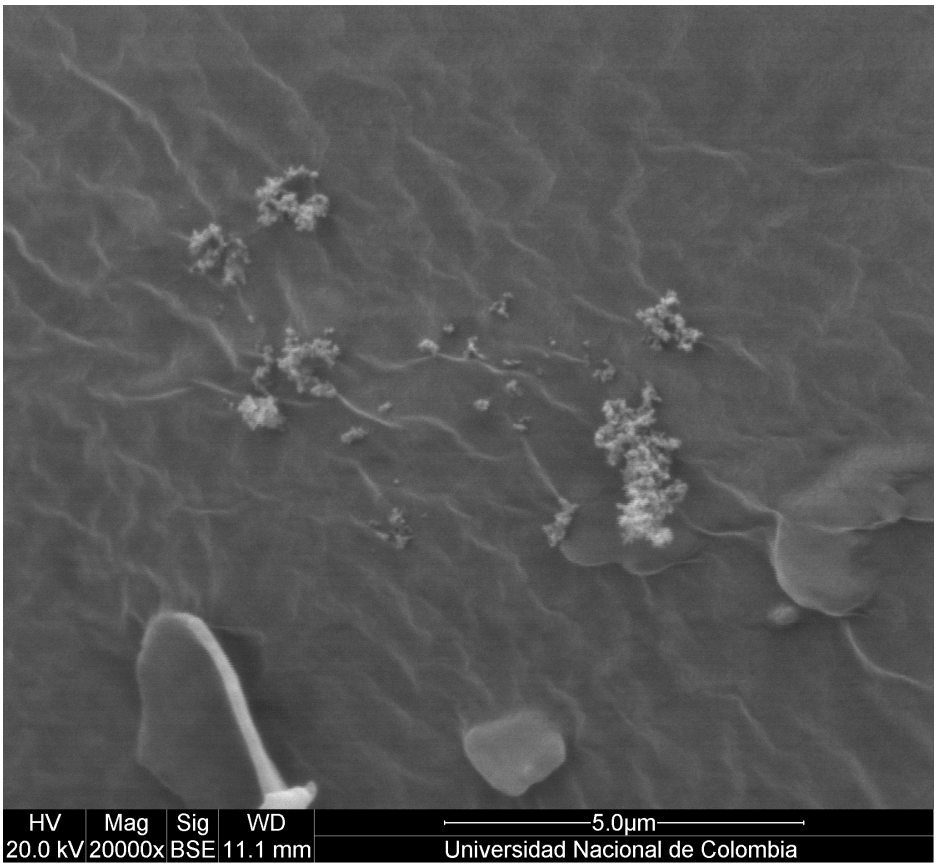


Figura 3-5: Aspecto nanopartículas vacías sin conjugar con DSPE, visualizadas por microscopía electrónica de barrido - SEM. Micrografía SEM nanopartículas PEG-$(PCL)_2$-vacío.

En las Figuras 3-5 y 3-6 correspondientes a los sistemas nanoparticulados vacíos se aprecian varios detalles: para el caso del sistema PEG-$(PCL)_2$-vacío, se visualizan algunas formaciones globulares más pequeñas sobre la superficie, las cuales podrían corresponder a agregados de nanopartículas o inclusiones dentro de la matriz. Por otra parte, para el caso del sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-vacío, se observan varias formaciones esféricas dispersas sobre la superficie

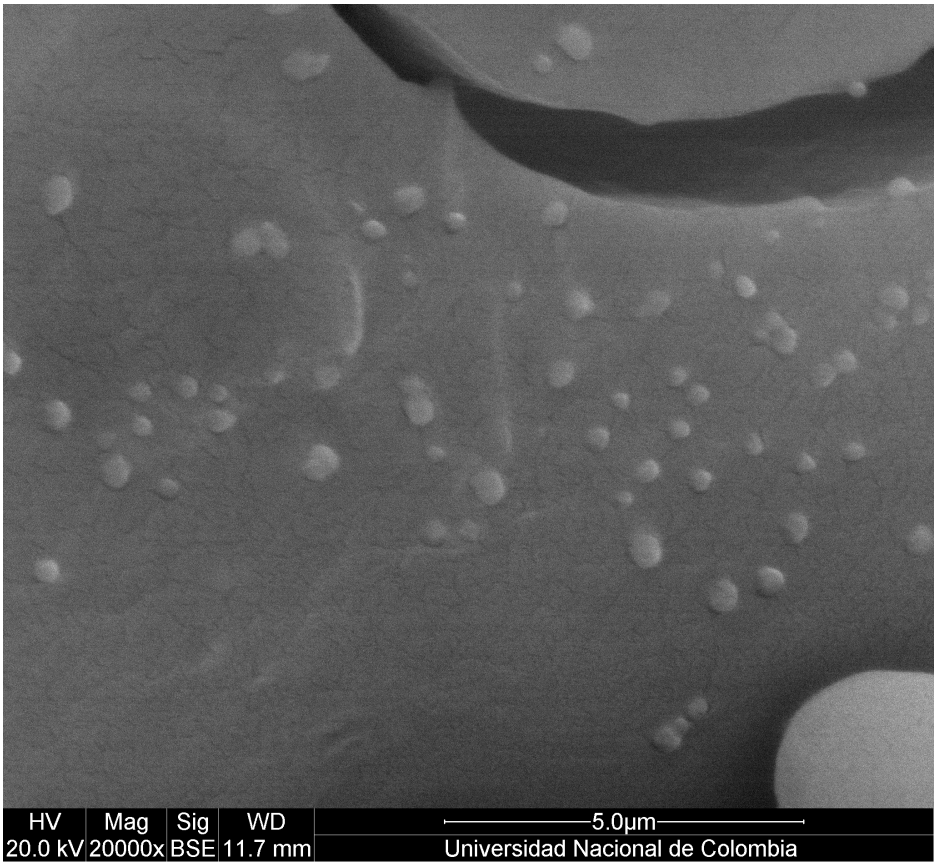


Figura 3-6: Aspecto nanopartículas vacías conjugadas con DSPE, visualizadas por microscopía electrónica de barrido - SEM. Micrografía SEM nanopartículas PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-vacío.

del material, de tamaño y morfología uniforme, siendo esto indicativo de nanopartículas bien definidas distribuidas sobre la superficie en la cual se adquirió la micrografía; la morfología sugiere que el proceso de formación de nanopartículas ha tenido éxito y se puede observar su dispersión pese a que se evidencian aglomeraciones y formaciones de películas que impiden visualizar las nanopartículas individuales en la imagen.

Para el caso del sistema PEG-PCL-vacío, se evidenció una superficie aparentemente lisa con pliegues, que da la impresión de haberse formado una película polimérica que impide la visualización individual de las nanopartículas, sin que esta aporte demasiada información en cuento a su morfología; de manera similar a lo ocurrido en el sistema PEG-PCL-DSPE-vacío, pues se aprecia una superficie rugosa con canales y poros, asi como algunas pequeñas estructuras al interior de estos canales, siendo indicativo de aparentes agregados de nanopartículas formadas por el proceso al cual se sometieron los materiales.

En la Figura 3-7 respecto a las nanopartículas cargadas con AmB se puede observar: del sistema PEG-PCL-AmB, partículas sobre la superficie con formas y tamaños irregulares y alargadas, lo que hace sospechar de fenómenos de agregación que impiden su visualización individual; en cuanto al sistema PEG-$(PCL)_2$-AmB, se evidencian partículas dispersas con formas más definidas y esféricas, indicando una menor agregación y mejor dispersión. En

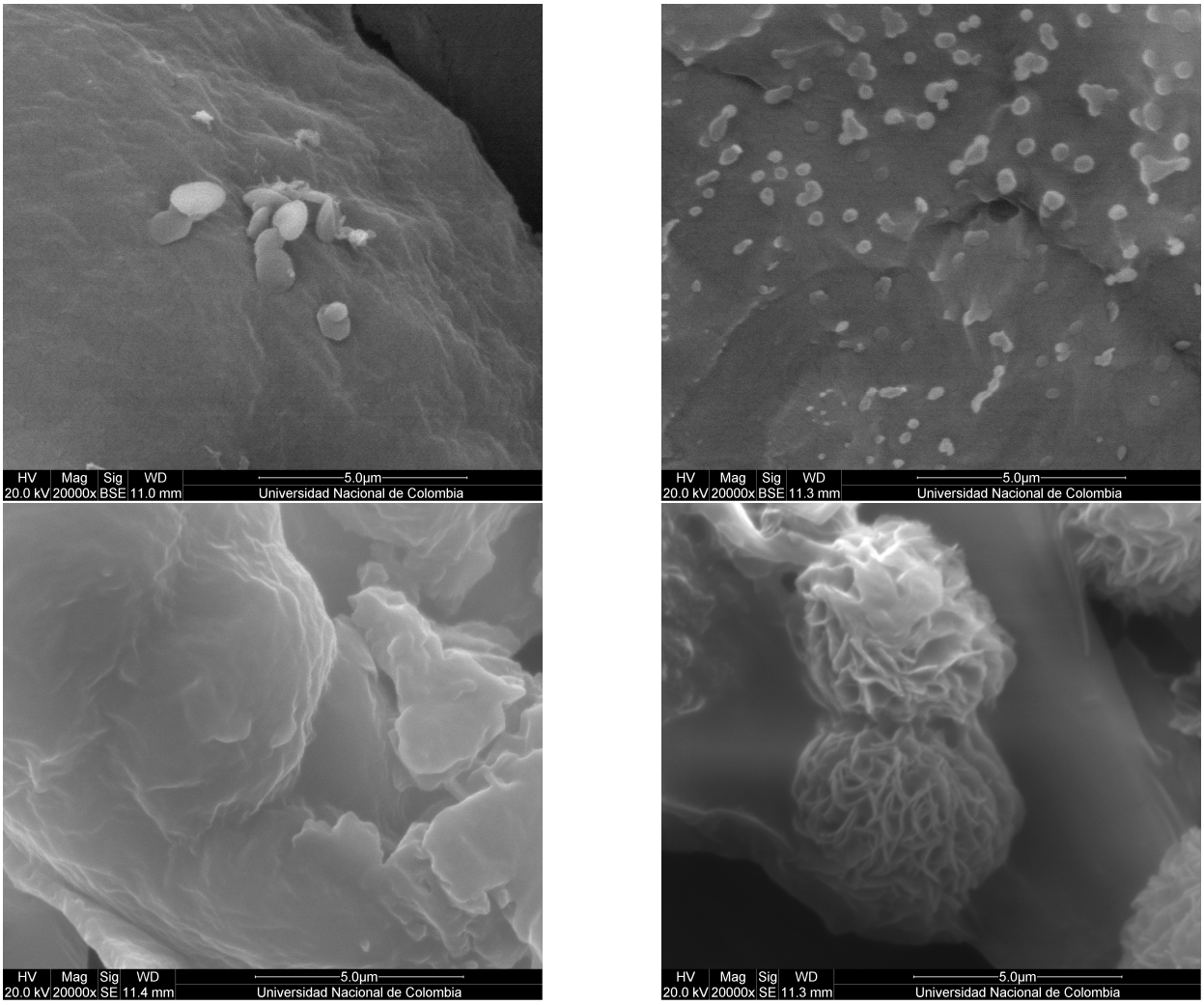


Figura 3-7: Aspecto nanopartículas cargadas con AmB visualizadas por microscopía electrónica de barrido - SEM. Arriba a la izquierda micrografía SEM nanopartículas PEG-PCL-AmB; a la derecha micrografía SEM nanopartículas PEG-$(PCL)_2$-AmB. Abajo a la izquierda micrografía SEM nanopartículas PEG-PCL-DSPE-AmB; a la derecha micrografía SEM nanopartículas PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB.

el sistema PEG-PCL-DSPE-AmB se visualiza una estructura porosa y rugosa, sin observar partículas individuales, por lo que estas pudieron formar agregados o películas que reunían múltiples unidades de ellas; por último, el sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB muestra una textura muy definida y parece formar racimos o agregados de partículas más pequeñas, además de que presentan una alta rugosidad siendo este un posible indicativo de una interacción fuerte entre el copolímero y la sustancia cargada (AmB).

Finalmente, el análisis de las imágenes obtenidas por SEM destaca que el uso de DSPE, PCL y PEG en combinación con AmB puede generar diferentes interacciones que impactan la morfología, agregación y posiblemente capacidad de carga del sistema nanoparticulado; de igual manera es importante considerar que el almacenamiento prolongado de los sistemas pudo

impactar negativamente en cuanto a la formación de películas y agregados que impidieron la dispersión libre de las estructuras nanoparticuladas factor que debe ser tenido en cuenta al momento de evaluar el desempeño de cada uno de ellos.

3.2.3 Tamaño y distribución de tamaño de partícula y potencial ζ

En cualquier sistema nanoparticulado resulta fundamental analizar las propiedades físicas como lo son el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial ζ; estos parámetros aportan información relevante respecto a la estabilidad del sistema y su comportamiento al interactuar con diferentes medios en función de las características de los mismos. La Tabla 3-2 muestra los resultados de los tamaños de partícula así como los valores de potencial ζ de cada sistema.

Tabla 3-2: Tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial ζ de los sistemas nanoparticulados.

Sistema nanoparticulado	**Diámetro promedio (nm)**	**PDI**	**Potencial ζ (mV)**
PEG-PCL-AmB	130,8±0,3	0,296±0,029	-3,99±0,69
PEG-PCL-vacío	77,8±2,6	0,238±0,238	-16,13±0,99
PEG-$(PCL)_2$-AmB	190,0±6,2	0,470±0,058	-13,93±0,67
PEG-$(PCL)_2$-vacío	100,2±1,8	0,291±0,036	-12,74±3,38
PEG-PCL-DSPE-AmB	158,1±0,9	0,274±0,024	-21,43±0,64
PEG-PCL-DSPE-vacío	113,5±3,8	0,391±0,016	-18,40±0,95
PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB	178,3±2,5	0,384±0,011	-22,93±0,35
PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-vacío	109,6±4,8	0,379±0,071	-25,30±3,04

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B,
DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

Los resultados demuestran que todos los sistemas se encuentran en la escala nanométrica, ya que se obtuvo un valor promedio inferior a los 200 nm. Esta es una de las características deseadas ya que, un tamaño en esta escala podría modificar el comportamiento del activo en cuanto a su biodisponibilidad, la penetración celular, el tiempo de circulación en el organismo y la acumulación en tejidos específicos [91]; de igual manera, al contrastar estos resultados con los obtenidos por microscopia SEM, soporta la idea de la formación de los agregados visualizados en las micrografías, los cuales para la evaluación de tamaño y distribución de tamaño de partícula se dispersaron satisfactoriamente permitiendo realizar las lecturas. Es importante resaltar que los sistemas cargados con AmB presentan un tamaño de partícula mayor en comparación con las nanopartículas vacías, aumento que se atribuye directamente a la encapsulación efectiva del IFA, lo que provoca un incremento en el volumen y peso de la partícula, resultando consistente con lo esperado y reportado en literatura [22, 92]. Así mismo, se evidencia consistencia con los valores de PDI obtenidos, se observa una

tendencia de aumento en los valores con la carga de AmB, lo cual habla de una menor uniformidad en la distribución de tamaño de partícula bajo estas circunstancias. Este incremento en el valor de PDI se asocia a que la carga de un fármaco dentro de un sistema nanopartículado puede generar una distribución de tamaños más amplia en un sistema de micelas poliméricas destinados a encapsular dicho IFA debido al incremento ocasionado por el espacio ocupado por las moleculas del farmaco en el sistema micelar. Es esencial mantener valores de polidispersidad bajos para garantizar comportamientos predecibles y consistente de los sistemas nanoparticulados, particularmente en lo referido a su comportamiento de liberación.

Por otra parte, al analizar los valores de potencial ζ se observa un aumento en el valor numérico del potencial, pero con signo negativo, en los sistemas con DSPE, siendo este resultado consistente con lo encontrado previamente por el grupo de Macromoléculas en investigaciones con sistemas similares [22, 57].

3.2.4 Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

En cualquier sistema nanoparticulado es fundamental conocer la cantidad de fármaco que puede ser transportado y cuán eficiente resulta el proceso de encapsulación respecto al fármaco que contienen; además, teniendo en cuenta que la AmB es una molécula de gran tamaño y peso molecular, aspectos que pueden llegar a dificultar una adecuada encapsulación en diversos sistemas, la determinación de la capacidad de carga de fármaco (Drug Loading Capacity, DLC) y la eficiencia de carga de fármaco (Drug Loading Efficiency, DLE) de las nanopartículas se convierten en parámetros de gran importancia para lograr un diseño eficiente del sistema [86]; el primero representa el porcentaje de fármaco cargado en las nanopartículas con respecto al peso total de las nanopartículas, mientras que el segundo indica la proporción de fármaco que se ha encapsulado exitosamente con respecto a la cantidad total de IFA utilizado en el proceso [74].

La Tabla 3-3 muestra los resultados obtenidos de DLC y DLE para cada sistema asi como sus respectivos rendimientos. Como era de esperarse, no se obtuvo respuesta cromatográfica para los sistemas vacíos empleados como blanco.

Tabla 3-3: Porcentajes de rendimiento, DLC y DLE en los diferentes sistemas nanoparticulados.

Sistema nanoparticulado	**%DLC**	**%DLE**	**%Rendimiento**
PEG-PCL-AmB	3,16±0,09	15,79±0,43	72,60
PEG-$(PCL)_2$-AmB	3,30±0,22	16,48±1,09	68,87
PEG-PCL-DSPE-AmB	5,75±0,87	28,77±4,33	68,02
PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB	13,04±1,43	65,21±7,17	72,86

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B,
DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

De acuerdo con los resultados se observa el incremento en la capacidad de carga y en la eficiencia de encapsulación cuando se tienen los sistemas conjugados con DSPE respecto a aquellos copolímeros sin este fosfolípido. Este comportamiento sugiere que la incorporación de DSPE mejora la interacción entre la AmB y el copolímero que conforma las nanopartículas, lo que puede explicarse por el carácter anfifílico de la AmB, que en el dominio hidrofóbico correspondiente a su cadena poliénica, presenta una fuerte afinidad por las cadenas lipídicas del DSPE, facilitando que la AmB se incorpore en las capas hidrofóbicas formadas por el DSPE en las nanopartículas. Por otro lado, los grupos hidroxilo y carboxilo presentes en la AmB pueden estar interactuando con los grupos fosfato y de etanolamina del DSPE mediante puentes de hidrógeno, brindando estabilidad estructural a las nanopartículas. Estos hallazgos concuerdan con los reportados previamente por otros investigadores [93, 57], siendo consistentes y congruentes con lo esperado.

Es de resaltar que el aumento en la proporción de DSPE en el copolímero que constituye los sistemas nanoparticulados juega un papel muy importante al mejorar la eficiencia de encapsulación, ya que se observa un incremento considerable respecto a su contraparte con una sola unidad de DSPE. Este aspecto juega un papel muy importante en cuanto al diseño del sistema nanoparticulado en el sentido de que refleja una menor pérdida de AmB durante el proceso de encapsulación.

3.3 Evaluación de la estabilidad y el comportamiento de liberación de la AmB a partir de los sistemas nanoparticulados

El empleo de diferentes tipos de copolímeros en la conformación de los sistemas nanoparticulados busca modular la liberación del fármaco, lo que impactaría en el control de las concentraciones plasmáticas, minimizando posibles fluctuaciones. Esto permitiría reducir la aparición de efectos adversos asociados al uso de la AmB, mejorando los esquemas de dosificación e incluso la adherencia de los pacientes a los tratamientos [94, 95]. En este apartado se presentan y discuten los resultados de los estudios de liberación y estabilidad realizados para los diferentes sistemas estudiados.

3.3.1 Determinación de condiciones sumidero o *sink*

Hablar de parámetros sumidero o condiciones *sink* hace referencia a garantizar que el medio sea capaz de disolver el IFA sin llegar a saturarse y afectar su cinética de disolución; en general se acepta que se han alcanzado estos criterios cuando en las circunstancias evaluadas del medio, este es capaz de disolver entre tres y diez veces la dosis máxima del IFA estudiado [76, 96]. Teniendo en cuenta que actualmente no existen presentaciones comerciales de AmB

destinadas a una administración por vía oral que requiera someterse al medio presente en el tracto gastrointestinal y que sirvan como comparador para establecer la dosis que debería estar en capacidad de solubilizarse en el medio, se toma como referencia para la determinación de las factores *sink* del presente estudio, la carga del sistema elaborado con mayor valor de capacidad de carga de fármaco (%DLC), siendo este el presentado por el sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB con un valor de 13,04 %; teniendo en cuenta las especificaciones en las que se llevó a cabo el experimento.

Para la evaluación de la solubilidad en las condiciones de composición de medio definidas (ver Tabla 6-3), se plantearon concentraciones de desoxicolato de sodio (DxNa) y dimetilsulfoxido (DMSO) de hasta 2,0 %; sin embargo, en la práctica se evidenció un aumento considerable en la viscosidad de aquellos medios compuestos por FIS para las proporciones de 1,0 % de DxNa o más, imposibilitando la toma de alícuotas para las concentraciones de 1,5 y 2,0 %. Este aumento en la viscosidad del medio puede deberse principalmente a interacciones entre la pancreatina presente en el medio simulado y el DxNa; este último puede actuar como un tensioactivo aniónico que puede conducir a la formación de complejos micelares por su interacción con la enzima, aumentando la resistencia al flujo del fluido, generando esta modificación en las propiedades reológicas del medio [97].

