

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

**PREPARACIÓN DE DISPERSIONES LIPÍDICAS DE TALLA
SUBMICRÓNICA POR MEDIO DEL MÉTODO DE
EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB DAVID TAMAYO ESQUIVEL

TUTOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

2005



Ciencias
Químicas

M343388



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David Quintanar y a la Dra. Adriana Ganem por todo el apoyo para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado por los comentarios hechos al presente trabajo.

A la Dra. Luisa Martínez Aguilar y a la QFB Marlen Navarrete Rodríguez por el apoyo brindado en la evaluación biológica de las dispersiones lipídicas de Omapatrilat.

Al técnico Rodolfo Robles de la FESC por su colaboración en la toma de las imágenes por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.

Multiquim México y Grindsted Dinamarca por la generosa donación de los materiales lipídicos.

Al CONACyT y a la DGEP por las becas otorgadas durante mis estudios de Maestría.

A SECYBS-COMECyT por la beca otorgada durante los dos últimos semestres de mis estudios de Maestría.

A la DGAPA y al CONACyT por el financiamiento otorgado a los proyectos PAPIIT IN214000 y J27741-M respectivamente, a los cuales pertenece la presente tesis.

Y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado humana y profesionalmente.

DEDICATORIAS

A mi mamá Catalina Esquivel Valdez y a mi papá Elías Tamayo Ortega por el apoyo y confianza que una vez más me han brindado. Gracias.

El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría del Dr. David Quintanar Guerrero en el Laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Jurado asignado:

| | |
|--------------|----------------------------------|
| Presidente | Dr. José Manuel Saniger Blesa |
| Vocal | Dra. Luz María Melgoza Contreras |
| Secretario | Dr. Jesús Gracia Fadrique |
| 1er Suplente | Dr. Luis Miguel Trejo Candelas |
| 2do Suplente | Dra. Elena Golovataya Dzhymbeeva |

ÍNDICE GENERAL

| | CONTENIDO | PÁGINA |
|------|---|--------|
| I. | RESUMEN | 1 |
| II. | INTRODUCCIÓN | 2 |
| III. | ANTECEDENTES | 5 |
| | 3.1 DISPERSIONES LIPÍDICAS | 5 |
| | 3.1.1 Métodos de preparación de dispersiones lipídicas | 7 |
| | 3.1.1.1 Obtención de <i>nanopellets</i> | 10 |
| | 3.1.1.2 Método de emulsificación / evaporación | 10 |
| | 3.1.1.3 Obtención de lipoesferas | 10 |
| | 3.1.1.4 Homogeneización a alta presión para la producción de nanopartículas lipídicas sólidas | 11 |
| | 3.1.1.5 Nanopartículas lipídicas sólidas preparadas por medio de la técnica de microemulsión | 12 |
| | 3.1.1.6 Método de desplazamiento del disolvente en medio acuoso | 12 |
| | 3.1.1.7 Técnica de hidratación de película / homogeneización a alta presión | 12 |
| | 3.2 MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN (MED) | 13 |
| | 3.3 MONOLEATO DE GLICERIL (MONOLEÍNA) | 17 |
| | 3.3.1 Transición de fases: Fase cúbica | 17 |
| | 3.3.2 Usos e importancia de la monoleína | 20 |
| | 3.3.3 Dispersiones acuosas de monoleína | 21 |
| IV. | HIPÓTESIS | 28 |
| V. | OBJETIVOS | 29 |
| | 5.1 OBJETIVO GENERAL | 29 |
| | 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES | 29 |
| VI. | MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| | 6.1 MATERIALES | 30 |
| | 6.1.1 Materiales lipídicos | 30 |
| | 6.1.2 Polímeros estabilizantes y tensoactivos | 30 |
| | 6.1.3 Disolventes | 30 |
| | 6.1.4 Soluciones amortiguadora y reactivos | 31 |

| CONTENIDO | | PÁGINA |
|-----------|---|--------|
| 6.1.5 | Equipos e instrumentos | 29 |
| 6.1.6 | Material biológico | 29 |
| 6.2 | MÉTODOS | 30 |
| 6.2.1 | Solubilidad de los lípidos | 30 |
| 6.2.2 | Preparación de las dispersiones lipídicas por medio del método de emulsificación difusión | 30 |
| 6.2.3 | Preparación de las dispersiones lipídicas por medio del método de emulsificación difusión a temperatura controlada | 30 |
| 6.2.4 | Determinación del tamaño de partícula promedio (TPP) | 31 |
| 6.2.5 | Variables evaluadas del proceso | 31 |
| 6.2.5.1 | Influencia de la cantidad de lípido sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 31 |
| 6.2.5.2 | Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 31 |
| 6.2.5.3 | Efecto del tipo y la concentración de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 31 |
| 6.2.5.4 | Influencia del disolvente sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 33 |
| 6.2.5.5 | Monitoreo de la estabilidad física de las dispersiones lipídicas | 33 |
| 6.2.6 | Microscopía electrónica de barrido (MEB) | 33 |
| 6.2.7 | Evaluación de la eficiencia <i>in vivo</i> de las dispersiones lipídicas cargados con Omapatrilat (OMA) | 33 |
| 6.2.7.1 | Pruebas cualitativas de solubilidad del Omapatrilat en los distintos disolventes del método de emulsificación difusión | 33 |
| 6.2.7.2 | Preparación de las dispersiones lipídicas cargados con Omapatrilat | 34 |
| 6.2.7.3 | Estabilidad química del Omapatrilat y física de las dispersiones lipídicas de monoleína | 35 |

| CONTENIDO | | PÁGINA |
|-----------|---|--------|
| 6.2.7.4 | Administración del Omapatrilat a ratas genéticamente hipertensas (<i>SHR</i>) | 35 |
| 6.2.7.5 | Monitoreo de la presión arterial media (PAM) | 35 |
| 6.2.7.6 | Cálculo del porcentaje del efecto alcanzado en la presión arterial | 35 |
| VII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| 7.1 | SOLUBILIDAD DE LOS LÍPIDOS | 36 |
| 7.2 | PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS POR MEDIO DEL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE: GELUCIRE® 44/14 Y MONOLEÍNA | 38 |
| 7.2.1 | Influencia de la cantidad de Gelucire® 44/14 sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 38 |
| 7.2.2 | Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14 | 39 |
| 7.2.3 | Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14 | 40 |
| 7.2.4 | Influencia del disolvente sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14 | 42 |
| 7.2.5 | Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14 | 43 |
| 7.2.6 | Influencia de la cantidad de monoleína sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 44 |
| 7.2.7 | Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de monoleína | 45 |
| 7.2.8 | Influencia del disolvente sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de monoleína | 49 |
| 7.2.9 | Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de monoleína | 50 |
| 7.3 | PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS POR MEDIO DEL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN A TEMPERATURA CONTROLADA | 54 |

| CONTENIDO | | PÁGINA |
|-----------|--|--------|
| 7.3.1 | Influencia de la cantidad de Gelucire® 50/13 sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas | 54 |
| 7.3.2 | Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Compritol® ATO 888 | 55 |
| 7.3.3 | Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Compritol® ATO 888 | 57 |
| 7.3.4 | Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de Compritol® ATO 888 | 58 |
| 7.3.5 | Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Geleol® | 59 |
| 7.3.6 | Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Geleol® | 59 |
| 7.4 | MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) | 61 |
| 7.5 | EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA <i>IN VIVO</i> DE LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS CARGADOS CON OMAPATRILAT (OMA) | 64 |
| 7.5.1 | Solubilidad del Omapatrilat en los disolventes del método de emulsificación difusión | 65 |
| 7.5.2 | Preparación de los sistemas submicrónicos cargados con Omapatrilat | 66 |
| 7.5.3 | Estabilidad química del Omapatrilat y física de las dispersiones lipídicas de monoleína | 66 |
| 7.5.4 | Administración del Omapatrilat a ratas genéticamente hipertensas (<i>SHR</i>) | 67 |
| VIII. | CONCLUSIONES | 72 |
| IX. | PERSPECTIVAS | 74 |
| X. | REFERENCIAS | 75 |
| XI. | ANEXOS | 82 |
| 11.1 | PROPIEDADES DE LOS LÍPIDOS | 82 |
| 11.1.1 | Compritol 888 ATO* | 82 |

| CONTENIDO | | PÁGINA |
|------------------|---|---------------|
| 11.1.2 | Geleol [®] | 83 |
| 11.1.3 | Gelucire [®] 44/14 | 84 |
| 11.1.4 | Gelucire [®] 50/13 | 85 |
| 11.1.5 | Monoleato de glicerilo (Monoleína) | 86 |
| 11.2 | DETERMINACIÓN DE OMAPATRILAT DISUELTO EN LA FASE ACUOSA | 87 |
| 11.3 | PRUEBA PARA LA ESTABILIDAD DEL OMAPATRILAT FORMULADO EN LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS DE MONOLEÍNA | 87 |
| 11.4 | GUÍA SOBRE IMPUREZAS DE DISOLVENTES RESIDUALES PARA LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA | 90 |

ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA | NOMBRE | PÁGINA |
|----------|--|--------|
| Tabla 1 | Lípidos y emulsificantes usados para la preparación de nanopartículas lipídicas (Mehnert y Mäder, 2001). | 5 |
| Tabla 2 | Ejemplos de material lipídico, estabilizante y técnica usada para la preparación de SLN. | 7 |
| Tabla 3 | Polímeros, estabilizantes y disolventes usados para el MED, así como algunos fármacos incorporados en las NP's preparadas por este método. | 13 |
| Tabla 4 | Métodos reportados para la preparación dispersiones de la FC de la MO. | 22 |
| Tabla 5 | Distintos lípidos para la preparación de los sistemas lipídicos de talla nanométrica. | 37 |
| Tabla 6 | Distintos lípidos para la preparación de los sistemas nanoparticulados. | 38 |
| Tabla 7 | Prueba cualitativa de solubilidad de los lípidos para la preparación de sistemas nanoparticulados. | 38 |
| Tabla 8 | Efecto del tipo de disolvente sobre el TPP de las dispersiones de Gelucire® 44/14 y 5 % (p/v) PVAL. | 44 |
| Tabla 9 | Estabilidad de las DL's preparadas a partir de Gelucire® 44/14 y PVAL. | 44 |
| Tabla 10 | Efecto de la cantidad de MO en la fase interna sobre el TPP de las DL's, usando PVAL 5 % (p/v) y usando MEC. | 45 |
| Tabla 11 | Efecto de la cantidad de PVAL en la fase externa sobre el TPP de la DL's preparadas a partir de MO usando MEC. | 47 |
| Tabla 12 | Efecto del tipo de estabilizante sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de MO y 5% (p/v) de estabilizante. | 48 |
| Tabla 13 | Efecto del tipo de disolvente sobre el TPP de las DL's de MO y PVAL (5% p/v). | 50 |
| Tabla 14 | Efecto de la temperatura del agua adicionada a la emulsión sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire® 50/13 y PVAL (5 % p/v). | 53 |
| Tabla 15 | Efecto de la velocidad de agitación sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Compritol® ATO 888, PVAL 5% (p/v) y AE a 62 °C. | 55 |
| Tabla 16 | Preparación de DL's a partir de Compritol® ATO 888 usando distintos estabilizantes (AE a 62 °C). | 56 |
| Tabla 17 | Efecto de la cantidad de P407 sobre el TPP de las DL's de Compritol® ATO 888 (AE a 62 °C). | 57 |

| TABLA | NOMBRE | PÁGINA |
|--------------|---|---------------|
| Tabla 18 | Comparación de dos distintas condiciones a las que se sometieron las DL's de Compritol® ATO 888 y PVAL (5% p/v). | 58 |
| Tabla 19 | Estabilidad de las DL's de Compritol® ATO 888 y PVAL (5% p/v) en presencia de parabenos (AE a 62°C). | 58 |
| Tabla 20 | Efecto de la variación de P407 sobre el TPP de las DL's de Geleol® (AE a 52°C). | 59 |
| Tabla 21 | Efecto de la variación de PVAL sobre el TPP de las dispersiones de Geleol® (MEC a 42 °C). | 59 |
| Tabla 22 | Efecto de la temperatura del proceso sobre el TPP de las DL's de Geleol® (MEC). | 60 |
| Tabla 23 | Distintas condiciones de velocidad y tiempo probadas para encontrar el punto donde las fases fueran fácilmente separables por decantación (AE a 62 °C). | 62 |
| Tabla 24 | Datos cualitativos sobre la solubilidad del OMA en los disolventes evaluados. | 67 |
| Tabla 25 | Valores de Rf obtenidos de las DLMO cargadas con OMA, un blanco de OMA puro y una mezcla de ambos. | 68 |
| Tabla 26 | Estabilidad física de las DLMO cargadas con OMA. | 68 |
| Tabla 27 | Presión arterial media (mmHg) tomada al tiempo cero los cinco días para los distintos tratamientos y el blanco de MO. | 71 |
| Tabla 28 | Comparación de las PAM de los tres último días s de tratamiento entre las DLMO y la Solución de OMA. | 72 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | NOMBRE | PÁGINA |
|------------|---|--------|
| Figura 1. | Homogeneizador a alta presión LAB 40, APV Lubeck, Alemania. | 11 |
| Figura 2. | Representación esquemática de la formación de las NP's por medio del método de emulsificación difusión de Quintanar-Guerrero et al., 1996. | 16 |
| Figura 3. | Estructura química de la MO (PM: 356.5 g/mol). | 17 |
| Figura 4. | Estructura tridimensional de la fase cúbica de la MO-agua, en la que se muestra la bicapa lipídica que la forma, de Shah <i>et al.</i> , 2001. | 18 |
| Figura 5. | Diagrama de fases del sistema MO-Agua en el que se muestra la fase micelar reversa (L2), la fase lamelar (L α), la fase cúbica (FC) y la fase reversa hexagonal (HII) (Larsson, 1989). | 19 |
| Figura 6. | Representación esquemática de los Cubosomas [®] . Las partículas dispersas en el medio acuoso tienen un arreglo cristalino en forma de FC en su interior de Nakano <i>et al.</i> , 2001. | 21 |
| Figura 7. | Representación esquemática para preparar DL's de Compritol [®] ATO 888 por medio del MED a temperatura controlada. | 32 |
| Figura 8. | Efecto de la cantidad de lípido sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire [®] 44/14y PVAL (5% p/v) con MEC. | 40 |
| Figura 9. | Efecto de la velocidad de agitación sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire [®] 44/14, PVAL (5% p/v), usando MEC. | 41 |
| Figura 10. | Efecto de la concentración del PVAL sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire [®] 44/14. | 42 |
| Figura 11. | Estabilidad de las DL's de Gelucire [®] 44/14 preparadas usando diferentes estabilizantes (P188, P407, Gelatina, PVP, PVAL). | 43 |
| Figura 12. | Influencia de la cantidad de MO en la fase interna sobre el TPP de las DL's. | 46 |
| Figura 13. | Efecto de la cantidad de PVAL en la fase externa sobre el TPP de las DL's de MO. | 47 |
| Figura 14. | Efecto de la cantidad de P407 en la fase externa sobre el TPP de las DL's de MO. | 48 |
| Figura 15. | Estabilidad física de las DL's preparadas a partir de MO y PVAL. | 51 |
| Figura 16. | Influencia de la cantidad de Gelucire [®] 50/13 sobre el TPP de las DL's usando PVAL (5% p/v) como estabilizante. | 54 |
| Figura 17. | Tendencia del TPP de las DL's preparadas a partir de Compritol [®] ATO 888 y PVAL al variar la velocidad de agitación (AE a 62 °C). | 55 |

| FIGURA | NOMBRE | PÁGINA |
|------------|---|--------|
| Figura 18. | Variación del TPP de las DL's de Compritol® ATO 888 al variar la cantidad de P407 en la fase externa. | 57 |
| Figura 19. | Imagen obtenidas por medio de MEB (15,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. | 63 |
| Figura 20. | Imagen obtenidas por medio de MEB (10,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. | 63 |
| Figura 21. | Imagen obtenidas por medio de MEB (20,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. | 64 |
| Figura 22. | Imagen obtenidas por medio de MEB (10,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. | 64 |
| Figura 23. | Estructura química del Omapatrilat de Sica <i>et al.</i> , 2000. | 65 |
| Figura 24. | Porcentaje de efecto antihipertensivo a través del tiempo de una solución de Omapatrilat (▲) -tomada como el 100%-, una suspensión (◆)y de las DL's preparada a partir de MO (■)en el primer día del tratamiento. | 69 |
| Figura 25. | Presión arterial media inicial (PAM _{inicial} ; t=0 -▲-) y final (PAM _{final} ; t=180 min -■-) en ratas hipertensas, a lo largo de cinco días de tratamiento con OMA-DLMO. | 70 |
| Figura 26. | Diferencia de presión (ΔP) entre la PAM _{inicial} (t=0) y la PAM _{final} (t=180 min) a lo largo de cinco días de tratamiento con OMA-DLMO. | 71 |

ABREVIATURAS

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO |
|--------------|---|
| ABS | Albúmina sérica bovina |
| ac/ag, ag/ac | Aceite / agua, Agua / aceite |
| AE | Acetato de etilo |
| AIP | Acetato de isopropilo |
| AM | Acetato de metilo |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| Cryo-TEM | Microscopía electrónica de transmisión (bajas temperaturas) |
| CV | Coefficiente de variación |
| DE | Desviación estándar |
| DL's | Dispersiones lipídicas |
| DLMO | Dispersiones lipídicas de monoleína |
| EP | Farmacopea Europea (" <i>European Pharmacopeia</i> ") |
| FC | Fase cúbica |
| FDA | Agencia de administración de alimentos y fármacos de los EUA " <i>Food and Drug Administration</i> " |
| GRAS | Generalmente reconocido como seguro " <i>Generally Recognized as Safe</i> " |
| HLB | Balance hidrofílico lipofílico (" <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i> ") |
| HPTLC | Cromatografía en capa fina de alta resolución (" <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> ") |
| ICH | Grupo Internacional de armonización (" <i>International Conference on Harmonisation</i> ") |
| MEC | Metil etil cetona |
| MED | Método de Emulsificación Difusión |
| MO | Monoleína |
| NOAEL | Nivel en que no se observaron efectos adversos (" <i>Not Observed Adverse Effects Level</i> ") |
| NP's | Nanopartículas |
| OMA | Omapatrilat |

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO |
|-------------|---|
| P188 | Poloxámero 188 |
| P407 | Poloxámero 407 |
| PAM | Presión Arterial Media |
| PS | Presión sistólica |
| PD | Presión diastólica |
| PCS | Espectroscopía de correlación de fotones " <i>Photon correlation spectroscopy</i> " |
| PEG | Polietilenglicol |
| PLA | Ácido poliláctico |
| PLA/GA | Ácido Poliláctico Co-glicólico |
| PS | Presión sistólica |
| PVAL | Alcohol Polivinílico |
| PVP | Poli(vinilpirrolidona) |
| SLN | Nanopartículas Lipídicas Sólidas (" <i>Solid Lipid Nanoparticles</i> ") |
| TA | Temperatura ambiente |
| TC | Temperatura controlada |
| TPP | Tamaño de partícula promedio |
| μE | Microemulsión |

I. RESUMEN

Este trabajo propone al método de emulsificación difusión (MED) como una alternativa para la preparación de sistemas lipídicos de talla submicrónica, para lo cual se sustituyó el uso de polímeros por sustancias lipídicas puras o mezclas de éstas. Los lípidos que se usaron para la obtención de estas dispersiones fueron: Gliceril behenato (Compritol[®] ATO 888), monoestearato de Glicerilo 40-55 (Geleol[®]), lauroil macroglicéridos (Gelucire[®] 44/14), estearoil macroglicéridos (Gelucire[®] 50/13) y monoleato de glicerilo (Rylo[®] 20).¹ Estos lípidos fueron seleccionados por su baja toxicidad y capacidad de proteger fármacos (p.ej. hidrólisis, oxidación y degradación enzimática) y/o de proporcionar un control en la liberación de los agentes terapéuticos. Distintas variables del MED se modificaron para encontrar las condiciones que permitieran la obtención de las dispersiones lipídicas (DL's), así como para determinar la influencia de estas variables sobre el tamaño de partícula promedio (TPP) de las dispersiones. Estas variables fueron la cantidad de lípido, el tipo y cantidad de estabilizante, la velocidad de agitación, la temperatura del proceso y el tipo de disolvente. Se emplearon estabilizantes de origen natural y sintético con diversos pesos moleculares y mecanismo de estabilización (albúmina sérica bovina, gelatina, alcohol polivinílico, poli(vinilpirrolidona), polisorbato 80 y poloxámero 188). Para determinar el TPP de las dispersiones formadas se empleó la técnica de dispersión de rayos láser (PCS, "*Photon Correlation Spectroscopy*"). Se encontró que la velocidad de agitación, la cantidad de estabilizante, la temperatura del proceso y la miscibilidad del disolvente con el agua, guardan una relación inversa con el TPP mientras que la cantidad de lípido en la fase interna presentó una relación directa con el TPP. Fue posible obtener sistemas dispersos de talla submicrónica con todos los lípidos. Para evaluar la potencialidad de estos sistemas en la liberación *in vivo* se cargó un agente antihipertensivo (Omapatrilat) en un sistema compuesto de monoleato de glicerilo. La dispersión obtenida con este monoglicérido presenta una talla de partícula inferior a los 180 nm, además se pudieron obtener omitiendo el uso de un estabilizante. Esta dispersión fue comparada con una suspensión y una solución del mismo fármaco al ser administrada a cinco grupos de ratas genéticamente hipertensas, a las que se monitoreó la presión arterial media (PAM) usando una técnica no invasiva. Se encontró que la PAM de las ratas a las cuales se administró el Omapatrilat por medio de las DL's de monoleato de glicerilo se estabilizó al tercer día de su administración, mostrando además un rápido efecto comparable con el obtenido para la administración de los fármacos en solución.

¹ Para una descripción más detallada de estos lípidos consultar la sección de Anexos.

II. INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos más importantes en el desarrollo de un sistema terapéutico es el balance entre el efecto deseado y sus reacciones adversas, para tratar de evitar o disminuir estos efectos indeseados o adversos, la liberación de principios activos en el sitio blanco ha sido una de las alternativas exploradas en los últimos años. Este concepto fue introducido por Paul Ehrlich al inicio del siglo pasado (1906) con su concepto fundamental de “*bala mágica*”. Ehrlich imaginó que podrían desarrollarse sistemas que ejercieran un efecto determinado sobre un sitio blanco, depositando en él la sustancia activa, actualmente este concepto se conoce como vectorización de fármacos. Entre los sistemas desarrollados con esta finalidad sobresalen los acarreadores coloidales de fármacos que, con su talla de partícula (menor a 1 μm) y la modificación de su superficie, parecieran hacer tangible la propuesta de Ehrlich. Un ejemplo de la aplicación de la vectorización son los agentes anticancerígenos que frecuentemente presentan una baja selectividad respecto al sitio de acción, lo que en consecuencia se asocia a severos efectos secundarios. Por ello para la administración de estos fármacos se han desarrollado acarreadores dirigidos que puedan proporcionar mayor eficiencia a los tratamientos.

Con la finalidad de dirigir los agentes terapéuticos, tanto en el espacio (sitio de acción) como en el tiempo, se han propuesto diversos sistemas. Por ejemplo se han sistemas capaces de dirigirse a órganos y células blanco como el hígado, células cancerosas e inclusive el propio núcleo de la célula (Burke, 2000; Venkatraman *et al.*, 2000). Los acarreadores coloidales como las microemulsiones, los liposomas y las nanopartículas (NP's) han demostrado ser útiles tanto en el control del sitio como en la velocidad de liberación. Es por ello que las partículas coloidales han recibido atención en los últimos años, ya que son una excelente alternativa para el control de la liberación de agentes terapéuticos. Estas partículas submicrónicas (partículas del orden de 10-1000 nm) han sido propuestas en las siguientes modalidades (Jaeghere *et al.*, 1999):

- a) Como sistemas de liberación controlada para uso parenteral, oral y nasal;
- b) Para la formulación de principios activos con alta especificidad en cuanto a la zona de acción, es decir, que actúan solamente sobre los sitios u órganos blanco;
- c) Como base en el desarrollo de la matriz de las tabletas, recubrimientos en partículas y sistemas de almacenamiento parenterales; y/o
- d) Como sistemas mucoadhesivos, entre otros.

Algunos de estos sistemas presentan ciertos problemas por ejemplo con las nanopartículas poliméricas existe la posibilidad de efectos tóxicos de los monómeros o de los propios polímeros preformados, ya que los polímeros aceptados para su uso como implantes no tienen la misma tolerancia por el organismo al ser administrados en forma de nanopartículas. Esto debido a que las partículas en los rangos nanométricos pueden penetrar las células (p.ej. macrófagos) y la degradación del polímero dentro de la célula es capaz de producir efectos tóxicos, como se ha reportado para los poliésteres (Smith *et al.*, 1986). En el caso de los liposomas se puede mencionar la falta de estabilidad así como su baja capacidad para cargar fármacos. Una clara ventaja del uso de los sistemas acarreadores lipídicos es que reducen el riesgo de toxicidad crónica o aguda.

Al inicio de los 90's como una nueva alternativa a los sistemas acarreadores de fármacos tradicionales ya mencionados surgen las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, por sus siglas en inglés), las cuales se forman a partir de lípidos y no de polímeros. Estos lípidos presentan una baja toxicidad y alta biocompatibilidad, además se han reportado como sistemas estables, con una buena capacidad de cargar fármacos. Al mismo tiempo estos sistemas han mostrado un alto potencial para la vectorización ("*drug targeting*") y liberación sostenida de fármacos (Müller *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999). En su preparación se han usado mezclas complejas de glicéridos como las grasas sólidas, que poseen una buena capacidad de carga (Westesen *et al.*, 1997). Sumado a esto, la presencia de mono y diglicéridos favorece la solubilización del fármaco (Müller *et al.*, 2000). Dentro de los sistemas coloidales lipídicos también se han empleado lípidos puros, entre estos el monoleato de glicerilo o monoleína. Este lípido tiene una estructura que le confiere características especiales, por ejemplo en presencia de agua forma diversas estructuras capaces de liberar de manera controlada algunos fármacos (Ganem-Quintanar *et al.*, 2000 y por Shah *et al.*, 2001).