Los resultados del estudio de solubilidad para la determinación de las condiciones *sink* se muestran en la Tabla 3-4. En esta tabla se presentan únicamente los correspondientes al medio FIS, debido a que los resultados de los experimentos en el medio FGS arrojaron valores de concentración de AmB alrededor del límite de cuantificación de la técnica analítica (Apéndice B).

Es importante considerar la susceptibilidad intrínseca de la AmB cuando se expone a medios ácidos, ya que su inestabilidad en estas condiciones ha sido ampliamente documentada. Esta característica puede explicar las lecturas por debajo del límite de detección observadas en el medio FGS durante el estudio de solubilidad, como se reporta en trabajos previos que evidencian dicha inestabilidad en medios ácidos y en presencia de ácido clorhídrico, componente fundamental del FGS [98, 99].

La tasa de degradación de la AmB en este medio podría haber afectado significativamente los valores de concentración determinados posterior a la realización del estudio de solubilidad, lo cual será abordado en mayor detalle en la sección correspondiente. La AmB es una molécula anfifílica con estructura macrocíclica que contiene enlaces tipo éster altamente susceptibles a la hidrólisis en ambientes ácidos, especialmente por acción de protones. La ruptura de estos enlaces conduce a la apertura del macrociclo, con la consecuente pérdida de su estructura principal, lo que compromete tanto su estabilidad como su eficacia terapéutica [100, 101]. Aunque existen otros mecanismos de degradación descritos para la AmB, este se ha reportado como el principal bajo condiciones ácidas, en particular en presencia de HCl.

La AmB es un IFA insoluble en agua y no dispone actualmente de presentaciones farmacéuticas destinadas a la administración por vía oral. No obstante, y como se explicó previamente, para el presente estudio se tomó como referencia la carga de AmB correspondiente al sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB. La Figura 3-8 muestra los resultados obtenidos en la evaluación

Tabla 3-4: Solubilidad de la AmB en un medio FIS que incluye desoxicolato de sodio (DxNa) y dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C.

Medio evaluado	% DxNa	% DMSO	[AmB] (µg/mL)	% AmB
FIS	0,0	0,0	<0,0896	-
FIS	0,1	0,0	0,120±0,0077	0,002±0,0001
FIS	0,3	0,0	0,238±0,0153	0,005±0,0003
FIS	0,5	0,0	0,306±0,0186	0,006±0,0004
FIS	1,0	0,0	69,56±2,025	1,39±0,04
FIS	1,5	0,0	-	-
FIS	2,0	0,0	-	-
FIS	0,0	0,1	0,171±0,0039	0,003±0,00001
FIS	0,0	0,3	0,163±0,0123	0,003±0,0002
FIS	0,0	0,5	0,0977±0,0036	0,002±0,00007
FIS	0,0	1,0	0,150±0,0077	0,003±0,0002
FIS	0,0	1,5	0,277±0,0912	0,006±0,003
FIS	0,0	2,0	0,388±0,0303	0,008±0,0006

FIS: fluido intestinal simulado

<0,08959: corresponde a un valor por debajo del LOQ - no se realizó la inyección

de la solubilidad de la AmB en el medio FIS a 37 °C, empleando diferentes concentraciones de DMSO como cosolvente. Este análisis permitió establecer la capacidad del medio para disolver la AmB en condiciones controladas, con el fin de aproximarse a las condiciones *sink* requeridas para una adecuada evaluación biofarmacéutica.

Como se observa en los resultados presentados en la Tabla 3-4 y en la Figura 3-8, en ninguno de los casos evaluados se logró superar el umbral establecido para considerar el cumplimiento de las condiciones *sink*. Si bien se identificó una tendencia al aumento en la cantidad de AmB disuelta al incorporar 1,0 % de DMSO al medio FIS, dicho incremento fue insuficiente.

Estos resultados sugieren que sería necesario emplear una proporción significativamente mayor de DMSO para alcanzar el objetivo de disolución deseado. Sin embargo, un aumento en la concentración de este cosolvente comprometería la similitud del medio con las características del fluido intestinal humano en condiciones fisiológicas, lo cual limita su aplicabilidad y lo hace inviable como medio de simulación adecuado.

La Figura 3-9, junto con la Tabla 3-4, presentan los resultados obtenidos en el medio FIS utilizando diferentes concentraciones de DxNa. Se observa una tendencia creciente en la concentración de AmB disuelta a medida que se incrementa la proporción de DxNa, alcanzando un aumento exponencial en su capacidad de solubilización al emplear una concentración del 1,0 %. Esta fue la composición del medio en la que la AmB mostró la mayor solubilidad. Sin embargo, es necesario considerar factores propios de la AmB, como

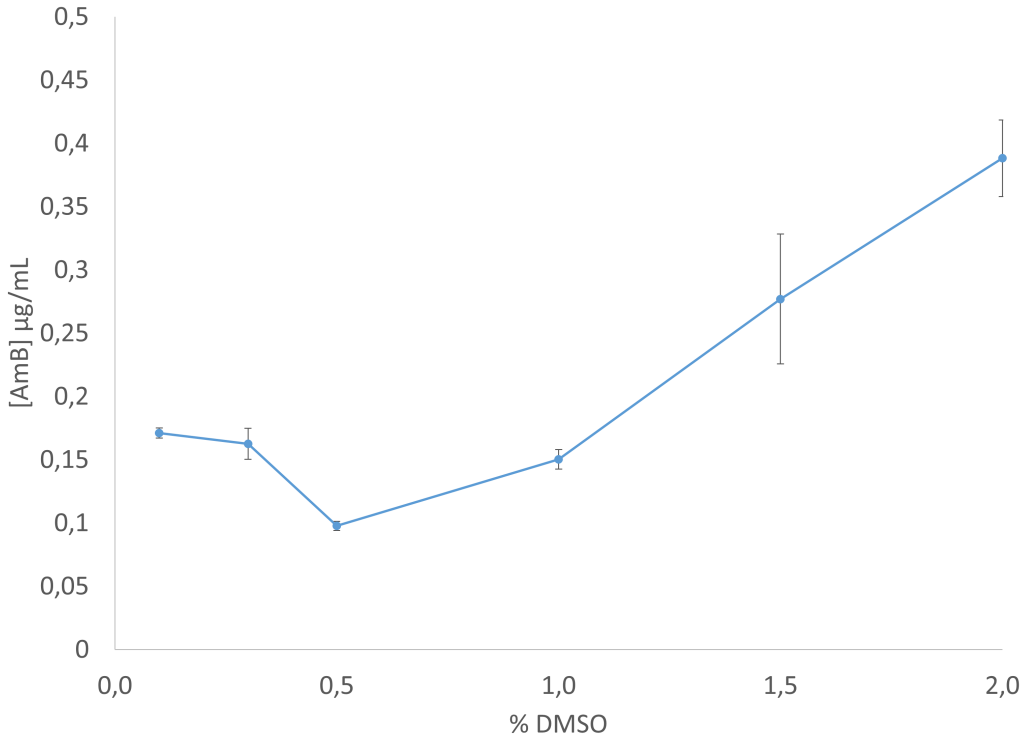


Figura 3-8: Solubilidad de la AmB en función del porcentaje de DMSO en el medio FIS a 37°C.

su cinética de degradación, la cual depende del pH del medio en el que se encuentra. En la literatura se han reportado cinéticas de degradación de primer orden en medios fuertemente ácidos, así como comportamientos cinéticos de tipo sigmoideo en pH cercanos a la neutralidad [102, 98].

Una cinética de primer orden implica que la velocidad de degradación de una sustancia, en este caso la AmB, es directamente proporcional a su concentración en el medio. Por tanto, la tasa de degradación será mayor cuando se alcancen concentraciones elevadas del IFA, disminuyendo progresivamente a medida que la concentración se reduce [102]. Además, la degradación de la AmB sigue una cinética compleja que puede describirse mediante la ecuación de Arrhenius, lo cual evidencia una marcada dependencia de la temperatura sobre la tasa de degradación [100]. Bajo estas consideraciones, es posible que, al finalizar el tiempo total del ensayo, a pesar de haberse alcanzado inicialmente valores de solubilidad acordes con lo esperado, la degradación de la AmB haya sido lo suficientemente significativa como para reducir su concentración en el medio por debajo del límite de detección.

Un comportamiento de degradación que sigue una cinética sigmoidea, como ocurre en medios con valores de pH cercanos a la neutralidad (por ejemplo, el medio FIS), implica que la velocidad de degradación no es constante ni directamente proporcional a la concentración de la AmB. En cambio, sigue un patrón en forma de "S", caracterizado por una fase inicial de latencia, seguida por una fase intermedia de crecimiento exponencial, y finalmente una fase de estabilización [102].

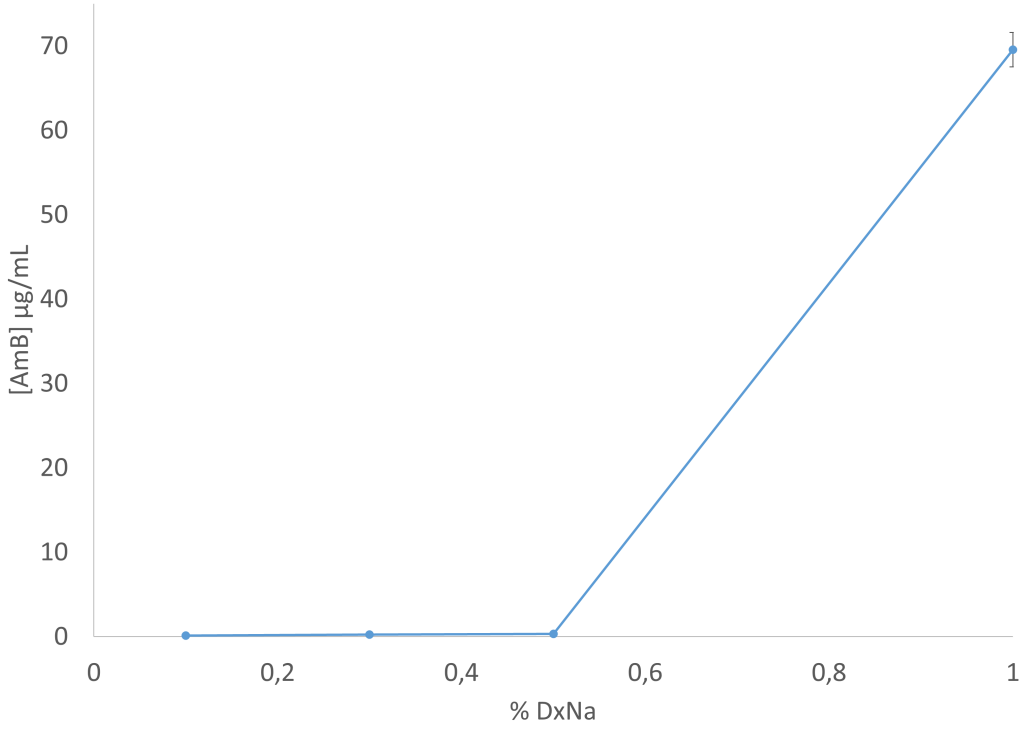


Figura 3-9: Solubilidad de la AmB en función del porcentaje de DxNa en el medio FIS a 37°C.

Durante la primera fase mencionada, la degradación es lenta, posiblemente debido a la presencia inicial del fármaco en forma de agregados estables, que son relativamente resistentes a la degradación. Posteriormente, debido a cambios fisicoquímicos en el medio (como la disociación de estos agregados hacia la forma monomérica del compuesto), la AmB queda más expuesta, incrementándose significativamente la tasa de degradación. En esta segunda etapa, dicha tasa puede mostrar un incremento exponencial, influenciada por factores externos como la temperatura, que, al igual que en condiciones ácidas, acelera considerablemente la degradación del compuesto. Finalmente, en la tercera fase, la velocidad de degradación vuelve a disminuir cuando la concentración del fármaco alcanza niveles muy bajos o por la acumulación de productos de degradación que inhiben aún más el proceso, lo cual explica los resultados observados y representados en la Tabla 3-4.

Considerando lo anterior, y con base en los resultados de los ensayos realizados para determinar las condiciones *sink*, se decidió utilizar medios con una concentración de DxNa del 1,0 %, tanto para el FIS como para el FGS. Si bien estos resultados no fueron completamente satisfactorios en cuanto a los valores de solubilidad deseados, lo que puede explicarse por la susceptibilidad intrínseca de la AmB a la degradación en medios fuertemente ácidos, como ya fue explicado.

Por lo tanto, y con el propósito de mantener un control riguroso sobre las variables experimentales y la composición de los medios en los análisis posteriores, se estimó conveniente mantener igual la concentración de DxNa (1,0 %) en ambos medios para los posteriores

estudios de liberación.

3.3.2 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas de AmB

Una característica importante del tracto gastrointestinal es la variación significativa de pH que existe a lo largo de sus diferentes segmentos. Particularmente, destaca el ambiente fuertemente ácido del estómago, seguido por un entorno más básico en el tracto intestinal. Para un producto que pretende ser formulado para administración oral, resulta fundamental caracterizar su comportamiento y asegurar su estabilidad frente a estos cambios de pH.

Para ello, se evaluó la capacidad del sistema nanoencapsulado para proteger a la AmB en soluciones tampón con pH 1,2; 6,8 y 7,4, con el propósito de determinar el impacto de estas condiciones sobre las nanopartículas, considerando además los cambios fisiológicos a los que el sistema podría exponerse tras una administración por vía oral. La Tabla 3-5 presenta los resultados de los ensayos de estabilidad realizados tras exponer directamente las nanopartículas a medios fuertemente ácidos.

Tabla 3-5: Determinación de concentraciones de AmB en sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH de 1,2.

Tiempo (h)	**PEG-PCL-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-AmB**	**PEG-PCL-DSPE-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB**
	[AmB] (µg/mL)	**[AmB] (µg/mL)**	**[AmB] (µg/mL)**	**[AmB] (µg/mL)**
0,0	0,4293±0,593	-	0,0929±0,087	0,1332±0,077
0,5	0,0908±0,037	-	0,0990±0,095	0,0973±0,126
1,0	-	-	-	-
2,0	-	-	<0,08959	-
3,0	-	-	<0,08959	-

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

<0,08959: Lectura por debajo del LOQ; -: Lectura por debajo del LOD

Las lecturas realizadas en medio ácido (buffer pH 1,2), muestran valores en su mayoría por debajo del LOD de la técnica analítica, impidiendo la detección de la AmB; sin embargo, se observó una tendencia en los sistemas a la generación de lecturas efectivas de AmB presente en el medio en los primeros tiempos de muestreo que posteriormente desaparece, lo cual puede estar directamente asociado a una alta velocidad de degradación que está sufriendo la AmB. De manera paralela, los espectros UV/VIS de las muestras fueron determinados en el rango comprendido entre los 300 y 500 nm y se muestran en la Figura 3-10.

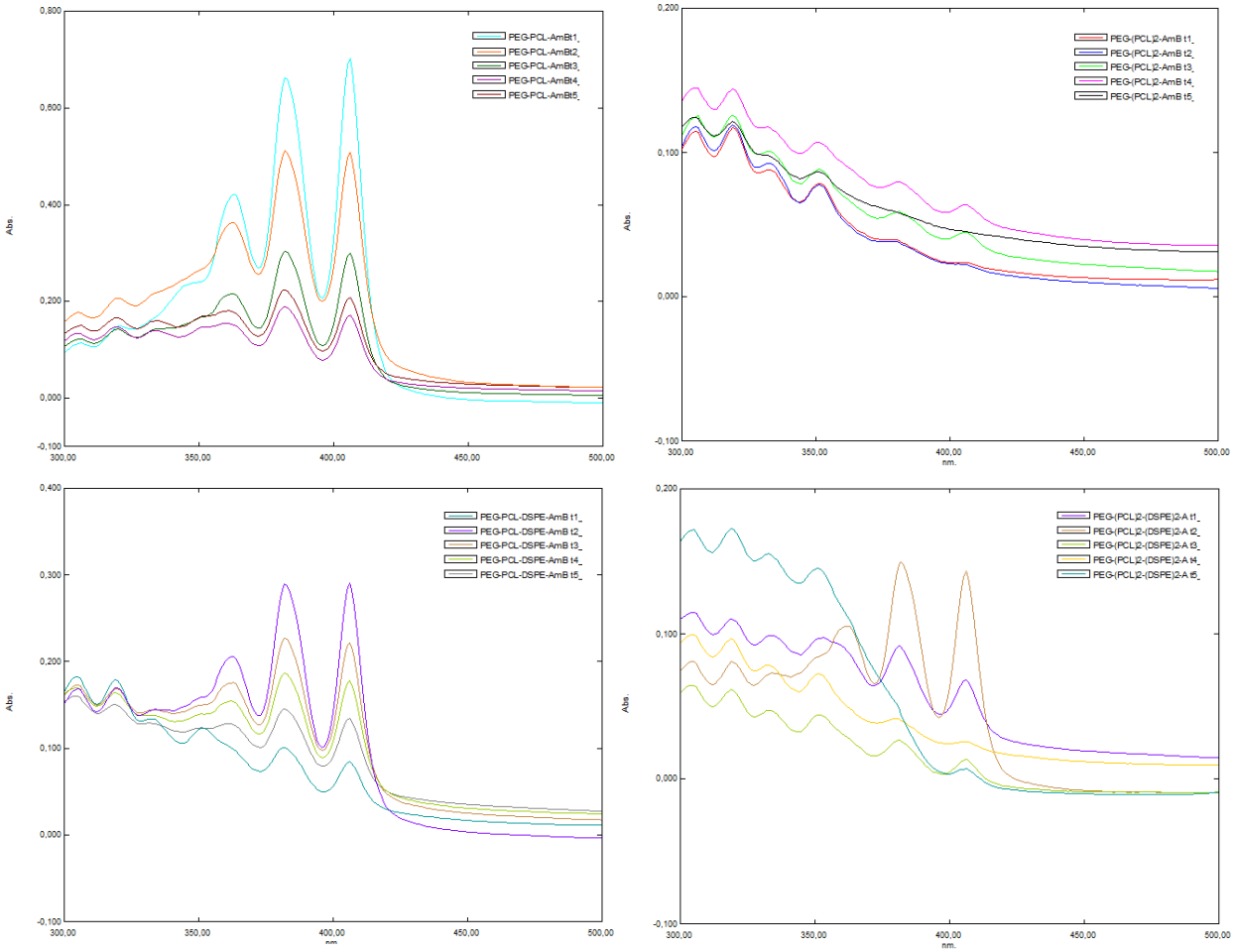


Figura 3-10: Espectros UV/VIS se sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH 1,2. Arriba a la izquierda variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-PCL-AmB; a la derecha variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-$(PCL)_2$-AmB. Abajo a la izquierda variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-PCL-DSPE-AmB; a la derecha variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB

Este resultado complementa el análisis realizado por HPLC-DAD, para lo cual se determinó el espectro de la AmB en este mismo rango, que sirve de comparación; el espectro UV/VIS de la AmB se muestra en la Figura 3-11.

La AmB tiene un espectro UV/VIS característico con máximos de absorbancia en los rangos alrededor de los 405-409 nm y entre 360-370 nm principalmente [103], estos se aprecian claramente en la Figura 3-11. Los espectros presentados en la Figura 3-10 muestran varios hallazgos relevantes:

- Si bien no corresponde a un análisis cuantitativo, es posible hablar de un comportamiento similar al obtenido del análisis por HPLC-DAD, ya que en los muestreos iniciales, se observan espectros de mayor intensidad cuya señal va descendiendo conforme avanza el ensayo, principalmente en el caso de los sistemas compuestos por PEG-PCL-AmB y

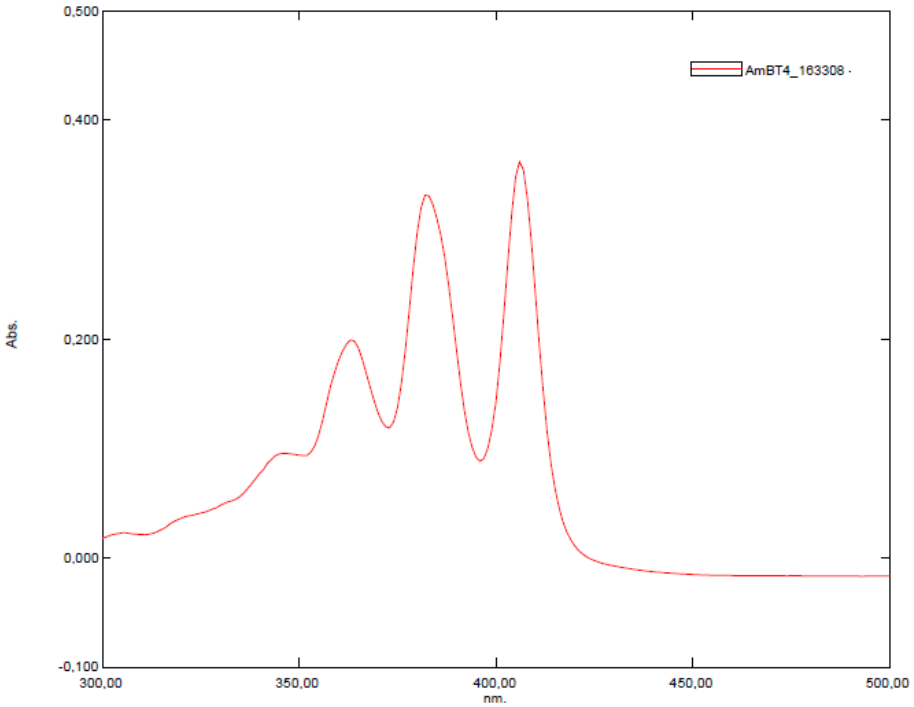


Figura 3-11: Espectro UV/VIS de la anfotericina B en solución.

PEG-PCL-DSPE-AmB.

- Los sistemas compuestos por PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB muestran deformaciones considerables de los espectros, los cuales en conjunto con los resultados de la Tabla 3-8, se asocian a una marcada degradación del activo.

- Teniendo en cuenta que los sistemas nanoparticulados exhibieron valores de potencial ζ de magnitudes negativas, puede estar ocurriendo una mayor protonación de los grupos funcionales superficiales de las nanopartículas en medio ácido, alterando la magnitud de este potencial lo que ocasionaría una disminución de la estabilidad coloidal, factor que puede estar contribuyendo en los resultados obtenidos [104].

Las Tablas 3-6 y 3-7 presentan los resultados de los estudios de estabilidad realizados a los sistemas nanoparticulados en medios con pH 6,8 y 7,4, respectivamente. En ambos casos se observaron comportamientos muy similares. Aunque para algunos sistemas se mantuvo la situación en la cual las concentraciones determinadas por HPLC-DAD estuvieron por debajo de los límites de detección (LOD) o límites de cuantificación (LOQ), impidiendo así su detección o cuantificación precisa, esta situación ocurrió en menor medida que en los estudios realizados en pH ácido.

Es importante considerar que, durante estos ensayos, las nanopartículas se sometieron a condiciones de estrés destinadas a afectar su integridad estructural, con el propósito de evaluar su estabilidad. Además, la AmB presente en los sistemas nanoparticulados quedó

expuesta directamente a medios esencialmente acuosos, en los cuales puede sufrir procesos de hidrólisis, explicando así los resultados observados en los medios con pH 6,8 y 7,4.

Tabla 3-6: Determinación de concentraciones de AmB en sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH de 6,8.

Tiempo (h)	**PEG-PCL-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-AmB**	**PEG-PCL-DSPE-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB**
	[AmB] (µg/mL)	**[AmB] (µg/mL)**	**[AmB] (µg/mL)**	**[AmB] (µg/mL)**
0,0	0,8999±1,274	-	0,3431±0,108	<0,08959
0,5	0,4635±0,610	-	0,4152±0,606	<0,08959
1,0	2,9805±0,881	<0,08959	0,9432±0,392	<0,08959
2,0	4,3195±4,743	<0,08959	1,1860±0,065	1,1164±1,778
3,0	0,7679±0,043	<0,08959	0,9316±0,063	<0,08959

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

<0,08959: Lectura por debajo del LOQ; -: Lectura por debajo del LOD

Tabla 3-7: Determinación de concentraciones de AmB en sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH de 7,4.

Tiempo (h)	**PEG-PCL-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-AmB**	**PEG-PCL-DSPE-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB**
	[AmB] (µg/mL)	**[AmB] (µg/mL)**	**[AmB] (µg/mL)**	**[AmB] (µg/mL)**
0,0	6,2009±0,980	1,1544±0,999	2,0043±1,375	0,2127±0,242
0,5	2,9694±0,258	<0,08959	4,9316±3,849	0,1112±0,080
1,0	3,5495±0,353	<0,08959	0,4518±0,317	<0,08959
2,0	0,8960±1,324	0,5239±0,789	1,9026±1,571	<0,08959
3,0	0,0908±0,037	-	0,0990±0,095	0,0973±0,126

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

<0,08959: Lectura por debajo del LOQ; -: Lectura por debajo del LOD

De manera similar a lo mostrado en la Figura 3-10, se obtuvieron también los espectros UV/VIS para los sistemas sometidos a medios con pH 6,8 y 7,4. Estos espectros pueden consultarse detalladamente en el Apéndice C.2. En general, los resultados siguen un comportamiento análogo al descrito previamente para el medio con pH 1,2. No obstante, en estos

casos, los espectros mantienen mejor su integridad, lo que, sumado a los resultados obtenidos mediante HPLC-DAD, sugiere una mayor estabilidad de los sistemas cuando se encuentran en condiciones cercanas a la neutralidad o ligeramente básicas.

En resumen, los resultados obtenidos en esta sección resaltan el problema intrínseco de la AmB relacionado con su degradación en medios ácidos y su susceptibilidad a sufrir procesos de hidrólisis. Aunque los sistemas desarrollados lograron preservar parcialmente la integridad de la AmB bajo condiciones cercanas a la neutralidad, en ambientes fuertemente ácidos esta capacidad se ve comprometida. Por lo tanto, sería necesario considerar modificaciones en la formulación, como la implementación de un recubrimiento entérico, con el fin de proteger adecuadamente las nanopartículas en medios fuertemente ácidos, similares a los encontrados fisiológicamente a la altura del estómago.

3.3.3 Evaluación de los perfiles de liberación en fluidos biológicos simulados

Los perfiles de liberación de AmB se evaluaron en los fluidos biológicos simulados FGS y FIS cada uno con un 1,0 % de DxNa. Los resultados se presentan para una de las condiciones evaluadas en las Figuras 3-12, 3-13 y 3-14.

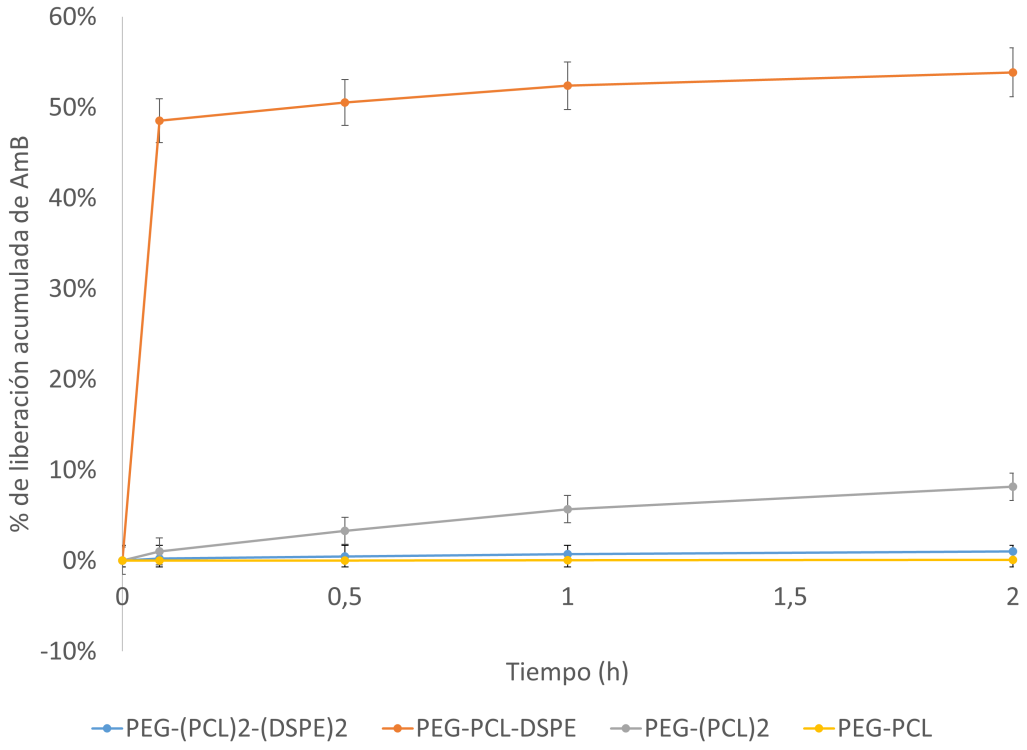


Figura 3-12: Perfiles de liberación de nanopartículas cargadas con AmB en FGS a 37°C.

En la Figura 3-12 se muestran los perfiles de liberación de AmB desde los sistemas de

nanopartículas estudiados en fluido gástrico simulado. Se evidencia un comportamiento de mayor liberación en los sistemas que tienen DSPE como parte del copolímero en comparación de los que no lo tienen. Cabe destacar que el sistema compuesto por PEG-PCL-DSPE-AmB fue el que presentó la mayor liberación. Este comportamiento sugiere que la presencia de DSPE en la composición del copolímero facilita la liberación de AmB especialmente en medio ácido, posiblemente por interacciones de tipo hidrofóbico y electrostáticas entre el DSPE y el medio, debido a su naturaleza química, con dos colas hidrofóbicas y una cabeza polar, lo que ocasiona una posible reducción de la agregación, impactando sobre la estabilidad coloidal del sistema [105, 106].

Pese a esto, los resultados no sugieren un comportamiento dependiente únicamente de la presencia de DSPE: para el caso del sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB aunque se muestra una mayor liberación de AmB respecto a los sistemas que no tienen DSPE en su composición, este libera una proporción mucho menor en comparación con el sistema con una sola unidad de DSPE, lo cual puede estar relacionado con su estructura que con dos bloques de PCL y DSPE genera interacciones más fuertes con la AmB limitando su salida de la nanopartícula [106]; por otra parte, las interacciones hidrofobicas entre el PCL y la AmB debido a la naturaleza hidrofobica del PCL, pueden proveer estabilidad al fármaco dentro del núcleo de la nanopartícula mientras que el DSPE, al ser un fosfolípido con colas hidrofóbicas, puede formar una capa lipídica alrededor del núcleo de PCL, contribuyendo también a la estabilidad estructural de la nanopartícula modulando su comportamiento de liberación [107]; por su parte, la presencia de PEG en el sistema confiere propiedades hidrofílicas a la superficie de las nanopartículas, mejorando su solubilidad en medios acuosos [108, 57].

Considerando que el medio ácido degrada la AmB, además de que en la mucosa gástrica no se espera la mayor absorción, no sería deseable una liberación alta en este tipo de medios, por lo que una adecuada modulación de la liberación del IFA dada por una mayor proporción de DSPE en los sistemas nanoparticulados podría cumplir con este propósito, lo cual corresponde con lo expuesto por otros autores [98, 109, 43].

La Tabla 3-8 ilustra el ajuste de los datos experimentales a los modelos matemáticos de orden 0, orden 1, Higuchi, Weibull, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin (ver ecuaciones 1-1, 1-2, 1-3, 1-6, 1-4 y 1-5, respectivamente) del comportamiento de liberación de la AmB desde los sistemas, en fluido gástrico simulado.

Los valores de la constante de liberación para el modelo de orden 0 varían significativamente de un sistema a otro, sin embargo, se evidencian buenos ajustes en relación con los coeficientes de determinación presentados, aunque cada sistema exhibe un mejor ajuste a un modelo diferente como se aprecia al revisar los valores de R^2 de la Tabla 3-8. Para el caso del sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB, el mejor ajuste se logra con el modelo de orden cero, lo cual se asocia a un comportamiento de liberación constante, que se puede apreciar en la Figura 3-12.

Por su parte, el sistema PEG-PCL-DSPE-AmB mostró un mejor ajuste con el modelo de Higuchi, lo cual está asociado principalmente con un mecanismo de liberación controlado por difusión desde la matriz polimérica. El modelo de Higuchi asume una difusión unidimensional, donde la liberación del fármaco es directamente proporcional a la raíz cuadrada del

Tabla 3-8: Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para los sistemas nanoparticulados en FGS a 37°C.

Modelo matemático	**Parámetro**	**PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB**	**PEG-PCL-DSPE-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-AmB**	**PEG-PCL-AmB**
Orden 0	k_0 ($\% * h^{-1}$)	0,0039	0,0262	0,0355	0,0005
	R^2	0,988	0,937	0,971	0,955
Orden 1	k_1 (h^{-1})	0,6834	0,0511	0,9676	1,3290
	R^2	0,908	0,930	0,825	0,980
Higuchi	k_H ($\% * h^{-0,5}$)	0,0054	0,0384	0,0506	0,0006
	R^2	0,945	0,978	0,960	0,749
Weibull	β	0,5560	0,0686	0,5838	1,5277
	R^2	0,981	0,838	0,988	1,000
Korsmeyer-Peppas	k_{K-P}	0,0070	0,5225	0,0539	0,0005
	n	0,5507	0,0459	0,6151	0,4258
	R^2	0,981	0,838	0,992	0,832
Peppas-Sahlin	k_1	6,866E-07	0,5161	0,0332	0,0000
	k_2	0,0070	0,0065	0,0204	0,0004
	m	0,2530	0,0453	0,4408	0,5624
	R^2	0,973	0,838	0,991	0,987

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

tiempo, implicando que la tasa de liberación disminuye conforme avanza el tiempo debido a la reducción del gradiente de concentración del fármaco desde la matriz hacia el medio circundante [110].

Este comportamiento puede explicarse por la estructura híbrida de las nanopartículas PEG-PCL-DSPE, que presentan un núcleo hidrofóbico constituido principalmente por PCL capaz de encapsular eficazmente moléculas lipofílicas como la AmB, mientras que la corona externa formada por DSPE-PEG confiere estabilidad coloidal y protección frente a interacciones desfavorables con el medio externo [111]. El núcleo hidrofóbico funciona como reservorio del fármaco, permitiendo una liberación controlada y sostenida, que se ajusta al modelo de Higuchi debido a que el mecanismo dominante es la difusión del fármaco desde el interior hacia el medio externo a través de poros o canales acuosos formados en la matriz polimérica [106].

Además, estudios previos han demostrado que sistemas similares basados en PEG-PCL

presentan típicamente un perfil de liberación bifásico, caracterizado por una fase inicial rápida atribuida al fármaco superficial o débilmente adsorbido, seguida de una fase de liberación sostenida, atribuible precisamente al mecanismo de difusión desde el núcleo de la matriz [106, 112]. Esto concuerda con lo observado en el presente estudio, donde gráficamente se evidencia una tendencia a la disminución en la velocidad de liberación, estabilizándose eventualmente con el tiempo, confirmando así el ajuste al modelo descrito por Higuchi.

En consecuencia, el comportamiento observado respalda la elección de esta formulación específica (sistema PEG-PCL-DSPE-AmB) como una estrategia adecuada para obtener una liberación sostenida de la AmB, protegiendo al fármaco de condiciones adversas como las encontradas en medios ácidos, y potenciando así su aplicabilidad terapéutica en sistemas de administración oral [113, 114].

Respecto al sistema PEG-$(PCL)_2$-AmB, los resultados muestran una mayor correlación con el modelo de Korsmeyer-Peppas, sugiriendo un mecanismo de liberación mediado por difusión anómala o no Fickiana [48]. En este tipo de mecanismo, la liberación del fármaco no está exclusivamente gobernada por difusión simple, sino que también involucra un proceso adicional relacionado con la relajación o erosión de la matriz polimérica. Este comportamiento mixto es característico de sistemas en los que las cadenas del polímero presentan una movilidad suficiente para permitir una relajación significativa durante el proceso de liberación, además de la difusión tradicional a través de la matriz [110].

En este caso específico, el valor del exponente n obtenido en el modelo de Korsmeyer-Peppas (cercano a 0,6151 según los datos experimentales presentados en la Tabla 3-8) indica claramente esta difusión anómala. Valores de n entre 0,45 y 0,89 típicamente implican una combinación de mecanismos controlados tanto por difusión como por relajación polimérica [112]. La estructura del copolímero PEG-$(PCL)_2$, caracterizado por la presencia de dos bloques hidrofóbicos de poli(ε-caprolactona) y un bloque hidrofílico central de PEG, permite precisamente dicha relajación estructural asociada a la penetración del medio acuoso en la matriz. Esta penetración facilita no solo la difusión del fármaco, sino también cambios en la matriz que permiten un proceso combinado de difusión-relajación, en línea con lo descrito por Korsmeyer-Peppas [48, 112]. Por lo que el ajuste obtenido al modelo y el valor del exponente n, indica que el sistema PEG-$(PCL)_2$-AmB es adecuado para aplicaciones en las que se busca una liberación moderada y sostenida, que aprovecha las propiedades dinámicas de la matriz polimérica, proporcionando así una liberación eficiente y controlada del fármaco encapsulado [106, 113].

Finalmente, el sistema PEG-PCL-AmB exhibe un mayor ajuste al modelo Weibull, lo que sugiere que el mecanismo predominante de liberación del fármaco está mediado por procesos de erosión o desintegración de la matriz polimérica en el medio estudiado. Este mecanismo está respaldado por el valor del parámetro β obtenido del ajuste al modelo Weibull, cuyo valor mayor a 1 indica claramente un proceso de liberación acelerado, característico de matrices poliméricas cuya integridad estructural se pierde progresivamente debido a procesos de erosión o desintegración [115, 110].

Este comportamiento es consistente con estudios previos en los que las matrices basadas

en PEG-PCL se han reportado como sistemas que pueden sufrir erosión hidrolítica en medios acuosos, facilitando la liberación del fármaco encapsulado a medida que la matriz se degrada [116, 117, 118]. Por lo tanto, en este caso particular, la liberación de AmB desde las nanopartículas PEG-PCL-AmB estaría principalmente influenciada por la pérdida gradual de la matriz polimérica, permitiendo la exposición y consecuente liberación del fármaco al entorno.

Los perfiles de liberación de los sistemas evaluados en medio ácido muestran comportamientos similares, aunque mediados por mecanismos diferentes en función del modelo que mejor se ajusta a cada condición. Las bajas tasas de liberación observadas en este apartado pueden ser deseables para condiciones ácidas, teniendo en cuenta la integridad del IFA.

En la Figura 3-13 se presentan los perfiles de liberación de la AmB desde los sistemas nanoparticulados en fluido intestinal simulado.

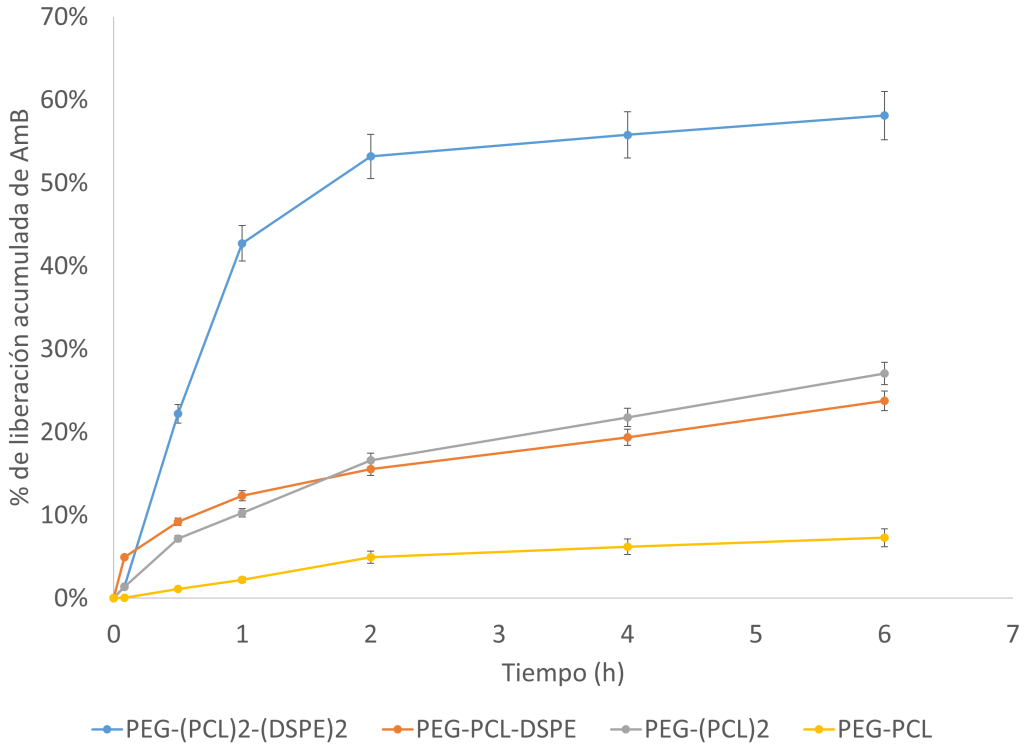


Figura 3-13: Perfiles de liberación de nanopartículas cargadas con AmB en FIS a 37°C.

La Tabla 3-9 muestra el ajuste de los datos experimentales a los modelos matemáticos estudiados respecto al comportamiento de liberación de la AmB desde los sistemas, en este mismo medio.

Gráficamente se evidencia un perfil de liberación mucho más favorable para el sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB: en general, se alcanzaron mayores concentraciones de AmB liberada a partir de todos los sistemas en comparación de lo sucedido en el FGS. Considerando que el FIS representa el ambiente en donde fisiológicamente se darán los procesos de absorción,

Tabla 3-9: Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para los sistemas nanoparticulados en FIS a 37°C.