El método de emulsificación difusión, que se propuso originalmente para la preparación de nanopartículas a partir de polímeros, se puede considerar como una modificación del proceso de "*salting-out*", pero sin el uso de sales. Este método involucra el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua, los cuales son saturados previamente con la finalidad de alcanzar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. El polímero (según la metodología propuesta inicialmente) es disuelto en el disolvente saturado con agua y esta solución orgánica se dispersa con una solución acuosa que contiene un estabilizante, formándose una emulsión. Finalmente se

adiciona agua a esta emulsión y con ello se da la formación de nanopartículas como consecuencia de la difusión del disolvente orgánico de la fase interna hacia la fase externa (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

Debido a la importancia que tienen los sistemas lipídicos acarreadores de fármacos en la administración de los agentes terapéuticos, este proyecto podría aportar por si mismo una nueva alternativa para la preparación de estos sistemas, además de apoyar con información a proyectos futuros en los que se busque el desarrollo y administración de algún agente terapéutico por medio de estos sistemas. En este trabajo se emplean mezclas complejas de triglicéridos y un lípido puro (monoleato de glicerilo), lípidos de baja toxicidad y con un alto potencial para controlar la liberación de los agentes terapéuticos. Hasta ahora la preparación de los sistemas lipídicos involucra procesos que no son universales y en general requieren de equipo especializado. El uso del método de emulsificación difusión para el desarrollo de estos sistemas ofrece ventajas como permitir el control de la temperatura del proceso, llevarse a cabo con equipo sencillo y de bajo costo, realizarse en tiempos relativamente cortos y ser factible su escalamiento.

En la siguiente sección se expondrán de manera general como antecedentes de este trabajo los diferentes tipos y técnicas de preparación de dispersiones lipídicas de talla submicrónica, las características y las estructuras que hacen de la monoleato de glicerilo un lípido con alto potencial para la vectorización de fármacos y finalmente el método de emulsificación difusión como una posible alternativa para la preparación de dispersiones lipídicas.

III. ANTECEDENTES

3.1 DISPERSIONES LIPÍDICAS

De manera general las nanopartículas lipídicas están constituidas por un lípido sólido, un estabilizante y agua. El término lípido abarca una variedad de compuestos entre los que se incluyen mono, di y triglicéridos, ácidos grasos, esteroides (p.ej. Colesterol) y ceras. Los estabilizantes usados para las nanopartículas lipídicas pueden ser de muy diversos tipos, con distintos pesos moleculares y con o sin carga. La elección del tipo de estabilizante a usar depende de la ruta de administración siendo la más limitante la parenteral. Se ha encontrado además que una mezcla de estabilizantes puede prevenir de manera más eficiente la aglomeración. En una revisión hecha recientemente (Mehnert y Mäder, 2001) se muestra una visión global de los diferentes tipos de lípidos y estabilizantes usados para la preparación de nanopartículas lipídicas (Tabla 1).

Tabla 1. Lípidos y estabilizantes usados para la preparación de nanopartículas lipídicas (Mehnert y Mäder, 2001).

| Lípidos y estabilizantes | Ejemplos |
|------------------------------------|--|
| Triglicéridos | Tricaprina / Trilaurina / Trimiristina / Tripalmitina Triestearina / Coco-glicéridos hidrogenados (Softisan® 142) Witepsol® W 35 / Witepsol® H 35 / Witepsol® H 42 / Witepsol® E 85 |
| Lípidos duros | Monoestearato de glicerilo (Imwitor® 900) Behenato de glicerilo (Compritol® 888 ATO) Palmitoestearato de glicerilo (Precirol® ATO 5) Cetil palmitato / Ácido esteárico / Ácido palmítico / Ácido decanoico / Ácido behénico Acidan N12 |
| Emulsificantes / Co-emulsificantes | Lecitina de soya (Lipoid® S 75, Lipoid® S 100) Lecitina de huevo (Lipoid® E 80®) Fosfatidilcolina (Epikuron® 170®, Epikuron® 200) Poloxámero 188 / Poloxámero 182 / Poloxámero 407 / Poloxamina 908 / Tyloxapol Polisorbato 20 / Polisorbato 60 / Polisorbato 80 Colato de sodio / Glicolato de sodio Taurocolato de sodio / Taurodeoxicolato de sodio / Butanol / Ácido butírico Dioctil sulfosuccinato de sodio Monoctilfosfato de sodio |

La toxicidad de los excipientes usados para la preparación de SLN se puede discutir en función de la ruta de administración empleada. Por ejemplo para la administración oral y tópica los excipientes usados no presentan mayor problema. Para las SLN destinadas a la administración tópica pueden ser empleados todos los excipientes que actualmente se usan en el área farmacéutica y/o cosmética, por ejemplo en las cremas y ungüentos. En el caso de la administración oral pueden ser empleados todos los lípidos y tensoactivos destinados a las formas de dosificación convencionales como tabletas, *pellets* y cápsulas; además de todos los compuestos clasificados como GRAS ("Generally Recognized as Safe"). Entre los tensoactivos aceptados para la administración parenteral se encuentran la lecitina, Tween 80, Poloxámero 188, glicolato de sodio (estos cuatro son aceptados también para la administración intravenosa), Span 85, poli(vinilpirrolidona), entre otros.

La tolerancia de las SLN ha sido investigada tanto *in vitro* como *in vivo*, p.ej. las SLN fueron comparadas con NP's de poliésteres (PLA -Ácido poliláctico-, PLA/GA -Ácido Poliláctico Coligólico-). En este estudio a una concentración de 0.5 % de NP's PLA/GA se encontró 100 % de muerte celular; sin embargo 10 % de SLN en la suspensión celular permitió una viabilidad de aproximadamente un 80 % (Maaßen *et al.*, 1993 y Müller *et al.*, 1996b). Otro estudio se llevó a cabo en ratones con el palmitato de cetilo, a los animales se administraron 1.33 g del lípido / kg de peso, después de administrar seis inyecciones no se encontró toxicidad aguda para este lípido. Tampoco se halló indicio de crecimiento del hígado o del bazo, y la histopatología no aportó pruebas de toxicidad (Müller *et al.*, 1997).

En un estudio sobre la degradación enzimática (lipasa pancreática / colipasa) *in vitro* de SLN, donde se determinó la turbidez de las suspensiones y la cantidad formada de ácidos grasos libres, se encontró que la velocidad de degradación fue rápida para las SLN formadas de Dynasan® 114 (trimiristato de glicerilo), media para las de cetil palmitato y muy lenta para las de Compritol® ATO 888. Un hallazgo importante fue que el tensoactivo tiene un efecto marcado sobre la velocidad de degradación, al usar poloxámero 188 (estabilizante estérico) se retrasó la velocidad de degradación para el Dynasan® 114, mientras que las sales biliares a bajas concentraciones promovieron la degradación. Esto se atribuye a que la lipasa (enzima encargada de la degradación de los lípidos) no encuentra un sitio para poder anclarse, como consecuencia del impedimento estérico del polímero estabilizante. Este efecto podría ser usado para controlar la velocidad de liberación de manera independiente o sinérgica con la naturaleza del lípido (Müller *et al.*, 1996a).

3.1.1 Métodos de preparación de dispersiones lipídicas

Diferentes metodologías para la preparación de dispersiones lipídicas sólidas han sido propuestas por varios grupos de investigación (Tabla 2). La mayoría de estas técnicas fueron desarrolladas al inicio de los 90's y permiten la obtención de dispersiones desde el orden de los micrómetros hasta los nanómetros. En función del tamaño y de la composición reciben diferentes denominaciones por ejemplo lipoesferas, *nanopellets* y nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). Las partículas formadas por lípidos que a temperatura ambiente son sólidos y cuyo diámetro promedio se encuentra en el orden de los nanómetros se conocen como SLN, que después de los liposomas son los acarreadores coloidales lipídicos más ampliamente estudiados.

Tabla 2. Ejemplos de material lipídico, estabilizante y técnica usada para la preparación de SLN.

| Agente Terapéutico ¹ | Material Lipídico ² | Estabilizante o Tensoactivo ³ | Método ⁴ / Referencia |
|---------------------------------|--|--|---|
| --- | Dynasan 114 [®] Compritrol [®] 888 ATO Cetil palmitato | Poloxámero 188 Colato de sodio | HPH Müller <i>et al.</i> , 1996 |
| Lisozima | Witerpsol [®] E 85 Softisan [®] 142 Monoesteol Superpolistato Alcohol cetílico | Tween 80 Poloxámero 188 Poloxámero 182 (solubilizó a la proteína en la fase lipídica antes de iniciar el proceso de HPH) | HPH Técnica en frío Almeida <i>et al.</i> , 1997 |
| AZT-P | Trilaurina (TL) Centro sólido | DPPC DMPG DMPC DSPC | FP-HPH Heiati <i>et al.</i> , 1997 |
| | | DPPC DMPG-Na PE-PEG | FP-HPH Heiati <i>et al.</i> , 1998 |
| Tetracaina y etomidato | Dynasan [®] 112 Compritrol [®] 888 ATO | Lipoid [®] S 75 Poloxámero 188 | HPH Schwartz y Mehnert, 1997 |
| | | Epikuron [®] 200 (tensoactivo) | |
| Diazepam | Ácido esteárico Ácido behénico Acidan N12 | Taurocolato de sodio (cosurfactantes) Poloxámero 188 Trealosa (medio acuoso de dispersión) | μEM Cavalli <i>et al.</i> , 1997 |
| --- | Compritrol [®] ATO 888 | Poloxámero 188 | HPH Freitas y Müller, 1998 |

Tabla 2 (Continuación)

| Agente Terapéutico ¹ | Material Lipídico ² | Estabilizante o Tensoactivo ³ | Método ⁴ / Referencia |
|--|--|---|--|
| Complejos de hidrocortisona y progesterona | Imwitor [®] 900 Ácido esteárico | Epikuron 200 (tensoactivo) | μEM Cavalli <i>et al.</i> , 1999 |
| | | Taurocolato de sodio Butanol (cosurfactantes) | |
| Camptotecina | Ácido esteárico Lecitina de soya | Poloxámero 188 | HPH Yang <i>et al.</i> , 1999 |
| --- | Cetil palmitato | Plantacare [®] 2000 | HPH Lukowski <i>et al.</i> , 2000 |
| Prednicarbato | Compritol [®] ATO 888 Precirol Dynasan [®] 114 | Poloxámero 188 | NR Maia <i>et al.</i> , 2000 |
| | | Lipoid [®] S75 | |
| --- | Precifac [®] ATO | Sucro ésteres | HPH Lippacher <i>et al.</i> , 2000; 2001 |
| Vitamina A | Imwitor [®] 900 Compritol [®] 888 ATO Dynasan [®] 116 Cutina [®] CP Cera de abeja | Tween 80 | HPH Jenning y Gohla, 2000a |
| | | NR | HPH Jenning <i>et al.</i> , 2000b |
| Vitamina A | Compritol [®] 888 ATO Miglyol [®] 812 | Miranol [®] Ultra C32 Poloxámero 188 | Jenning <i>et al.</i> , 2000c |
| | | NR | Jenning <i>et al.</i> , 2000d |
| --- | Cutina [®] CP Compritol [®] 888 ATO Alcohol estearílico (octadecanol) Imwitor [®] 900 [*] Geleol [®] Dynasan [®] 114 | Poloxámero 188 Poloxámero 407 Tego Care 450 Tagat S SDS Tween 80 Span 85 Sales biliares Sucro ésteres S1670 | HPH Zimmermann y Müller, 2001 |
| Propionato de clobetasol | Monostearin | PVAL | SDM Hu <i>et al.</i> , 2002 |
| --- | Softisan [™] 100, 142, 154 Witepsol [™] H35 Cetilpalmitato | Fosfolipon [™] 90G | MDD Schbert y Müller- Goymann, 2003 |

(1) **AGENTE TERAPÉUTICO:** AZT-P: Profármaco del AZT, 3'-azido-3'-deoxitimidina palmitato (AZT: 3'-azido-3'-deoxitimidina; Zidovudine[®]); Camptotecina: Fármaco anticarcinogénico; Complejos de hidrocortisona y progesterona: Formado por β-ciclodextrina o 2-hidropropil-β-ciclodextrina; Prednicarbato: Glucocorticoides tópico Prednisolona 17-etilcarbonato, 21-propionato; Vitamina A: Retinol.

(2) **MATERIAL LIPÍDICO:** Acidan[™] N12 (diglicérido de monoestearato monocitrato); Compritol[®] 888 ATO (behenato de glicerilo); Cutina[®] CP (cetil palmitato); Dynasan[™] 112 (trilaureato de glicerilo); Dynasan[™] 114

(trimiristato de glicerilo); Dynasan[®] 116 (tripalmitato de glicerilo); Geleol[®] (palmitoestearato de glicerilo); Imwitor[®] 900 (monoestearato de glicerilo); Miglyol[®] 812 (triglicéridos caprílico:capríco); Monoestrol (palmitoestearato propilenglicol); Precifac[®] ATO (cetil palmitato); Superpoliestato (polioxietilenglicol mono, diestearato 300).

(3) **ESTABILIZANTE:** DPPC (Dipalmitoil fosfatidilcolina); DMPC (Dimiristoil fosfatidilcolina); DMPG (Dimiristoil fosfatidilglicerol); DMPG-Na (Dimiristoil fosfatidil glicerol de sodio); DSPC (Diestearoil fosfatidilcolina); Miranol Ultra C32 (cocoanfocetato de sodio); PE-PEG [Dipalmitoil fosfatidil etanolamine-*N*-(poli(etilen glicol)₂₀₀₀); PVAL: Alcohol polivinílico; SDS (Dodecil Sulfato de Sodio); Sucro ésteres S1670 (ésteres de ácidos grasos y sucrosa); Tagat S (polioxietilenglicerol monoesterato); Taurocolato de sodio (sales biliares); Tween 80 (polioxietilén sorbitan monoestearato); Fosfolipon[®] 90G: Fosfatidilcolina 90 %; Lipoid S 75 (lecitina de soya); Epikuron[®] 200 (fosfatidilcolina de soya 95 %); Tego Care 450 (poliglicerol metilgluco diestearato). Miglyol[®] 812 (triglicéridos caprílico:capríco); Monostrol (palmitoestearato propilenglicol); Precifac[®] ATO (cetil palmitato); Superpolistato (polioxietilenglicol mono, diestearato 300); DPPE-PEG 2000 (Dipalmitoil fosfatidiletanolamina-polietilenglicol 2000); Plantacare 2000 (alquil glucósidos).

(4) **MÉTODOS:** “*Stealth SLNs*”: Se refiere a las SLN que presentan un recubrimiento tal, que aumenta su tiempo en circulación; FP-HPH: Formación de una película al solubilizar los componentes en CHCl₃, retirar el CHCl₃, y rehidratar en un medio acuoso; finalmente la emulsión formada (diámetro aprox. de 1-2 μm) se somete a HPH; HPH: Homogeneización a alta presión; SDM: Método de difusión de disolvente en medio acuoso; μEM: Método de microemulsión. NR: No se reporta.

3.1.1.1 Obtención de nanopellets

Los *nanopellets* fueron desarrollados al inicio de los 90's para la administración oral, son producidos al dispersar un lípido fundido en una solución de tensoactivo por medio de agitación o sonicación. Las dispersiones obtenidas por medio de este método contienen altas cantidades de micropartículas. En general se obtienen mezclas de micropartículas y NP's y la obtención del tamaño nanométrico depende del poder de la agitación. Con esta talla de partícula no representan ningún problema para la administración oral, pero cuando se trata de administración intravenosa las micropartículas no son una opción. Para la obtención selectiva de NP's se deben emplear cantidades altas de tensoactivo, con lo cual uno se mueve hacia la solubilización del lípido y aumentan los riesgos de toxicidad del tensoactivo (Speiser, 1990).

3.1.1.2 Método de emulsificación / evaporación

En este método se propone la producción de nanopartículas lipídicas por medio de la precipitación del lípido que se encuentra disuelto en la fase orgánica de una emulsión. El material lipídico se disuelve en un disolvente inmisible en agua (p.ej. ciclohexano), éste es emulsificado en una fase acuosa con ayuda de un molino coloidal seguido de homogeneización a alta presión. Posteriormente se evapora el disolvente y se precipita el lípido en la fase acuosa, con ello se da la formación de las SLN. Los residuos de disolvente en la suspensión final fueron menores a 150 ppm, como lo demostró la Cromatografía de gases. Con acetato de colesterol como modelo de fármaco y una mezcla de lecitina / glicolato de sodio como emulsificante el diámetro medio de las partículas fue de 25 nm (Sjöström y Bergenståhl, 1992). La reproducibilidad de este método fue posteriormente confirmada (Siekman y Westesen, 1996), sólo que en este caso el disolvente usado fue cloroformo y para la formación de la emulsión se uso un homogeneizador de alta presión. El diámetro reportado para este sistema es de entre 30 y 100 nm dependiendo de la proporción de lecitina / glicolato de sodio.

3.1.1.3 Obtención de lipoesferas

Las lipoesferas son micropartículas sólidas insolubles en agua que tienen una capa de fosfolípidos embebida en la superficie; estos sistemas tienen un centro sólido (a temperatura ambiente) hidrofóbico rodeado por fosfolípidos. El diámetro promedio que se puede obtener es de entre 0.3 y 250 μm . Estas partículas se preparan fundiendo el material del cual estará formado el centro de la partícula y agregando fosfolípidos que se encuentran en un medio acuoso. Esta mezcla se dispersa por medio de sonicación o agitación mecánica y el enfriamiento

de ésta permite la solidificación del lípido y la subsecuente formación de las lipoesferas (Domb, 1993, 1995).

3.1.1.4 Homogeneización a alta presión para la producción de nanopartículas lipídicas sólidas

En esta técnica la producción de SLN es por medio de la homogeneización a alta presión (Fig. 1) de los lípidos fundidos y una solución acuosa conteniendo al estabilizante. Las gotas de lípido solidifican y se forman las SLN. Los dos métodos que con mayor frecuencia son utilizados para la preparación de SLN son la técnica de homogeneización a alta presión ("*High Pressure Homogenization*") en caliente y en frío. En ambos casos para cargar las partículas con un fármaco, se disuelve en el lípido a una temperatura de aproximadamente 5 a 10 °C por encima del punto de fusión del lípido (Schwartz, *et al.*, 1992).

- i. Homogeneización en caliente. El lípido fundido se dispersa bajo agitación en una solución acuosa del tensoactivo que se encuentra a la misma temperatura que la fase lipídica. La pre-emulsión obtenida se homogeneiza usando un homogeneizador de pistón ("*homogenizer piston-gap*"), entonces la nanoemulsión se enfría hasta temperatura ambiente de esta manera se forman las SLN.
- ii. Homogeneización en frío. El lípido fundido conteniendo al fármaco se enfría, lo que provoca la aparición de micropartículas (aproximadamente de 50 a 100 μm). Estas micropartículas se dispersan en una solución de tensoactivo frío y así se forma una pre-suspensión que se homogeneiza a temperatura ambiente (o menor). La energía necesaria para producir las SLN por esta técnica es considerable .

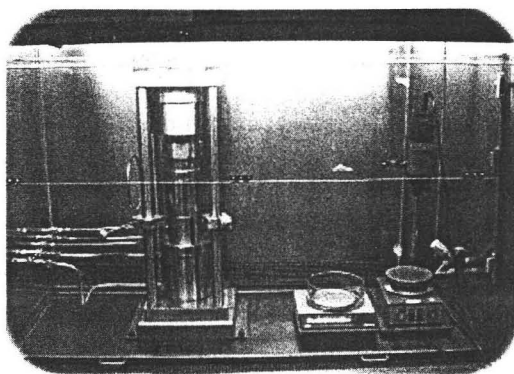


Figura 1. Homogeneizador a alta presión LAB 40, APV Lubeck, Alemania.

3.1.1.5 Nanopartículas lipídicas sólidas preparadas por medio de la técnica de microemulsión

La preparación de SLN por medio del método de microemulsión (μ E) consiste en dispersar una μ E caliente (ac/ag) en un medio acuoso frío bajo agitación mecánica (Gasco, 1993). La μ E está compuesta del lípido (p.ej. ácido esteárico), tensoactivo (p.ej. polisorbato 20, polisorbato 60 y fosfatidilcolina de soya), co-surfactante(s) (p.ej. butanol) y agua. Con lo que se forma un sistema transparente y termodinámicamente estable siempre y cuando los componentes se encuentren en las proporciones adecuadas para formar la microemulsión. La microemulsión a 65-70 °C se adiciona a un medio acuoso frío (2-3 °C) bajo agitación mecánica lo que asegura que la reducción del tamaño de partícula se debe a la precipitación del lípido y no a un proceso mecánico. Comúnmente las proporciones entre la μ E y el agua son de 1:25 a 1:50 (Cavalli *et al.*, 1997, 2000). Por medio de esta técnica se han preparado los llamados “*stealth SLNs*” que son SLN que presentan en su superficie un recubrimiento que les permite aumentar su tiempo en circulación sanguínea, se ha empleado polietilenglicol (PEG) o algún derivado de éste.

3.1.1.6 Método de desplazamiento del disolvente en medio acuoso

En este método el lípido y fármaco se disuelven completamente en una mezcla de acetona y etanol (50:50) a temperatura controlada (50 °C). La solución resultante se vierte bajo agitación mecánica sobre un medio acuoso ácido (pH de 1.10 ajustado con HCl 0.1 M) que contiene 1% (p/v) de alcohol polivinílico (PVAL) a temperatura ambiente y se agita por cinco minutos. Las SLN son producidas de manera muy rápida. Posteriormente el sistema se centrifuga y re-suspende en agua destilada. El ajuste del pH del medio acuoso ácido es con la finalidad de ajustar el potencial zeta para coacervar las SLN y que sea fácil la separación por centrifugación. La distribución del tamaño de partícula obtenida por Hu *et al.*, (2002) al utilizar monoestearina y propionato de clobetasol por este método es bimodal (14 nm y 432 nm).

3.1.1.7 Técnica de hidratación de película / homogeneización a alta presión

La preparación de SLN consiste en disolver en una fase orgánica (p.ej. cloroformo) el material lipídico, los fosfolípidos (estabilizante) y/o el fármaco. Después de removida la fase orgánica se forma una película lipídica que es hidratada en una solución salina y agitada por 5 min a 50 °C. Finalmente la emulsión obtenida (diámetro de entre 1–2 μ m) se homogeneiza por medio de un sistema de alta presión (aproximadamente cinco ciclos a 60–70 °C y 15 000 psi) para obtener las SLN (Heiati *et al.*, 1997).

3.2 MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN (MED)

El método de emulsificación difusión (MED) se puede considerar como una modificación del proceso de "salting-out" pero sin el uso de sales, lo que evita los subsecuentes pasos de purificación así como los problemas relacionados con la compatibilidad entre los fármacos y los electrolitos. La originalidad del MED consiste en el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua. Al desarrollar este método para la preparación de NP's poliméricas se usó alcohol bencílico como disolvente (Leroux *et al.*, 1995a, 1995b). Las NP's se prepararon al formar una emulsión (ac/ag) entre la solución del polímero en alcohol bencílico y una solución acuosa que contenía al hidrocoloide estabilizante, seguido de la dilución de la emulsión con agua. En la Tabla 3 se muestran polímeros, estabilizantes, disolventes y fármacos probados en el MED.

Tabla 3. Polímeros, estabilizantes y disolventes usados para el MED, así como algunos fármacos incorporados en las NP's preparadas por este método.

| Polímeros Agente Terapéutico de las NP's | Estabilizantes | Disolvente | Referencia (Año) |
|---|--|--|--|
| PLA / PLGA (85:15) / PCL / Eudragit® S100 | PVAL (26,000) Gelatina | Alcohol bencílico | Leroux <i>et al.</i> , 1995a |
| Clorambucilo | | | |
| PLA / Eudragit® S100, L100, L100-55 | PVAL | Alcohol bencílico | Leroux <i>et al.</i> , 1995b |
| Inhibidor de Proteasa | | | |
| PLA | PVAL (26,000 y 30,000- 70,000) Poloxámero 188 Polisorbato 80 Dextran 70 Gelatina PVP | Propilencarbonato | Quintanar- Guerrero <i>et al.</i> , 1996 |
| PLA | PVAL (26,000) | Propilencarbonato | Quintanar- Guerrero <i>et al.</i> , 1997 |
| PLA / Eudragit® E / PCL | | | |
| Mygliol®812 / Aceite mineral (Centro de las nanocápsulas) | PVAL (26, 000) | Acetato de etilo Propilencarbonato Alcohol bencílico | Quintanar- Guerrero <i>et al.</i> , 1998 |
| Sudan III (colorante lipofílico) / Indometacina / Progesterona / Estradiol / Clorambucilo / Clofibrato / Vitamina E (Modelos de fármacos lipofílicos) | | | |

Tabla 3 (Continuación)

| Polimeros | Estabilizantes | Disolvente | Referencia (Año) |
|---|----------------------------------|---|--|
| Agente Terapéutico de las NP's | | | |
| PLA | PVAL (26, 000) Poloxámero 188 | Propilencarbonato | Quintanar-Guerrero <i>et al.</i> , 1998b |
| PLA / PCL / Eudragit® E / CAP / CAT / EVAC / EC | PVAL (26, 000) Poloxámero 407 | Acetato de etilo Metil etil cetona | Quintanar-Guerrero <i>et al.</i> , 1999 |
| PLA Complejo Oligonucleótido-CTAB | PVAL | Alcohol bencílico | Berton <i>et al.</i> , 1996 |
| PLGA (75:25) Benzoato de 17 β-Estradiol | DMAB PVAL (30 000-70 000) | Propilencarbonato | Kwon <i>et al.</i> , 2001 |
| PLGA (75:25) | Poloxámero 188 | Metil etil cetona Acetato de etilo Propilencarbonato Alcohol bencílico | Choi <i>et al.</i> , 2002 |
| PCL Mygliol®812 Indometacina | PVAL (127 000) Poloxámero 188 | Acetato de etilo | Guinebrière <i>et al.</i> , 2002 |
| PLA / PLGA (75:25, 50:50) p-THPP | PVAL | Alcohol bencílico | Konan <i>et al.</i> , 2003 |

PVAL: Alcohol polivinílico, **PVP:** Polivinilpirrolidona; **PLA:** Poli(ácido D,L-láctico); **PCL:** Poli(ε-caprolactona); **Eudragit®:** Copolímeros del ácido metacrílico; **CAP:** Acetofalato de celulosa; **CAT:** Acetotrimetilato de celulosa; **PLGA:** poli(D,L-láctico-co-glicólico); **EVAC:** Acetato de etilenevinil (copolímero que contiene acetato de vinilo en un 40 %); **EC:** Etilcelulosa; **CTAB:** Bromuro de Cetiltrimetilamonio; **DMAB:** Bromuro de Didodecildimetil amonio; **Mygliol® 812:** Aceite neutro, **p-THPP:** Meso-tetra(4-hidroxifenil) porfirina.