Modelo matemático	**Parámetro**	**PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB**	**PEG-PCL-DSPE-AmB**	**PEG-$(PCL)_2$-AmB**	**PEG-PCL-AmB**
Orden 0	k_0 (% * h^{-1})	0,0770	0,0285	0,0398	0,0119
	R^2	0,622	0,929	0,929	0,896
Orden 1	k_1 (h^{-1})	0,3873	0,2146	0,3728	0,6045
	R^2	0,382	0,767	0,625	0,517
Higuchi	k_H (% * $h^{-0,5}$)	0,2357	0,0769	0,1073	0,0322
	R^2	0,857	0,995	0,992	0,957
Weibull	β	0,4006	0,4049	0,5680	0,6125
	R^2	0,970	0,982	0,997	0,981
Korsmeyer-Peppas	k_{K-P}	0,3786	0,1201	0,1080	0,0262
	n	0,2764	0,3703	0,5149	0,5972
	R^2	0,965	0,982	0,997	0,981
Peppas-Sahlin	k_1	0,3786	0,0633	0,0000	0,0000
	k_2	0,0000	0,0566	0,1080	0,0262
	m	0,2764	0,2441	0,2574	0,2986
	R^2	0,965	0,982	0,997	0,981

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

resulta deseable que el sistema sea capaz de liberar el fármaco en este punto.

El sistema PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB presentó un mejor ajuste al modelo Weibull, indicando un comportamiento retardado o difusivo en la liberación del fármaco. Este tipo de comportamiento sugiere una liberación inicial lenta o retardada seguida de una fase más acelerada [115]. El valor del parámetro β, menor a 1 según los datos presentados en la Tabla 3-9, es característico de un mecanismo de liberación difusivo con retardo inicial, reflejando una interacción inicial fuerte entre la matriz polimérica y la anfotericina B, o posiblemente una resistencia inicial a la difusión causada por la estructura del sistema nanoparticulado [119].

La Figura 3-13 evidencia este comportamiento en la curva de liberación, mostrando una fase inicial con una pendiente suave, indicando una liberación lenta durante la primera hora, seguida de una fase significativamente pronunciada que refleja un cambio en la velocidad de liberación del fármaco al medio [110]. Este patrón bifásico podría deberse a procesos como

la hidratación inicial y permeabilización de la matriz polimérica, que tras alcanzar cierto grado de humectación o erosión, incrementa notablemente la difusión de AmB desde las nanopartículas hacia el fluido intestinal simulado (FIS) [118, 113]. Dichas características hacen que este sistema sea particularmente adecuado para formulaciones que requieran una liberación inicial controlada, seguida de una liberación más rápida y sostenida del fármaco en condiciones intestinales.

En el caso del sistema PEG-PCL-DSPE-AmB, se evidencia un claro efecto "burst", caracterizado por una rápida liberación inicial del fármaco seguida de una fase más lenta y sostenida. Este comportamiento se ajusta satisfactoriamente al modelo de Higuchi, indicando que el mecanismo predominante de liberación es por difusión [120]. Este mecanismo está estrechamente relacionado con la estructura porosa y permeable del material, que permite la rápida liberación inicial debido a la disponibilidad inmediata del fármaco en la superficie o en poros accesibles. Posteriormente, la liberación sostenida se atribuye a la difusión gradual del fármaco encapsulado desde el núcleo polimérico hacia el fluido intestinal simulado (FIS), manteniendo una concentración constante durante períodos prolongados [112, 113]. Este comportamiento bifásico puede ser especialmente favorable para tratamientos donde se requiera una concentración inicial terapéutica rápida, seguida de una liberación controlada a largo plazo.

Los sistemas PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-PCL-AmB muestran ajustes similares en los modelos de Weibull, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin. Según el modelo de Korsmeyer-Peppas, ambos sistemas presentan un mecanismo de liberación no Fickiano, lo que implica que la liberación del principio activo se da por una combinación simultánea de difusión y relajación o erosión de la matriz polimérica [48]. Asimismo, el ajuste al modelo de Peppas-Sahlin indica que, aunque se observan ambos mecanismos operando conjuntamente, predomina el mecanismo de difusión en la liberación del principio activo. Este comportamiento mixto es típico en matrices poliméricas en las que inicialmente ocurre una liberación controlada por difusión a través de poros y espacios de la matriz, seguido por una liberación adicional debida a la relajación estructural o ligera erosión de la matriz polimérica que facilita la salida del fármaco hacia el medio circundante [121, 119, 118]. Este tipo de mecanismo es beneficioso para formulaciones que buscan un equilibrio entre liberación inmediata inicial y una liberación sostenida del fármaco a lo largo del tiempo.

Por último, la Figura 3-14 y la Tabla 3-10 muestran los resultados respecto a los comportamientos de liberación realizando un recambio completo del medio de liberación, iniciando por FGS y cambiando posteriormente a FIS.

Visualmente, se observa claramente un cambio significativo en el comportamiento de liberación de todos los sistemas estudiados al enfrentar la transición del medio gástrico simulado (FGS) al fluido intestinal simulado (FIS), reflejando así las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal. Esta situación agrega complejidad al análisis global del perfil de liberación para cada sistema. Particularmente, los sistemas PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-PCL-DSPE-AmB presentan una liberación inicial considerablemente mayor en el medio ácido, incrementándose aún más tras el cambio al medio intestinal, lo que indica cambios potenciales en los mecanismos y patrones de liberación.

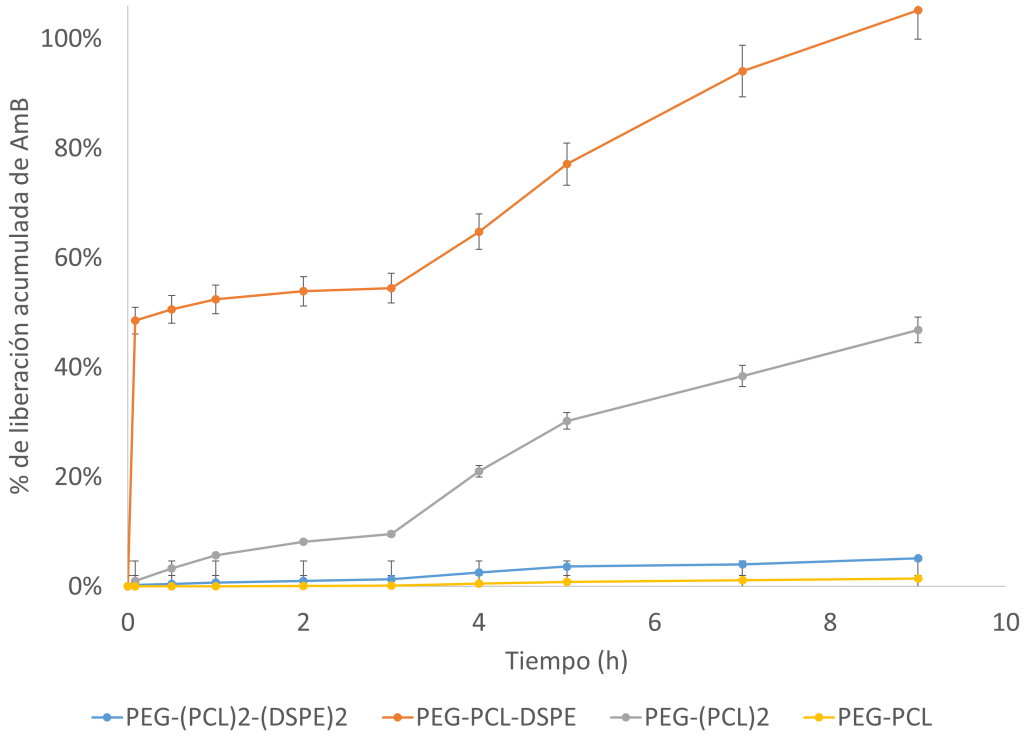


Figura 3-14: Perfiles de liberación de nanopartículas cargadas con AmB con recambio de medio de FGS a FIS a 37°C.

Aunque matemáticamente se observan diferentes modelos preferentes para cada sistema según la Tabla 3-10, todos muestran ajustes adecuados al modelo de Peppas-Sahlin [121]. Este modelo resulta especialmente valioso para interpretar situaciones complejas con cambios significativos en el mecanismo de liberación debido a que considera tanto procesos difusivos como procesos de relajación de la matriz polimérica. En particular, el análisis sugiere que la liberación de los sistemas PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-PCL-DSPE-AmB está predominantemente gobernada por difusión; sin embargo, se evidencia también una contribución relevante de la relajación estructural de la matriz en el caso del sistema PEG-$(PCL)_2$-AmB [48, 119]. Por otro lado, los sistemas PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB y PEG-PCL-AmB no parecen presentar un efecto significativo de relajación de matriz con el tiempo, indicando que su mecanismo predominante es de tipo difusivo tras el cambio del medio gástrico al intestinal [118, 113]. Este comportamiento resalta la importancia de considerar los cambios fisiológicos en el diseño de sistemas de liberación controlada para administración oral, permitiendo asegurar una liberación eficiente y adecuada del principio activo en la región objetivo del tracto gastrointestinal [110].

Finalmente, es importante considerar que ninguno de estos resultados puede verse de manera aislada, pensando en las mejores opciones para incluir en una formulación es necesario considerar el comportamiento exhibido en conjunto, destacándose para el propósito de esta investigación los sistemas que en su composición cuentan con DSPE, no solo en términos de carga y eficiencia de encapsulación, sino también en el comportamiento de liberación

Tabla 3-10: Parámetros y coeficientes de determinación de varios modelos cinéticos de liberación para los sistemas nanoparticulados con recambio de medio de FGS a FIS a 37°C.

Modelo matemático	**Parámetro**	**PEG-(PCL)$_2$-(DSPE)$_2$-AmB**	**PEG-PCL-DSPE-AmB**	**PEG-(PCL)$_2$-AmB**	**PEG-PCL-AmB**
Orden 0	k_0 ($\% * h^{-1}$)	0,0057	0,0660	0,0537	0,0017
	R^2	0,967	0,947	0,972	0,955
Orden 1	k_1 (h^{-1})	0,3227	0,0917	0,3773	0,5922
	R^2	0,878	0,960	0,837	0,863
Higuchi	k_H ($\% * h^{-0,5}$)	0,0173	0,1914	0,1613	0,0050
	R^2	0,872	0,783	0,861	0,802
Weibull	β	0,9753	0,5039	1,2958	1,8561
	R^2	0,983	0,720	0,989	0,969
Korsmeyer-Peppas	k_{K-P}	0,0064	0,4706	0,0456	0,0007
	n	0,9598	0,3263	1,0770	1,3844
	R^2	0,983	0,796	0,987	0,983
Peppas-Sahlin	k_1	0,0000	0,3346	0,0464	0,0000
	k_2	0,0064	0,1334	0,0064	0,0014
	m	0,4799	0,2477	0,8028	0,4722
	R^2	0,983	0,803	0,985	0,974

PEG: poli(etilenglicol), PCL: poli(caprolactona), AmB: anfotericina B

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

demostrado, lo que los convierten en candidatos deseables por sus características para la inclusión en nuevas formulaciones de AmB diseñadas para la vía oral.

4 Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Mediante el desarrollo de sistemas micelares utilizando copolímeros de polietilenglicol (PEG) y poli(ϵ-caprolactona) (PCL) conjugados con fosfolípidos (DSPE), se logró encapsular eficazmente la AmB, lo cual fue constatado mediante las diferentes técnicas de análisis empleadas en la caracterización de cada uno de los sistemas elaborados. La inclusión de DSPE en las formulaciones estudiadas aumentaron considerablemente las eficiencias de encapsulación de la anfotericina B, llegando a obtener %DLE superiores al 60 % superando considerablemente las eficiencias obtenidas en sistemas sin esta conjugación.

La determinación del tamaño y distribución de tamaño de partícula permitió corroborar la escala nanométrica de los sistemas elaborados, lo cual corresponde a una característica buscada en las nanopartículas, ya que al tratarse de sistemas que encapsulan un IFA muy insoluble en medios acuosos, favorece los procesos de liberación y disolución en medios esencialmente acuosos; la inclusión de DSPE a la formulación también favoreció la estabilidad coloidal de los sistemas, ya que se evidenció un aumento en la magnitud de los valores negativos del potencial ζ, lo que a su vez significa un aumento en las fuerzas de repulsión, lo cual reduce la posibilidad de formación de agregados que puedan llegar a afectar la funcionalidad de la formulación.

Los estudios de estabilidad a diferentes condiciones de pH evidenciaron un comportamiento aceptable de los sistemas micelares estudiados en ambientes cercanos a la neutralidad; sin embargo, esta situación no se cumplió al evaluar los sistemas en medios ácidos, donde la susceptibilidad a la hidrólisis propia de la anfotericina B se pudo apreciar. El paso por el tracto gastrointestinal condiciona al contacto con un medio fuertemente ácido, en una formulación que está siendo diseñada considerando la posibilidad de administrarse por vía oral, por lo que la inestabilidad en medios ácidos supone una limitante; esto plantea la necesidad de emplear recubrimientos de tipo entérico que permitan superar el paso por estas condiciones agresivas para el sistema.

Los estudios de liberación en condiciones biológicas simuladas demostraron que es posible obtener sistemas que presenten comportamientos de liberación controlada, de manera particular en condiciones que simulan el ambiente intestinal fisiológico, el sistema PEG-

$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB fue capaz de liberar controladamente aproximadamente el 60 % del fármaco durante el periodo de tiempo evaluado.

En conjunto, los resultados demuestran que las formulaciones micelares de anfotericina B con precursores poliméricos conjugados con fosfolípidos, son candidatas a su inclusión en sistemas de liberación controlada destinadas a ser administradas por la vía oral.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de las nanopartículas más prometedoras empleando recubrimientos de tipo entérico que permitan a los sistemas aquí estudiados superar las condiciones fuertemente ácidas a las cuales deberá exponerse la formulación; adicionalmente, es necesario considerar el recubrimiento no solo como medida protectora ante un medio agresivo, sino que su inclusión puede llegar a afectar los patrones de liberación u otra característica que afecte el despeño del sistema.

Se sugiere considerar la posibilidad de estandarizar los procesos de obtención y elaboración de los sistemas micelares, con el fin de asegurar rendimientos y eficiencias comparables entre los lotes elaborados que a su vez pueden minimizar variaciones en características de desempeño de los sistemas.

Se recomienda realizar estudios complementarios que evalúen la permeabilidad intestinal desde los sistemas nanoparticulados estudiados, dichos estudios aportarían información valiosa considerando el escenario de inclusión de las micelas en productos destinados a administración por vía oral.

A Apéndice A: Síntesis química para la obtención de materiales poliméricos y sistemas nanoparticulados

Los procesos de síntesis química para la obtención de los polímeros y sistemas nanoparticulados aquí estudiados, se obtuvieron siguiendo desarrollos previos del grupo de investigación de Macromoléculas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia; a continuación se detallan los procesos de síntesis química llevados a cabo.

A.1 Síntesis de copolímeros

Se sintetizaron diferentes copolímeros, algunos de ellos constituyendo precursores intermedios para la obtención final del material deseado; cada uno de los procesos se realizó siguiendo las metodologías previamente establecidas en el grupo de investigación de Macromoléculas [22, 57].

A.1.1 Síntesis de copolímeros de PEG-PCL

Los copolímeros de PEG-PCL se sintetizaron mediante polimerización con apertura de anillo técnica de polimerización en la que los monómeros que contienen un anillo cerrado (como lactonas, lactamas o epóxidos) son convertidos en polímeros mediante la ruptura de dicha estructura [122]. En una síntesis típica se emplearon mPEG (1 mmol de 5 kDa), CL (50 mmol) y como catalizador $Sn(Oct)_2$ (0,5 mmol) en un matraz de fondo redondo y se disolvieron en 30 mL de tolueno seco, la mezcla se llevó a atmósfera inerte con nitrógeno y se sometió a agitación a temperatura de 110 °C por 24 horas.

La Figura A-1 muestra la reacción de síntesis química llevada a cabo; de manera análoga se llevo a cabo la síntesis de PCL-PEG-PCL empleando el equivalente al doble de la relación molar utilizada de ϵ caprolactona, sometido a las mismas condiciones de reacción. El producto

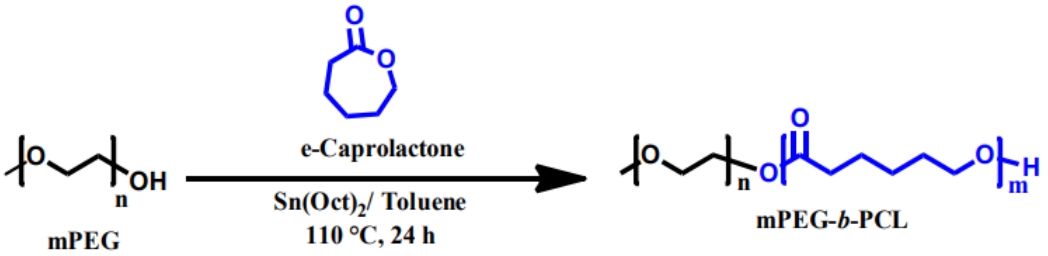


Figura A-1: Reacción de síntesis de copolímeros PEG-PCL [57].

de la reacción se llevó a dietil éter, del cual posteriormente se recuperó el sólido por filtración.

A.1.2 Síntesis de copolímeros de PEG-PCL-COOH

Si bien los copolímeros de PEG-PCL fueron empleados para la síntesis de algunos de los sistemas micelares estudiados, también fueron empleados como material de partida para obtener copolímeros conjugados con los cuales se obtendrían otros sistemas objeto de estudio. En este sentido, se sintetizaron copolímeros de PEG-PCL-COOH como productos intermedios necesarios para la conjugación con DSPE a partir de la reacción de los copolímeros PEG-PCL y PCL-PEG-PCL con anhídrido succínico y DMAP en dioxano y TEA manteniendo una relación molar 1:3:3:3 (PEG-PCL:Anhídrido succínico:DMAP:TEA); el medio se llevó a atmósfera inerte con nitrógeno y se sometió a agitación a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, se evaporó el dioxano por rotaevaporación y se adicionó agua ocasionando una hidrólisis en el producto de reacción, el cual fue extraído con diclorometano y separado después.

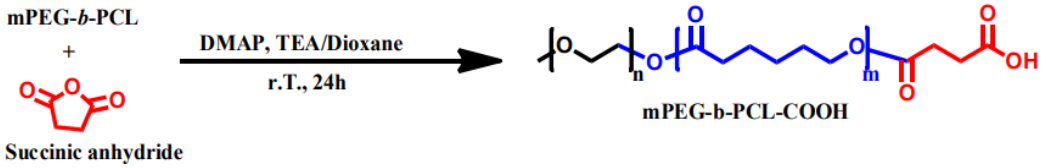


Figura A-2: Reacción de síntesis de copolímeros PEG-PCL-COOH [57].

La Figura A-2 muestra la reacción de síntesis química llevada a cabo; de manera análoga se llevó a cabo la síntesis de HOOC-PCL-PEG-PCL-COOH empleando el equivalente al doble de la relación molar utilizada respecto al copolímero base, sometido a las mismas condiciones de reacción.

A.1.3 Conjugación de copolímeros de PEG-PCL-DSPE

Los copolímeros carboxilados obtenidos previamente fueron empleados en su totalidad como precursores para la obtención de materiales conjugados con fosfolípidos mediante procesos de

amidación; para ello se disolvieron los copolímeros modificados, DCC y NHS en diclorometano con una relación molar 1:1:1 respectivamente, a lo cual de manera posterior se añadió TEA manteniendo una relación molar 2:1 respecto al copolímero base y la mezcla reaccionó durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. Posteriormente se adicionó el fosfolípido DSPE 1:1 respecto al copolímero carboxilado, dejando reaccionar por 24 horas más, cumplido este tiempo se evaporó el diclorometano y el producto resultante se purificó precipitándolo con éter dietílico a 0°C, se filtró y se secó al vacío para obtener PEG-PCL-DSPE.