Posteriormente se introdujo una modificación en la metodología que fue la saturación del disolvente parcialmente miscible en agua. Esta saturación de la fase orgánica con agua y de la fase acuosa con el disolvente orgánico, permite mejorar el equilibrio termodinámico del sistema (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996). La técnica consiste en la formación de una emulsión (ac/ag), entre la solución de un polímero biodegradable (según el método propuesto inicialmente) en el disolvente saturado con agua (p.ej. propilencarbonato) y una fase acuosa que contiene el estabilizante (p.ej. alcohol polivinílico o gelatina) previamente saturada con el disolvente orgánico. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el disolvente difunda hacia la fase externa lo que trae como resultado la formación de NP's del polímero. La adición de un estabilizante adecuado evita la formación de grumos de polímero, pues éste actúa como un agente protector. El método de emulsificación difusión presenta las siguientes ventajas: Se puede usar equipo de laboratorio convencional; se emplean disolventes aceptados

farmacéuticamente; es posible reciclar los disolventes; es adaptable a varios tipos de polímeros; además presenta un alto grado de reproducibilidad y eficiencia.

Choi *et al.* (2002) mencionan que el MED fue desarrollado por Niwa *et al.* (1993); sin embargo el método desarrollado por este autor para la preparación de NP's involucra el uso de acetona y de diclorometano, ninguno de estos disolventes es parcialmente soluble en agua. Esta metodología, que se basa en la combinación de un disolvente clorado y un disolvente miscible en agua, es considerada por algunos autores (Jaeghere *et al.*, 1999) como una variación del método de emulsificación- evaporación. En este método la polaridad del disolvente miscible en agua (acetona) facilita la incorporación de fármacos hidrosolubles así como la emulsificación del sistema por la rápida difusión del disolvente, sin embargo no se puede considerar igual al MED propuesto inicialmente por Leroux *et al.* (1995^a).

En el mecanismo de formación de las nanopartículas cada gota de la emulsión, formada previamente a la adición del exceso de agua, produce varias nanopartículas como resultado de un fenómeno interfacial durante la difusión del disolvente. Sin embargo, este fenómeno no puede ser completamente explicado por los efectos de convección o por la turbulencia interfacial. Por tanto, se sugiere que las nanopartículas se forman debido a la inestabilidad química producida por el transporte de disolvente, por un mecanismo similar al usado para explicar el proceso de emulsificación espontánea ("*diffusion-stranding mechanism*"). El mecanismo que se propone no se atribuye a la inestabilidad mecánica. La idea básica es que la difusión del disolvente de los glóbulos de la emulsión, acarrea moléculas hacia la fase acuosa formando regiones locales de supersaturación de las cuales se forman nuevos glóbulos o agregados del polímero (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas "*protonanopartículas*" por la presencia de un estabilizante es muy importante para evitar su coalescencia y con ello la formación de aglomerados. Así, si el estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y si su efecto de protección es adecuado, entonces se completará la difusión del disolvente y se forman las NP's (Fig. 2). Variables de la preparación como la velocidad de agitación y la concentración del polímero pueden ser factores importantes en la formación y el espesor de la región de supersaturación y pueden así cambiar el tamaño de las NP's. Otros parámetros como la viscosidad y el pH de la fase externa no presentaron un efecto importante en el tamaño de partícula (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996, 1997).

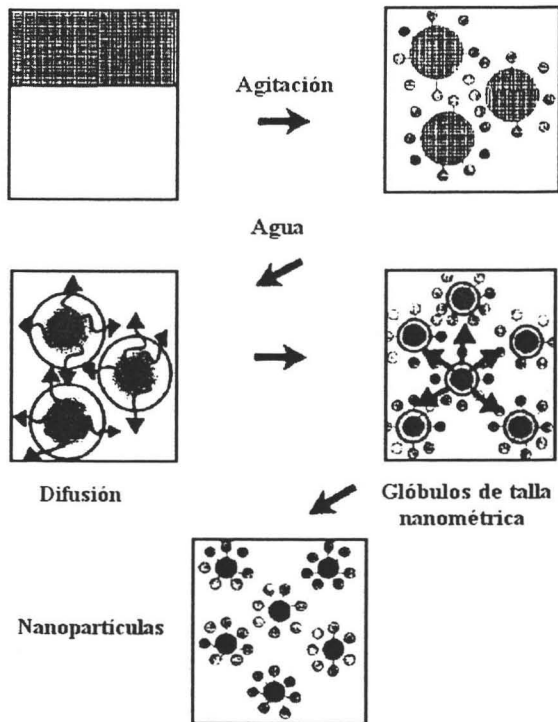


Figura 2. Representación esquemática de la formación de las NP's por medio del método de emulsificación difusión de Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996.

Como se puede apreciar en la Tabla 3, el MED ha sido empleado usando diversos tipos de polímeros, estabilizantes y disolventes para la preparación de nanopartículas; además se han incorporado algunos fármacos. Con esta técnica se prepararon pseudolátex (dispersiones coloidales acuosas de polímeros insolubles en agua) de polímeros biodegradables y no biodegradables, sólo que en este caso en lugar de adicionarse un exceso de agua, el disolvente fue retirado por evaporación directa (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1999). También se ha reportado la preparación de nanocápsulas, en las que su centro oleoso permitió la incorporación de diversos fármacos liposolubles (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998a).

3.3 MONOLEATO DE GLICERILO (MONOLEÍNA)

De los lípidos seleccionados el monoleato de glicerilo o monoleína (MO) es el único que se encuentra en estado puro, este lípido en presencia de agua forma varias fases que han sido usadas como acarreadores de fármacos. La comprensión de este comportamiento se considera importante para el entendimiento del sistema disperso que se propone preparar con este material, por ello que se dedica un apartado para la MO. En esta sección se hará una mención de su estructura y usos, así como de la preparación de dispersiones acuosas reportadas con este lípido.

3.3.1 Transición de fases: Fase cúbica

La MO es un lípido polar anfifílico en el cual, la cadena del ácido graso (ácido oleico) le confiere características no polares mientras que los grupos hidroxilo le permiten la interacción con el medio acuoso (Fig. 3). La MO es considerada como un excipiente no tóxico, biodegradable y biocompatible, por lo que se clasifica como un material GRAS (“*Generally Recognized as Safe*”) y está incluido en la Guía de Ingredientes Inactivos de la FDA. Su solubilidad en agua es muy baja (10^{-6} mol dm^{-3}), sin embargo puede hincharse y formar cristales líquidos. En la década de los 70’s y 80’s la MO fue usada principalmente como emulsificante y como promotor de absorción. Fue en 1984 cuando la MO fue por primera vez propuesta para ser usada en un sistema de liberación controlada (Ganem-Quintanar *et al.*, 2000).

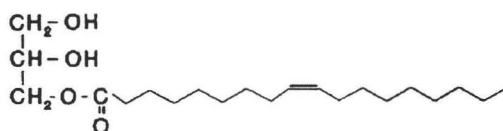


Figura 3. Estructura química de la MO (PM: 356.5 g/mol).

Una característica de los lípidos es la dependencia de su transición de fases con la temperatura. Por debajo de la llamada temperatura de transición los lípidos existen en un estado de gel, un aumento en la temperatura resulta en una transición a un estado fluido similar a la fusión de un sólido cristalino. Sin embargo, cuando una molécula lipídica se calienta, en lugar de fundirse directamente forma un líquido isotrópico, pasando a través de varios estados intermedios llamados mesofases o cristales líquidos. Se dice entonces que estas moléculas han sufrido un mesomorfismo termotrópico. Ciertas moléculas cuando se combinan con otra sustancia (p.ej. agua) pueden formar estos cristales líquidos. De los cristales líquidos formados por la MO las

bicapas apiladas (fase lamelar) y los arreglos de cilindros ordenados (fase hexagonal) son las más conocidas, en tanto que la red tridimensional que forma la fase cúbica (FC) es la más compleja de estas estructuras mesomórficas (Fig. 4). El número y el tipo de fases que puede presentar un lípido depende de varios factores como la temperatura, la hidratación y la clase de lípido. Algunos lípidos que pueden formar la fase cúbica además de la monoleína (probablemente el más ampliamente estudiado) son: *Monopentadecenoin*, *monomystolein*, *monoelaidin*, fosfatidiletanolamina, fosfolípidos y fosfolípidos-PEG (Briggs y Caffrey, 1994; Shah *et al.*, 2001). En resumen, los cristales líquidos formados por moléculas anfifílicas presentan polimorfismo, quizás el ejemplo más espectacular sea la fase cúbica bicontinua que es un sistema de canales acuosos abiertos separados por una bicapa lipídica infinita. La MO es un lípido que presenta la característica de poder formar la fase cúbica en presencia de agua.

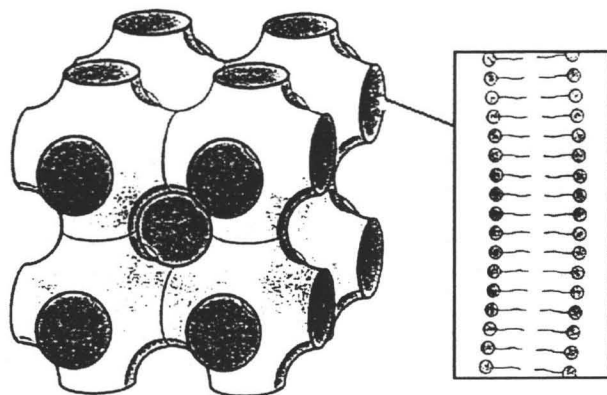


Figura 4. Estructura tridimensional de la fase cúbica de la MO-agua, en la que se muestra la bicapa lipídica que la forma, de Shah *et al.*, 2001.

Como se muestra en la Fig. 5 la MO en presencia de agua se organiza en una bicapa lipídica y forma una fase micelar reversa (L_2) y tres tipos de cristales líquidos el lamelar (L_a), el hexagonal reverso (H_{II}) y la FC. La estructura depende de la cantidad de agua y de la temperatura. La fase lamelar (L_a) presenta una estructura con un alto grado de ordenamiento que se extiende en una dimensión, en la que se alterna la bicapa lipídica y los canales de agua. La fase hexagonal lipídica y los canales de agua. La fase hexagonal reversa (H_{II}) consiste en un enrejado dimensional en el que se extienden tubos infinitos separados por una bicapa lipídica (Chupin *et al.*, 2002; Marrik y Tielman, 2002). Y la FC es una

estructura que consiste en una bicapa lipídica bicontinua curva que se extiende en tres dimensiones que separa a dos canales acuosos. El diámetro del poro acuoso de la fase completamente hinchada es de aproximadamente 5 nm, cabe mencionar que este arreglo presenta una alta viscosidad (Shah *et al.*, 2001). Para pasar de las estructuras lamelares planas a las fases altamente curvas como la hexagonal y la cúbica se requiere un doblamiento de la interfase, lo que tiene asociado un costo energético. Se cree que es precisamente esta energía relacionada a la curvatura la que determina la estabilidad de la fase (Chung y Caffrey, 1994). El cálculo de esta energía es una de las herramientas que ha permitido proponer distintas estructuras de las mesofases liotrópicas que se forman al variar la cantidad de agua o al estar en un sistema de tres componentes (p.ej. MO-Agua-Proteína).

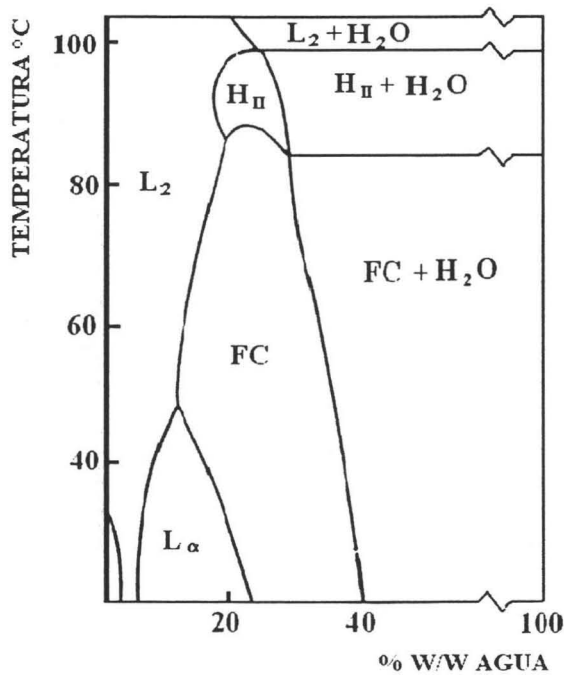


Figura 5. Diagrama binario de fases del sistema MO-Agua en el que se muestra la fase micelar inversa (L_2), la fase lamelar (L_α), la fase cúbica (FC) y la fase inversa hexagonal (H_{II}) de Larsson, 1989.

3.3.2 Usos e importancia de la monoleína

Debido al alto grado de ordenamiento de los sistemas constituidos por la fase cúbica (FC) de la MO, estos pueden ser de utilidad en la vectorización de fármacos o como bioreactores. Proteínas como la lisozima y el citocromo-c pueden ser incorporadas dentro de la FC de la MO. La actividad enzimática de la proteína cinasa-c ligada a membranas de la FC ha mostrado tener una mayor actividad que aquellas ligadas a fosfolípidos en la fase lamelar (Gustafsson *et al.*, 1997; Razumas *et al.*, 1996). La FC ha mostrado también poder liberar lentamente pequeñas moléculas y proteínas, tanto por vía oral como parenteral, además de haber sido administrada por vías locales por ejemplo la vaginal y la periodontal. Existen numerosos ejemplos en los que la FC ha sido usada como un medio para controlar la liberación de fármacos y proteínas, así como las distintas vías de administración en que han sido probadas. Para más detalles de estos ejemplos se recomienda consultar las revisiones hechas por Ganem-Quintanar *et al.* (2000) y por Shah *et al.* (2001).

Debido a que la FC cuenta con dos dominios, uno acuoso y otro lipídico, puede solubilizar moléculas con carácter hidrofílico, lipofílico e inclusive con carácter anfifílico, estas últimas podrían localizarse en la interfase de los dos dominios. La biodegradabilidad, la habilidad de incorporar y de liberar lentamente una variedad de moléculas con diferentes propiedades fisicoquímicas y la capacidad de mejorar la estabilidad física, química y/o enzimática de los fármacos y proteínas incorporadas, hacen a la MO una sustancia con alto potencial para su uso en la liberación controlada de fármacos (Engström, 1990; Drummond y Fong, 2000; Ganem-Quintanar *et al.*, 2000; Larsson, 1997; Shah *et al.*, 2001).

Uno de los principales inconvenientes al administrar directamente un fármaco cargado en la FC es la alta viscosidad que presenta el sistema (Shah *et al.*, 2001). Una alternativa para resolver este problema es el uso de una dispersión acuosa de MO en su FC. Debido a que la FC que forma la MO es estable en exceso de agua y que puede ser dispersada en presencia de un tensoactivo apropiado. Estas dispersiones submicrónicas llamadas Cubosomas[®] (Larsson, 1989) han sido propuestas para la liberación sostenida, especialmente para liberación parenteral de péptidos y proteínas (Engström *et al.*, 1996).

3.3.3 Dispersiones acuosas de monoleína

La estructura cúbica puede describirse como una fase periódica e infinita de bicapas que se extiende en tres dimensiones. Los primeros ejemplos de la fragmentación de esta FC bilamelar (Fig. 6), fueron reportados hace unos veinte años (Patton y Carey, 1979; Lindström *et al.*, 1981). En estos trabajos se afirma que si la FC se agita en presencia de una solución de sales biliares, se formará una dispersión acuosa de la FC (Cubosomas[®]). Estas dispersiones se encuentran en una zona del diagrama ternario donde la FC existe en equilibrio con el agua y con la fase L_{α} (lamelar). En estas dispersiones la fase L_{α} se encuentra en la parte externa de las partículas cúbicas (Larsson, 1989).

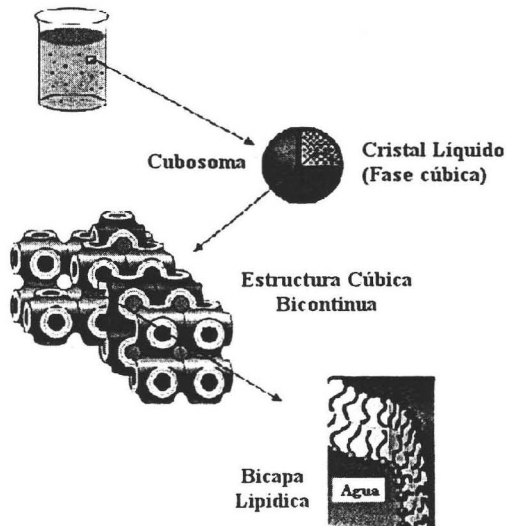


Figura 6. Representación esquemática de los Cubosomas[®]. Las partículas dispersas en el medio acuoso tienen un arreglo cristalino en forma de FC en su interior de Nakano *et al.*, 2001.

Si se adiciona una tercera molécula que sea capaz de reducir la energía libre interfacial y que no interfiera en el arreglo interno de la FC, es posible formar NP's que mantengan este arreglo en su interior (Nakano *et al.*, 2001). La elección de un agente estabilizante para la dispersión de estas fases es un punto crucial. Debido a que al formarse las partículas el tensoactivo puede quedar embebido en el seno de éstas y con ello cambiar la estructura cristalina interna de la fase lipídica (Gustafsson *et al.*, 1997). Los estabilizantes que han mostrado buenos resultados son aquellos cuyo mecanismo de acción involucra el impedimento estérico. Se asume que las NP's de MO conservan la misma estructura interna y propiedades de la FC, ofreciendo así ventajas similares a las de la FC en volumen ("bulk"). Comparativamente con los liposomas, la superficie que ofrece la bicapa de las NP's cúbicas puede incrementar la capacidad de cargar moléculas lipofílicas y anfifílicas (Siekman *et al.*, 2002).

Existen pocos reportes sobre la preparación de las dispersiones submicrónicas acuosas de la FC, en la Tabla 4 se muestran las técnicas empleadas por diferentes autores en la preparación de estas dispersiones. La preparación típica de los Cubosomas[®] se realiza al combinar agua y MO en las proporciones adecuadas, y posteriormente permitir que alcancen su estado de equilibrio (40 °C por 24 h). La FC resultante, que presenta la apariencia de un gel transparente, se dispersa por la aplicación de energía mecánica o de ultrasonido. Con frecuencia se usan los homogeneizadores de alta presión para la producción de los Cubosomas[®], lo que requiere de numerosos pasos antes de la homogeneización del gel en NP's (Spicer *et al.*, 2001).

Tabla 4. Métodos reportados para la preparación de dispersiones de la FC de MO.

| MO Dispersada | Estabilizante | Método de Preparación | Referencia (Año) |
|------------------|------------------------------|---|------------------------------------|
| 1-7 % p/p | P403 8 % p/p (MO/P) | Se mezcló MO y P403 fundidos con agua (93-99 % p/p) y posteriormente se sometió a microfluidización a 80 °C. A una muestra en equilibrio de la FC (exceso de agua 99 % p/p) se le expuso a irradiación de ultrasonido. | Gustafsson <i>et al.</i> , 1996 |
| 2-12 % (MO/P) | P407 2-12 % p/p (MO/P) | Lípido y poloxámero fundidos se agregaron gota a gota sobre agua en agitación para formar una dispersión primaria. La disminución del tamaño de partícula se realizó por medio de microfluidización (5000 psi a 80 °C). | Gustafsson <i>et al.</i> , 1997 |

Tabla 4 (Continuación)

| MO Dispersada | Estabilizante | Método de Preparación | Referencia (Año) |
|--|-------------------------------|--|--------------------------------|
| 1 % (p/v) (MO/Tris- Solución amortiguadora) | P407 | <p>Dispersión Directa (> 5 % p/p P407): El MO y el P407 se mezclaron con CHCl_3, después se evaporó el disolvente y la mezcla se secó a vacío. A la película de MO/P407 formada se añadieron 50 ml de solución amortiguadora. La mezcla se dispersó usando un homogenizador a 80 °C. Posteriormente se redujo el tamaño de partícula por medio de un emulsificador de alta presión (350 kg/cm², 30 min a 60 °C).</p> <hr/> <p>Evaporación en fase reversa (< 5 % p/p P407)*: Una película de MO/P407 se disolvió en 10 ml de CFCl_3 y se le adicionó solución amortiguadora, posteriormente esta mezcla fue agitada a 0 °C. La mezcla se calentó lentamente para provocar la evaporación del CFCl_3. El homogeneizador y el emulsificador de alta presión fueron usados bajo las mismas condiciones que en la dispersión directa.</p> | Nakano <i>et al.</i> , 2001 |
| 1.8 % | P407 0.2 % p/v P / Agua | <p>Técnica convencional de dispersión del gel en volumen: El poloxámero 407 (8 % p/p) y la MO (92 % p/p) fundidos se combinaron hasta obtener una solución homogénea. Esta solución se agregó a agua desionizada para formar una mezcla con 1.8 % MO, 98 % de agua y 0.2 % de Poloxámero 407. La mezcla se sonicó por 60 min a temperatura controlada (25 °C).</p> | Spicer <i>et al.</i> , 2001 |
| 68 % | P407 0.3 % p/p P / Agua | <p>FC cristalina en presencia de un Hidrótopo: El gel en volumen fue preparado al combinar MO fundida (93 % p/p) y EtOH (7 % p/p) para formar un líquido poco viscoso isotrópico. Una solución 1.2 % de P407 se adicionó al líquido anterior para formar así un gel (cristal líquido cúbico) en exceso de agua (composición final: 68 % MO, 26.7 % agua, 5 % EtOH, and 0.3 % P407). Esta mezcla se sonicó por 5 min.</p> | |

Tabla 4 (Continuación)

| MO Dispersada | Estabilizante | Método de Preparación | Referencia (Año) |
|---------------|-----------------------------|---|---------------------------------|
| 5 % | P407 1 % p/v P / Agua | <p>Cubosomas por nucleación:</p> <p>a) Dilución de un líquido isotrópico Un líquido isotrópico (50 % MO, 50 % EtOH) se diluyó con una solución de P407 en agua para formar una dispersión coloidal de Cubosomas[®] (89 % agua, 5 % MO, 5 % EtOH y 1 % P407).</p> | Spicer <i>et al.</i> , 2001 |
| 3 % | | <p>b) Dilución de una emulsión Se preparó una emulsión (70 % agua, 20 % EtOH, y 10 % MO) y se diluyó con una solución de P407 para formar una dispersión de la FC (90 % agua, 6 % EtOH, 3% MO, y 1 % polímero) usando solamente agitación manual.</p> | |
| 6.5 % | P407 1 % p/p | <p>Sistema binario: 6.5 % MO y agua. Sistema ternario: Se preparó por agitación de la FC en una dispersión de PL (6.5 MO, 3.5 % PL). La dispersión de PL fueron preparadas por sonicación de PL y agua, para formar SUV hasta que la ligera turbidez original apareciera ópticamente clara.</p> <p>Estos sistemas se agitaron posteriormente en presencia de una solución de P407 y se pre-dispersaron por sonicación intermitente bajo un baño de agua fría 10–15 min. Finalmente se homogeneizó a alta presión.^b</p> | Siekman <i>et al.</i> , 2002 |

MO: Monoleína; MO/P: Relación entre la monoleína y el polímero usado para estabilizar la dispersión; P/Agua: Relación entre el polímero y el agua usado para estabilizar la dispersión; FC: Fase Cúbica; P403: Poloxámero 403; P407: Poloxámero 407; Tris-Solución amortiguadora: 10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7; PL: Soya purificada (Lipoid S 100); SUV: Vesículas Unilamelares Pequeñas (*Small Unilamellar Vesicles*).

a: Cuando la razón entre el P407 y el MO fue menor a 5 % en peso, la dispersión de MO en la solución amortiguadora se dificultó, debido a esto se adoptó el método de evaporación en fase reversa.
b: Composición y proceso original propuestos por Landh and Larsson (Landh, 1991; Landh and Larsson, 1993).

La fragmentación de la FC es un procedimiento que toma tiempo ya que involucra múltiples pasos. El tiempo de equilibrio para poder obtener el gel sin la presencia de fases cristalinas anisotrópicas (líquido), según reportan Siekmann *et al.* (2002) al realizar el monitoreo por medio de microscopía de luz polarizada, es de entre 24 y 48 horas. Estos mismos autores también han reportado que las mejores propiedades de homogeneidad macroscópica y estabilidad a corto plazo para la obtención de los Cubosomas* se pueden tener siguiendo las indicaciones que se muestran a continuación:

- (1) Equilibrio de la FC MO/agua (24–48 h),
- (2) Agitación con la dispersión de SUV –Vesículas unilamelares- (48 h),
- (3) Adición de una solución de P407 y agitación continua (24–48 h),
- (4) Pre-dispersión por medio de sonicación (5–10 min),
- (5) Homogeneización a alta presión

Es importante mencionar que las proporciones y los procedimientos seguidos por los autores son los mismos que propusieron Landh, (1991); Landh y Larsson, (1993). La modificación de estos tiempos trae como consecuencia cambios significativos en las propiedades de las dispersiones obtenidas (Siekmann *et al.*, 2002). Así, la preparación de dispersiones submicrónicas por medio del método de fragmentación de la FC en volumen (“*bulk*”), requiere de tiempos considerables para permitir la obtención de las NP’s. Por otro lado, algunas técnicas requieren del uso de disolventes clorados o bien del empleo de equipo sofisticado de laboratorio lo que aumenta el costo de producción.

IV. HIPÓTESIS

Si el método de emulsificación difusión permite la obtención de partículas submicrónicas poliméricas formadas por el mecanismo de difusión del disolvente, entonces al sustituir los polímeros por sustancias lipídicas y encontrar las condiciones idóneas se producirán por este mismo mecanismo dispersiones lipídicas de talla submicrónica que pueden ser potenciales acarreadores de activos terapéuticos.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el método de emulsificación difusión nos permite la obtención de sistemas dispersos lipídicos de talla submicrónica con potencialidad terapéutica, a partir de la optimización de los parámetros del proceso.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Determinar cualitativamente las condiciones de solubilización de los lípidos en los disolventes (parcialmente solubles en agua) que se emplearán como fase orgánica en el método de emulsificación difusión, para establecer las condiciones en las que se puedan obtener los sistemas dispersos submicrónicos para cada uno de los lípidos.

- ii. Determinar la influencia de distintos parámetros sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas (cantidad de lípido, el tipo y la cantidad de estabilizante, la naturaleza del disolvente y la velocidad de agitación) usando los lípidos modelo, y poder así establecer los parámetros críticos en la preparación de estos sistemas de talla submicrónica por medio del método de emulsificación difusión.

- iii. Cargar un fármaco liposoluble (Omapatrilat, un antihipertensivo) en un sistema disperso formado de monoleína mediante el método de emulsificación difusión, y probar la eficiencia de este sistema como acarreador y promotor de la absorción oral.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Materiales lipídicos

Gliceril behenato; Compritol® ATO 888 (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México)

Monoestearato de Glicerilo 40-55; Geleol® (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México)

Lauroil macroglicéridos; Gelucire® 44/14 (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México)

Estearoil macroglicéridos; Gelucire® 50/13 (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México)

Monoleato de glicerilo; Rylo® MG 20 (Danisco; donado por Grindsted, Dinamarca)

6.1.2 Polímeros estabilizantes y tensoactivos

Albúmina sérica bovina (Serva; USA)

Gelatina (J.T., Baker; México)

Alcohol polivinílico, Mowiol® PM 26 000 (Clariant; Alemania)

Poli(vinilpirrolidona), Plasdane RS 29/32 (USA)

Polisorbato 80, Tween® 80 (ICI Surfactants; USA)

Poloxámero 188, Pluronic F68® (Sigma; Alemania)

Poloxámero 407, Pluronic F127* (Sigma; Alemania)

6.1.3 Disolventes

Acetato de etilo GA (Aldrich; USA)

Acetato de etilo HPLC (Fermont; México)

Acetato de isopropilo GA (Mallinckrodt; USA)

Acetato de metilo GA (Aldrich; USA)

Agua destilada (Milli Q, Millipore USA)

Metil etil cetona GA (Fermont; México)

Cloroformo GA (Fermont; México)

Metanol GA (Fermont; México)

6.1.4 Soluciones amortiguadoras y reactivos

Bifalato de potasio ($\text{KHC}_6\text{H}_4(\text{COO})_2$) (Baker; México)

Bicarbonato de sodio NaHCO_3 (Baker; México)

Ninhidrina (Baker; México)

6.1.5 Equipos e instrumentos

Agitador de velocidad variable (Caframo RZR-1; Canadá)

Balanza Analítica (Boeco BBC32; Alemania)

Balanza microanalítica (Mettler, Suiza)

Baño de agua (Polyscience 5L, USA)

Sonicador (Branson Branson 5210, USA)

Microscopio electrónico de barrido (JOEL JMS-25SII, Japón)

Contador submicrónico de partículas (Coulter N4 Plus, USA)

pHmeter (Corning 430, UK)

Rotavapor (Laborota Heidolph 4000, Alemania)

Ultracentrífuga (Beckman Optima LE-80K, USA)

Equipo no invasivo para medir los parámetros fisiológicos de las ratas (Instituto Nacional de Cardiología, México)

Cromatógrafo de alta resolución en capa fina (HPTLC)

- i. Fase estacionaria: Placas de fase reversa gel de sílice C18 con indicador fluorescente (Aluigram RP-18W/UV, Alemania)
- ii. Fase móvil: CHCl_3 :MeOH (95:5)

6.1.6 Material biológico

Ratas genéticamente hipertensas *SHR* (“*Spontaneously hypertensive rats*”) donada por el Bioterio del CINVESTAV-IPN Unidad Sur.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Solubilidad de los lípidos

Para la realización de esta prueba se colocaron 60 mg de lípido y 3 ml del disolvente ($\approx 2\%$ p/v) en cuestión (saturado con agua) y se agitó en vórtex por 3 min. Para los casos en que no se observó solubilidad a temperatura ambiente ($25\text{-}30^\circ\text{C}$) se colocó el tubo de ensaye en un baño de agua y se varió la temperatura desde 30°C hasta 65°C . Es importante mencionar que esta prueba fue de tipo cualitativo, no se obtuvieron datos de la cantidad máxima de lípido que puede solubilizar el disolvente, sólo se determinó si la cantidad de lípido (2% p/v) fue soluble y la temperatura a la cual se logró. También se realizó una prueba cualitativa de solubilidad en agua para los distintos lípidos, en ésta se colocaron aproximadamente 500 mg del lípido en 25 ml ($\approx 2\%$ p/v) de agua.

6.2.2 Preparación de las dispersiones lipídicas por medio del método de emulsificación difusión

Para la preparación de las dispersiones lipídicas se empleó el MED, de manera general 400 mg del lípido se disuelven en 20 ml del disolvente (2% p/v) parcialmente soluble en agua (previamente saturado), esta fase orgánica se emulsifica con 40 ml de una fase acuosa saturada que contiene 5% p/v del estabilizante (p.ej. alcohol polivinílico). Posteriormente se somete a emulsificación con un agitador de velocidad variable a 1800 rpm por un periodo de 10 min. A la emulsión resultante se le adicionan 160 ml de agua destilada y se agita por 10 min. Finalmente se retira el exceso de disolvente por medio de un rotavapor, hasta que el volumen de la dispersión es de aproximadamente 100 ml.

6.2.3 Preparación de las dispersiones lipídicas por medio del método de emulsificación difusión a temperatura controlada

Para emplear el MED a temperatura controlada 200 mg de lípido se disuelven en 20 ml del disolvente previamente saturado de agua a la temperatura de solubilización del lípidos. Esta fase orgánica es emulsificada con 40 ml de una fase acuosa saturada de disolvente que contiene al estabilizante (p.ej. PVAL 5% p/v) y que se encuentra a la misma temperatura que la fase orgánica. Posteriormente se somete a emulsificación con un agitador de velocidad variable por un periodo de 10 min, manteniendo el control de la temperatura por medio de un baño de agua. A la emulsión resultante se le adicionan 160 ml de agua destilada a la misma temperatura que se

encuentra la emulsión y se agita por 10 min. Posteriormente se deja enfriar hasta 30 °C bajo agitación constante. Finalmente se retira el exceso de disolvente por medio de un rotavapor, hasta que el volumen de la dispersión es de aproximadamente 100 ml (Fig. 7).

6.2.4 Determinación del tamaño de partícula promedio (TPP)

La talla de las NP's se determinó empleando un contador submicrónico de dispersión de rayos láser a un ángulo de 90° (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*). Todas las medidas se hicieron por triplicado (n=3) para calcular el Tamaño de Partícula Promedio (TPP), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

6.2.5 Variables evaluadas del proceso

Con el fin de optimizar el método de preparación de las dispersiones lipídicas (DL's) se evaluaron los siguientes parámetros:

6.2.5.1 Influencia de la cantidad de lípido sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

Se varió la concentración del lípido hasta que se observó un TPP superior a un micrómetro o bien se observó la presencia de precipitados en la dispersión. En esta prueba se mantuvo fija la velocidad de agitación y la concentración del estabilizante (PVAL 5% p/v).

6.2.5.2 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

Se prepararon DL's a distintas velocidades de agitación, empleando agitación mecánica convencional (500 a 2500 rpm) con un agitador de velocidad variable. Para el caso de las DL's preparadas a temperatura ambiente se usó una propela tipo turbina y cuando la temperatura fue controlada la propela fue tipo centrífuga.

6.2.5.3 Efecto del tipo y la concentración de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

Manteniendo fija la cantidad del lípido (400 mg, 2 % p/v) se varió la concentración del estabilizante en la fase externa de la emulsión desde 0.5 hasta 15 % p/v. Se evaluaron distintos tipos de estabilizantes naturales y sintéticos: Poloxámero 188, poloxámero 407, gelatina, albúmina sérica bovina, poli(vinilpirrolidona), alcohol polivinílico y Tween 80 (surfactante).

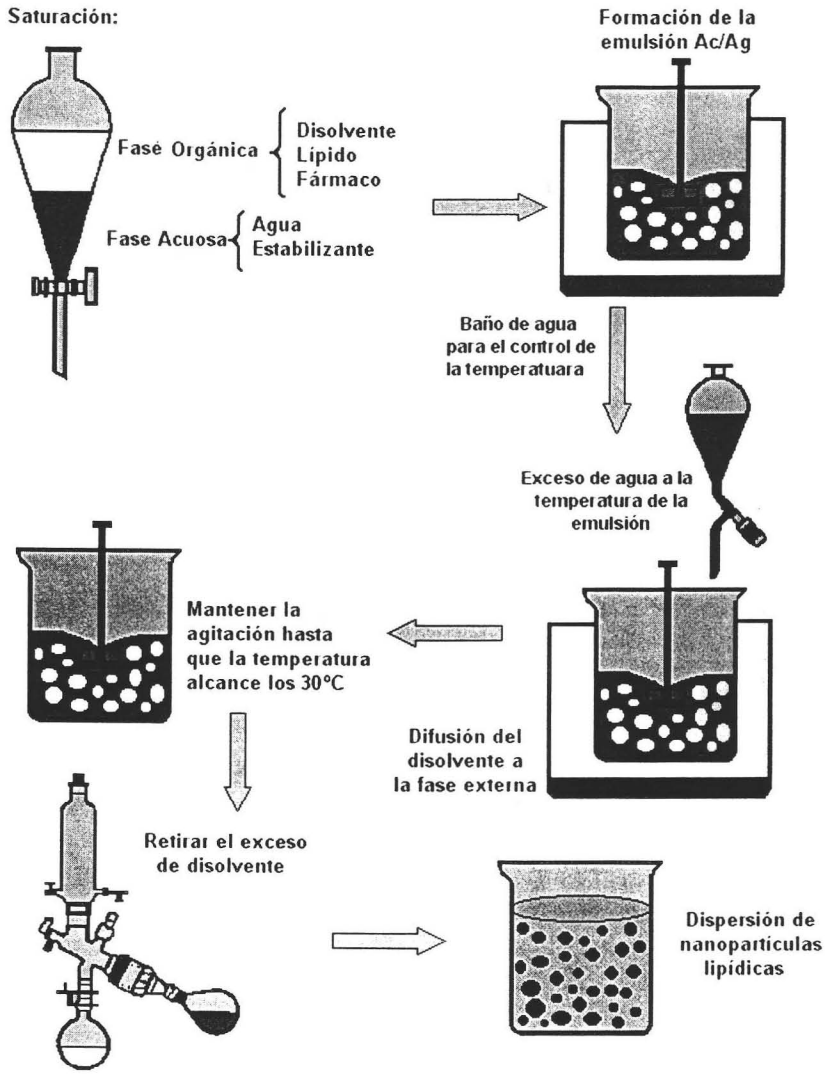


Figura 7. Representación esquemática para preparar DL's de Compritol® ATO 888 por medio del MED a temperatura controlada.

6.2.5.4 Influencia del disolvente sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

Otro parámetro del proceso que está directamente ligado con el mecanismo de formación de las NP's es el tipo de disolvente. Por ello se prepararon distintas formulaciones en las que se mantuvo fija la cantidad de lípido, de PVAL (5 % p/v) y la velocidad de agitación, variando únicamente el tipo de disolvente parcialmente miscible en agua. Se probó la metil etil cetona (MEC), el acetato de metilo (AM), el acetato de etilo (AE) y el acetato de isopropilo (AIP).

6.2.5.5 Monitoreo de la estabilidad física de las dispersiones lipídicas

Para poder evaluar la estabilidad física de las DL's se almacenaron en presencia de conservadores (metilparabeno al 0.18 % p/v y propilparabeno 0.02 % p/v) o refrigeración (4 °C) para evitar la contaminación microbiológica. Se evaluó el TPP a diferentes intervalos de tiempo.

6.2.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se determinaron las condiciones de centrifugación (velocidad / tiempo) que permitieran la separación de las NP's de la fase externa. El paquete formado se resuspendió y se volvió a centrifugar, esto con la finalidad de retirar el exceso de estabilizante. Una gota de las nanopartículas se aplicó sobre distintos materiales (papel, vidrio y directamente sobre el portamuestra) y se secó. Finalmente las NP's se recubrieron con una película fina de oro (≈ 20 nm) y la superficie se evaluó por medio de microscopio electrónico de barrido a 12.5 kV.

6.2.7 Evaluación de la eficiencia *in vivo* de las dispersiones lipídicas cargados con Omapatrilat (OMA)

6.2.7.1 Pruebas cualitativas de solubilidad del Omapatrilat en los distintos disolventes del método de emulsificación difusión

Esta prueba se llevó a cabo para determinar que combinación de fase orgánica / acuosa se usaría en la preparación de las DL's de OMA y garantizar que el OMA permaneciera en la fase orgánica y no migrara a la fase acuosa durante la preparación de las DL's. Se colocó una cantidad conocida del fármaco en cada uno de los disolventes orgánicos (AM, AE, AIP y MEC previamente saturados) y fases acuosas (agua destilada pH 5.9, solución

amortiguadora pH 8.5, solución amortiguadora pH 4.0) a probar. La cantidad de OMA en la fase orgánica fue de 0.3 % p/v (15mg/5ml) y de 0.15 % p/v (15mg/10ml) para la fase acuosa, considerando una carga en las DL's de 60 mg en 100 ml (0.6 mg/ml a ser administrados).

Para cada fase orgánica y acuosa se agitó 1 min (vórtex) y la prueba se realizó a temperatura ambiente (25-30 °C). Por medio de inspección visual se determinó si era o no soluble la cantidad de OMA colocada en el disolvente. Para las fases acuosa en que el OMA no fue soluble (el polvo permaneció en el tubo de ensaye) el sedimento se filtró y al filtrado (recuperado en un vial) se le retiró la fase acuosa por medio de presión reducida en un desecador, y se trató como se describe a continuación. Una vez seco el vial, se lavó cinco veces con 1ml de AE_{HPLC} , se juntaron los lavados y finalmente se aforó a 5 ml. De aquí se tomaron de manera automática 5000 nl (2500 nl dos veces) para ser aplicados en la placa fase reversa C18 de HPTLC. La muestra se corrió junto con la curva de calibración de OMA [300 a 2300 ng], preparada a partir de un stock de 1 ng/nl. Una vez que el AE_{HPLC} se había evaporado de la placa, ésta se eluyó (95:5 $CHCl_3$:MeOH) y se le aplicó el revelador (ninhidrina -0.2 g en 100 ml de alcohol etílico anhidro). Una vez que las muestras toman la coloración rosa intenso característico (250-300 min), se leyó en el espectro a una longitud de onda de 515 nm. Finalmente para conocer la cantidad de OMA en la muestra se extrapola la absorbancia en la curva de calibración. Para el caso en que no aparecía una mancha color rosada con el R_f de la muestra a cuantificar, se concluía que no había más del 2% de OMA soluble en la fase acuosa de la prueba de solubilidad (10ml).

6.2.7.2 Preparación de las dispersiones lipídicas cargados con Omapatrilat

Una vez seleccionado el disolvente para la preparación de las DL's la metodología seguida fue similar a la mencionada previamente para la preparación de DL's por medio del MED (Sección 6.2.2). La única variante fue que el OMA (60 mg) se disolvió en la fase orgánica (20 ml del disolvente saturado) junto con la MO (250 mg). La dispersión que contenía al OMA se llevo a un volumen exacto de 100 ml para tener una concentración de 0.6 mg/ml. De esta manera, para una dosis de 1 mg / kg / día, se pudo administrar a una rata (peso \approx 0.3 kg) un volumen de 0.5 ml de la dispersión de MO por día.

6.2.7.3 Estabilidad química del Omapatrilat y física de las dispersiones lipídicas de monooleína

La estabilidad química del OMA posterior a la preparación de las DL's se corroboró por medio de CCF, usando un sistema de elución $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5) junto con un control positivo (OMA puro). Se tomaron exactamente 2 ml de la DL's y se colocaron en un vial (HPTLC) para evaporar el agua por medio de presión reducida. Una vez seca la muestra se disolvió con AE_{HPLC} y se eluyó junto con el control y una mezcla de ambos. Para la estabilidad física de las dispersiones lipídicas de MO se monitoreó la talla de partícula de éstas durante el doble del tiempo que tomarían las pruebas *in vivo* (12 días) como se explicó en la sección 6.2.4.

6.2.7.4 Administración del Omapatrilat a ratas genéticamente hipertensas (SHR)

Los tratamientos fueron: Una solución (OMA-Soln.), una suspensión (OMA-Susp.) y una dispersión lipídica a base de monooleína (OMA-DLMO). La dosis del Omapatrilat fue de 1 mg / kg / día y se mantuvo constante para los distintos tratamientos. Por cada uno de ellos se emplearon cinco ratas genéticamente hipertensas (SHR "*spontaneously hypertensive rats*"). El estudio comprendió cinco días durante los cuales se administraron las distintas formas farmacéuticas una vez al día a cada grupo. Como control se utilizaron tres ratas SHR a las que se administró DLMO sin OMA.

6.2.7.5 Monitoreo de la presión arterial media (PAM)

Para el monitoreo de la presión arterial sistólica (PS) y diastólica (PD) se empleó un método no invasivo usando un equipo diseñado en el Instituto Nacional de Cardiología (Flores *et al.*, 2002). Una vez obtenidas la PS y la PD a diferentes tiempos (0 a 3 h) para cada día de la administración, se calculó la presión arterial media (PAM) con la relación:

$$\text{PAM} = (2\text{PS} + \text{PD}) / 3 \text{ [mmHg]}$$

6.2.7.6 Cálculo del porcentaje del efecto alcanzado en la presión arterial

Para establecer el porcentaje del efecto alcanzado por los distintos tratamientos se tomó la diferencia entre la PAM inicial ($t = 0$) y la final ($t = 180$ min) como el 100 %, de esta manera a cada punto se le pudo asignar un porcentaje de efecto.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 SOLUBILIDAD DE LOS LÍPIDOS

Una vez que se seleccionaron los lípidos, con base en sus propiedades fisicoquímicas, toxicidad y biocompatibilidad farmacéutica, la primera prueba realizada fue la solubilidad de estos en los distintos disolventes, así como en agua. Los lípidos fueron el Compritol® ATO 888, Geleol®, Gelucire® 44/14, Gelucire® 50/13 y el Rylo® 20 (Tabla 5).

Tabla 5. Distintos lípidos para la preparación de los sistemas lipídicos de talla nanométrica.

| Lípidos | HLB | p.f. (°C) |
|--------------------|------|-----------|
| Compritol® ATO 888 | 2.0 | 69.0-74.0 |
| Geleol® | 3.8 | 54.5-58.5 |
| Gelucire® 44/14 | 14.0 | 42.5-47.5 |
| Gelucire® 50/13 | 13.0 | 46.0-51.0 |
| Rylo® MG20 | 3.3 | 35.0 |

FM: NR: No Reportado

Algunos de los lípidos propuestos para la preparación de las DL's pueden dispersarse en agua, por lo cual se realizó una prueba de solubilidad en agua destilada de todos los lípidos a manera de control. Pasados cinco días en contacto con el medio acuoso el Gelucire® 44/14 y el Gelucire® 50/13 habían formado dispersiones, para el caso del Gelucire® 44/14 se apreciaba a simple vista la presencia de partículas. Lo anterior está directamente relacionado con sus valores de HLB altos lo cual significa que tienen un alto contenido de moléculas afines al agua. Se realizó la determinación del TPP para las dispersiones de Gelucire® 50/13 (Tabla 6) y se encontró que éste fue de 336 ± 14 nm a los cinco días. De lo anterior se puede concluir que el Gelucire® 50/13 pueda dispersarse en agua en partículas de tamaño submicrónico sin el uso de un estabilizante o tensoactivo. Cabe señalar que el Gelucire® 50/13 puede autodispersarse en tallas submicrónicas, pero esto no significa que pueda integrar un fármaco en las partículas formadas. Otro punto importante es que este lípido no había sido utilizado para la preparación de este tipo de sistemas coloidales. El Compritol® ATO 888 y el Geleol®, con valores de HLB bajos, son lípidos que presentan una alta hidrofobicidad lo cual se hizo evidente con la formación de grandes agregados (Tabla 6). Para el caso del Rylo® MG20 o monooleína (MO) se formó una estructura transparente con apariencia de un gel viscoso que presentó límites bien definidos, muy probablemente se trata de la fase cúbica en volumen de acuerdo con lo descrito en la literatura (Ganem-Quintanar *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2001).

Tabla 6. Distintos lípidos para la preparación de los sistemas nanoparticulados.

| Lípidos | Solubilidad en agua | Apariencia Macroscópica |
|--------------------|---------------------|---|
| Compritol® ATO 888 | Insoluble | Agregados detectables a simple vista |
| Geleol® | Insoluble | Agregados detectables a simple vista |
| Gelucire® 44/14 | Dispersable | Dispersión y agregados (>1 µm) |
| Gelucire® 50/13 | Dispersable | Dispersión lechosa (336.0±14nm) ^a |
| Rylo® MG20 | Insoluble | El lípido se hincho y formó una estructura transparente que presentó límites bien definidos |

a: El TPP que se reporta se tomó cinco días después de haber colocado el lípido con el agua destilada

Como se aprecia en la Tabla 7 a temperatura ambiente el Compritol® ATO 888 y Gelucire® 50/13 no son solubles en los disolventes probados (AM, AE, AIP y MEC), mientras que Geleol® sólo fue soluble a temperatura ambiente en el AIP. Lo anterior limita su uso para la preparación de DL's por medio del método de emulsificación difusión a temperatura ambiente. Por lo tanto, para el empleo de este método se tuvo que controlar la temperatura del proceso, es decir, se trabajó a una temperatura tal que permitiera solubilizar al lípido en el disolvente usado. Por otro lado, la MO y el Gelucire® 44/14 son solubles a temperatura ambiente en los disolventes (AM, AE, AIP, MEC). De lo anterior se puede concluir que para la preparación de las dispersiones lipídicas del Compritol® ATO 888 y Gelucire® 50/13 será necesaria la modificación del proceso, teniéndose que llevar a cabo a temperatura controlada al emplear AM, AE, AIP y MEC. Finalmente para el Geleol® este ensayo deja abierta la posibilidad de poder preparar dispersiones lipídicas por medio del MED a temperatura ambiente (AIP y AE) o controlada (AM y MEC). Cabe señalar que esta opción está abierta para todos los lípidos, siempre y cuando se encuentre un disolvente capaz de solubilizarlo a temperatura ambiente y que además permita la obtención de las DL's de talla submicrónica.

Tabla 7. Prueba cualitativa de solubilidad de los lípidos para la preparación de dispersiones lipídicas.

| Lípidos | Metil etil cetona | | Acetato de metilo | | Acetato de etilo | | Acetato de isopropilo | |
|--------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------|-----------------------|------------|
| | TA ^a | TC ^b | TA | TC | TA | TC | TA | TC |
| Compritol® ATO 888 | No | Si (65 °C) | No | No ^c | No | Si (60 °C) | No | Si (55 °C) |
| Geleol® | No | Si (40 °C) | No | Si (45 °C) | Si | --- | Si | --- |
| Gelucire® 44/14 | Si | --- | Si | --- | Si | --- | Si | --- |
| Gelucire® 50/13 | No | Si (35 °C) | No | Si (35 °C) | No | Si (40 °C) | No | Si (50 °C) |
| Rylo® MG20 | Si | --- | Si | --- | Si | --- | Si | --- |

(a) TA: Temperatura ambiente (25-30°C); (b) TC: Temperatura controlada; (c) En este caso la temperatura máxima probada fue de 55 °C

7.2 PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS POR MEDIO DEL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE: GELUCIRE® 44/14 Y MONOLEÍNA

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la preparación de las dispersiones por medio de método de emulsificación difusión a temperatura ambiente para los lípidos: Gelucire® 44/14 y monoleína. Estos dos lípidos pudieron ser solubilizados en distintos disolventes a temperatura ambiente, por esta razón se presentan los resultados de estos en primera instancia.

7.2.1 Influencia de la cantidad de Gelucire® 44/14 sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

La influencia de la concentración de Gelucire® 44/14 en la fase interna se evaluó al modificar ésta desde 5 % hasta 25 % (p/v). En la Fig. 8 se advierte que el TPP de las dispersiones va en aumento a medida que la cantidad del lípido se incrementa en la fase interna. Este efecto es muy marcado entre las concentraciones de 15 y 20 % (p/v). En este gráfico también se observa que a concentraciones de 20 y 25 % las dispersiones obtenidas presentaron TPP por encima de $1\mu\text{m}$, siendo 15 % la máxima cantidad que puede ser incorporada manteniéndose las tallas submicrónicas. Esta observación puede ser explicada con base en el cambio de viscosidad que trae consigo el aumento de la cantidad de lípido en la fase interna. Con lo que la velocidad de difusión del disolvente (parcialmente miscible en agua) de la fase interna hacia la fase externa disminuye. De acuerdo al mecanismo de formación previamente explicado (Sección 3.2) la aparición de una gruesa zona de supersaturación, como consecuencia de la disminución de la velocidad de difusión del disolvente, lo que provocará la formación de NP's de mayor tamaño. Lo anterior se explica debido a que la probabilidad de agregación de las "protonanopartículas" aumenta y con ellos disminuye el efecto del estabilizante. Esta relación inversa entre la carga de la fase interna y el tamaño de partícula fue explicado por Leroux *et al.*, 1995. Estos autores mencionan que la estabilidad de una dispersión se ve favorecida cuando la diferencia en densidades de las fases es pequeña. Así, al aumentar la concentración de lípidos en la fase orgánica la densidad de ésta cambia y con ellos la estabilidad de la emulsión, teniendo efecto en el tamaño de partícula formado. Resultados similares fueron obtenidos por Schubert y Müller-Goymann (2003) en la preparación de nanopartículas lipídicas (Softisan® 100) por medio del método de inyección de disolvente.