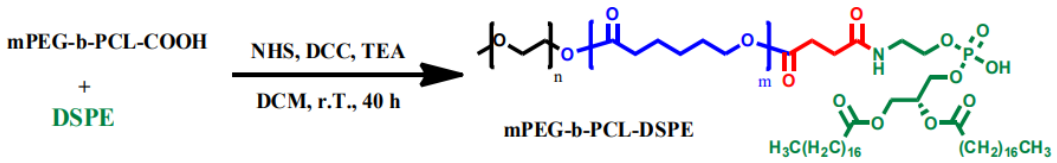
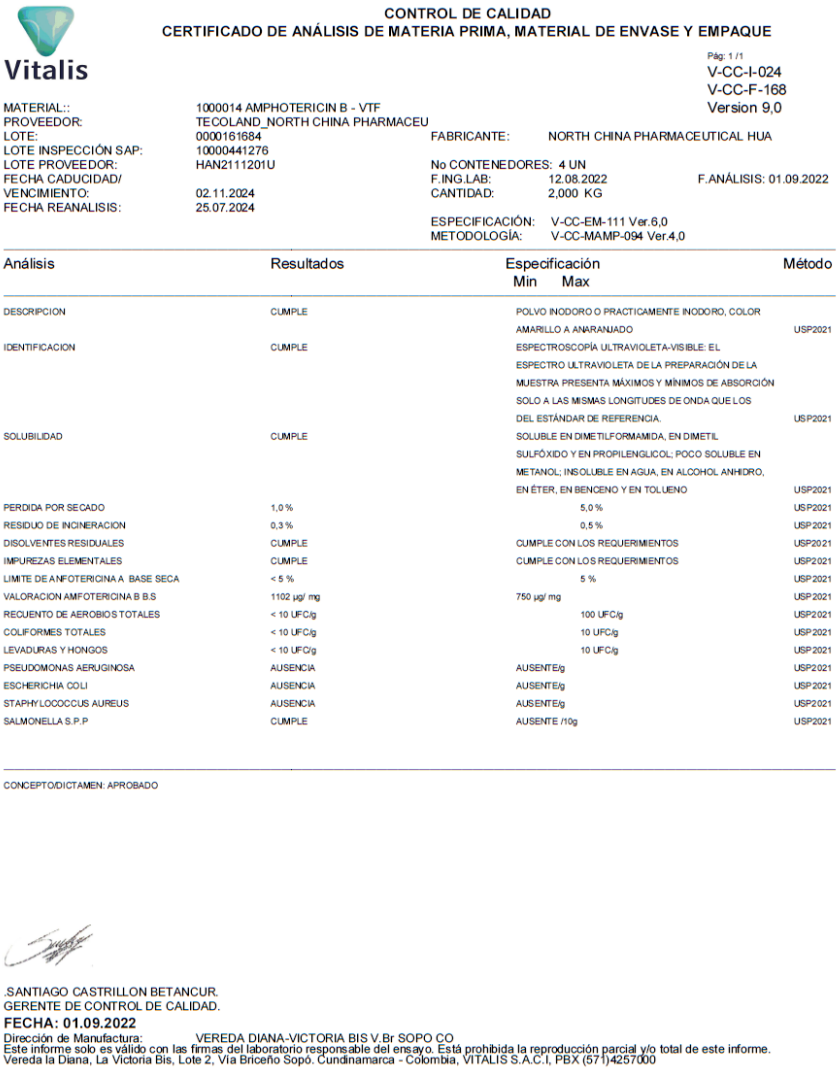


Figura A-3: Reacción de síntesis de copolímeros PEG-PCL-DSPE [57].

La Figura A-3 muestra la reacción de síntesis química realizada; de manera análoga se llevó a cabo la síntesis de DSPE-PCL-PEG-PCL-DSPE empleando el equivalente al doble de la relación molar utilizada respecto al copolímero base de fosfolípido, sometido a las mismas condiciones de reacción y purificación.

A.2 Síntesis de nanopartículas

Se prepararon diferentes sistemas nanoparticulados, los cuales fueron caracterizados y evaluados en la presente investigación. Para su preparación, se emplearon los materiales descritos en la sección 6.1 en donde se hace alusión a la AmB; en la Figura A-4 se muestra el certificado de análisis aportado de la materia prima utilizada.



Vitalis

CONTROL DE CALIDAD
CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA, MATERIAL DE ENVASE Y EMPAQUE

Pág: 1 /1
V-CC-I-024
V-CC-F-168
Version 9,0

MATERIAL:: 1000014 AMPHOTERICIN B - VTF
PROVEEDOR: TECOLAND_NORTH CHINA PHARMACEU
LOTE: 0000161684
LOTE INSPECCIÓN SAP: 10000441276
LOTE PROVEEDOR: HAN2111201U
FECHA CADUCIDAD/ VENCIMIENTO: 02.11.2024
FECHA REANALISIS: 25.07.2024

FABRICANTE: NORTH CHINA PHARMACEUTICAL HUA
No CONTENEDORES: 4 UN
F.ING.LAB: 12.08.2022 F.ANÁLISIS: 01.09.2022
CANTIDAD: 2,000 KG

ESPECIFICACIÓN: V-CC-EM-111 Ver.6,0
METODOLOGÍA: V-CC-MAMP-094 Ver.4,0

Análisis	Resultados	Especificación Min	Especificación Max	Método
DESCRIPCION	CUMPLE	POLVO INODORO O PRACTICAMENTE INODORO, COLOR AMARILLO A ANARANJADO		USP2021
IDENTIFICACION	CUMPLE	ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE: EL ESPECTRO ULTRAVIOLETA DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PRESENTA MÁXIMOS Y MÍNIMOS DE ABSORCIÓN SOLO A LAS MISMAS LONGITUDES DE ONDA QUE LOS DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA.		USP2021
SOLUBILIDAD	CUMPLE	SOLUBLE EN DIMETILFORMAMIDA, EN DIMETIL SULFÓXIDO Y EN PROPILENGLICOL; POCO SOLUBLE EN METANOL; INSOLUBLE EN AGUA, EN ALCOHOL ANHIDRO, EN ÉTER, EN BENCENO Y EN TOLUENO		USP2021
PERDIDA POR SECADO	1,0 %		5,0 %	USP2021
RESIDUO DE INCINERACION	0,3 %		0,5 %	USP2021
DISOLVENTES RESIDUALES	CUMPLE	CUMPLE CON LOS REQUERIMIENTOS		USP2021
IMPUREZAS ELEMENTALES	CUMPLE	CUMPLE CON LOS REQUERIMIENTOS		USP2021
LIMITE DE ANFOTERICINA A BASE SECA	< 5 %		5 %	USP2021
VALORACION AMFOTERICINA B B.S	1102 µg/ mg	750 µg/ mg		USP2021
RECUENTO DE AEROBIOS TOTALES	< 10 UFC/g		100 UFC/g	USP2021
COLIFORMES TOTALES	< 10 UFC/g		10 UFC/g	USP2021
LEVADURAS Y HONGOS	< 10 UFC/g		10 UFC/g	USP2021
PSEUDOMONAS AERUGINOSA	AUSENCIA	AUSENTE/g		USP2021
ESCHERICHIA COLI	AUSENCIA	AUSENTE/g		USP2021
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	AUSENCIA	AUSENTE/g		USP2021
SALMONELLA S.P.P	CUMPLE	AUSENTE /10g		USP2021

CONCEPTO/DICTAMEN: APROBADO

.SANTIAGO CASTRILLON BETANCUR.
GERENTE DE CONTROL DE CALIDAD.
FECHA: 01.09.2022
Dirección de Manufactura: VEREDA DIANA-VICTORIA BIS V.Br SOPO CO
Este informe solo es válido con las firmas del laboratorio responsable del ensayo. Está prohibida la reproducción parcial y/o total de este informe.
Vereda la Diana, La Victoria Bis, Lote 2, Vía Briceño Sopó. Cundinamarca - Colombia, VITALIS S.A.C.I, PBX (571)4257000

Figura A-4: Certificado de análisis anfotericina B.

Como se mencionaron en la Tabla 2-2, fueron varias las formulaciones sintetizadas con sus respectivos sistemas blanco; en ambos casos se siguió el mismo procedimiento con la única diferencia que en el caso de los sistemas blanco, la fase metanólica no contenía AmB

en solución. Los procesos de síntesis se realizaron siguiendo las metodologías previamente establecidas en el grupo de investigación de Macromoléculas [22, 57]. La Figura A-5 muestra el detalle del proceso de nanoprecipitación ejecutado.

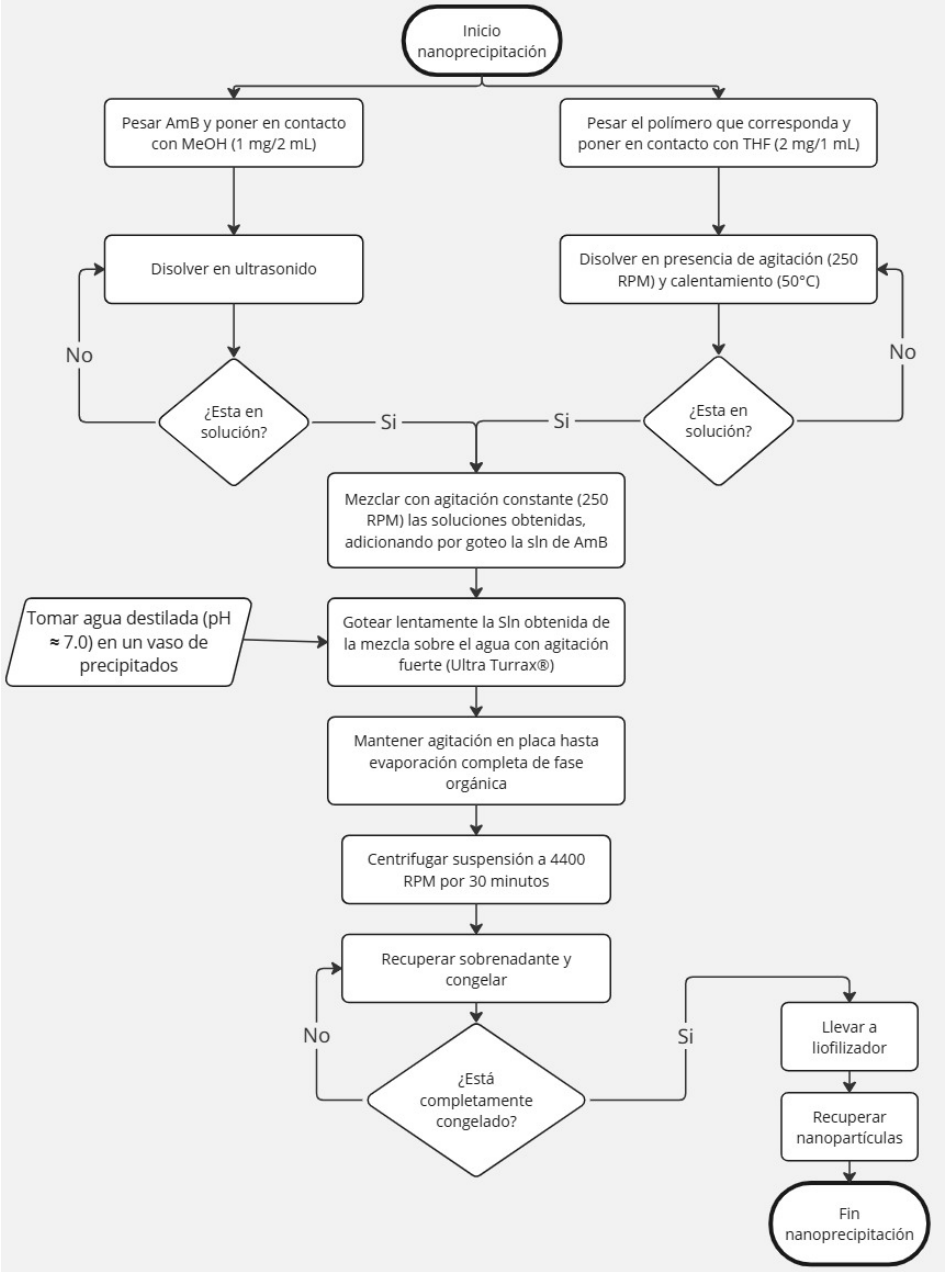


Figura A-5: Proceso de nanoprecipitación. Elaborado con el software Miro®.

B Apéndice B: Validación de una metodología analítica para la cuantificación de AmB

Para cuantificar la AmB presente en los sistemas nanoparticulados, así como en los diferentes medios evaluados, se desarrolló y validó una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). La validación del método analítico se realizó mediante la adición de estándar para la elaboración de las curvas de calibración del mismo. Previo a la determinación de las características de desempeño, se evaluó la idoneidad del sistema con el fin de evaluar si el método es adecuado para el propósito previsto.

B.1 Condiciones cromatográficas

Se empleó un equipo de cromatografía líquida Shimadzu® con desgasificador DGU-20, dos bombas binarias LC-6AD, sistema detector de arreglo de diodos SPD M20-A, horno para columna CTO-20A, automuestreador SIL-20A HT y módulo de comunicación CMB20A. El software utilizado para el procesamiento de datos fue LabSolutions LC.

Como fase móvil se trabajó un gradiente de elución, donde la fase móvil A correspondió a H_2O: CH_3COOH (0,73 %) y la fase móvil B fue acetonitrilo (ACN), con flujo de 1,0 mL/min. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 Phenomenex® (250 mm * 4,6 mm i.d; 5µm), a temperatura ambiente y detección a 408nm. Se inyectaron 10 µL de cada muestra, previamente filtrada a través de membrana PVDA (0,22 µm), marca Millipore®. La cuantificación fue realizada por el método de estándar externo.

B.2 Preparación de las muestras

Para la validación de la metodología se prepararon soluciones madre por triplicado de 1 mg/mL equivalente de AmB en una de mezcla 50:50 DMSO:metanol (con el fin de garantizar completa disolución de la AmB), a partir de las cuales se prepararon diluciones de 5 µg/mL en metanol. De estas soluciones se hicieron las preparaciones para trabajar curvas de calibración en el rango de 3 µg/mL a 0,05 µg/mL de AmB; estas concentraciones se emplearon tanto en sistema como en método; este ultimo fue evaluado empleando el sistema nanoparticulado con el polímero mPEG-b-PCL-DSPE.

B.3 Idoneidad del sistema

Con el objetivo de verificar que las condiciones del sistema son óptimas para llevar a cabo los análisis requeridos, se evaluó la idoneidad del sistema cromatográfico, para lo cual se preparó una solución de AmB de concentración 10 µg/mL la cual se inyectó 10 veces al cromatógrafo, en la Figura B-1 se muestra el perfil cromatográfico obtenido a una longitud de onda de 407 nm.

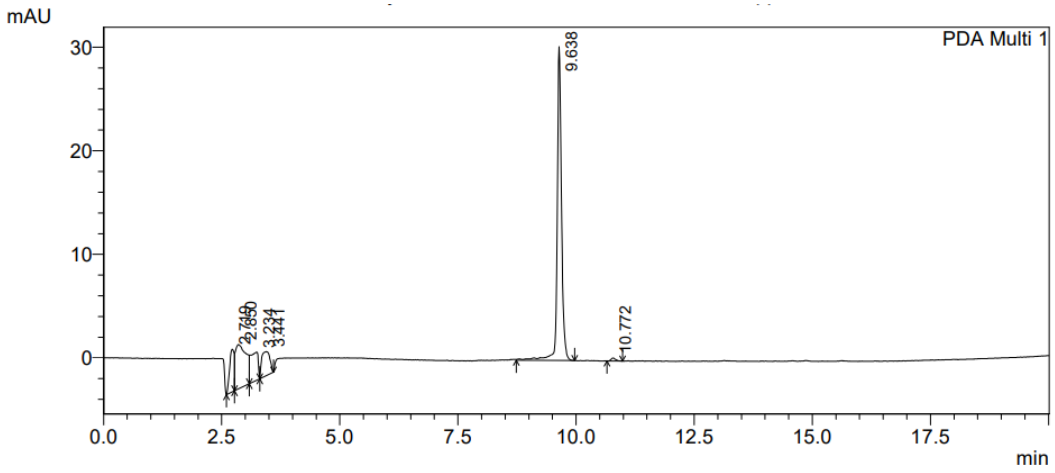


Figura B-1: Perfil cromatográfico de AmB.

Se determinaron los siguientes parámetros: factor de asimetría, número de platos teóricos, factor de capacidad, precisión de la inyección, resolución y factor de separación sus resultados se prestan en la Tabla B-1.

Los valores obtenidos fueron evaluados respecto a los lineamientos establecidos por la farmacopea USP [44]; de acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que el sistema cumple con los criterios de aceptación y por lo tanto la metodología propuesta cumple con los parámetros de idoneidad, lo cual lo hace un método apto para la cuantificación de AmB.

Tabla B-1: Parámetros de idoneidad del sistema.

Parámetro	Valor obtenido	CV (%)	Criterio de aceptación
Factor de asimetría	1,45	1,07	<2
Número de platos teóricos	48155773	3,29	>2000
Factor de capacidad	2,44	1,08	Entre 2 y 10
Resolución	4,63	2,50	>2
Factor de separación	1,13	0,26	>1

B.4 Características de desempeño

La validación del método se realizó teniendo siguiendo los lineamientos establecidos por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés), de acuerdo con los lineamientos establecidos por la guía ICH Q2 (R2) [123], evaluando los parámetros presentados a continuación:

B.4.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad del sistema y del método, se establecieron cinco niveles de concentración de AmB: 0,05, 0,25, 0,5, 1,5 y 3,0 µg/mL, cada uno se preparó por triplicado a partir de la dilución de las soluciones madre preparadas. La evaluación de la linealidad se hizo por medio del análisis de varianza (ANOVA) para la regresión. El estadístico t de Student se usó para evaluar la pendiente y el intercepto, con un nivel de confianza del 95 %.

En la Figura B-2 se presentan las curvas de calibración (relación de áreas vs. concentración) para el sistema y para el método, en las cuales se puede observar un coeficiente de correlación de 0,9996 y 0,996 respectivamente, lo que indica un alto grado de relación entre la variable x (concentración de AmB) y la variable y (respuesta).

Por otra parte, se aplicaron pruebas de hipótesis para evaluar el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración, mediante el estadístico t de Student, las Tablas B-2 y B-3 muestran los resultados de la prueba estadística para sistema y método respectivamente.

El test aplicado para el intercepto en el sistema y método arrojó unos valores de t experimental $<t$ tabulado, por tanto, no se rechazó H_0; con esto es posible afirmar que las rectas presentan un intercepto con el eje Y que no es significativamente diferente de cero y una convergencia al origen. Respecto a las pendientes, se encontraron valores experimentales de t mayores a los tabulados, por consiguiente, se rechazó H_0; es decir, las pendientes son significativamente

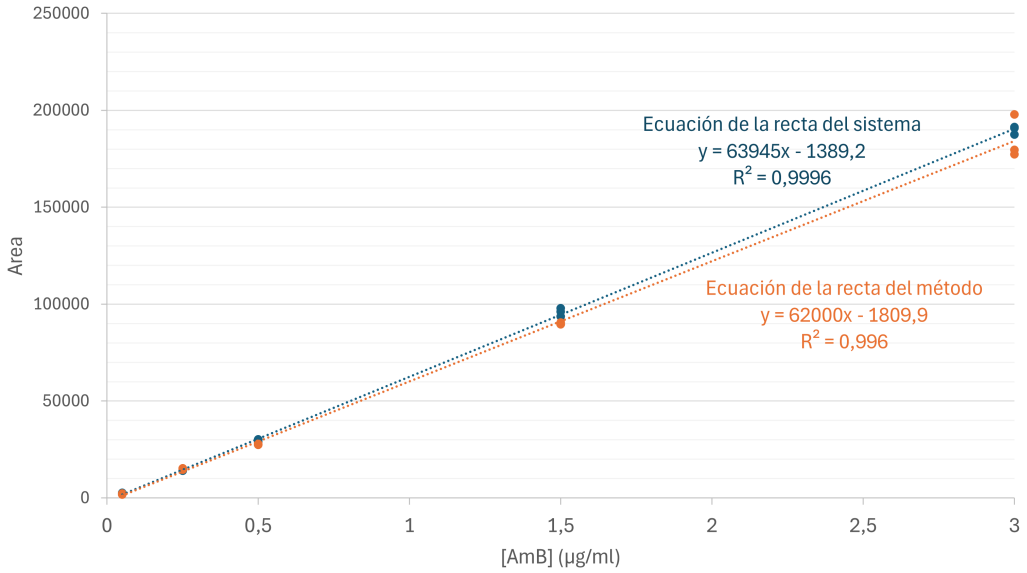


Figura B-2: Curvas de calibración para sistema y método.

Tabla B-2: Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la linealidad del sistema.

Parámetro	**Hipótesis**	t_{exp}	t_{tab}**(13; 0,05)**	**Criterio**	**Resultado**
Pendiente	H_0: La pendiente no es diferente de cero H_1: La pendiente es diferente de cero	180,1801	2,1604	$t_{exp} > t_{tab}$ Se Rechaza H_0	Se rechaza H_0 La pendiente es diferente de cero
Intercepto	H_0: El intercepto no es diferente de cero H_1: El intercepto es diferente de cero	-2,5738	2,1604		No se rechaza H_0 El intercepto no es diferente de cero
Correlación	H_0: No hay correlación entre x y y H_1: Hay correlación entre x y y	162,4122	2,1604		Se rechaza H_0 Hay correlación entre x y y

diferentes de cero; por otro lado, la prueba de hipótesis para el coeficiente de correlación exhibió unos t experimental $>t$ tabulado, lo cual llevó a rechazar H_0, permitiendo concluir que en ambos casos hay correlación significativa entre las dos variables, concentración (X) y área bajo la curva (Y) con una confianza del 95 %, demostrando que los datos experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal.

Del análisis de varianzas ejecutado tanto para sistema como para el método (Tabla B-4), se obtuvo que la regresión es significativa, ya que en ambos casos F experimental $>F$ tabulado, llevando esto a rechazar la H_0 que establecía que la regresión no era significativa; lo que implica que el modelo lineal utilizado en el sistema y el método evaluado es útil para predecir

Tabla B-3: Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la linealidad del método.