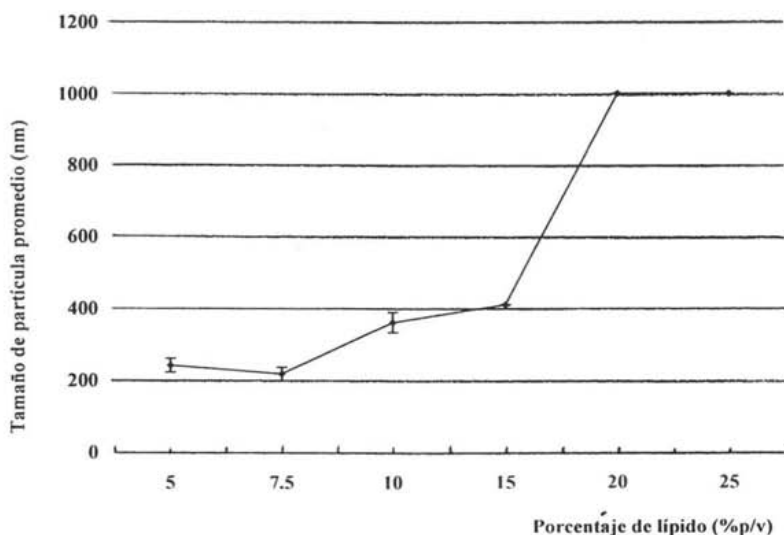


Figura 8. Efecto de la cantidad de lípido sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire® 44/14 y PVAL (5% p/v) con MEC.

7.2.2 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14

La velocidad de agitación y el TPP de las dispersiones preparadas a partir de Gelucire® 44/14 guardan una relación inversamente proporcional, es decir entre mayor sea la agitación empleada menor será el TPP. Lo anterior, que se muestra en la Fig. 9, puede ser también fundamentado con base en el mecanismo de formación de las NP's para el MED. En el mecanismo propuesto para esta metodología se contempla la existencia de una emulsión ac/ag que al ser diluida da pie a la formación de las NP's. Cada uno de los glóbulos de esta emulsión forma varias "protonanopartículas", es decir que cada glóbulo de la emulsión dará lugar no sólo a una nanopartícula sino a varias de ellas. Es de esperarse entonces que con una velocidad de agitación mayor el tamaño del glóbulo de la emulsión disminuya y con ello también lo harán las "protonanopartículas". Lo que trae como consecuencia que las NP's formadas presentan una menor talla de partícula cuanto menor sea el tamaño del glóbulo de la emulsión formada. Cabe señalar que a velocidades de agitación por arriban de 2000 rpm se obtuvieron tamaños de partícula promedio menores de 100 nm, hallazgo interesante desde el punto de vista tecnológico.

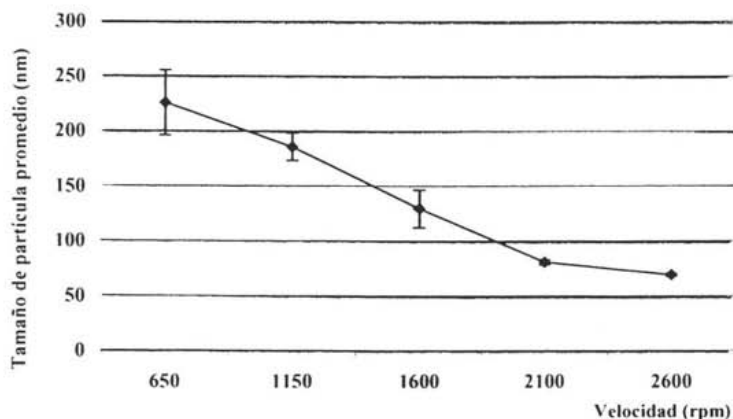


Figura 9. Efecto de la velocidad de agitación sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire® 44/14, PVAL (5% p/v), usando MEC.

7.2.3 Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14

La influencia del estabilizante (PVAL 0.5-15.0 % p/v) sobre el TPP de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14 se muestra en la Fig. 10. El TPP decrece a medida que la cantidad de estabilizante aumenta, sin embargo bajas cantidades de PVAL (0.5 y 2.5% p/v) permiten la obtención de dispersiones de talla submicrónica. También se puede observar que a partir de la concentración de 10 % no se encontró variación en el TPP. La explicación para este comportamiento se basa en que un tamaño de glóbulo menor en la emulsión produce nanopartículas de menor tamaño (como se mencionó en la sección anterior). Cuando la cantidad de estabilizante es suficiente para que el tamaño del glóbulo alcance su mínimo tamaño, el exceso de estabilizante no juega un papel importante en la protección del glóbulo ni en la reducción del TPP (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

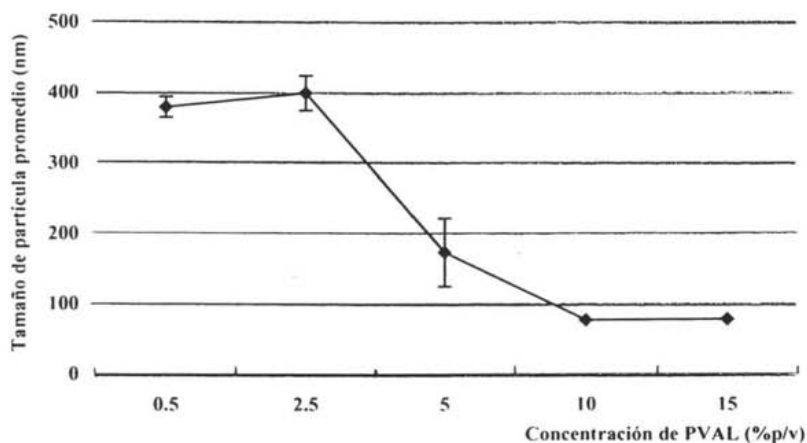


Figura 10. Efecto de la concentración del PVAL sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire* 44/14, usando MEC.

A excepción del Tween 80 todos los estabilizantes usados (P188, Gelatina, ASB, PVP, PVAL) permitieron la obtención de las DL's submicrónicas, sin embargo a pesar de permitir la preparación de las NP's algunos de ellos no son capaces de estabilizar las dispersiones al paso del tiempo (Fig. 11). Solamente el PVAL mantiene los tamaños de partícula submicrónicos a través de la prueba de estabilidad por treinta días.

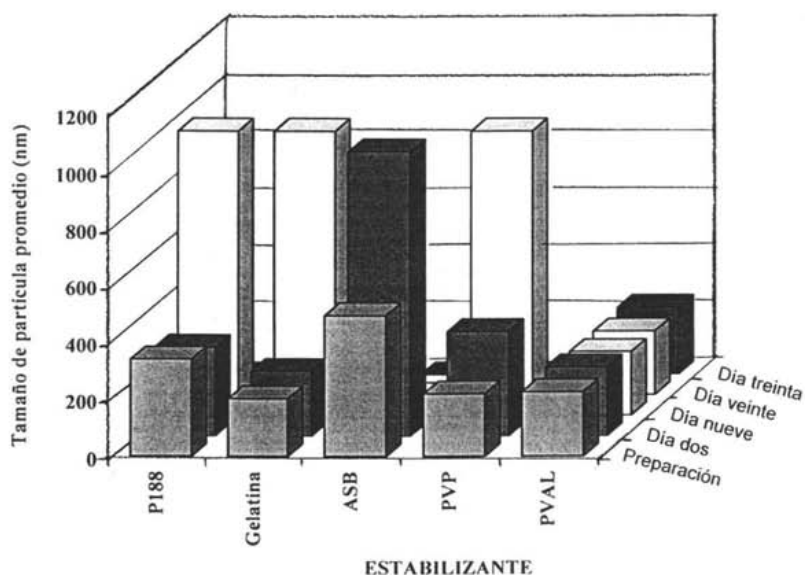


Figura 11. Estabilidad de las DL's de Gelucire® 44/14 preparadas usando diferentes estabilizantes (P188, Gelatina, ASB, PVP, PVAL).

7.2.4 Influencia del disolvente sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14

Como se puede ver en la Tabla 8 existe una variación en el TPP de las dispersiones de Gelucire® 44/14 en función del disolvente utilizado (AM, AE, AIP, MEC), lo anterior es apoyado por las pruebas estadísticas de ANOVA ($\alpha=0.05$, $F_{\text{Tablas}} = 7.5901$, $F_{\text{Calculada}} 373.1366$). El TPP está directamente relacionado con la miscibilidad entre el disolvente y el agua, entre mayor es la miscibilidad acuosa menor es el TPP de las DL's. Esto se puede explicar si relacionamos estos hallazgos con el mecanismo de formación de NP's propuesto para el método de emulsificación difusión explicado en la sección 3.2 (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1997). La formación de las NP's se debe a la difusión de la fase orgánica hacia la fase acuosa, así entre mayor sea la miscibilidad del disolvente con el agua, mayor será la velocidad a la cual éste difunde. Lo anterior concuerda con lo reportado por Labouret *et al.* (1995) al producir partículas por dilución de una solución de polímero con agua. Estos investigadores encontraron que el tamaño de partícula está determinado por la velocidad de distribución del disolvente, por lo que sólo se producían NP's al usar disolventes cuya distribución hacia la fase acuosa fuera muy rápida (p.ej. acetona), mientras que el tamaño de partícula aumentó al emplear disolventes menos hidrofílicos. Cabe mencionar que

con los cuatro disolventes probados fue posible la obtención de sistemas dispersos con un TPP menor a 1µm.

Tabla 8. Efecto del tipo de disolvente sobre el TPP de las dispersiones de Gelucire® 44/14 y 5 % (p/v) PVAL.

| Disolvente | Miscibilidad con agua ¹ | TPP ± DE (nm) | CV |
|------------|------------------------------------|---------------|-----|
| MEC | 37.0 | 171 ± 7.5 | 4.4 |
| AM | 33.0 | 166 ± 1.6 | 0.9 |
| AE | 8.5 | 271 ± 6.1 | 2.3 |
| AIP | 3.0 | 385 ± 15.7 | 6.6 |

(1). La miscibilidad está referida al peso por cada 100 partes (Lange's Handbook of Chemistry, 1973)

Lo anterior está de acuerdo con lo planteado por Davies y Rideal (1961) quienes afirmaron que la difusión de un disolvente puro de una gota de disolvente que contiene lípido (fase interna) provoca variaciones en la tensión interfacial en la superficie del glóbulo, esta variación baja la tensión superficial e induce turbulencia y pulsaciones interfaciales entre las dos fases. A su vez esta turbulencia interfacial y pulsación causan un rompimiento del glóbulo original en pequeños fragmentos de gotas cuya concentración de lípidos sufre muy ligeros cambios. Se puede concluir así que el tipo de disolvente empleado es un parámetro crítico para la formación de las dispersiones lipídicas.

7.2.5 Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14

El seguimiento de la estabilidad física se realizó por medio del TPP de las DL's de Gelucire® 44/14 y PVAL. Se encontró que el día de su preparación éstas tuvieron un TPP de 225 ± 2.7 nm y que a los cuatro meses presentaron un TPP muy semejante (236.4 ± 48.7 nm). En la Tabla 9 se muestran los TPP a través del tiempo para estas DL's observándose que no hay diferencia significativa entre las medias según la prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$, $F_{\text{Calculada}}$ de 0.2875; F_{Tablas} de 3.1059).

Tabla 9. Estabilidad de las DL's preparadas a partir de Gelucire® 44/14 y PVAL usando MEC.

| Tiempo | TPP ± DE (nm) | CV |
|-------------|---------------|------|
| Preparación | 224.6 ± 2.7 | 1.2 |
| Día dos | 240.6 ± 15.1 | 6.3 |
| Día nueve | 223.1 ± 6.4 | 2.9 |
| Día veinte | 224.1 ± 5.4 | 2.4 |
| Día treinta | 235.7 ± 31.7 | 13.4 |
| Mes cuatro | 236.4 ± 48.7 | 15.3 |

7.2.6 Influencia de la cantidad de monoleína sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

Como se mencionó previamente (Sección 3.3) la monoleína es un lípido que presenta características muy particulares y para el entendimiento de los resultados obtenidos en este trabajo es necesario tomar en cuenta estas propiedades.

La relación entre la concentración de monoleína en la fase interna y el TPP de las DL's se aprecia en la Tabla 10 y en la Fig. 12. Se puede distinguir claramente incluso a altas concentraciones (15% p/v) que las DL's que se obtuvieron con MO presentaron un tamaño submicrónico ($< 1 \mu\text{m}$), y su TPP no sobrepasa los 180 nm en ninguno de los casos. Al aplicar la prueba estadística de ANOVA ($\alpha = 0.05$, $F_{\text{Tablas}} = 2.2957$, $F_{\text{Calculada}} = 1.7519$) a estos resultados, no se encontró una diferencia significativa entre las medias de los TPP para las distintas concentraciones de monoleína. El hecho de no haber encontrado una variación en el TPP con el aumento de la concentración de MO en la fase interna posiblemente se debe a que la monoleína presenta un estado de agregación tal, que la talla de la dispersión no se ve afectada por la cantidad, aunque la eficiencia del proceso empieza a bajar. En este caso la carga máxima obtenida sin que se observe la aparición de agregados es de 7.5 % (p/v). Si analizamos la composición de las dispersiones y las contrastamos con los diagramas de fases reportados para la MO-H₂O (Larsson, 1989), podemos suponer que el tipo de estructura que se ha obtenido es la fase cúbica (FC) de la MO que se forma en exceso de agua. Sin embargo, como se discutirá más adelante hay que tener en cuenta que en nuestro sistema tenemos un tercer componente que es el estabilizante.

Tabla 10. Efecto de la cantidad de MO en la fase interna sobre el TPP de las DL's, usando PVAL 5 % (p/v) y usando MEC.

| MO % (p/v) | MO/PVAL | TPP \pm DE (nm) | CV | Agregación |
|------------|---------|-------------------|-----|------------|
| 0.13 | 0.01 | 175.7 \pm 1.2 | 0.7 | - |
| 0.25 | 0.03 | 172.3 \pm 5.9 | 3.4 | - |
| 1.00 | 0.10 | 177.0 \pm 3.4 | 1.9 | - |
| 1.50 | 0.20 | 175.0 \pm 2.2 | 1.2 | - |
| 2.00 | 0.20 | 175.7 \pm 1.4 | 0.8 | - |
| 3.00 | 0.30 | 177.0 \pm 1.7 | 1.0 | - |
| 4.00 | 0.40 | 176.7 \pm 0.8 | 0.5 | - |
| 5.00 | 0.50 | 175.0 \pm 1.2 | 0.7 | - |
| 7.50 | 0.80 | 179.3 \pm 3.1 | 1.7 | - |
| 10.00 | 1.00 | 179.7 \pm 1.7 | 1.0 | - |
| 15.00 | 1.50 | 175.0 \pm 1.6 | 0.9 | - |

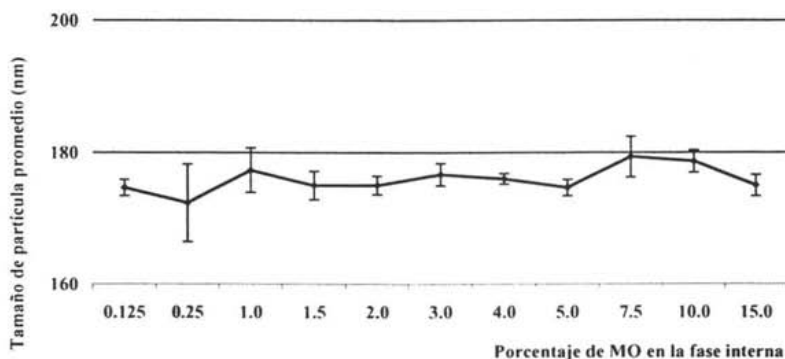


Figura 12. Influencia de la cantidad de MO en la fase interna sobre el TPP de las DL's.

En las Tablas 10 se observa que a una razón de MO/PVAL ≥ 1 aparecen agregados macroscópicos en la dispersión, lo que sugiere que la relación MO/PVAL que se requiere para poder dispersar la totalidad del lipido, es menor a uno. El hallazgo permite sugerir que las estructuras de estas partículas no difieran demasiado en función de la concentración del lipido, apoyando lo planteado previamente en esta sección.

7.2.7 Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de monoleína

Al variar la concentración de PVAL en la fase externa encontramos que el TPP no se ve afectado de manera significativa como se puede observar en la Tabla 11 (ANOVA $\alpha=0.05$, donde incluyendo todos los datos la $F_{\text{Tablas}} = 2.8477$, $F_{\text{Calculada}} 50.8132$ y exceptuando la MO sin PVAL $F_{\text{Tablas}} = 3.1059$, $F_{\text{Calculada}} 2.8415$), lo que apoya la idea de la existencia de un estado de agregación de talla nanométrica en el que se encuentra la MO en las DL's. Un resultado importante, que se puede apreciar en la Fig. 13, es que la MO sin el uso de PVAL puede dispersarse en tallas nanométricas (105 ± 4.1 nm). Sin embargo se formaron agregados en la formulación que contenía 400 mg del lipido. Las DL's preparadas a partir de MO sin el uso de estabilizantes posiblemente estén formadas de la FC de acuerdo a Siekmann *et al.*, 2002, ya que esta estructura de la MO se ha reportado sin el uso de estabilizantes en exceso de agua.

Tabla 11. Efecto de la cantidad de PVAL en la fase externa sobre el TPP de la DL's preparadas a partir de MO usando MEC.

| PVAL (p/v) | MO:PVAL | TPP \pm DE (nm) | CV | Agregación |
|------------|---------|-------------------|-----|------------|
| 0.0 | 1:0 | 105.3 \pm 4.1 | 3.9 | + |
| 0.5 | 2:1 | 165.3 \pm 10.3 | 6.3 | + |
| 1.0 | 1:1 | 161.7 \pm 5.8 | 3.6 | + |
| 2.5 | 2:5 | 167.0 \pm 7.9 | 4.7 | - |
| 5.0 | 1:5 | 173.3 \pm 5.7 | 3.3 | - |
| 10.0 | 1:10 | 178.0 \pm 1.5 | 0.8 | - |
| 15.0 | 1:15 | 174.0 \pm 2.2 | 1.2 | - |

En las Tablas 11 se aprecia nuevamente que a una razón de MO/PVAL \geq 1 aparecen agregados macroscópicos en la dispersión, apoyando lo planteado en la sección anterior sobre la relación MO/PVAL que se requiere para poder dispersar la totalidad del lípido (menor a uno).

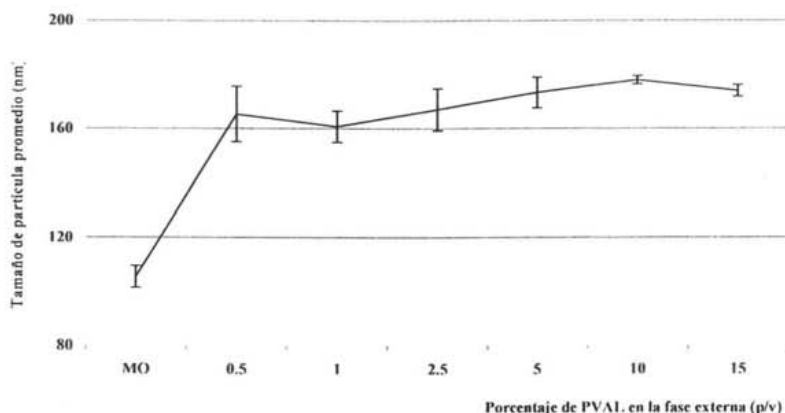


Figura 13. Efecto de la cantidad de PVAL en la fase externa sobre el TPP de las DL's de MO.

En la Tabla 12 se muestran los TPP para los estabilizantes usados, pudiéndose apreciar que estos permitieron la obtención de DL's de MO de orden submicrónico. Sin embargo las dispersiones de MO preparadas con PVAL y P407 como estabilizantes presentaron una sola población de partículas mientras que para la DL's con P188 y Tween 80 formaron de al menos dos poblaciones de partículas. El comportamiento de las dispersiones preparadas con P188 puede estar directamente relacionado con la capacidad de este estabilizante para evitar la coalescencia de las partículas, es decir su eficiencia en este sentido es baja. Comportamiento que no se observó con el PVAL y el P407 con lo que podemos concluir que estos estabilizantes son

capaces de mantener a las partículas estables de manera individual. Por otra parte, la reducción en la tensión superficial provocada por la presencia del Tween 80 parece ser que es capaz de permitir la formación de las DL's de MO de tamaños muy cercanos a los 100 nm, además de una población de tamaños de aproximadamente 10 nm. Esta última probablemente esté constituida de pequeñas vesículas formadas por el excedente de Tween que no está directamente relacionado con la superficie de las partículas.

Tabla 12. Efecto del tipo de estabilizante sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de MO y 5% (p/v) de estabilizante, usando MEC.

| Estabilizante | Mecanismo | TPP \pm DE (nm) | CV |
|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------|
| PVAL | Estérico | 154.2 \pm 9.3 | 6.0 |
| P407 | Estérico | 170.9 \pm 13.4 | 7.8 |
| P188 | Estérico | 760.2 \pm 125.3 113.7 \pm 45 | 16.5 |
| Tween 80 | Disminución de la tensión superficial | 116.0 \pm 9.0 12.6 \pm 1.7 | 7.8 |

Al variar la cantidad de P407, estabilizante con el que la mayoría de las dispersiones de MO reportadas han sido preparadas, se encontró una relación inversa entre la cantidad de estabilizante en la fase externa y el TPP de las DL's (Fig. 14).

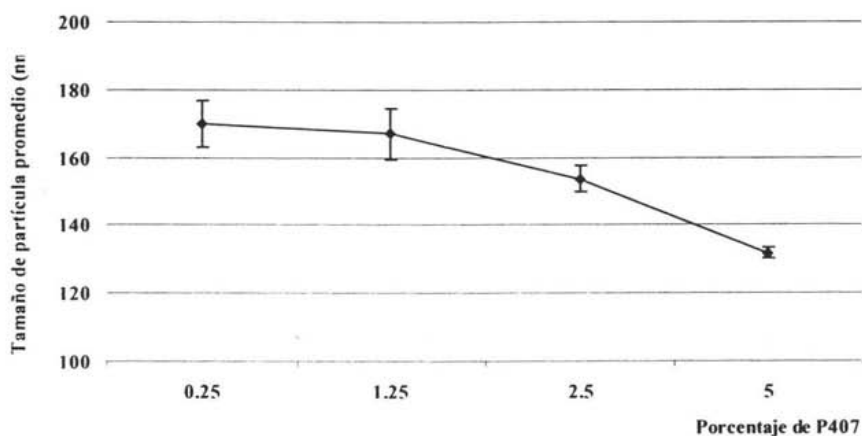


Figura 14. Efecto de la cantidad de P407 en la fase externa sobre el TPP de las DL's de MO, usando MEC.

A nuestro conocimiento no existen reportes del uso del PVAL como posible agente estabilizante para la preparación de sistemas dispersos de MO, sin embargo la dispersión de la MO en agua se ha conseguido usando proteínas como la caseína o la lisozima; polímeros sintéticos como el P403 o P407 y por medio de tensoactivos iónicos naturales como lo son las sales biliares (p.ej. glicolato de sodio, taurocolato de sodio). También se han reportado los diagramas de fases para sistema como MO-lisozima-H₂O (Larsson, 1989); MO-P407-H₂O (Landh, 1994) y para MO-Sales biliares-H₂O (Gustafsson *et al.*, 1999). Para tratar de hacer una analogía con los resultados obtenidos en este trabajo es conveniente analizar los diagramas de fases reportados para los poloxámeros, cuyo mecanismo de estabilización (estérico), es el mismo del PVAL y el P407. En los sistemas en los que se introduce una tercera molécula se ha encontrado que en la zona del diagrama de fases donde el agua se encuentra en exceso (como en nuestro caso) aparece una estructura llamada L₃. Esta fase L₃ o esponja "*sponge phase*" se puede considerar como la versión fundida de la fase cúbica bicontinua inversa y se cree que está conformada de membranas en forma de silla "*saddle-shaped*" que están multiconectadas sin presentar un ordenamiento importante. La región correspondiente a la fase L₃ no se encuentra en los diagramas MO-H₂O, apareciendo hasta que se introduce una molécula anfifílica al sistema (Gustafsson *et al.*, 1999; Landh, 1994). En el sistema MO-P407-H₂O Landh (1994) reporta que a altas diluciones ($\approx 80\%$ p/p) y con una proporción aproximadamente igual entre la MO y el P407 aparece la fase L₃ o esponja. Este autor menciona que a medida que la dilución aumenta también lo hace la opalescencia del sistema. En este trabajo se afirma que es esta fase L₃ la que permite tener dispersiones coloidales de la FC: Cubosomas[®]. Lo anterior se explica basándose en el diagrama de fases MO-P407-H₂O, en el que existe una región de tres fases L₃-FC-H₂O. Gustafsson *et al.* (1999) al agregar una pequeña cantidad de glicolato de sodio al sistema MO-H₂O o MO-solución salina (0.155M) observaron un hinchamiento considerable de la fase de cristal-líquido, en donde la fase L₃ aparece entre la fase lamelar y las soluciones diluidas. Estos autores reportan también (por medio de Cryo-TEM) que en las regiones diluidas del diagrama de fases además de micelas y vesículas, pueden aparecer partículas dispersas de la fase cúbica, así como fragmentos de la fase L₃.

Con base en lo anterior se sugiere que las dispersiones coloidales del sistema MO-P407-H₂O preparadas en este trabajo están constituidas en su estructura interna por la fase L₃ y la FC. Donde la L₃ está en contacto con el medio acuoso y esta fase se forma como consecuencia de que el dominio lipofílico del P407 se encuentra embebido en la bicapa lipídica de la MO (Landh, 1994). Sin embargo hay que tener en cuenta que el PVAL y el P407 presentan

diferencias estructurales importantes, mientras que el P407 tiene en su estructura una porción hidrofílica y otra lipofílica, el PVAL es un polímero lineal que no presenta zonas con una marcada diferencia de polaridades. Ahora bien, para el caso del PVAL posiblemente este polímero no se incorpore a la estructura, sino que se mantiene en la superficie de las partículas estabilizándolas, sin incorporarse en la bicapa lipídica de la MO. A este factor se puede deber la diferencia en el comportamiento de uno y otro estabilizante.