Parámetro	**Hipótesis**	t_{exp}	$t_{\textbf{tab}}$**(13; 0,05)**	**Criterio**	**Resultado**
Pendiente	H_0: La pendiente no es diferente de cero H_1: La pendiente es diferente de cero	56,6908	2,1604	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ Se Rechaza H_0	Se rechaza H_0 La pendiente es diferente de cero
Intercepto	H_0: El intercepto no es diferente de cero H_1: El intercepto es diferente de cero	-1,0881	2,1604		No se rechaza H_0 El intercepto no es diferente de cero
Correlación	H_0: No hay correlación entre x y y H_1: Hay correlación entre x y y	51,1004	2,1604		Se rechaza H_0 Hay correlación entre x y y

los valores de la variable dependiente a partir de las variables independientes. Por otro lado, no existe un desvío significativo de la linealidad ya que el F experimental $<F$ tabulado en ambos casos, esto implica que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones de AmB; por tanto se afirma que se obtuvo un comportamiento lineal para el sistema y método.

Tabla B-4: Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad en sistema y método.

Parámetro	**Grados de libertad (gl)**	**Suma de Cuadrados (SC)**	**Cuadrado Medio (CM)**	F_{exp}	F_{tab}
Sistema					
Regresión	1	72951314022	72951314022	32464,879	4,667
Falta de ajuste	3	10057789,91	3352596,635	1,750	3,259
Error residual	13	29212093,91	2247084,147		
Error puro	10	19154304	1915430,4		
Error total	14	72980526116			
Método					
Regresión	1	68580500200	168580500200	3213,843	4,667
Falta de ajuste	3	20683849,66	6894616,555	0,2686	3,259
Error residual	13	277408261,7	21339097,05		
Error puro	10	256724412	25672441,2		
Error total	14	68857908462			

B.4.2 Selectividad

Para determinar la capacidad del método de identificar y cuantificar con precisión la AmB en presencia de posibles interferentes se determinó la selectividad del método analítico mediante la comparación de las pendientes del sistema y método obtenidas de la regresión lineal

empleando una prueba t, lo anterior teniendo en cuenta que estas representan la relación entre las concentraciones del analito (AmB en este caso) y la respuesta medida. En la Tabla B-5 se muestran los resultados de dicha prueba.

Tabla B-5: Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la selectividad.

Pendiente	**Valor**	**Hipótesis**	$S^2_{\textbf{Regresión}}$	S_p	$t_{\textbf{exp}}$	$t_{\textbf{tab}}$ **(26; 0,05)**
Sistema (b_s)	63945,05	H_0: $b_s = b_m$	2247084,14	3434,1070	0,5664	2,0555
Método (b_m)	61999,86	H_1: $b_s \neq b_m$	21339097,05			

Al comparar el valor t experimental con el tabulado se tiene que $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, lo que significa que no se rechaza la hipótesis nula y que no hay diferencia significativa entre las pendientes comparadas, lo que indica que el método es selectivo y la respuesta instrumental observada se debe únicamente a la generada por el analito de interés en este caso la AmB.

B.4.3 Especificidad

Por medio de la comparación de las señales y los tiempos de retención de los cromatogramas obtenidos de las muestras de solventes empleados (DMSO y metanol), los componentes de la fase móvil (H_2O: CH_3COOH 0,73 % y acetonitrilo), los medios simulados para análisis (siendo estos fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS)) y el respectivo blanco de los sistemas poliméricos empleados, se determinó que no se presentaban interferentes en el tiempo de retención de la AmB.

Como se observa en las Figuras B-3 y B-4, no se identifican señales adicionales además de la generada por la AmB; adicionalmente, se verificó que ninguna de las muestras modificaba el espectro de absorción molecular (EAM) para ninguno de los casos. Esto indica que tras la comparación del espectro medio del pico con el resto de espectros, a medida que eluye el analito, no se evidencian interferentes que afecten las lecturas obtenidas, por tanto la metodología analítica empleada garantiza la obtención de una señal inequívoca y específica de la AmB sin ningún interferente, haciendo que el método sea especifico.

B.4.4 Precisión

Para evaluar la precisión de la metodología analítica, se analizaron tres niveles de concentración equivalente de AmB en sistema y método: 0,05, 0,5 y 3,0 µg/mL. Para evaluar la repetibilidad (niveles intradías), se prepararon triplicados de los niveles antes mencionados y se aplicó una prueba de Cochran con un nivel de confianza del 95 % y en términos del coeficiente de variación promedio ponderado (RSDp), el cual tiene como criterio de aceptación un RSDp $\leq$ 5 %, evaluando de esta manera la homogeneidad de las varianzas de las diferentes mediciones. Por otro lado, para el caso de la precisión intermedia (niveles interdía)

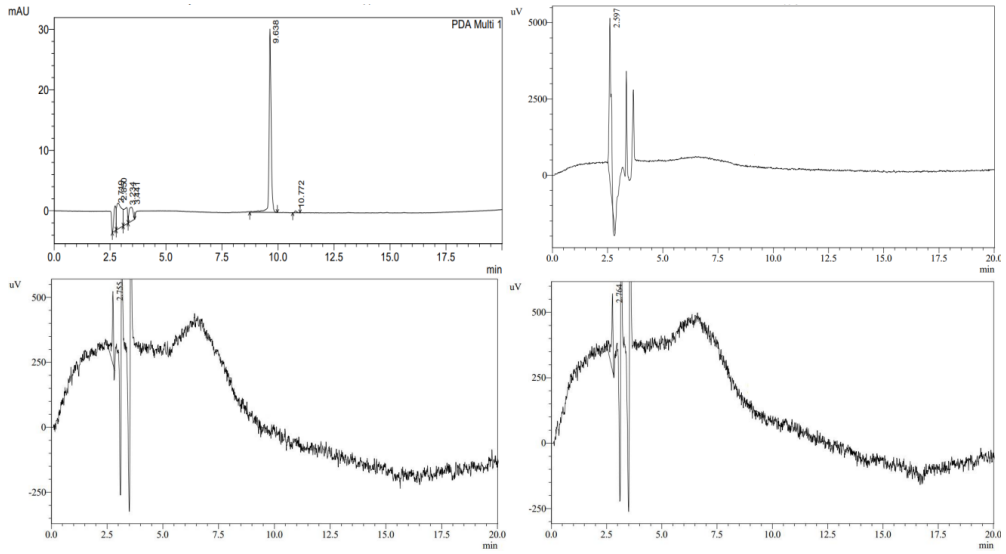


Figura B-3: Cromatogramas a $\lambda = 407\,\text{nm}$ para la evaluación de especificidad 1. De izquierda a derecha y arriba a abajo: Perfil cromatografico para la AmB, perfil cromatografico blanco sistemas nanoparticulados, perfil cromatografico para el fluido gástrico simulado (FGS) y perfil cromatografico para el fluido intestina simulado (FIS). Datos procesados con el software LCsolution®.

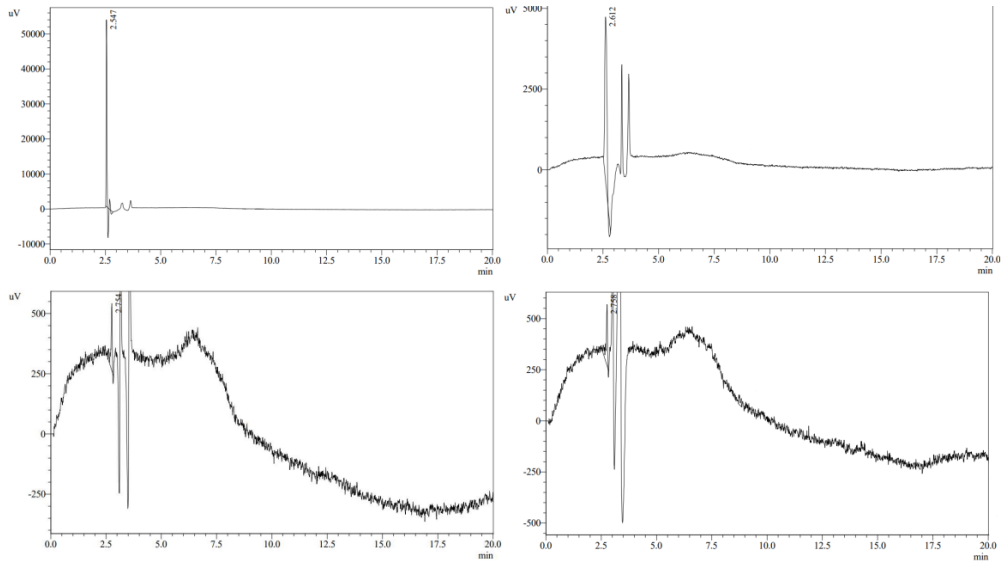


Figura B-4: Cromatogramas a $\lambda = 407\,\text{nm}$ para la evaluación de especificidad 2. De izquierda a derecha y arriba a abajo: Perfil cromatografico para el solvente DMSO, perfil cromatografico para el solvente metanol, perfil cromatografico para la fase móvil acuosa (H_2O: CH_3COOH 0,73 %) y perfil cromatografico para la fase móvil organica (ACN). Datos procesados con el software LCsolution®.

se emplearon los mismos niveles ya mencionados y se evaluó empleando un ANOVA con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla B-6: Parámetros estadísticos test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad en determinación de AmB en el sistema y método.

	%RSDp	$G_{\mathbf{exp}}$	$G_{\mathbf{tab}}$	H_0
Sistema	1,75	0,8647	0,8709	No hay diferencia significativa entre varianzas
Método	1,30	0,7880	0,8709	

En la Tabla B-6 se muestran los resultados del test de Cochran aplicado tanto al sistema como al método evaluados, en donde se observan en ambos casos valores de RSDp inferiores al 5 %, lo que cumple el criterio estipulado y refleja que la metodología analítica tiene una buena repetibilidad y garantiza que los resultados son fiables cuando se repiten bajo las mismas condiciones experimentales; de igual manera, los valores obtenidos de G_{exp} fueron menores a los valores de G_{tab}, implicando que no hay diferencia significativa entre las varianzas de los niveles de concentración evaluados, con lo que no se rechaza la hipótesis nula establecida.

Con relación a la precisión intermedia, se determinó a través del análisis de varianza ANOVA que ninguna de las fuentes de variación (día y réplica) afectan la precisión del sistema y método ya que el valor de F_{exp} fue inferior al F_{tab} tanto para el sistema como para el método, tal como se puede apreciar en la Tabla B-7; esto indica que las diferencias observadas entre días y réplicas no son lo suficientemente grandes como para ser consideradas estadísticamente significativas y por tanto se cumple con el parámetro de precisión intermedia para la metodología analítica.

Tabla B-7: Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la precisión intermedia en sistema y método.

Parámetro	**Grados de libertad (gl)**	**Suma de Cuadrados (SC)**	**Cuadrado Medio (CM)**	F_{exp}	F_{tab}
Sistema					
Día	2	332077561,6	166038780,8	0,02096	3,443
Réplica	2	27722616,0	13861308,0	0,00175	3,443
Error	22	174252632929,1	7920574224,1		
Error total	26	174612433106,7			
Método					
Día	2	332468698,1	166234349,0	0,01868	3,443
Réplica	2	50510503,4	25255251,7	0,00284	3,443
Error	22	195806941643,5	8900315529,3		
Error total	26	196189920844,9			

B.4.5 Exactitud

Para la evaluación de la exactitud del método, se prepararon por triplicado soluciones de concentración 0,05, 0,5 y 3,0 µg/mL de AmB equivalente en metanol; la exactitud se calculó mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, evaluando de esta manera todo el rango lineal; considerando la complejidad de la

matriz de la muestra, como criterio de aceptación para este parámetro, se determinó que el porcentaje de recuperación (%R) debe encontrarse entre el 95 y 105 %. La Tabla B-8 muestra los resultados dela evaluación de exactitud del método.

Tabla B-8: Parámetros estadísticos t Student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica.

Parámetro	**Valor**	**Hipótesis**	$t_{\mathbf{exp}}$	$t_{\mathbf{tab}}$ **(9; 0,05)**
%R Promedio	95,5608			
S^2	91,8352	H_0: %R = 100 %	1,3280	2,3060
%CV	10,0282			

La recuperación media de la metodología analítica se encuentra dentro de los limites establecidos (95-105 %); por otro lado, el resultado de la prueba t de Student acepta la hipótesis nula que establece que la recuperación no es significativamente diferente del 100 %, ya que se obtuvo que el valor de t_{exp} es menor que el t_{tab}.

B.4.6 Limites de detección y cuantificación

Para el cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), se prepararon nueve curvas de calibración del método y el sistema, en el rango de 0,05 a 3,0 µg/mL de AmB equivalente; se hizo uso de los valores de las pendientes y las desviaciones estándar de las repuestas obtenidas para calcular los LOD y LOQ en cada caso como se muestra a continuación:

Límite de detección (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{3{,}3 \cdot \sigma}{b} \tag{B-1}$$

Donde:

- σ es la desviación estándar de la regresión (error residual).
- b es la pendiente de la curva de calibración.

Límite de cuantificación (LOQ)

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{b} \tag{B-2}$$

Donde:

- σ es la desviación estándar de la regresión (error residual).
- b es la pendiente de la curva de calibración.

En la Tabla B-9 se resumen los valores de LOD y LOQ para cada caso:

Tabla B-9: Determinación de límites de cuantificación y detección de AmB en el sistema y método.

	Parámetro	Valor	LOQ (µg/mL)	LOD (µg/mL)
Sistema	σ	499,70	0,07814	0,0258
	b	63945,05		
Método	σ	555,49	0,08959	0,0296
	b	61999,86		

C Apéndice C: Soportes espectrales complementarios

A lo largo de la investigación se realizaron diferentes ensayos y se aplicaron diversas técnicas que sustentan los resultados obtenidos, que se presentan a continuación.

C.1 Soportes espectrales FTIR complementarios

En esta sección se muestran los espectros FTIR para los sistemas nanoparticulados de PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-vacío (Figura C-1), PEG-PCL-DSPE-AmB y PEG-PCL-DSPE-vacío (Figura C-2), PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-vacío (Figura C-3).

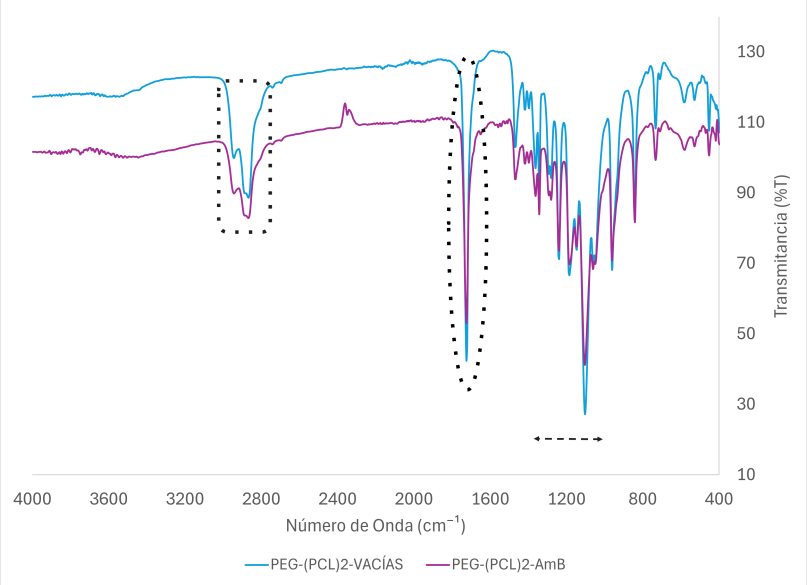


Figura C-1: Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-$(PCL)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-vacío.

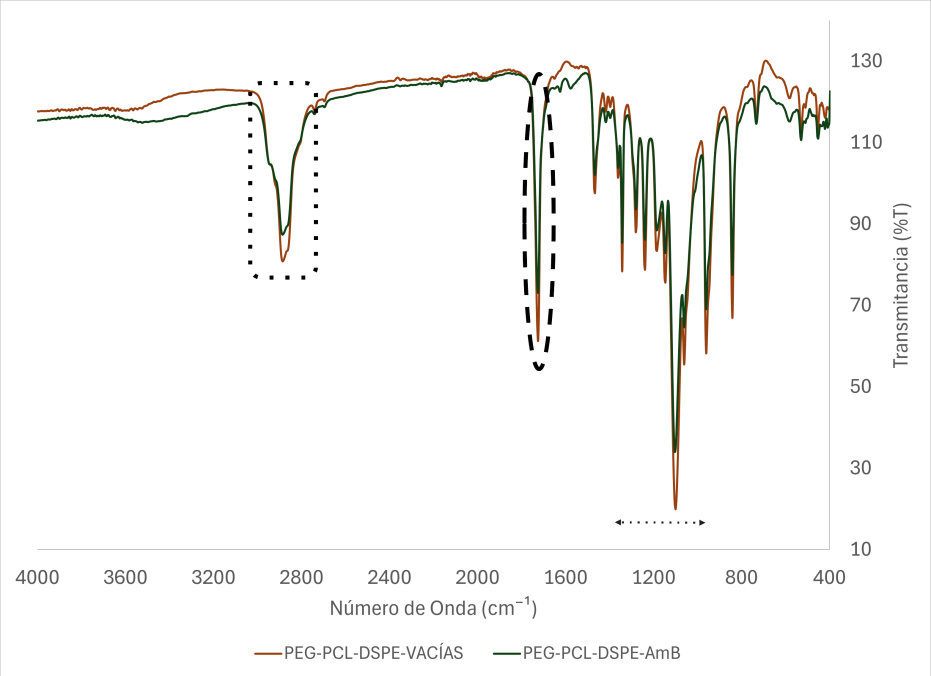


Figura C-2: Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-PCL-DSPE-AmB y PEG-PCL-DSPE-vacío.

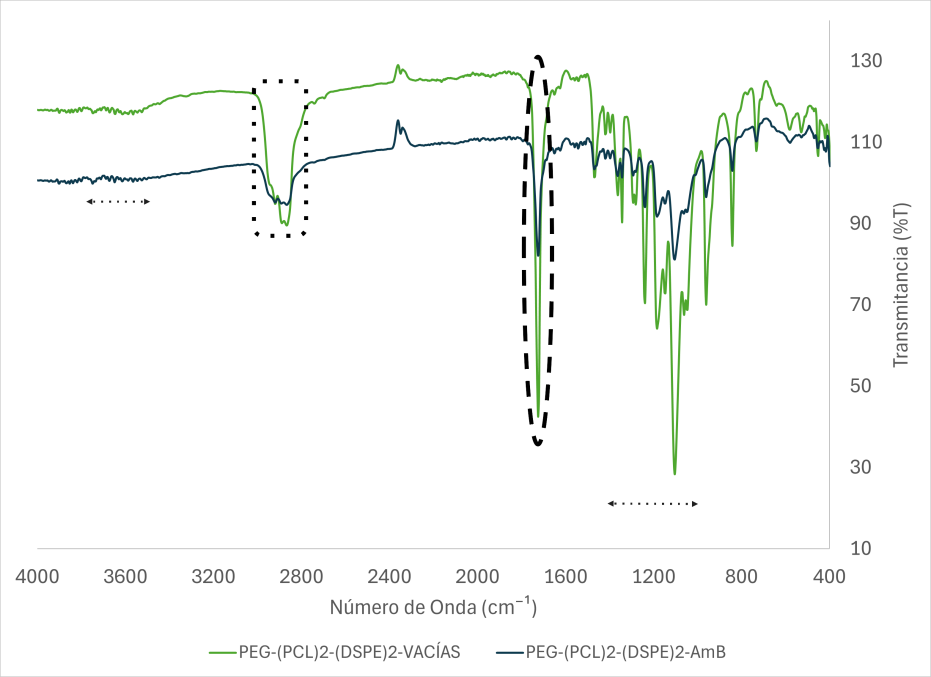


Figura C-3: Espectros FTIR se los sistemas nanoparticulados PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB y PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-vacío.

C.2 Soportes espectrales UV/VIS complementarios

En este apartado se presentan los espectros UV/VIS de los estudios de estabilidad para los ensayos realizados a pH de 6,8 (Figura C-4) y 7,4 (Figura C-5) respectivamente.