7.2.8 Influencia del disolvente sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de monoleína

Los TPP obtenidos al variar el tipo de disolvente en la preparación de las DL's a partir de la MO se muestran en la Tabla 13. Se puede apreciar que los valores son muy cercanos principalmente para los casos de AM, AE y AIP, para poder afirmar que hay una diferencia entre estas medias se realizó un análisis estadístico por medio de la prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$, $F_{\text{Tablas}} = 4.0662$, $F_{\text{Calculada}} 10.9933$, incluyendo todos los datos). Una vez comparadas las distintas medias se encontró que solamente la talla de partícula de las DL's preparadas con MEC mostró una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA $\alpha=0.05$, $F_{\text{Tablas}} = 4.0662$, $F_{\text{Calculada}} 0.2682$, excepto la MEC). Este hecho puede estar relacionado con la miscibilidad entre la MEC en agua, ya que de los cuatro disolventes utilizados, es la que presenta la mayor miscibilidad y por consecuencia mayor velocidad de difusión. Como ya se mencionó, de acuerdo con el mecanismo de formación de las NP's propuesto para el MED, la velocidad de difusión guarda una relación inversa con el TPP (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

Tabla 13. Efecto del tipo de disolvente sobre el TPP de las DL's de MO y PVAL (5% p/v).

| Disolvente | Miscibilidad con agua ^a | TPP \pm DE (nm) | CV |
|------------|------------------------------------|-------------------|-----|
| MEC | 37.0 | 156.3 \pm 2.9 | 1.9 |
| AM | 33.0 | 168.8 \pm 1.3 | 0.8 |
| AE | 8.5 | 170.4 \pm 5.5 | 3.2 |
| AIP | 3.0 | 168.7 \pm 2.5 | 1.5 |

a: La miscibilidad está referida al peso por cada 100 partes

7.2.9 Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de monooleína

La estabilidad física de las dispersiones (Fig. 15) se monitoreó a través de varios meses, encontrándose que el TPP de las dispersiones se mantuvo por debajo de $1\mu\text{m}$ (orden submicrónico) por tres meses, sin embargo para el quinto mes los tamaños de partícula se elevaron por encima de este valor. El comportamiento que presentaron las DL's de MO con respecto a la estabilidad está de acuerdo con lo propuesto por Siekmann *et al.* (2002) para las dispersiones coloidales de la FC de la MO, quien menciona la aparición de cremación o "creaming" y el rápido aumento del TPP. Este autor atribuye este comportamiento a la cristalización de la MO. En este monitoreo también se encontró que la estabilidad física de las DL's no se ve afectada por la cantidad de lipido en la fase interna.

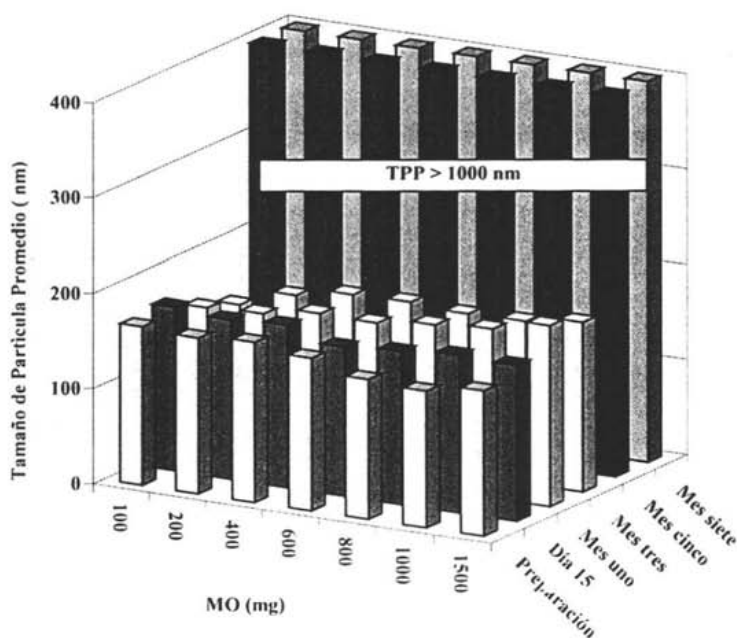


Figura 15. Estabilidad física de las DL's preparadas a partir de MO y PVAL, usando MEC.

Hasta este momento se han analizado los resultados de la preparación de las DL's por medio del MED a temperatura ambiente para el Gelucire® 44/14 y la monoleína, en donde el MED resultó ser una alternativa para la preparación de DL's a partir de MO y Gelucire® 44/14. Señalando que el Gelucire® 44/14 no había sido reportado para la preparación de sistemas dispersos de talla submicrónica. De estos resultados se puede concluir de manera general que un parámetro crítico del proceso de preparación de dispersiones lipídicas por medio del método de emulsificación difusión es el tipo de disolvente y de estabilizante. Hay variables propias de proceso como la concentración de lipido, concentración de estabilizante y velocidad de agitación que pueden ser ajustadas para obtener los TPP deseados de acuerdo a las necesidades de la formulación. El tiempo de preparación de las dispersiones submicrónica de MO es relativamente corto en comparación con el método de fragmentación de la FC en volumen. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio más detallado para poder tener un mejor entendimiento de las nanoestructuras que probablemente se están formando en el seno de las DL's. Por otro lado, recordemos que las micropartículas pueden ser administradas vía intramuscular o subcutánea, sin embargo algunas terapias requieren la aplicación de fármacos vía intravenosa por lo que demandan del uso de acarreadores de talla nanométrica. La mayoría de las dispersiones lipídicas preparadas en este trabajo presentaron tamaños submicrónicos (10-1000 nm). Así, estos sistemas presentan una alternativa en la administración de fármacos vía intravenosa. Sumado a lo anterior se debe de resaltar la prácticamente nula toxicidad de los lípidos mencionados.

7.3 PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS POR MEDIO DEL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN A TEMPERATURA CONTROLADA

Como se ya se mencionó el Gelucire® 50/13, Compritol® ATO 888 y Geleol® no son solubles en AM, AE, AIP, MEC (Tabla 7) a temperatura ambiente lo que impide su uso para la preparación de DL's por medio del MED en estas condiciones. Por ello se propuso mantener una temperatura controlada durante el proceso, es decir trabajar a una temperatura tal que permitiera solubilizar al lípido y además lograr la difusión del disolvente al agregar un exceso de agua.

7.3.1 Influencia de la cantidad de Gelucire® 50/13 sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas

El Gelucire® 50/13 no es soluble a temperatura ambiente en ninguno de los disolventes, sin embargo al aumentar la temperatura fue posible disolver este lípido en todos ellos. Por lo anterior para el MED se sugiere mantener la temperatura entre 2-5 °C por arriba de la temperatura a la cual el lípido se solubiliza, para evitar la precipitación de éste como consecuencia de las variaciones de temperatura del sistema. Para determinar hasta que etapa del proceso se debía controlar la temperatura, se realizó una prueba en la cual se emplearon dos disolventes (MEC y AE) para formar la emulsión a temperatura controlada, y se varió en cada uno de ellos la temperatura a la que se adicionó el exceso de agua (Temperatura ambiente -TA-, Temperatura controlada -TC-) a la emulsión. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 14 y se puede ver que la adición de agua debe llevarse a cabo a la misma temperatura a la que se encuentre la emulsión, pues de lo contrario el TPP aumenta por arriba del orden submicrónico. Lo anterior se observó tanto para la MEC como para el AE cuando se trabajó a TC, podemos concluir entonces que cuando se controla la temperatura del MED se debe llevar a cabo durante la totalidad del mismo, para permitir que el equilibrio se mantenga. Siendo la temperatura del proceso un parámetro crítico para este tipo de lípidos.

Tabla 14. Efecto de la temperatura del exceso de agua adicionada a la emulsión sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Gelucire® 50/13 y PVAL (5 % p/v).

| Disolvente | Temperatura del agua | TPP ± DE (nm) | CV |
|------------|----------------------|---------------|-----|
| MEC | TA | > 1000 | --- |
| | TC (35-40 °C) | 223,6 ± 8,6 | 3,9 |
| AE | TA | >1000 | --- |
| | TC (40-45 °C) | 90,2 ± 3,5 | 3,9 |

El TPP de las DL's obtenidas a partir de Gelucire® 50/13 por medio del MED a temperatura controlada con diferentes cantidades de lípido en la fase interna se pueden observar en la Fig. 16. En esta Figura es evidente una relación directa entre la cantidad de lípido agregada a la fase interna y el TPP de las DL's. Este comportamiento es semejante al mostrado por las DL's de Gelucire® 44/14 (Fig. 8), suponemos entonces que se puede explicar bajo los mismos argumentos y da pie a pensar que el mecanismo de formación de las partículas no se ve afectado por la elevación de la temperatura. Es importante resaltar que fue posible la obtención de DL's con tamaños de partícula por debajo de los 100 nm. Las DL's preparadas con Gelucire® 50/13 presentaron una tonalidad azul con apariencia lechosa, que a medida que el TPP disminuía la apariencia macroscópica de las DL's pasaba de lechosa a translúcida azulada.

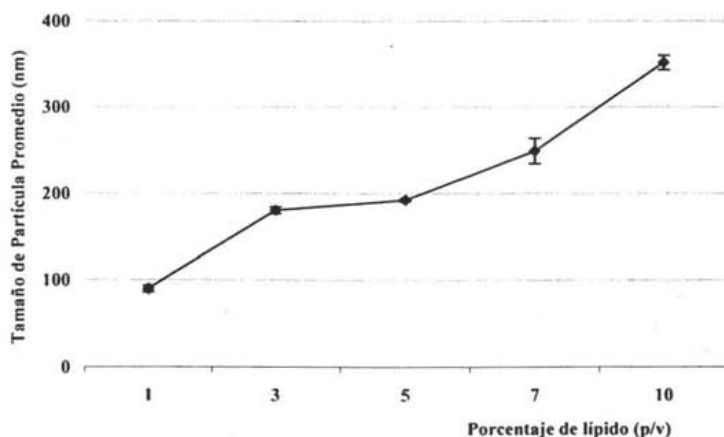


Figura 16. Influencia de la cantidad de Gelucire® 50/13 sobre el TPP de las DL's usando PVAL (5% p/v) como estabilizante.

7.3.2 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Compritol® ATO 888

Cuando se varió la velocidad de agitación en el MED usando Compritol® ATO 888 (Tabla 15), los resultados obtenidos muestran una tendencia similar a la que se encontró al emplear el Gelucire® 44/14 (Fig. 8). Es decir que a medida que la velocidad de agitación aumenta el TPP disminuye. Sin embargo, las dispersiones lipídicas de Gelucire® 44/14 presentaron un menor TPP que las de Compritol® ATO 888, además para el caso del Compritol® ATO 888 no fue posible obtener partículas de talla submicrónica al emplear velocidades bajas (Tabla 15). Siendo el Gelucire® 44/14 y el Compritol® ATO 888 mezclas complejas de mono, di y tri-glicéridos, su comportamiento se debe posiblemente a que el primero tiene un contenido de cadenas

hidrofílicas cortas [C8, C10, C12 (30-50%), C14 (5-25%), C16 (4-25%), C18 (5-35%)], mayor que el Compritol® ATO 888 [C16, C18, C20 (<10%), C22 (>83%), C24]. El Compritol® ATO 888 está constituido de cadenas más largas lo que le confiere mayor hidrofobicidad (HLB 2), haciendo su dispersión en medios acuosos más complicada en comparación con el Gelucire® 44/14 (HLB 14). Además este último tiene un alto contenido de ésteres de ácidos grasos y PEG (sustancia hidrofílica), que le da una mayor hidrofílicidad. Este comportamiento es apoyado por las pruebas iniciales en las que el Gelucire® 44/14 fue capaz de dispersarse por sí mismo (TPP > 1 µm), mientras que el Compritol® ATO 888 en presencia de agua sólo forma grandes agregados (Tabla 6).

Tabla 15. Efecto de la velocidad de agitación sobre el TPP de las DL's preparadas a partir de Compritol® ATO 888, PVAL 5% (p/v) y AE a 62 °C.

| Velocidad de Agitación (rpm) | TPP ±DE (nm) | CV | Agregados |
|------------------------------|--------------|------|-----------|
| 800 | >1000 | --- | + |
| 1000 | 749.8 ± 12.0 | 12.0 | - |
| 1400 | 603.8 ± 6.6 | 6.6 | - |
| 1800 | 446.6 ± 3.6 | 0.8 | - |
| 2300 | 254.1 ± 9.1 | 3.6 | - |

En la Fig. 17 se puede observar la tendencia antes mencionada, además se hace evidente la obtención de dispersiones lipídicas de tallas por debajo de 300 nm. Lo anterior nos permite corroborar la versatilidad del MED, en el cual las variables pueden ser controladas dando con esto la oportunidad de modificar el TPP, así como la superficie de las partículas.

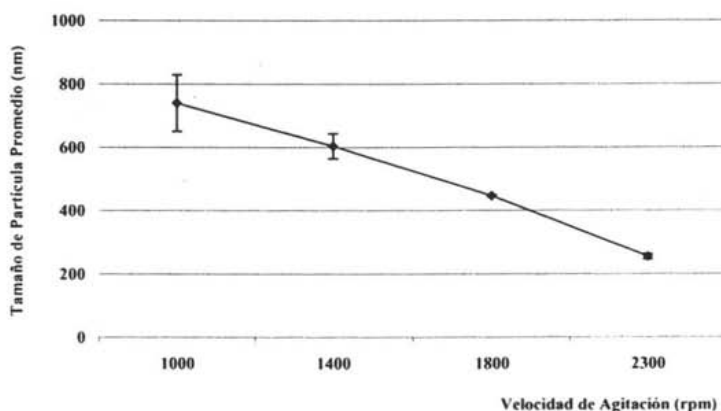


Figura 17. Tendencia del TPP de las DL's preparadas a partir de Compritol® ATO 888 y PVAL al variar la velocidad de agitación (AE a 62 °C).

7.3.3 Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Compritol® ATO 888

La preparación de las DL's a partir de Compritol® ATO 888 usando el MED permite la obtención de dispersiones de talla submicrónica, empleando diversos estabilizantes (Tabla 16). Los estabilizantes que mostraron mejores resultados fueron aquellos cuyo mecanismo está relacionado con el impedimento estérico. Mientras que el Tween 80 no permitió obtener dispersiones mono poblacionales de talla submicrónica. Cabe mencionar que entre los estabilizantes utilizados se encuentra un poloxámero (P407), el cual puede ser empleado en una variedad de formulaciones farmacéuticas para diferentes vías de administración como la tópica, oral, y parenteral (Kibbe, 2000). Además, en la preparación de las DL's se empleó el PVAL que presenta una toxicidad igualmente baja.

Tabla 16. Preparación de DL's a partir de Compritol® ATO 888 usando distintos estabilizantes (AE a 62 °C).

| Estabilizantes | TPP ± DE (nm) | Agregados |
|----------------|----------------|-----------|
| Tween 80 | 1474.5 ± 320.9 | - |
| | 104.0 ± 6.8 | |
| P407 | 308.6 ± 4.7 | - |
| PVAL | 305.0 ± 14.3 | - |

En la Tabla 17 se puede observar que al incrementarse la cantidad de estabilizante (Poloxámero 407) el TPP disminuye hasta aproximadamente 200 nm con la máxima concentración probada del estabilizante (10% p/v). Sin embargo, la obtención de las DL's de talla submicrónica se dio desde la adición de 1.5% (p/v) de P407 (Fig. 18). Para la primera concentración probada (0.5% p/v) se obtuvieron tamaños de partícula mayores a 1µm, pero no se observaron agregados detectables a simple vista, este hallazgo sugiere que la modificación de la concentración del estabilizante permite la obtención de micropartículas. Comportamiento similar fue descrito por Leroux *et al.*, 1995 para la preparación de nanopartículas por medio del MED empleando Eudragit® S100 en la fase interna, gelatina en la fase externa y alcohol bencilico como disolvente. Estos autores encontraron que al modificar la cantidad del estabilizante en la fase interna, el TPP de las dispersiones se movió de micropartículas a nanopartículas. Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996 reportan esta misma tendencia del TPP a disminuir a medida que se aumenta la cantidad de PVAL o P188 al preparar NP's a partir de PLA y propilencarbonato como disolvente.

Tabla 17. Efecto de la cantidad de P407 sobre el TPP de las DL's de Compritol® ATO 888 (AE a 62°C).

| Proporción L:E | Razón L/E | P407 (% p/v FE) | TPP ± DE (nm) | CV | Agregados |
|----------------|-----------|-----------------|-----------------------------|------|-----------|
| 1:1 | 1.00 | 0.5 | 3146.6 ± 324.4 ^a | 10.3 | - |
| 1:3 | 0.33 | 1.5 | 497.4 ± 44.1 | 8.9 | - |
| 1:5 | 0.20 | 2.5 | 410.9 ± 5.4 | 1.3 | - |
| 1:10 | 0.10 | 5 | 253.1 ± 11.0 | 4.4 | - |
| 1:20 | 0.05 | 10 | 191.6 ± 7.4 | 3.8 | - |

a: Aparecen dos poblaciones aprox. el 75% son mayores a 1 µm

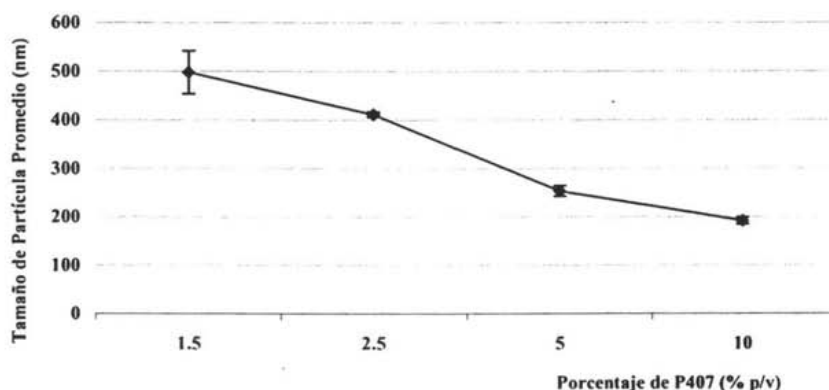


Figura 18. Variación del TPP de las DL's de Compritol® ATO 888 al variar la cantidad de P407 en la fase externa.

7.3.4 Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de Compritol® ATO 888

Con la finalidad de poder monitorear la estabilidad física de las DL's formadas a partir del Compritol® ATO 888 se probaron dos opciones para evitar su contaminación microbiológica. En la primera se adicionó una combinación de parabenos y en la segunda se colocó en refrigeración (4 °C). Como se puede apreciar en la Tabla 18 no hay diferencia significativa (ANOVA, $\alpha = 0.05$) en el TPP de las DL's a las que se adicionó los parabenos y las que se mantuvieron en refrigeración en comparación con el control. Por lo tanto se concluye que puede usarse cualquiera de las dos opciones mencionada para la conservación de las DL's de Compritol® ATO 888 y así evitar su contaminación microbiológica.

Tabla 18. Comparación de dos condiciones para la conservación de DL's de Compritol® ATO 888 y PVAL (5% p/v).

| Tratamiento | TPP ± DE (nm) | CV |
|--|--------------------------|-----------------------|
| Control | 313.3 ± 31.7 | 10.1 |
| Conservadores (Metilparabeno 0.18% p/v y propilparabeno 0.02% p/v adicionados al final del proceso) ^a | 322.4 ± 24.4 | 7.6 |
| Refrigeración (20 días a 4°C) | 310.9 ± 9.4 | 3.0 |
| ANOVA ($\alpha=0.05$) | $F_{Calculada} = 0.1830$ | $F_{Tablas} = 5.1432$ |

a: La determinación del TPP se realizó 24h después de haber agregado la solución de parabenos

Las DL's preparadas a partir de Compritol® ATO 888 y de PVAL (5% p/v) resultaron tener estabilidad física, en la Tabla 19 se muestran algunos de los resultados para este monitoreo. Podemos observar que pasados poco más de tres meses las DL's que se mantuvieron en refrigeración conservaron su talla submicrónica.

Tabla 19. Estabilidad de las DL's de Compritol® ATO 888 y PVAL (5% p/v) en presencia de parabenos.

| Tiempo (días) | TPP ± DE (nm) | CV | Agregados |
|-------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------|
| Inicio | 332.4 ± 5.0 | 1.5 | - |
| 3 | 303.3 ± 11.4 | 3.7 | - |
| 60 | 313.3 ± 31.7 | 10.1 | - |
| 100 | 302.9 ± 5.8 | 1.9 | - |
| ANOVA ($\alpha=0.05$) | | $F_{Calculada} = 1.9276$ | $F_{Tablas} = 4.0662$ |

7.3.5 Efecto de la concentración y tipo de estabilizante sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Geleol®

En la Tabla 20 se muestran los resultados correspondientes a las DL's de Geleol® en las que se varió la concentración de estabilizante (Poloxámero 407) en la fase externa. Como se puede apreciar la concentración mínima encontrada con la que se pueden obtener las dispersiones submicrónicas de Geleol® es de 5% (p/v). En esta Tabla se puede apreciar también que con el aumento de la concentración de estabilizante al 10% el tamaño de partícula promedio disminuye, tal como sucedió con el Compritol® ATO 888. Lo anterior sugiere un mecanismo similar al planteado previamente para el método de emulsificación difusión a temperatura ambiente. Cabe mencionar que a pesar de que este lípido es soluble a temperatura ambiente en AIP, la preparación de DL's de talla submicrónica no fue posible, empleando este disolvente.

Tabla 20. Efecto de la variación de P407 sobre el TPP de las DL's de Geleol® (AE a 52°C).

| Porcentaje (p/v) de P407 | TPP ± DE (nm) | CV | Agregados |
|--------------------------|---------------|-----|-----------|
| 0.3 | >1000 | --- | + |
| 0.5 | >1000 | --- | + |
| 1.0 | >1000 | --- | + |
| 1.5 | >1000 | --- | + |
| 2.5 | >1000 | --- | + |
| 5.0 | 513 ± 16.3 | 3.2 | - |
| 10.0 | 247 ± 17.8 | 7.2 | - |

Según los resultados de la Tabla 21 el poloxámero 407 a diferencia del PVAL, permite la preparación de dispersiones submicrónicas a partir de Geleol® con porcentaje de 5 y 10 % (p/v). Este comportamiento se podría explicar debido a que el P407 puede estabilizar la emulsión que se forma durante el proceso de emulsificación difusión a temperatura controlada. Con el aumento de la temperatura la solubilidad de este polímero disminuye y su afinidad por la interfase aumenta y con ello su capacidad de estabilizar las "protonanoparticulas". Este efecto de estabilización finalmente permiten obtener DL's de orden submicrónico a partir del Geleol®. Los porcentajes de P407 de 15 y 20 % no pudieron ser probados debido a que a esas concentraciones y a la temperatura ensayada este polímero forma un gel difícil de manipular. Estos resultados obtenidos con el Geleol® confirman que un parámetro crítico de la preparación de dispersiones lipídicas por medio de método de emulsificación difusión a temperatura controlada es el tipo de estabilizante. El estabilizante toma una mayor importancia cuando la temperatura del proceso se eleva porque mantener la estabilidad de la emulsión es más complicada al tenerse mayor movilidad en el sistema.

Tabla 21. Efecto de la variación de PVAL sobre el TPP de las dispersiones de Geleol® (MEC a 42 °C).

| Estabilizante | Porcentaje (p/v) | TPP ± DE (nm) | Agregados |
|---------------|------------------|---------------|-----------|
| PVAL | 5 | >1000 | + |
| P407 | | 209 ± 21.9 | - |
| PVAL | 10 | >1000 | + |
| P407 | | 107 ± 4.8 | - |
| PVAL | 15 | >1000 | + |
| | 20 | >1000 | + |

7.3.6 Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula promedio de las dispersiones lipídicas de Geleol®

Al aumentar la temperatura del proceso el TPP disminuye como se observa en la Tabla 22, habiendo una diferencia significativa entre las tres medias según el análisis estadístico de ANOVA ($\alpha = 0.05$, $F_{Calculada} = 28.7650$, $F_{Tablas} = 5.1432$). Este fenómeno está directamente relacionado con el mecanismo de formación de las NP's que ha sido propuesto para esta técnica (Quintanar *et al.*, 1996) y con la relación que guarda la velocidad de difusión con la temperatura. De acuerdo a la ley de Stokes-Einstein al aumentar la temperatura del proceso la velocidad de difusión del disolvente también lo hace por la relación directa entre el coeficiente de difusión (D) y la temperatura (T):

$$D = k_B T / 6 \eta \pi r$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en K, η es la viscosidad del disolvente y r es el radio de la partícula que difunde

Como ya se expuso previamente (Sección 3.2) la formación de las NP's se da debido a un fenómeno de difusión de disolvente de la fase interna hacia la fase externa, así al aumentar la temperatura del proceso la velocidad de difusión también lo hace. Como consecuencia las "protonanopartículas" formadas son de menor tamaño y con ello la talla final de las NP's disminuye. Un hallazgo similar fue reportado por Kwon *et al.* (2001) para la NP's de PLGA preparadas por el método de emulsificación difusión. Estos autores encontraron que al aumentar la temperatura a la que se adiciona el agua a la emulsión, el tamaño de las partículas decrece.

Tabla 22. Efecto de la temperatura del proceso sobre el TPP de las DL's de Geleol® (MEC).

| Estabilizante | Temperatura | TPP \pm DE (nm) |
|---------------|-------------|-------------------|
| P407 10 % | 40 °C | 183.4 \pm 7.0 |
| | 45 °C | 142.3 \pm 20.9 |
| | 50 °C | 102.0 \pm 5.7 |

Las dispersiones preparadas por medio de la técnica de homogeneización a alta presión produce partículas de *lipidos fundidos sobre enfriados* más que partículas sólidas (Westesen *et al.*, 1997). Cabe mencionar que este método es el que se usa con mayor frecuencia actualmente para la preparación de SLN ("Solid Lipid Nanoparticles"). Los fármacos cargados en partículas de *lipidos fundidos sobre enfriados* ("Supercooled melts lipids") presentan una alta movilidad, y con ello los fármacos van migrando desde la parte interna de la partícula. Lo anterior hace a

estos sistemas una mala elección para la liberación controlada de fármacos, sin embargo la movilidad del fármaco es drásticamente reducida en las nanopartículas sólidas (cristalizadas). En el caso del MED las partículas se forman como consecuencia de la precipitación del lípido por su insolubilidad (cristalización) más que por un proceso mecánico o físico. Los sistemas dispersos preparados en este trabajo permiten que el fármaco pierda movilidad y con ello se disminuya drásticamente su migración de la fase interna. Esto hace de las partículas submicrónicas preparadas por el MED una buena opción para tener un mejor control sobre la liberación del fármaco. De esta manera el MED se convierte en una alternativa interesante para la producción de DL's de talla submicrónica, con capacidad potencial para la liberación controlada de fármacos.

En la preparación de las DL's por medio del MED los tiempos de preparación son cortos en comparación con el método de homogeneización de alta presión, que como ya se mencionó es el método más frecuentemente empleado para la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). Para el MED partiendo de la dispersión del estabilizante y de los disolventes saturados el proceso toma no más de 30 minutos. Además el aporte energético es relativamente bajo puesto que no es necesario el uso de homogeneizadores de alta velocidad y/o presión, no requiere de equipo especializado y es posible su escalamiento. Las DL's submicrónicas preparadas por medio del método de emulsificación de los lípidos fundido ("*High Pressure Homogenization*") presentan una baja carga de fármacos, debido generalmente a la pobre capacidad de los lípidos fundidos para solubilizar fármacos poco solubles en agua (Westesen *et al.*, 1997). La preparación de sistemas lipídicos coloidales por medio del MED permite una alta solubilización de fármacos poco solubles en agua, lo que hace suponer que las dispersiones preparadas en este trabajo pueden acarrear cantidades importantes de este tipo de fármaco. Otro punto importante es que las partículas lipídicas pueden ofrecer protección contra la degradación, p. ej. contra hidrólisis.

7.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Para obtener las micrografías de microscopía electrónica de barrido, se eligieron las DL's preparadas a partir de Compritol® ATO 888 debido que este lípido es el más ampliamente empleado en las dispersiones lipídicas de talla nanométrica, además fueron las DL's con mejor estabilidad de las preparadas en este trabajo. Las dispersiones de Compritol® ATO 888 fueron centrifugadas a diferentes velocidades y tiempos para encontrar las condiciones de separación de las NP's lipídicas y la fase externa y así retirar el exceso de estabilizante. En la Tabla 23 se observa que son necesarias velocidades por encima de las 10,000 rpm para poder separar las fases de las DL's de Compritol® ATO 888 y PVAL. Cuando se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos se observó cierta separación de las fases y a medida que el tiempo y la velocidad aumentó, la separación fue mejorando. Así las condiciones de velocidad y tiempo de centrifugación para la separación adecuada de las fases fueron 20,000 rpm durante 20 min.

Tabla 23. Distintas condiciones de velocidad y tiempo para encontrar el punto donde las fases fueran fácilmente separables.

| Velocidad (rpm) | Tiempo (minutos) | Separación de fases |
|-----------------|------------------|---------------------|
| 3,000 | 30 | No hay separación |
| 5,000 | 30 | No hay separación |
| 10,000 | 10 | +/- Separación |
| 20,000 | 20 | Separación |
| 20,000 | 30 | Separación |

Una vez centrifugadas las DL's se tomó la fase interna, se redispersó en agua destilada y se determinó el TPP. El TPP aumentó aproximadamente al doble de su tamaño inicial (previo a la centrifugación), debido probablemente a que con la centrifugación las partículas se aglomeran trayendo como resultado el incremento en el TPP. Para regresar al TPP submicrónico inicial se sonicaron las muestras por aproximadamente 5 min y así se pudo continuar con el tratamiento de la muestra para su observación al microscopio electrónico de barrido (MEB). En las micrografías de la MEB de las dispersiones de Compritol® ATO 888 (Fig. 19, 20, 21 y 22) se pueden apreciar las partículas de forma esférica y de superficie lisa. En algunas de estas imágenes es posible apreciar partículas de manera individual. La MEB es la técnica que nos permite afirmar que hemos obtenido sistemas dispersos del orden submicrónico, confirmando los resultados previamente aportados por la PCS (TPP submicrónicos $\phi < 1000\text{nm}$) y por las observaciones macroscópicas de las DL's entre las que se destacan el efecto Tyndall y la no aparición de sedimento en las dispersiones.

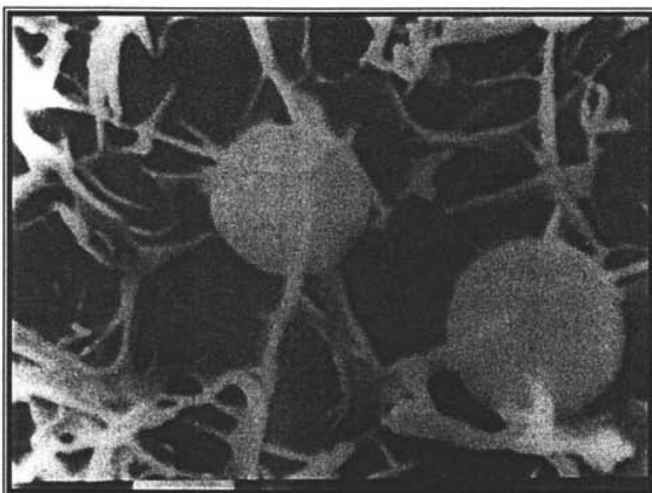


Figura 19. Imagen obtenidas por medio de MEB (15,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. Imágenes tomadas con la asistencia del Técnico Rodolfo Robles de la FESC.

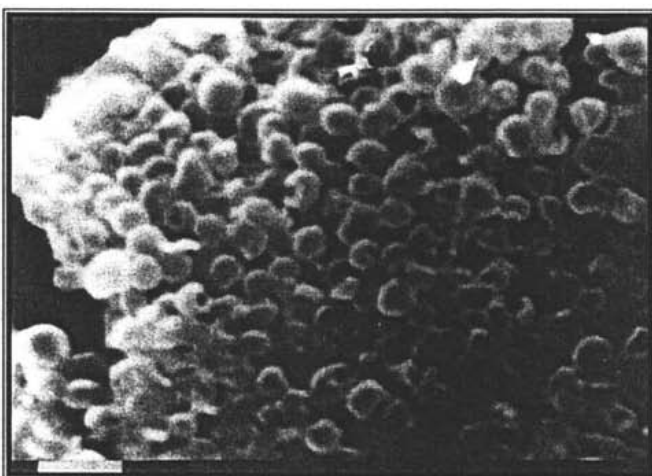


Figura 20. Imagen obtenidas por medio de MEB (10,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. Imágenes tomadas con la asistencia del Técnico Rodolfo Robles de la FESC.

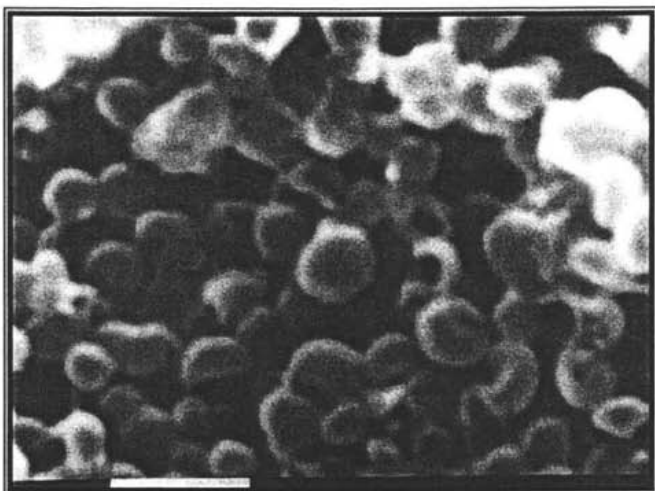


Figura 21. Imagen obtenidas por medio de MEB (20,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. Imágenes tomadas con la asistencia del Técnico Rodolfo Robles de la FESC.

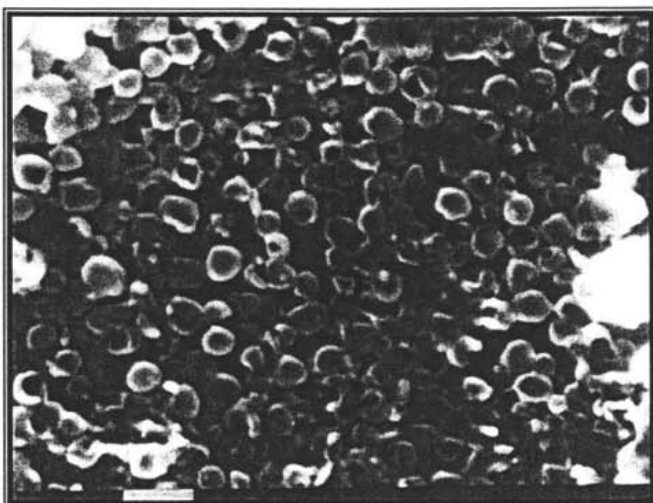


Figura 22. Imagen obtenidas por medio de MEB (10,000X) de las partículas submicrónicas obtenidas a partir de Compritol® ATO 888 por medio del MED. Imágenes tomadas con la asistencia del Técnico Rodolfo Robles de la FESC.

7.5 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA *IN VIVO* DE LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS CARGADOS CON OMAPATRILAT (OMA)

Los sistemas desarrollados en este trabajo pueden ser una alternativa para la administración oral de fármacos hidrofóbicos, debido a que los materiales lipídicos de las DL's y los tamaños de partícula de éstas pueden ser una alternativa para la liberación controlada, vectorización y/o facilitar la absorción de este tipo de fármacos. Con la finalidad de probar la aplicación de los sistemas dispersos propuestos se decidió cargarlos con un fármaco liposoluble el Omapatrilat para evaluar esta potencialidad (Fig. 23).

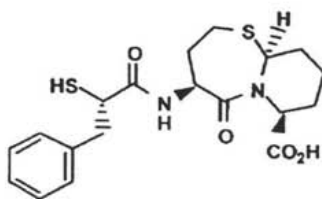


Figura 23. Estructura química del Omapatrilat de Sica *et al.*, 2000.

El Omapatrilat -OMA- (Vanlev[®]), uno de los agentes más novedosos en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y renales, es un antihipertensivo de los llamados inhibidores de la vasopeptidasa (inhibe endopeptidasa neutra así como la enzima convertidora de angiotensina). El OMA tiene actividad por un periodo largo ($t_{1/2}$ 14-19 h), lo que permite su administración una vez al día. Puede ser suministrado por vía oral alcanzando su concentración máxima aproximadamente entre 0.5 y 2 h. La biodisponibilidad oral de este agente es de aproximadamente un 30%. Adicionalmente el OMA ha demostrado actividad anti-isquemia en ensayos preclínicos (Morazo *et al.*, 2001; Rouleau *et al.*, 2000). Este agente terapéutico presenta una actividad a muy bajas dosis lo que permite su incorporación en los sistemas que han sido desarrollados.

La MO ha sido empleada para la administración de fármacos por vía oral, debido a que ofrece varias ventajas entre las que se destacan su prácticamente nula toxicidad, sus propiedades de bioadhesión, así como su capacidad para liberar sostenidamente un fármaco (Ganem-Quintanar *et al.*, 2000; Sallam *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2001). Las DL's obtenidas con este lipido presentaron una talla de partícula inferior a los 180 nm además se pudieron obtener omitiendo el

uso de un estabilizante. Este monoglicérido presenta un comportamiento similar a las sales biliares formando distintas estructuras capaces de facilitar la absorción (Patton y Carey, 1979), haciéndolo un potencial acarreador de fármacos en la administración oral. La preparación de las DL's preparadas a partir de MO cargadas con OMA puede ser una alternativa potencial para la administración de este fármaco por vía oral.

7.5.1 Solubilidad del Omapatrilat en los disolventes del método de emulsificación difusión

Se encontró que el OMA es soluble en los cuatro disolventes AM, AE, AIP, MEC utilizados para la preparación de las DL's por medio del MED en la primera parte de este trabajo. La prueba se llevó a cabo con los disolventes saturados con agua. Considerando que los acetatos al degradarse forman ácidos que a su vez podrían interferir con el pH del medio y con ello en la solubilidad del OMA se decidió emplear la MEC por ser el disolvente más estable y con una DL_{50} baja. Cabe mencionar que el AM, AE, AIP y la MEC se encuentran dentro del grupo de disolventes considerados como menos tóxicos y con menor riesgo para la salud humana según la FDA ("Guía sobre impurezas de disolventes residuales para la industria farmacéutica -Q3C-").

Para conocer algunas de las constantes fisicoquímicas del OMA se empleó un programa de computación (SPARTAN), así se obtuvieron sus pK_a 's y su $\log P$. Los pK_a 's calculados fueron 4.2, 8.5, y 15.1 y el $\log P$ fue de 1.62. El valor obtenido de $\log P$ nos confirma que se trata de una molécula hidrofóbica, ya que este valor de coeficiente de partición [octanol/agua] indica que el OMA (no ionizado) estará en una proporción aproximada de 42:1 favoreciéndose la fase oleosa. De esta manera se pudo encontrar que en un medio alcalino la molécula se solubilizará debido a que ésta se encuentra ionizada. Lo anterior permite establecer que entre 5-8 es el rango de pH en el que se debe llevar a cabo el MED y garantizar que el fármaco se encuentra en su forma neutra y por tanto con su menor solubilidad acuosa. Posteriormente se realizaron algunas pruebas cualitativas de solubilidad (Tabla 24) para confirmar la baja solubilidad del OMA en agua.

Tabla 24. Datos cualitativos sobre la solubilidad del Omapatrilat en los disolventes evaluados.

| Fase del MED | Disolvente | Saturación | pH | Soluble (Sí / No) | Cantidad soluble |
|---------------|------------------|------------------|-----|-------------------|------------------|
| Fase Acuosa | H ₂ O | --- | 5.9 | No | << 2 % p/v |
| | SA pH 8.5 | --- | 8.5 | Sí | 0.15 % p/v |
| | SA pH 4 | --- | 3.9 | No | --- |
| | H ₂ O | MEC | 5.5 | No | << 2 % p/v |
| | SA pH 4 | MEC | 4.9 | No | << 2 % p/v |
| Fase Orgánica | MEC | H ₂ O | 5.3 | Sí | 0.3 % p/v |
| | MEC | SA pH 4 | 4.9 | Sí | 0.3 % p/v |

SA: Solución amortiguadora

En la Tabla 24 se puede observar también que el OMA se solubiliza en la MEC (Fase orgánica) saturada con solución amortiguadora pH 4 o con H₂O destilada (pH 5.9). De la misma manera el OMA se disolvió en el medio acuoso a pH de 8.5, sin embargo el OMA no es soluble en la solución amortiguadora a pH 4 ni en el H₂O destilada a la que no se adicionó ningún regulador de pH. Se eligió precisamente el H₂O destilada (pH de 5.9) para el proceso ya que el OMA presentó una muy baja solubilidad (<< 2 % p/v), además la preparación de las DL's es más sencilla. Lo anterior va de acuerdo con las predicciones realizadas para la solubilidad del OMA en función del pH. Así se decidió que fuera MEC saturada con H₂O destilada la fase interna y H₂O destilada saturada con MEC la fase externa.

7.5.2 Preparación de los sistemas submicrónicos cargados con Omapatrilat

La dispersión de MO cargada con Omapatrilat (OMA-DLMO) se preparó por medio del MED a temperatura ambiente usando MEC y H₂O destilada. Éstas presentaron un TPP de 155.4 ± 0.3 nm, de apariencia lechosa con un ligero tono azulado (Efecto Tyndall) y uniforme a nivel macroscópico.

7.5.3 Estabilidad química del Omapatrilat y física de las dispersiones lipídicas de monoleína

Posterior a la preparación de las dispersiones de MO se realizaron algunas pruebas sencillas de estabilidad de las partículas submicrónicas así como del OMA. Por medio de la CCF se aseguró que el OMA no había presentado ningún tipo de degradación química como consecuencia del proceso de preparación de las dispersiones de MO ya que en la placa de CCF no se observó la aparición de ningún otro compuesto además del OMA (Tabla 25).

Tabla 25. Valores de Rf obtenidos de las dispersiones de MO cargadas con Omapatrilat (OMA-DLMO), Omapatrilat puro (OMA_{puro}) y una mezcla física de ambos (OMA-DLMO + OMA_{puro}).

| Muestras | Rf |
|--------------------------------|------|
| OMA-DLMO | 0.67 |
| OMA-DLMO + OMA _{puro} | 0.68 |
| OMA _{puro} | 0.69 |

En cuanto a la estabilidad física de las dispersiones, el TPP de las dispersiones de MO no se encontró cambio en la talla de las partículas como se puede observar en la Tabla 26. En esta Tabla se aprecia que no hay diferencia significativa entre los TPP según la prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$, $F_{Calculada}$ de 2.2786; F_{Tablas} de 5.1432). Lo anterior nos permite concluir que la estabilidad física de las dispersiones de MO no se ve afectada en al menos el doble del periodo en que se correrán las pruebas *in vivo*.

Tabla 26. Estabilidad física de las dispersiones lipídicas de monooleína cargadas con Omapatrilat.

| Tiempo (días) | TPP \pm DE (nm) | CV |
|---------------|-------------------|-----|
| Preparación | 155.4 \pm 1.04 | 0.7 |
| 5 | 155.7 \pm 0.98 | 0.6 |
| 12 | 157.1 \pm 1.10 | 0.7 |

7.5.4 Administración del Omapatrilat a ratas genéticamente hipertensas (SHR)

El efecto alcanzado al administrar el OMA (Fig. 24) fue de 93 y de 37 % (comparado con la solución de mismo fármaco 100%) usando como acarreadores a las partículas submicrónicas de MO y a la suspensión respectivamente. Lo anterior está relacionado directamente con la solubilidad del OMA, mientras que en la suspensión se encuentra en forma de grandes cristales, en la formulación con MO se encuentra molecularmente en las partículas. Esto explica porque las dispersiones de MO provocaron un mayor efecto farmacológico, ya que si el OMA se encuentra en forma molecular se facilita su absorción y llegada a torrente sanguíneo, por consiguiente facilita su efecto. Comparando las curvas de porcentaje de efecto entre los distintos tratamientos (Fig. 24) se observa que la administración del OMA por medio de las dispersiones de MO presenta menor variación en cuanto al efecto alcanzado. Lo anterior es indudablemente una ventaja de las dispersiones de MO con respecto a la administración del antihipertensivo en solución, ya que estas variaciones no son recomendables para este tipo de tratamientos. Lo que

nos permite concluir que el uso de las dispersiones de MO permitió la administración de OMA presenta ventajas tangibles sobre la administración de la suspensión y la solución del mismo principio activo.

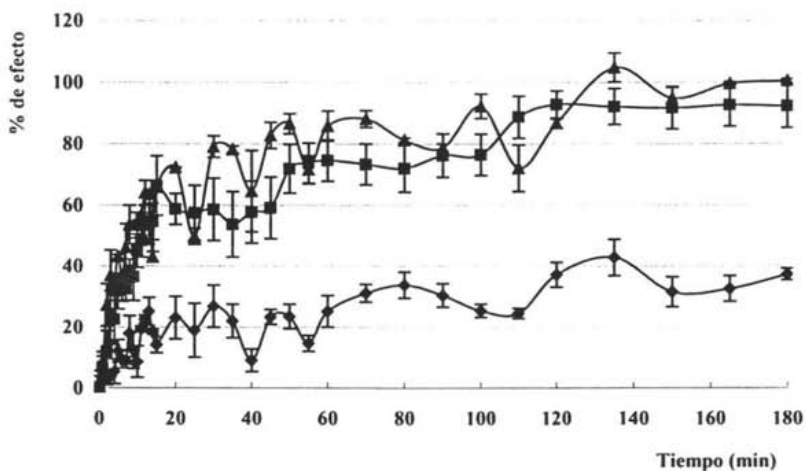


Figura 24. Porcentaje de efecto antihipertensivo a través del tiempo de una solución de Omapatrilat (▲) -tomada como el 100%-, una suspensión (★) y de las DL's preparada a partir de MO (■) en el primer día del tratamiento.

El efecto máximo del OMA administrado por medio de las dispersiones de MO se alcanza aproximadamente a las 2h, lo cual está de acuerdo con lo reportado previamente por Morazo *et al.* (2001) y Rouleau *et al.* (2000). En esta misma gráfica se puede ver que aproximadamente a los 10 min se ha alcanzado 50 % del efecto máximo, lo cual es importante ya que es una ventaja del empleo de estos sistemas submicrónicos acarreadores de MO para la administración de fármacos cuyo efecto sea requerido de manera rápida. Lo anterior debe estar relacionado con lo planteado previamente sobre el efecto de la monoleína en la absorción de fármacos, al ser administrada por vía oral. Este efecto es similar a las sales biliares que forman distintas estructuras capaces de facilitar la absorción (Patton y Carey, 1979, Gustafsson *et al.*, 1999). Para el caso del Omapatrilat es importante que se alcance un efecto rápido debido a que una elevación en la presión arterial puede traer consecuencias graves si no se normaliza lo más pronto posible.

Calculando el valor de la presión arterial media (PAM) con los datos de la literatura -PS 116 y PD 91 mmHg- se tiene que para una rata sana la PAM es de 107.7 mmHg (Flores *et al.*, 2002). La administración de OMA a través de las dispersiones de MO permitió estabilizar la PAM de los animales hipertensos al tercer día del tratamiento (Fig. 25).

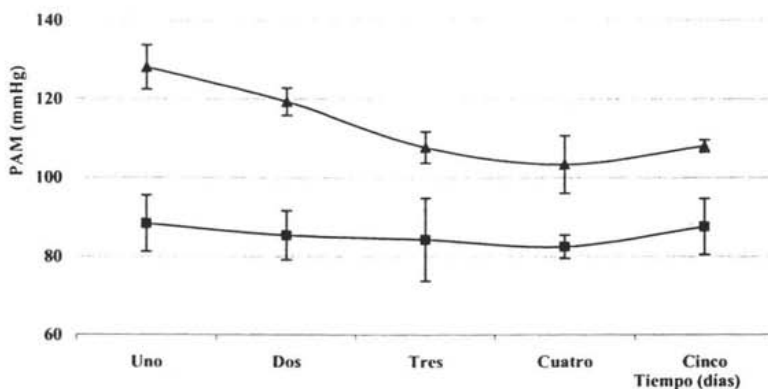


Figura 25. Presión arterial media inicial ($PAM_{inicial}$; $t=0$ -▲-) y final (PAM_{final} ; $t=180$ min -■-) en ratas hipertensas, a lo largo de cinco días de tratamiento con OMA-DLMO.

En la Fig. 26 se puede apreciar que la diferencia entre la PAM inicial y la final de las ratas baja hasta alcanzar un valor constante al tercer día. Es decir, la PAM inicial promedio ($n=5$) de las ratas tratadas con OMA por medio de las dispersiones de MO descendió a través del tiempo, y al tercer día llegó a un valor de 108 mmHg que es muy cercano al valor de PAM reportado para una rata sana.

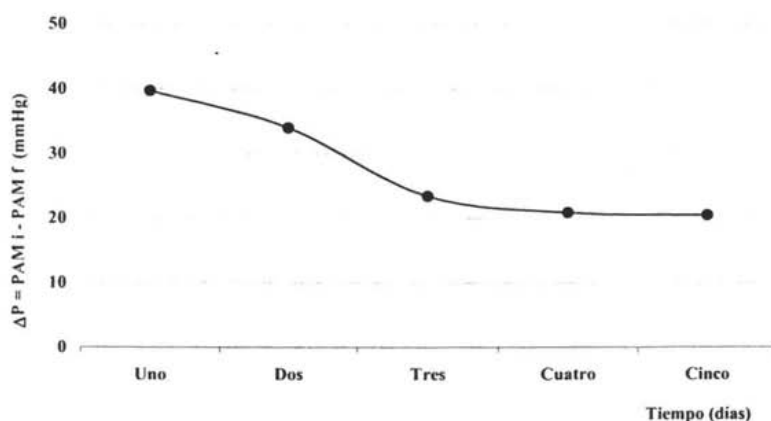


Figura 26. Diferencia de presión (ΔP) entre la PAM inicial ($t=0$) y la PAM final ($t=180$ min) a lo largo de cinco días de tratamiento con OMA-DLMO.

Un análisis de las PAM al tiempo cero nos permitió establecer diferencias importantes entre los distintos tratamientos. En la Tabla 27 se observa que la PAM de las ratas a las que se administró solamente MO (Blanco) en forma de DL's mostró cambios en la PAM a través de los cinco días de tratamiento. Sin embargo hay que tener en cuenta que se está trabajando con animales genéticamente hipertensos por lo que con el paso del tiempo la PAM va en aumento. Un resultado semejante se observó cuando se empleó la suspensión de OMA, es decir, que las ratas no mostraron una mejoría. La administración de una suspensión no permitió estabilizar a los animales hipertensos, sólo se presentó cierto efecto unas horas después de su administración, además de no permitir un efecto prolongado del fármaco. Esto probablemente porque hay una disolución-absorción incierta, como consecuencia de la forma cristalina y lipofiliidad del Omapatrilat en la suspensión.

Tabla 27. Presión arterial media -PAM- tomada al tiempo cero los cinco días para los distintos tratamientos y el blanco de MO.

| DÍA | MO (mmHg) | Suspensión (mmHg) | OMA-DLMO (mmHg) | OMA-Solución (mmHg) | |
|----------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|---------------------|---------|
| UNO | 133.6 ± 3.3 | 135.9 ± 1.4 | 130.0 ± 5.6 | 135.4 ± 3.8 | |
| DOS | 134.0 ± 2.4 | 133.4 ± 0.8 | 119.3 ± 3.5 | 120.4 ± 2.4 | |
| TRES | 133.3 ± 3.6 | 136.1 ± 1.8 | 107.7 ± 4.0 | 117.0 ± 3.6 | |
| CUATRO | 137.5 ± 2.9 | 134.8 ± 1.2 | 103.3 ± 7.3 | 111.8 ± 7.4 | |
| CINCO | 137.8 ± 0.8 | 136.8 ± 2.0 | 108.1 ± 1.6 | 116.5 ± 5.6 | |
| ANOVA ($\alpha=0.05$) | F _{Calculada} | 3.1645 | 3.7820 | 22.1599 | 17.0173 |
| | F _{Tablas} | 2.8661 | 2.8661 | 2.8661 | 2.8661 |

De este mismo análisis se puede concluir que las SHR tratadas con el OMA-DLMO y del OMA-Solución provocaron una disminución significativa en la PAM de las ratas hipertensas. Sin embargo al comparar los promedios de las PAM de los tres últimos días de tratamiento entre las OMA-DLMO vs OMA-Solución (Tabla 28) se aprecia que existe una diferencia significativa (Prueba t, $\alpha=0.05$). De lo anterior se puede concluir que la administración de OMA por medio de las DLMO provoca un descenso mayor en la PAM de las ratas y que el uso de los acarreadores lipídicos permite un mayor control en la liberación. Con este análisis se vuelve a observar que la PAM alcanzada por la ratas tratadas con OMA-DLMO está muy cercana de las PAM reportada para una rata sana. Cabe señalar que al realizar el análisis estadístico de la PAM inicial de los distintos grupos de animales hipertensos los resultados de la prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$, $F_{\text{calculada}}$ de 2.4356; F_{Tablas} de 3.2389) nos indica que las PAM inicial de todos los grupos estudiados se encontraba en dentro de un mismo rango.