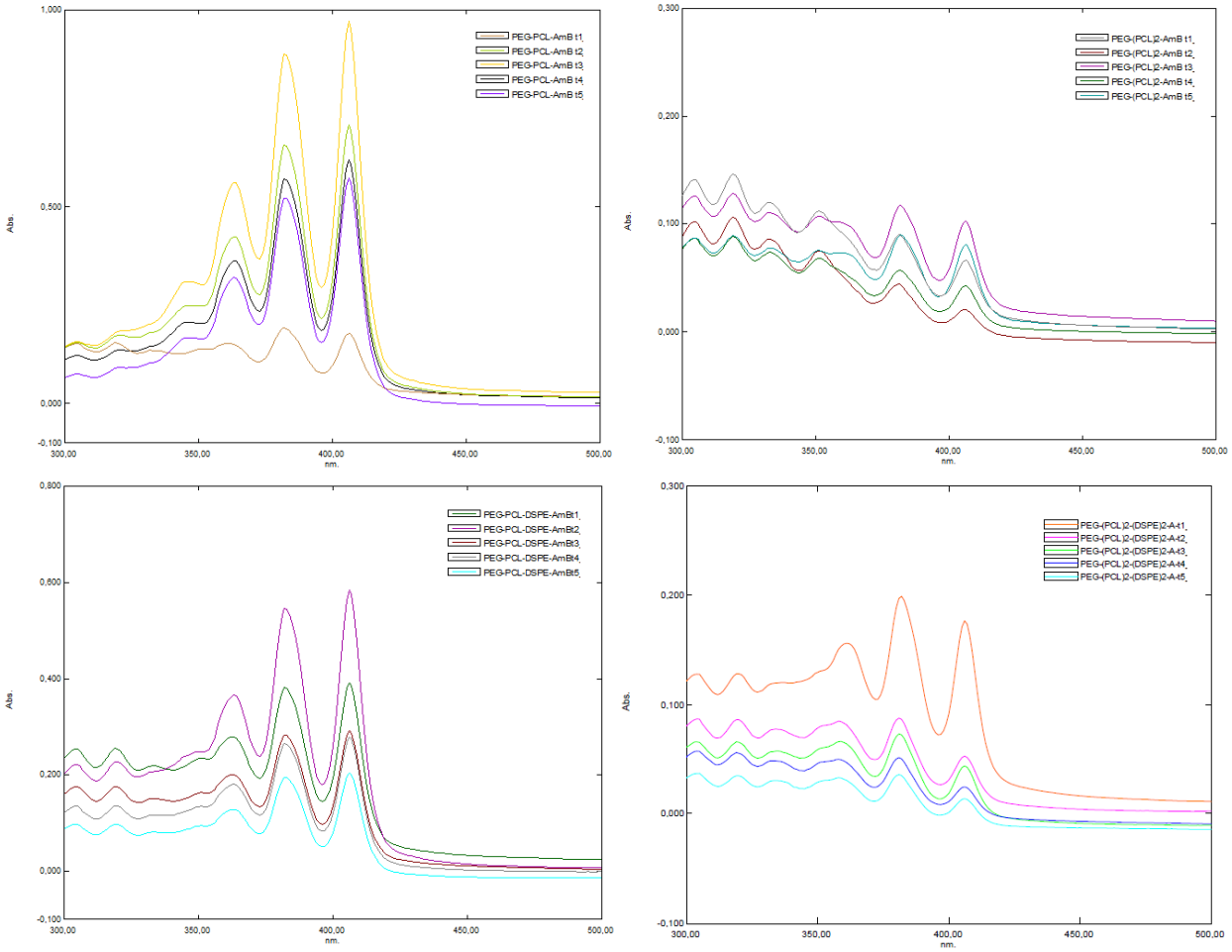


Figura C-4: Espectros UV/VIS se sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH 6,8. Arriba a la izquierda variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-PCL-AmB; a la derecha variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-$(PCL)_2$-AmB. Abajo a la izquierda variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-PCL-DSPE-AmB; a la derecha variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB.

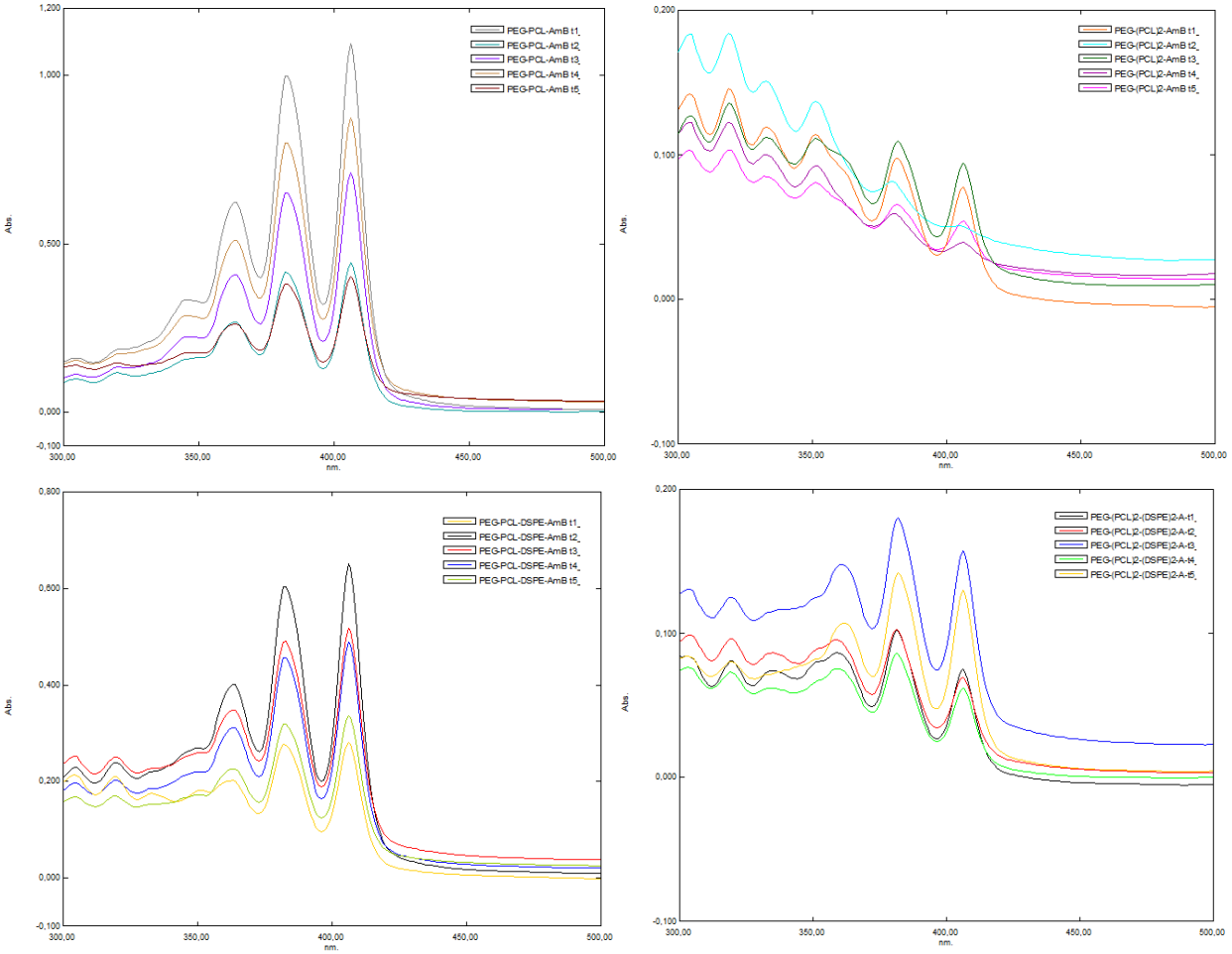


Figura C-5: Espectros UV/VIS se sistemas nanoparticulados sometidos a condiciones de pH 7,4. Arriba a la izquierda variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-PCL-AmB; a la derecha variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-$(PCL)_2$-AmB. Abajo a la izquierda variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-PCL-DSPE-AmB; a la derecha variación de espectros UV/VIS de nanopartículas de PEG-$(PCL)_2$-$(DSPE)_2$-AmB.

C.3 Soportes espectrales ^{1}H-RMN complementarios

En este apartado se presentan los espectros ^{1}H-RMN de los copolímeros complementarios que fueron sintetizados para el desarrollo y ejecución del presente estudio.

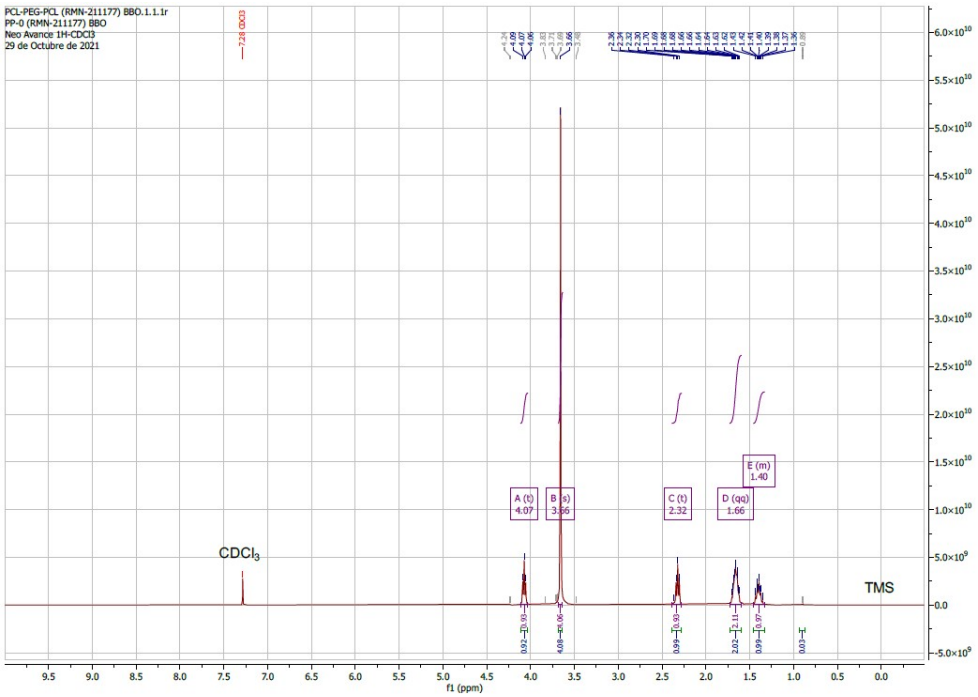


Figura C-6: Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros primera fase de síntesis. Espectro ^{1}H-RMN de copolímero PCL-PEG-PCL. Datos procesados con el software MestReNova®.

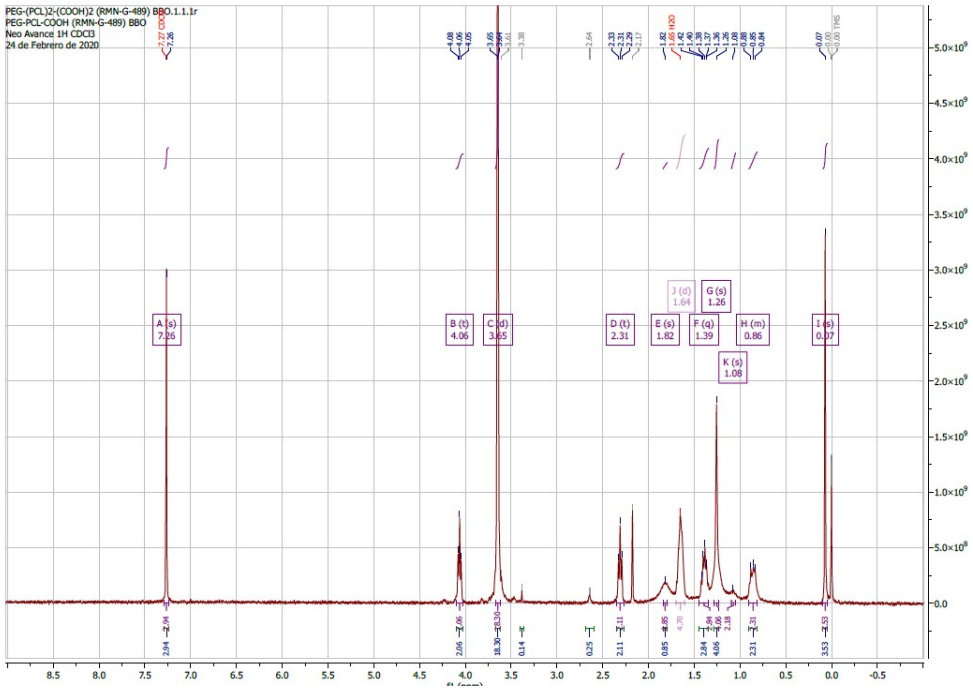


Figura C-7: Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros obtenidos como precursores para la conjugación. Espectro ^{1}H-RMN de copolímero COOH-PCL-PEG-PCL-COOH. Datos procesados con el software MestReNova®.

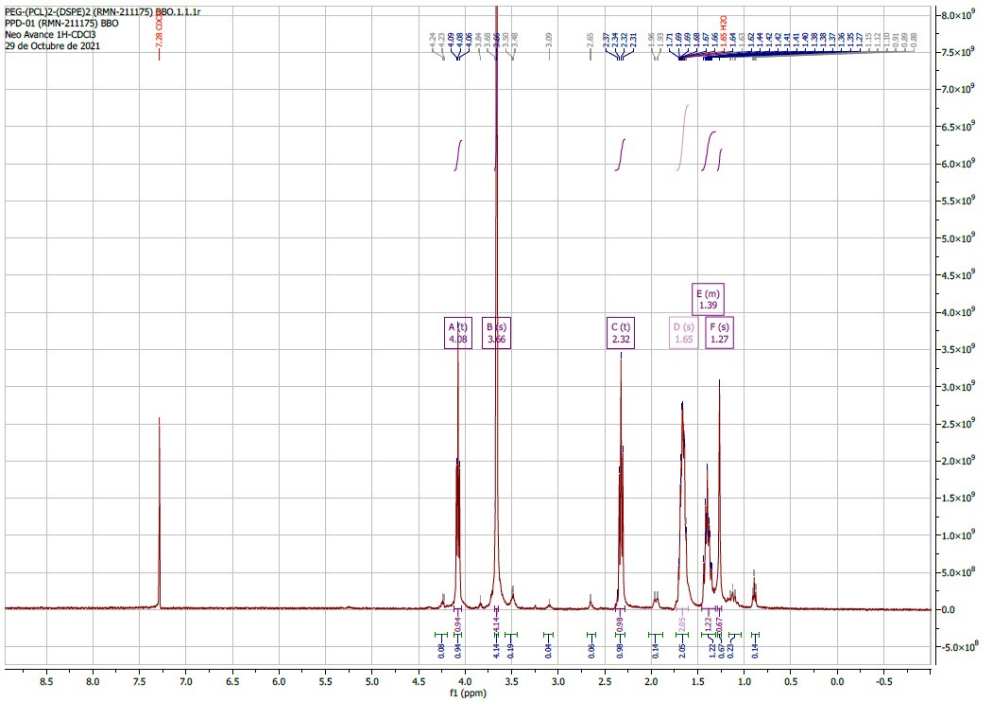


Figura C-8: Espectro ^{1}H-RMN de copolímeros conjugados con DSPE.Espectro ^{1}H-RMN de copolímero DSPE-PCL-PEG-PCL-DSPE. Datos procesados con el software MestReNova®.

Referencias Bibliográficas

[1] Berta Fernández Ledesma, Natalia A. Mendoza Palomar, and José Tomás Ramos Amador. Infección fúngica invasiva (ifi). Asociación Española de Pediatría, 2023. Guía/consenso AEP.

[2] C. Figueras Nadal, C. Díaz de Heredia Rubio, and M. L. Navarro. Infección fúngica invasiva (ifi): actualización. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2011. Documento en línea. Accedido el: 08-sep-2025.

[3] Diana Rey Sánchez, Laura Bernal Vaca, Melva Yomary Linares Linares, Claudia Marcela Parra Giraldo, Javier Ricardo Garzón Erazo, Sandra Liliana Valderrama Beltrán, Alejandra Cañas Arboleda, et al. Infección fúngica invasiva en pacientes inmunosuprimidos atendidos en un hospital de tercer nivel. *Revista Colombiana de Neumología*, 28(1):10--16, 2016.

[4] Jose Sifuentes-Osornio, Dora E Corzo-León, and L Alfredo Ponce-de León. Epidemiology of invasive fungal infections in latin america. *Current fungal infection reports*, 6(1):23--34, 2012.

[5] Gilbert Deray. Amphotericin b nephrotoxicity. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49(suppl_1):37--41, 2002.

[6] Richard J Hamill. Amphotericin b formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73:919--934, 2013.

[7] INVIMA. Información para profesionales de la salud, pacientes y cuidadores: Anfotericina b, Aug 2017. Documento oficial (boletín de seguridad). Accedido el: 08-sep-2025.

[8] JA Diaz, JR Urrego-Novoa, JA Moreno, C Huérfano, and VA Prieto. Análisis de costo-efectividad de anidulafungina en el tratamiento de la candidiasis invasiva en colombia. *Value in Health*, 18(7):A870, 2015.

[9] Celeste Alvarez, Dae Hwan Shin, and Glen S Kwon. Reformulation of fungizone by peg-dspe micelles: deaggregation and detoxification of amphotericin b. *Pharmaceutical research*, 33:2098--2106, 2016.

[10] Ivonne L Diaz and Leon D Perez. Synthesis and micellization properties of triblock copolymers pdmaema-b-pcl-b-pdmaema and their applications in the fabrication of amphotericin b-loaded nanocontainers. *Colloid and Polymer Science*, 293:913--923, 2015.

[11] Dolores R Serrano and Aikaterini Lalatsa. Oral amphotericin b: The journey from bench to market. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 42:75--83, 2017.

[12] Xiaochun Wang, Imran Shair Mohammad, Lifang Fan, Zongmin Zhao, Md Nurunnabi, Marwa A Sallam, Jun Wu, Zhongjian Chen, Lifang Yin, and Wei He. Delivery strategies of amphotericin b for invasive fungal infections. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(8):2585--2604, 2021.

[13] Martin Hoenigl, Volker Strenger, Walter Buzina, Thomas Valentin, Christoph Koidl, Albert Wölfler, Katharina Seeber, Angelika Valentin, Anna T Strohmeier, Ines Zollner-Schwetz, et al. European organization for the research and treatment of cancer/mycoses study group (eortc/msg) host factors and invasive fungal infections in patients with haematological malignancies. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(8):2029--2033, 2012.

[14] Patricia Escandón, Catalina de Bedout, Jairo Lizarazo, Clara Inés Agudelo, Ángela Tobón, Solmara Bello, Ángela Restrepo, and Elizabeth Castañeda. Cryptococcosis in colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomédica*, 32(3):386--398, 2012.

[15] Amalia del Palacio, Julia Villar, and Almudena Alhambra. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(1):2--7, 2009.

[16] Isabel Ruiz-Camps and Manuel Cuenca-Estrella. Antifúngicos para uso sistémico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(6):353--362, 2009.

[17] Ihor Bekersky, Robert M Fielding, Dawna E Dressler, Jean W Lee, Donald N Buell, and Thomas J Walsh. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin b (ambisome) and amphotericin b deoxycholate in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(3):828--833, 2002.

[18] Luis Thompson Moya, Hélio Sader, Marcelo Wolff Reyes, C Larrañaga, and Luis Bavestrello Fernández. Nuevas alternativas en el armamento anti infeccioso que el clínico debe conocer. *Rev. chil. infectol*, pages S26--S27, 2002.

[19] Helene Vogelsinger, Stefan Weiler, Angela Djanani, Jordan Kountchev, Rosa Bellmann-Weiler, Christian J Wiedermann, and Romuald Bellmann. Amphotericin b tissue distribution in autopsy material after treatment with liposomal amphotericin b and amphotericin b colloidal dispersion. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6):1153--1160, 2006.

[20] Laurence H Wang, Robert M Fielding, Philip C Smith, and Luke SS Guo. Comparative tissue distribution and elimination of amphotericin b colloidal dispersion (amphocil®) and fungizone® after repeated dosing in rats. *Pharmaceutical research*, 12:275--283, 1995.

[21] Mercedes Catalán and Juan Carlos Montejo. Antifúngicos sistémicos. farmacodinamia y farmacocinética. *Revista iberoamericana de micología*, 23(1):39--49, 2006.

[22] Elsa Ruth Arias Patrón. Caracterización de copolímeros en bloque conjugados como vehículos nanoestructurados para anfotericina b. Master's thesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias--Química, Bogotá, Colombia, 2020.

[23] DrugBank. Uses, interactions, mechanism of action amphotericin b, Jun 2005. Accedido el: 08-oct-2024.

[24] Dolores R. Serrano López. *Nuevas formulaciones orales, tópicas y parenterales de anfotericina B con acción antifúngica y antiparasitaria*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 2013.

[25] Arthur J Atkinson Jr and John E Bennett. Amphotericin b pharmacokinetics in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(2):271--276, 1978.

[26] Ana C Mesa-Arango, Liliana Scorzoni, and Oscar Zaragoza. It only takes one to do many jobs: Amphotericin b as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology*, 3:286, 2012.

[27] Thomas M Anderson, Mary C Clay, Alexander G Cioffi, Katrina A Diaz, Grant S Hisao, Marcus D Tuttle, Andrew J Nieuwkoop, Gemma Comellas, Nashrah Maryum, Shu Wang, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology*, 10(5):400--406, 2014.

[28] Raquel Fernández-García, Esther de Pablo, María Paloma Ballesteros, and Dolores R Serrano. Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin b and drug targeting. *International journal of pharmaceutics*, 525(1):139--148, 2017.

[29] Jodi M Lestner, Susan J Howard, Joanne Goodwin, Lea Gregson, Jayesh Majithiya, Thomas J Walsh, Gerard M Jensen, and William W Hope. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of amphotericin b deoxycholate, liposomal amphotericin b, and amphotericin b lipid complex in an in vitro model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(8):3432--3441, 2010.

[30] Min Liu, Meiwan Chen, and Zhiwen Yang. Design of amphotericin b oral formulation for antifungal therapy. *Drug delivery*, 24(1):1--9, 2017.

[31] Avnesh Kumari, Rubbel Singla, Anika Guliani, and Sudesh Kumar Yadav. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI journal*, 13:265, 2014.

[32] PN Ezhilarasi, P Karthik, Narayansing Chhanwal, and C Anandharamakrishnan. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and bioprocess technology*, 6:628--647, 2013.

[33] Seid Mahdi Jafari. An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, pages 1--34, 2017.

[34] C Anandharamakrishnan and C Anandharamakrishnan. Nanoencapsulation of food bioactive compounds. *Techniques for nanoencapsulation of food ingredients*, pages 1--6, 2014.

[35] Hugo Espinosa Andrews and Eristeo García Márquez. Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos, 2017.

[36] Juan Manuel Llabot, Santiago Daniel Palma, and D Allemandi. Nanopartículas poliméricas sólidas. *Nuestra Farmacia*, 53:40--47, 2008.

[37] C Anandharamakrishnan and C Anandharamakrishnan. Characterization of nanoparticles. *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*, pages 65--67, 2014.

[38] J Batalla Mayoral, A Cuadros Moreno, and E San Martín Martínez. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4):19, 2014.

[39] SANDRA YASMIN RODRIGUEZ GONZALEZ. Técnicas de análisis para evaluación de materiales nanoestructurados y su aplicación en nanomedicina, 2011.

[40] Claudia Luengo-Alonso, Juan José Torrado, Maria Paloma Ballesteros, Alessio Malfanti, Sara Bersani, Stefano Salmaso, and Paolo Caliceti. A novel performing peg-cholane nanoformulation for amphotericin b delivery. *International journal of pharmaceutics*, 495(1):41--51, 2015.

[41] Costas Demetzos. Biophysics and thermodynamics: the scientific building blocks of bio-inspired drug delivery nano systems. *AAPS PharmSciTech*, 16(3):491--495, 2015.

[42] A Vila, A Sanchez, M Tobıo, P Calvo, and MJ Alonso. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of controlled release*, 78(1-3):15--24, 2002.

[43] JMT Hamilton-Miller. The effect of ph and of temperature on the stability and bioactivity of nystatin and amphotericin b. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25(5):401--407, 1973.

[44] United States Pharmacopeia. *United States Pharmacopeia 38 --- National Formulary 33 (USP 38--NF 33)*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USA, 2015.

[45] F Rocha Formiga. Nanosistemas a base de poliésteres. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2009.

[46] Blanca Inés y Ganem Adriana y Quintanar David Chávez, Fabiola y Olvera. Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46(4):349--356, 2002.

[47] Marcos Luciano Bruschi. 5 - mathematical models of drug release. In Marcos Luciano Bruschi, editor, *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, pages 63--86. Woodhead Publishing, 2015.

[48] Richard W Korsmeyer, Robert Gurny, Eric Doelker, Pierre Buri, and Nikolaos A Peppas. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceutics*, 15(1):25--35, 1983.

[49] Kosmas Kosmidis and George Dassios. Monte carlo simulations in drug release. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 46:165--172, 2019.

[50] Carla Soares de Souza, Victor Ropke da Cruz Lopes, Gabriel Barcellos, Francisco Alexandrino-Junior, Patrícia Cristina da Costa Neves, Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio, Helvécio Vinícius Antunes Rocha, Ana Paula Dinis Ano Bom, and Alexandre Bezerra Conde Figueiredo. Unleashing fungicidal forces: Exploring the synergistic power of amphotericin b-loaded nanoparticles and monoclonal antibodies. *Journal of Fungi*, 10(5):344, 2024.

[51] MA Dasilva, KF Crespo Andrada, M Maldonado Torales, I Manrrique Hughes, P Pez, JC García-Martínez, and María Gabriela Paraje. Synergistic activity of gold nanoparticles with amphotericin b on persister cells of candida tropicalis biofilms. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1):254, 2024.

[52] Khadijeh Rajablou, Hossein Attar, Seyyed Kazem Sadjady, and Amir Heydarinasab. Dspc based polymeric micelles loaded with amphotericin b: synthesis, characterization, and in vitro study. *Nanomedicine Research Journal*, 8(1):37--49, 2023.

[53] Nandha Joyson, Anchal Pathak, and Keerti Jain. One platform comparison of polymeric and lipidic nanoparticles for the delivery of amphotericin b. *AAPS PharmSciTech*, 24(8):226, 2023.

[54] Songul Ulag, Sureyya Elif Celik, Mustafa Sengor, and Oguzhan Gunduz. Fabrication of amphotericin-b-loaded sodium alginate nanoparticles for biomedical applications. *BioNanoScience*, 12(4):1230--1237, 2022.

[55] Phyo Darli Maw, Prompong Pienpinijtham, Patamaporn Pruksakorn, and Phatsawee Jansook. Cyclodextrin-based pickering nanoemulsions containing amphotericin b: Part ii. formulation, antifungal activity, and chemical stability. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 69:103174, 2022.

[56] Aamir Sohail, Rahat Ullah Khan, Momin Khan, Mehvish Khokhar, Safat Ullah, Arshad Ali, Hazrat Bilal, Saadullah Khattak, Mirwaise Khan, and Baseer Ahmad. Comparative efficacy of amphotericin b-loaded chitosan nanoparticles and free amphotericin b drug against leishmania tropica. *Bulletin of the National Research Centre*, 45:1--9, 2021.

[57] Elsa R Arias, Vivian Angarita-Villamizar, Yolima Baena, Claudia Parra-Giraldo, and Leon D Perez. Phospholipid-conjugated peg-b-pcl copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin b. *Polymers*, 13(11):1747, 2021.

[58] Pratthana Chomchalao, Pataranapa Nimtrakul, Duy Toan Pham, and Waree Tiyaboonchai. Development of amphotericin b-loaded fibroin nanoparticles: a novel approach for topical ocular application. *Journal of Materials Science*, 55(12):5268--5279, 2020.

[59] Yeimy J Rodriguez, Luis F Quejada, Jean C Villamil, Yolima Baena, Claudia M Parra-Giraldo, and Leon D Perez. Development of amphotericin b micellar formulations based on copolymers of poly (ethylene glycol) and poly (ε-caprolactone) conjugated with retinol. *Pharmaceutics*, 12(3):196, 2020.

[60] Benedikt Göttel, Henrike Lucas, Frank Syrowatka, Wolfgang Knolle, Judith Kuntsche, Joana Heinzelmann, Arne Viestenz, and Karsten Mäder. In situ gelling amphotericin b nanofibers: a new option for the treatment of keratomycosis. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8:600384, 2020.

[61] Célia Faustino and Lídia Pinheiro. Lipid systems for the delivery of amphotericin b in antifungal therapy. *Pharmaceutics*, 12(1):29, 2020.

[62] Shabi Parvez, Ganesh Yadagiri, Mallikarjuna Rao Gedda, Aakriti Singh, Om Prakash Singh, Anurag Verma, Shyam Sundar, and Shyam Lal Mudavath. Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with amphotericin b and paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis. *Scientific Reports*, 10(1):12243, 2020.

[63] Pataranapa Nimtrakul, Waree Tiyaboonchai, and Supaporn Lamlertthon. Amphotericin b loaded nanostructured lipid carriers for parenteral delivery: characterization, antifungal and in vitro toxicity assessment. *Current drug delivery*, 16(7):645--653, 2019.

[64] Aiman Abu Ammar, Abed Nasereddin, Suheir Ereqat, Mary Dan-Goor, Charles L Jaffe, Eyal Zussman, and Ziad Abdeen. Amphotericin b-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. *Drug Delivery and Translational Research*, 9:76--84, 2019.

[65] MD Ashraf, Javed Abrar Farooqi, and Kalim Javed. Evaluation of macrophage injury and activation by amphotericin b-loaded polymeric nanoparticles. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(5):297--306, 2018.

[66] Hafiz Shoaib Sarwar, Muhammad Farhan Sohail, Noushin Saljoughian, Anees Ur Rehman, Sohail Akhtar, Akhtar Nadhman, Masoom Yasinzai, Howard E Gendelman, Abhay R Satoskar, and Gul Shahnaz. Design of mannosylated oral amphotericin b nanoformulation: Efficacy and safety in visceral leishmaniasis. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1):521--531, 2018.

[67] Claudia Luengo Alonso. *Nuevas formulaciones para la liberación de anfotericina B*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 2018.

[68] Mahasen A Radwan, Bushra T AlQuadeib, Lidija Šiller, Matthew C Wright, and Benjamin Horrocks. Oral administration of amphotericin b nanoparticles: antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats. *Drug Delivery*, 24(1):40--50, 2017.

[69] TC Moraes Moreira Carraro, C Altmeyer, N Maissar Khalil, and R Mara Mainardes. Assessment of in vitro antifungal efficacy and in vivo toxicity of amphotericin b-loaded plga and plga-peg blend nanoparticles. *Journal de mycologie medicale*, 27(4):519--529, 2017.

[70] Tessa Rui Min Tan, Kong Meng Hoi, Peiqing Zhang, and Say Kong Ng. Characterization of a polyethylene glycol-amphotericin b conjugate loaded with free amb for improved antifungal efficacy. *PLoS One*, 11(3):e0152112, 2016.

[71] Ivonne L Diaz, Claudia Parra, Melva Linarez, and Leon D Perez. Design of micelle nanocontainers based on pdmaema-b-pcl-b-pdmaema triblock copolymers for the encapsulation of amphotericin b. *AAPS PharmSciTech*, 16:1069--1078, 2015.

[72] Xiaolong Tang, Jingjing Dai, Jun Xie, Yongqiang Zhu, Ming Zhu, Zhi Wang, Chunmei Xie, Aixia Yao, Tingting Liu, Xiaoyu Wang, et al. Enhanced antifungal activity by ab-modified amphotericin b-loaded nanoparticles using a ph-responsive block copolymer. *Nanoscale Research Letters*, 10:1--11, 2015.

[73] Ying-Chen Chen, Chia-Yu Su, Hua-Jun Jhan, Hsiu-O Ho, and Ming-Thau Sheu. Physical characterization and in vivo pharmacokinetic study of self-assembling amphotericin b-loaded lecithin-based mixed polymeric micelles. *International Journal of Nanomedicine*, pages 7265--7274, 2015.

[74] Jing Zhou and Xue-hua Jiang. Formulation conditions on the drug loading properties of polymeric micelles. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2), 2019.

[75] Jennifer B Dressman, Gordon L Amidon, Christos Reppas, and Vinod P Shah. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical research*, 15:11--22, 1998.

[76] United States Pharmacopeia. *United States Pharmacopeia 41 --- National Formulary 36 (USP 41--NF 36): Test Solutions and Indicator Solutions*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USA, 2024.

[77] Eleftheria Nicolaides, Moira Symillides, Jennifer B Dressman, and Christos Reppas. Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharmaceutical research*, 18:380--388, 2001.

[78] Milo Gibaldi and Stuart Feldman. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of pharmaceutical sciences*, 56(10):1238--1242, 1967.

[79] Diego Rafael Monterroza Hernandez. *Desarrollo y validación de un método para evaluar la disolución de progesterona en suspensión oleosa contenida en una cápsula blanda de gelatina*. PhD thesis, Universidad Nacional de Colombia, 2016.

[80] Diego R Monterroza, Claudia M Baena-Aristizábal, Yolima Baena, et al. Development of a method to assess the dissolution of soft gelatin capsules containing progesterone in oily suspension. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(4):163--170, 2024.

[81] Juan José Carrascal Sánchez. *Evaluación del comportamiento fisicoquímico y antimicrobiano de complejos con polielectrolitos*. PhD thesis, Universidad Nacional de Colombia, 2021.

[82] Surbhi Mundra, Jay Kumar, Diva Maheshwari, Vaibhav K Shukla, Rahul Yadav, SVS Rama Krishna Pulavarti, and Ashish Arora. Protein labeling and structure determination by nmr spectroscopy. In *Biophysical and Computational Tools in Drug Discovery*, pages 65--131. Springer, 2021.

[83] Jing Che, Chukwunweike I Okeke, Zhong-Bo Hu, and Jing Xu. Dspe-peg: a distinctive component in drug delivery system. *Current pharmaceutical design*, 21(12):1598--1605, 2015.

[84] Mahdi Karimi, Amir Ghasemi, Parham Sahandi Zangabad, Reza Rahighi, S Masoud Moosavi Basri, H Mirshekari, M Amiri, Z Shafaei Pishabad, A Aslani, M Bozorgomid, et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 45(5):1457--1501, 2016.

[85] Robert Langer and Nicholas A Peppas. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE Journal*, 49(12):2990--3006, 2003.

[86] Fabienne Danhier, Eduardo Ansorena, Joana M Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, and Véronique Préat. Plga-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, 161(2):505--522, 2012.

[87] Vladimir P Torchilin. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*, 4(2):145--160, 2005.

[88] May M Eid. Characterization of nanoparticles by ftir and ftir-microscopy. In *Handbook of consumer nanoproducts*, pages 1--30. Springer, 2022.

[89] Barbara H Stuart. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2004.

[90] S PURI. Techniques for nanoparticles characterization. *Modern physics: concepts and applications*, 2004.

[91] Sourav Bhattacharjee. Dls and zeta potential--what they are and what they are not? *Journal of controlled release*, 235:337--351, 2016.

[92] MRMM Danaei, Mahvash Dehghankhold, Somayeh Ataei, F Hasanzadeh Davarani, R Javanmard, A Dokhani, S Khorasani, and MR Mozafari. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2):57, 2018.

[93] Jean C Villamil, Claudia M Parra-Giraldo, and León D Pérez. Enhancing the performance of peg-b-pcl copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin b through its conjugation with cholesterol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 572:79--87, 2019.

[94] Belén Begines, Tamara Ortiz, María Pérez-Aranda, Guillermo Martínez, Manuel Merinero, Federico Argüelles-Arias, and Ana Alcudia. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials*, 10(7):1403, 2020.

[95] Bibiana Margarita Rojas Cortés, Manuel Guillermo y Vallejo Díaz and Jairo Ernesto Perilla. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Ingeniería e Investigación*, 28(1):57--71, 2008.

[96] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Dissolution testing and acceptance criteria for immediate-release solid oral dosage form drug products containing high solubility drug substances: Guidance for industry, 1997. Accessed: October 10, 2024.

[97] René Holm, Anette Müllertz, and Huiling Mu. Bile salts and their importance for drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1):44--55, 2013.

[98] Phawanan Sawangchan, Francisco Alexandrino Júnior, Éverton N Alencar, Eryvaldo ST Egito, and Lee E Kirsch. The role of aggregation and ionization in the chemical instability of amphotericin b in aqueous methanol. *International Journal of Pharmaceutics*, 632:122586, 2023.

[99] VD Daniels and NH Rees. Analysis of the ultraviolet/visible spectrum of degraded poly (vinyl chloride) to determine polyene concentrations. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 12(9):2115--2122, 1974.

[100] Éverton N Alencar, Phawanan Sawangchan, Lee E Kirsch, and Eryvaldo Sócrates T Egito. Unveiling the amphotericin b degradation pathway and its kinetics in lipid-based solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(3):1248--1258, 2021.

[101] Marciela B Montenegro, Stefânia P de Souza, Raquel AC Leão, Helvécio VA Rocha, Claudia M de Rezende, and Rodrigo OMA de Souza. Methodology development and validation of amphotericin b stability by hplc-dad. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(5):916--926, 2020.

[102] Phawanan Sawangchan. *The effect of aggregation state on the degradation kinetics of Amphotericin B in aqueous solution*. The University of Iowa, 2017.

[103] John D Cleary, Stanley W Chapman, Edwin Swiatlo, and Robert Kramer. High purity amphotericin b. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(6):1331--1340, 2007.

[104] Soheyla Honary and Foruhe Zahir. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (part 1). *Tropical journal of pharmaceutical research*, 12(2):255--264, 2013.

[105] Rina Takayama, Yutaka Inoue, Isamu Murata, and Ikuo Kanamoto. Characterization of nanoparticles using dspe-peg2000 and soluplus. *Colloids and Interfaces*, 4(3):28, 2020.

[106] Fei Yu, Mingtao Ao, Xiao Zheng, Nini Li, Junjie Xia, Yang Li, Donghui Li, Zhenqing Hou, Zhongquan Qi, and Xiao Dong Chen. Peg--lipid--plga hybrid nanoparticles loaded with berberine--phospholipid complex to facilitate the oral delivery efficiency. *Drug delivery*, 24(1):825--833, 2017.

[107] Kavita R Gajbhiye, Rajesh Salve, Mahavir Narwade, Afsana Sheikh, Prashant Kesharwani, and Virendra Gajbhiye. Lipid polymer hybrid nanoparticles: a custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. *Molecular Cancer*, 22(1):160, 2023.

[108] Jennifer Cuellar, Lorena Parada-Díaz, Jorge Garza, and Sol M Mejía. A theoretical analysis of interaction energies and intermolecular interactions between amphotericin b and potential bioconjugates used in the modification of nanocarriers for drug delivery. *Molecules*, 28(6):2674, 2023.

[109] Bushra T Al-Quadeib, Mahasen A Radwan, Lidija Siller, Benjamin Horrocks, and Matthew C Wright. Stealth amphotericin b nanoparticles for oral drug delivery: In vitro optimization. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3):290--302, 2015.

[110] Marcos Luciano Bruschi. *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*. Woodhead Publishing, 2015.

[111] Shama Parveen, Pratishtha Gupta, Saurabh Kumar, and Monisha Banerjee. Lipid polymer hybrid nanoparticles as potent vehicles for drug delivery in cancer therapeutics. *Medicine in Drug Discovery*, 20:100165, 2023.

[112] Philip Grossen, Dominik Witzigmann, Sandro Sieber, and Jörg Huwyler. Peg-pcl-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *Journal of Controlled Release*, 260:46--60, 2017.

[113] Xiaoming Zhong, Jianqiong Yang, Hongyan Liu, Zhiwen Yang, and Ping Luo. Potential lipid-based strategies of amphotericin b designed for oral administration in clinical application. *Drug Delivery*, 30(1):2161671, 2023.

[114] Francelise B Cavassin, João Luiz Baú-Carneiro, Rogério R Vilas-Boas, and Flávio Queiroz-Telles. Sixty years of amphotericin b: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(1):115--147, 2021.

[115] Vasiliki Papadopoulou, Kosmas Kosmidis, Marilena Vlachou, and Panos Macheras. On the use of the weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International journal of pharmaceutics*, 309(1-2):44--50, 2006.

[116] Monica Boffito, Paolo Sirianni, Anna Maria Di Rienzo, and Valeria Chiono. Thermosensitive block copolymer hydrogels based on poly (-caprolactone) and polyethylene glycol for biomedical applications: state of the art and future perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3):1276--1290, 2015.

[117] Maria Chountoulesi, Dimitrios Selianitis, Stergios Pispas, and Natassa Pippa. Recent advances on peo-pcl block and graft copolymers as nanocarriers for drug delivery applications. *Materials*, 16(6):2298, 2023.

[118] Barbora Tomalova, Milada Sirova, Pavel Rossmann, Robert Pola, Jiri Strohalm, Petr Chytil, Viktor Cerny, Jakub Tomala, Martina Kabesova, Blanka Rihova, et al. The structure-dependent toxicity, pharmacokinetics and anti-tumour activity of hpma copolymer conjugates in the treatment of solid tumours and leukaemia. *Journal of Controlled Release*, 223:1--10, 2016.

[119] Tang Li, David Cipolla, Thomas Rades, and Ben J Boyd. Drug nanocrystallisation within liposomes. *Journal of Controlled Release*, 288:96--110, 2018.

[120] TJJOPS Higuchi. Mechanism of sustained-action medication. theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of pharmaceutical sciences*, 52(12):1145--1149, 1963.

[121] NA Peppas. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4):110--111, 1985.

[122] Antoine Tardy, Julien Nicolas, Didier Gigmes, Catherine Lefay, and Yohann Guillaneuf. Radical ring-opening polymerization: Scope, limitations, and application to (bio) degradable materials. *Chemical reviews*, 117(3):1319--1406, 2017.

[123] IHT Guideline. Validation of analytical procedures q2 (r2). *ICH: Geneva, Switzerland*, 2024.

[124] Julio Collazos, Eduardo Martínez, Jose Mayo, and Ibarra Sofía. Pulmonary reactions during treatment with amphotericin b: review of published cases and guidelines for management. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7):e75--e82, 2001.

[125] Zhiwen Yang, Min Liu, Jian Chen, Weijun Fang, Yanli Zhang, Man Yuan, and Jie Gao. Development and characterization of amphotericin b nanosuspensions for oral administration through a simple top-down method. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(6):569--576, 2014.

[126] Liam M Dalton, Carol A Kauffman, and Marisa H Miceli. Oral lipid nanocrystal amphotericin b (mat2203) for the treatment of invasive fungal infections. In *Open Forum Infectious Diseases*, volume 11, page ofae346. Oxford University Press US, 2024.

[127] Zeyad AlMajed, Najla M Salkho, Hana Sulieman, and Ghaleb A Husseini. Modeling of the in vitro release kinetics of sonosensitive targeted liposomes. *Biomedicines*, 10(12):3139, 2022.

[128] KH Ramteke, PA Dighe, AR Kharat, SV Patil, et al. Mathematical models of drug dissolution: a review. *Sch. Acad. J. Pharm*, 3(5):388--396, 2014.

[129] Theresa M Allen and Pieter R Cullis. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1):36--48, 2013.

[130] ITW Reagents. Amfotericina B Biochemica. `https://itwreagents.com/iberia/es/product/amfotericina+b+biochemica/A1907`, 2024. Accedido el: 07-oct-2024.