Tabla 28. Comparación de las PAM de los tres últimos días de tratamiento entre las DLMO y la Solución de OMA.

| Tratamiento | PAM (mmHg) | | | PAM Promedio (mmHg) | DE |
|------------------------------------|------------|------------|-----------|------------------------|--------|
| | Día Tres | Día Cuatro | Día Cinco | | |
| OMA-DLMO | 107.7 | 103.3 | 108.1 | 106.4 | 3.8 |
| OMA-Solución | 117.0 | 111.8 | 116.5 | 115.12 | 2.8 |
| Prueba t-student ($\alpha=0.05$) | | | | $t_{\text{calculada}}$ | 3.8683 |
| | | | | t_{Tablas} | 2.7765 |

Se debe tener en cuenta que la administración del OMA en solución puede presentar ciertas desventajas que las dispersiones de MO evitan, por ejemplo la dependencia de la solubilidad con el pH y la estabilidad química de la molécula en solución. Por su parte en las dispersiones de MO la molécula de OMA, que por su carácter lipofílico se encuentre alojado en la parte hidrofóbica de las partículas, presentará una mayor estabilidad física, química y enzimática. Lo anterior como consecuencia de la protección que le confieren las partículas acarreadoras a la molécula. Al encontrarse el fármaco dentro de un acarreador pueden evitarse también efectos secundarios relacionados con la irritación de la mucosa gástrica y/o intestinal. Las dispersiones de MO presentaron una talla submicrónica, lo que sumado al comportamiento estructural de este lipido, lo hacen un potencial acarreador de fármacos en la administración oral.

VIII. CONCLUSIONES

- i. Se establecieron las condiciones de solubilización de los lípidos en metil etil cetona, acetato de metilo, acetato de etilo y acetato de isopropilo para obtener sistemas dispersos submicrónicos por medio del método de emulsificación difusión.
- ii. Se obtuvieron dispersiones lipídicas de talla submicrónica a partir de monooleína, Gelucire® 44/14 mediante el método de emulsificación difusión a temperatura ambiente, lo que representa una nueva alternativa para la preparación de estos sistemas
- iii. Al controlar la temperatura del método de emulsificación difusión fue posible la obtención de dispersiones lipídicas de talla submicrónica a partir de Gelucire® 50/13, Compritol® ATO 888 y Geleol®. Las dispersiones lipídicas preparadas a partir de estos lípidos, también se conocen como nanopartículas lipídicas sólidas (SLN "*Solid Lipid Nanoparticles*") en este sentido este método es ahora una nueva alternativa para la preparación de estos sistemas.
- iv. El método de emulsificación difusión permite modifica la superficie de las partículas de manera sencilla al variar el tipo de estabilizaste.
- v. Las variables tecnológicas del método de emulsificación difusión empleado para la preparación de dispersiones lipídicas son sencillas de controlar. De entre estas variables las que guardan una relación inversa con el tamaño de partícula son la velocidad de agitación, la cantidad de estabilizante, la temperatura del proceso y la miscibilidad del disolvente con el agua. Por otro lado, la cantidad de lípido en la fase interna presentó una relación directa con el tamaño de partícula.
- vi. El método de emulsificación difusión permitió cargar un fármaco antihipertensivo en el sistema preparado a partir de monooleína, el cual promueve la absorción oral *in vivo* y permitió alcanzar rápidamente el efecto deseado
- vii. El método de emulsificación difusión es una nueva alternativa para la preparación de sistemas lipídicos con potencial uso terapéutico

IX. PERSPECTIVAS

La combinación de lípidos y polímeros para la preparación de los sistemas submicrónicos podría ser una buena alternativa para modular la liberación de fármacos, además podría tener una repercusión positiva en la estabilidad de las dispersiones. De la misma manera explorar nuevas posibilidades de materiales lipídicos como las ceras.

La preparación de nanocápsulas lipídicas por medio del método de emulsificación difusión podría realizarse usando lípidos con alto punto de fusión para formar las paredes de la cápsula y el centro oleoso por medio de un principio activo oleoso o bien algún aceite mineral que sea capaz de solubilizar fármacos lipofílicos. Lo anterior cumpliendo una condición básica: La insolubilidad de lípido y el aceite.

Llevar a cabo un estudio de estabilidad a largo plazo de algunas de las dispersiones lipídicas preparadas probando distintos empaques, intensidad de luz, temperatura, etc. es decir, variando las condiciones de almacenamiento.

Llevar a cabo un estudio sobre la liberación *in vitro* de un determinado principio activo variando el tipo de lípido, de estabilizante y las posibles proporciones de estos.

Recientemente se han desarrollado nuevos sistemas en los que se incorporan lípidos duros y aceites a los sistemas coloidales lipídicos, estos nuevos sistemas han sido llamados acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC, "*Nanostructured lipid carriers*"). Estos sistemas prometen ser la nueva generación de sistemas lipídicos coloidales. El MED puede también ser una alternativa para la preparación de estos sistemas, ya que se cuenta con una variedad amplia de disolventes y rangos de temperatura para poder solubilizar las distintas mezclas lípido-aceite elegidas.

Se podrían tratar de formar complejos de inclusión con fármacos que presentan problemas de solubilidad y/o estabilidad usando por ejemplo ciclodextrinas, posteriormente estos complejos se incorporarían en las dispersiones lipídicas. En este mismo sentido se podría probar el uso de detergentes catiónicos para atrapar pequeños péptidos.

X. REFERENCIAS

1. Almeida, A.J., Runge, S., Müller, R.H., 1997. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters. *Int. J. Pharm.* 149, 255-265.
2. Berton, M., Allemann, E., Stein, C.A., Gurny, R., 1999. Highly loaded nanoparticulate carrier using an hydrophobic antisense oligonucleotide complex. *Eur. J. Pharm.* 9, 163-170.
3. Briggs, J., Caffrey, M., 1994. The temperature-Composition phase diagram and mesophase structure characterization of monoptadecenoic acid in water. *Biophysical J.* 67, 1594-1602.
4. Burke, A.P., 2000. Controlled release protein therapeutics: Effects of process and formulation on stability. In: Wise, D.L. (Ed), *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. Marcel Dekker, New York, 2000 pp 661-692
5. Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M.E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 148, 47-54.
6. Cavalli, R., Caputo, O., Gasco, M.R., 2000. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J. Pharm. Sci.* 10, 305-309.
7. Cavalli, R., Peira, E., Caputo, O., Gasco, M.R., 1999. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 182, 59-69.
8. Choi, S.W., Kwon, H.Y., Kim, W.S., Kim, J.H., 2002. Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 201, 283-289.
9. Chung, H., Caffrey, M., 1994. The curvature elastic-energy function of the lipid-water cubic mesophase. *Nature* 368, 224-225.
10. Chupin, V., Boots, J.W.P., Killian, J.A., Demel, R.A., Kruijff, B., 2002. Thermotropic phase behavior of monoglyceride-dicetylphosphate dispersions and interaction with proteins: A ^2H and ^{31}P NMR study. *Biophysical J.* 82, 843-851.
11. Davies, J.T., Rideal, E.K. 1961. *Interfacial Phenomena*. Academic Press, New York, pp. 319-366.
12. Domb, A.J., 1993. Lipospheres for controlled delivery of substances, US Patent 5 188 837.

13. Domb, A.J., 1995. Long acting injectable oxytetracycline-liposphere formulation, *Int. J. Pharm.* 124, 271–278.
14. Drummond, C.J., Fong, C., 2000. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. *Current Opin. Colloid Inter. Sci.* 4, 449–456.
15. Engström, S., 1990. Drug delivery from cubic and other lipid–water phases. *Lipid Technol.* 2, 42–45.
16. Engström, S., Ericsson, B., Landh, T., 1996. A cubosome formulation for intravenous administration of somato-statin. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23, 215–216.
17. Flores, C.P.L., Infante, V.O., Sánchez, T.G., Martínez, M.R., Rodríguez R.G., 2002. Detección de signos vitales en ratas mediante métodos no invasivos. *Vet. Méx.* 33(2), 179–186.
18. Freitas, C., Müller, R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168, 221–229.
19. Ganem-Quintanar, A., Quintanar-Guerrero, D., Buri, P., 2000. Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26, 809–820.
20. Gasco, M.R., 1993. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. *US Patent, USS 188837.*
21. Guinebretière, S., Briancon, S., Fessi, H., Teodorescu, V.S. Blanchin, M.G., 2002. Nanocapsules of biodegradable polymers: Preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Materials Sci. Engineering C* 21, 137–142
22. Gustafsson, J., Ljusberg-Wahren, H., Almgren, M., Larsson, K., 1996. Cubic lipid–water phase dispersed into submicron particles. *Langmuir* 12, 4611–4613.
23. Gustafsson, J., Ljusberg-Wahren, H., Almgren, M., Larsson, K., 1997. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by a nonionic amphiphilic polymer. *Langmuir* 13, 6964–6971.
24. Gustafsson, J., Nylander, T., Almgren, M., Ljusberg-Wahren, H., 1999. Phase behavior and aggregate structure in aqueous mixtures of sodium cholate and glycerol monooleate. *J. Colloid Inter. Sci.* 211, 326–335
25. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Third edition, Edited by Arthur H. Kibbe, American Pharmaceutical Association (APhA), Washington DC. USA. 2000.

26. Heiati, H., Tawashi, R., Phillips, N.C., 1998. Solid lipid nanoparticles as drug carriers II. Plasma stability and biodistribution of solid lipid nanoparticles containing the prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate in mice. *Int. J. Pharm.* 174, 71–80.
27. Heiati, H., Tawashi, R., Shievers, R.R., Phillips, N.C., 1997. Solid lipid nanoparticles as drug carriers I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate. *Int. J. Pharm.* 146, 123-131.
28. Hu, F.Q., Yuan, H. Zhang, H.H. Fang, M., 2002. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* 239, 121–128.
29. Jaeghere F., Doelker, E., Gurny, R., 1999. Nanoparticles. In: Mathiowitz, E., (Ed.), *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol .2, John Wiley Sons, New York, pp. 641-664.
30. Jenning, V., Gohla, S.H., 2000a. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN^{*}). *Int. J. Pharm.* 196, 219–222.
31. Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M., Gohla, S.H., 2000b. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *J Control. Release.* 66, 115-126.
32. Jenning, V., Mäder, K., Gohla, S.H., 2000c. Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a 1H-NMR study. *Int. J. Pharm.* 205, 15-21.
33. Jenning, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.H., 2000d. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* 199, 167-177.
34. Konan, Y.N., Cerny, R., Favet, F., Berton, M., Gurny, R., Allémann, E., 2003. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl) porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 115-124.
35. Kwon, H.Y., Lee., J.Y., Choi, S.W., Jang, Y., Kim, J.H 2001. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 182, 123–130.
36. Labouret, A., Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1995. Application of an original process for obtaining colloidal dispersions of some coating polymers. Preparation, characterization, industrial scaling up. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, 229–241
37. Landh, T., 1991. Cubic phases and cubosomes in lipid–water systems. Thesis, Lund University.

38. Landh, T., 1994. Phase behavior in the system pine oil mono-glycerides—poloxamer 407—water at 20 °C. *J. Phys. Chem.* 98, 8453–8467.
39. Landh, T., Larsson, K., 1993. Particles, method of preparing said particles and uses thereof. PCT International Application WO93/06921.
40. Larsson, K., 1989. Cubic lipid-water phases: structures and biomembrane aspects. *J. Phys. Chem.* 93 (21) 7301–7314.
41. Larsson, K., 1997. Cubosomes and hexosomes for drug delivery. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24, 198-199.
42. Leroux, J.C., Allémann, E., Doelker, E., Gurny, R., 1995a. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur. J. Pharm.* 4(1), 14-18.
43. Leroux, J.C., Cozens, R., Roesel, J.L., Galli, B., Kubel, F., Doelker, E., Gurny, R., 1995b. Pharmacokinetics of a novel protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice. *Pharm. Sci.* 84(12), 1397-1391.
44. Lippacher, A., Müller, R.H., Mäder, K., 2000. Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *Int. J. Pharm.* 196, 227–230.
45. Lippacher, A., Müller, R.H., Mäder, K., 2001. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 214, 9-12.
46. Lukowski, G., Kasbohm, J., Pflügel, P., Illing, A., Wulff, H., 2000. Crystallographic investigation of cetylpalmitate solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 196, 201–205.
47. Maaßen, S., Schwartz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Yunis-Specht, F., Müller, B.W., Müller, R.H. 1993. Comparison of cytotoxicity between polyester nanoparticles and solid lipid nanoparticles (SLN). *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 20, 490-491.
48. Maia, C.S., Mehnert, W., Schafer-Korting, M., 2000. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids, *Int. J. Pharm.* 196, 165–167.
49. Marrik, S.J., Tielman, P., 2002. Molecular dynamics simulation of spontaneous membrane fusion during a cubic-hexagonal phase transition. *Biophysical J.* 83, 2386-2392.
50. Mehnert, W., y Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles production, characterisation and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196.

51. Morazo, P., Fortepiani, L.A. Ortiz, M.C. Atucha, N.M. García-Estaño, J., 2001. Omapatrilat normalizes renal function curve in spontaneously hypertensive rats. *BMC Pharmacology* 1:5.
52. Müller, R.H., Maaßen, S., Weyhers, H., Specht, F., Lucks, J.S., 1996. Cytotoxicity of magnetite loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 138, 85-94.
53. Müller, R.H., Maassen, S., Schwarz, C., Mehenert, W., 1997. Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes, . *Controlled Rel.* 47, 261-269
54. Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: A review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161-178.
55. Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242, 121-128.
56. Müller, R.H., Ruhl, D., Runge, S.A., 1996a. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *Int. J. Pharm.* 144, 115-121.
57. Nakano, M., Sugita, A., Matsuoka, H., Handa, T., 2001. Small-Angle X-ray Scattering and ¹³C NMR Investigation on the Internal Structure of "Cubosomes". *Langmuir* 17, 3917-3922.
58. Patton, J.S., Carey, M.C., 1979. Watching Fat Digestion. The formation of visible product phases by pancreatic lipase is described. *Science* 204, 145-147
59. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., Fessi, H., 1997. Study of the formation mechanism of nanoparticles by the emulsion-diffusion technique. *Colloid Polym. Sci.* 275, 640-647.
60. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., Fessi, H., 1998. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15, 1056-1064.
61. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., 1998b. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsification-diffusion technique. *J. Microencapsul.* 15, 107-119.
62. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., 1999. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation *Int. J. Pharm.* 188, 155-164.

63. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., Doelker, E., 1996. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of Poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsion–diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 143, 133–141.
64. Razumas, V., Larsson, K., Mieziš, K., Nylander, T., 1996. A cubic monoolein-cytechrome c-water phases: X-ray diffraction, FT-IR, differential scanning calorimetric, and electrochemical studies. *J. Phys. Chem.* 100, 11766-11774.
65. Rouleau, L.J., Pfeffer, A.M., Stewart, J.D., Isaac, D., Sestier, F., Kerut, E.K., Porter, B.C., Proulx, G., Qian C., Block, J.A., 2000. Comparison of vasoepitidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial.
66. Sallam, A.S., Khalil, E. Ibrahim, H., Freij, I., 2002. Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceril monooleate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 343-352.
67. Schubert, M.A., Müller-Goymann, C.C., 2003. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles evaluation of the method and process parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 125–131.
68. Schwartz, C., Mehenert, W., Lucks, J.S., Müller, R.H., 1992. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Int. J. Pharm.* 88, 53–56.
69. Schwartz, C., Mehnert, W., 1997. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 157, 171–179.
70. Shah, J.C., Sadhale, Y., Chilukuri, D.M., 2001. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 229–250.
71. Sica, D.A. Liao, W., Gehr, T.W.E., Khan, S., Jemal, M., Delaney, C.L., Ferreira, I.M., Malhotra, B.K., 2000. Disposition and safety of Omapatrilat in subjects with renal impairment. *Clin. Pharm. Therapeutics.* 7, 261-269.
72. Siekmann, B., Bunjes, H., Koch, M.H.J., Westesen, K., 2002. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride–water phases. *Int. J. Pharm.* 244, 33–43.
73. Siekmann, B., Westesen, K., 1996. Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 104–109.
74. Sjöström, B., Bergenstahl, B., 1992. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm.* 88, 53–62.

75. Smith, A., Hunneyball, I.M., 1986. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* 30, 215-220.
76. Speiser, P., 1990. Lipidnanopellets als Trägersystem für Arzneimittel zur peroralen Anwendung, European Patent EP 0167825.
77. Spicer, P.T., Hayden, K.L., Lynch, M.L., Ofori-Boateng, A., Burns, J.L., 2001. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). *Langmuir* 17, 5748–5756
78. Venkatraman, S., Davar, N. Chester, A. Kleiner, L. 2000. An overview of controlled release systems. In: Wise, D.L. (Ed), *Handbook of pharmaceutical control release technology*. Marcel Dekker, New York, pp 661-692
79. Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H.J., 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Control. Rel.* 48, 223–236.
80. Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W., Yang, C.Z., 1999. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain, *J. Controlled Rel.* 59, 299–307.
81. Zimmermann, E., Müller, R.H., 2001. Electrolyte and pH stabilities of aqueous solid liquid nanoparticles (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 203-210.
82. www.fda.gov/cder/duidance/Q3ct&1/pdf "Guidance for the Industry Q3C-Tables and List"

XI. ANEXOS

11.1 PROPIEDADES DE LOS LÍPIDOS

11.1.1 Compritol 888 ATO®

El Compritol 888 ATO® es una mezcla de mono, di y tri-glicéridos del ácido behénico donde la fracción de los diésteres es predominante (gliceril dibehenato). También se conoce como gliceril behenato atomizado y es preparado a partir de materia prima de origen vegetal. El compritol se sintetiza por esterificación de ácido behénico (ácido docosanoico -C₂₂H₄₄O₂), el producto se atomiza por spray-cooling y se obtiene un polvo fino de color blanco. Número de registro CAS: Gliceril dibehenato [94201-62-4]

Usos

Lubricante para la preparación de cápsulas y tabletas, agente aglutinante para la compresión directa, matriz lipofílica para la preparación sistemas de liberación sostenida de fármacos como tabletas y cápsulas.

Toxicidad

Toxicidad aguda del compuesto puro por vía oral: DL50 > 2000 mg/kg

Irritación ocular del compuesto puro: Media

Irritación cutánea: Ligera

Irritación ocular (5% en aceite de nuez): Bien tolerada

Solubilidad

Soluble en cloroformo, cloruro de metileno cuando se calienta. Insoluble en agua, etanol (96°), n-hexano y aceite mineral. Tiene un valor de HLB de 2.

Composición y Algunas Propiedades Fisicoquímicas

| Especificación | Descripción |
|-----------------------------------|-----------------|
| Rango de fusión (Punto de gotceo) | 69-74 °C |
| Valor de Acidez | < 4.00 mg KOH/g |
| Valor de saponificación | 145 a 165 mg/kg |
| Contenido de agua | < 1% |
| Contenido de glicerol libre | < 1% |
| Monoglicéridos totales | 13.0-21.0% |
| Diésteres totales | 40-60% |
| Triésteres totales | 21-35% |
| Ácido behénico (C22) | > 83.0% |
| Ácido araquídico (C20) | < 10.0% |
| Ácido esteárico (C18) | < 5.0% |
| Ácido palmítico (C16) | < 3.0% |
| Ácido lignocérico (C24) | < 3.0% |
| Ácido erucico (C22:1) | < 3.0% |

11.1.2 Geleol®

Monoestearato de glicerilo 40-55. Es una mezcla de mono, di y triglicéridos del ácido esteárico y palmítico. Este contiene al menos 40% y no más de 50% de monoglicéridos (2,3-dihidroxipropil estearato - C₂₁H₄₂O₄-). Producto de origen vegetal. Número de registro CAS: [31566-31-1]

Usos

Agente emulsificante, estabilizante, solubilizante; lubricante en tabletas y cápsulas, emoliente. Es un emulsificante no iónico que puede formar emulsiones ac/ag o ag/ac. Se usa también como ingrediente de tabletas de liberación sostenida de fármacos.

Toxicidad

Ratones administrados vía IP: DL₅₀ = 0.2g/kg

Irritación cutánea del compuesto puro: Muy bien tolerado

Irritación ocular (30%): Bien tolerado

Se considera un excipiente no tóxico y no irritante, se incluye en la lista GRAS, así como en la guía de ingredientes inactivos de la FDA (vía oral, oftálmica, ótica, rectal, tópica, transdermal y vaginal).

Solubilidad

Soluble en cloroformo, cloruro de metileno, éter, benceno y etanol (96°) a 60 °C.

Insoluble en agua, n-hexano y aceite mineral.

Composición y algunas propiedades fisicoquímicas

| Especificación | Descripción |
|----------------------------------|--------------------|
| Rango de fusión (Punto de goteo) | 54.5-58.5 °C |
| HLB | 3.8 |
| Valor de Acidez | < 3.0 mg KOH/g |
| Valor de saponificación | 158 a 177 mg KOH/g |
| Contenido de agua | < 1.0% |
| Contenido de glicerol libre | < 6.0% |
| Monoglicéridos totales | 40.0-55.0% |
| Diésteres totales | 30.0-45.0% |
| Triésteres totales | 5.0-15.0% |
| Ácido palmítico (C16) | 40.0-60.0% |
| Ácido esteárico (C18) | 40.0-60.0% |
| Ácido palmítico y esteárico | >90% |

11.1.3 Gelucire® 44/14

El Gelucire® 44/14 o Lauroil macroglicéridos (EP) es una mezcla bien definida de mono, di y triglicéridos y de mono y diésteres de ácidos grasos y polietilenglicol. Su origen es vegetal y petroquímico, se obtienen de la reacción de hidrogenación entre el aceite de grano de palma con PEG1500 (Polietilenglicol PM promedio de 1500). La composición aproximada es de 20% mono, di y tri-glicéridos; 75% de ésteres de los ácidos grasos con el PEG 1500 y 8% de PEG 1500 libre. Se usa para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos poco solubles, confiere protección contra la oxidación e hidrólisis, permite el manejo de fármacos de baja densidad, tóxicos o cuya dosis sea muy baja. Número de registro CAS: [93334-20-4/9004-81-3]

Toxicidad

Toxicidad aguda por vía oral en ratas: DL₅₀ > 2004 mg/kg

Toxicidad subcrónica (90 días) en perros: NOAEL > 2500 mg/kg/j

Prueba en simios: negativa

Prueba en micronúcleos: negativa

Ensayo en linfoma de ratón: negativo

Solubilidad

Soluble en etanol (96°), cloroformo y cloruro de metileno; en agua es dispersable y en aceites minerales es insoluble. Tiene un valor de HLB de 14.

Composición y algunas propiedades fisicoquímicas

| Especificación | Descripción |
|----------------------------------|--------------------|
| Rango de fusión (Punto de goteo) | 42.5 a 47.5 °C |
| Valor de Acidez | < 2.00 mg KOH/g |
| Valor de saponificación | 79 a 93 mg/kg |
| Contenido de agua | < 0.5 % |
| Contenido de glicerol libre | < 3 % |
| Ácido caprílico (C8) | < 15 % |
| Ácido cáprico (C10) | < 12 % |
| Ácido laúrico (C12) | 30 a 50 % |
| Ácido mirístico (C14) | 5 a 25 % |
| Ácido palmítico (C16) | 4 a 25 % |
| Ácido esteárico (C18) | 5 a 35 % |

11.1.4 Gelucire® 50/13

El Gelucire® 50/13 o estearoil macroglucéridos (EP) es una mezcla bien definida de mono, di y triglicéridos y de mono y diésteres de ácidos grasos del polietilenglicol (PEG). Su origen es vegetal y petroquímico, se obtienen de la reacción de hidrogenación entre el aceite de grano de palma con PEG1500 (Polietilenglicol PM promedio de 1500). La composición aproximada es de 20% mono, di y tri-glicéridos; 75% de ésteres de los ácidos grasos con el PEG 1500 y 8% de PEG 1500 libre. Se usa para mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de fármacos poco solubles, como agente para controlar la liberación de los fármacos, confiere protección contra la oxidación e hidrólisis, permite el manejo de fármacos de baja densidad, tóxicos o cuya dosis sea muy baja. El Gelucire 50/13 es uno de los grados que presenta un mayor punto de fusión como consecuencia de su alto contenido de ácidos palmítico y esteárico. Número de registro CAS: [91744-66-0/9004-99-3]

Toxicidad

Toxicidad aguda por vía oral en ratas: DL₅₀ > 20 g/kg

Solubilidad

Soluble en cloroformo y cloruro de metileno; en agua es dispersable y es insoluble en etanol (96°) y en aceites mineral. . Tiene un valor de HLB de 13.

Composición y algunas propiedades fisicoquímicas

| Especificación | Descripción |
|----------------------------------|-------------------|
| Rango de fusión (Punto de goteo) | 46.0 a 51.0 °C |
| Valor de Acidez | < 2.00 mg KOH/g |
| Valor de saponificación | 67 a 81 mg KOH/kg |
| Contenido de agua | < 0.5% |
| Contenido de glicerol libre | < 3 % |
| Ácido caprílico (C8) | < 3 % |
| Ácido cáprico (C10) | < 3 % |
| Ácido laúrico (C12) | < 5 % |
| Ácido mirístico (C14) | < 5 % |
| Ácido palmítico (C16) | 40-50 % |
| Ácido esteárico (C18) | 48-58 % |
| Ácido palmítico y esteárico | > 90 % |

11.1.5 Monoleato de glicerilo (Monoleína)

El monoleato de glicerilo o monoleína (ácido 9-octadecanoico (Z)-monoéster) se obtiene por esterificación de la glicerina con ácidos grasos, principalmente ácido oleico (ácido (Z) -9-octadecanoico). Se presenta en forma de una pasta blanca de olor característico. Número de registro CAS: [25496-72-4]

Usos

Se usa en formulaciones tópicas, como agente emulsificante para formar emulsiones ag/ac. Puede ser usado para la liberación sostenida de varios fármacos.

Toxicidad

El monoleato de glicerilo es considerado como un excipiente no tóxico, biodegradable y biocompatible, por lo que se clasifica como un material GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y está incluido en la Guía de Ingredientes Inactivos de la FDA (*Inactive Ingredients Guide*). La monoleína se degrada por acción de las esterasas que se encuentran presentes en diversos tejidos. La MO es el mayor producto de la hidrólisis enzimática de triglicéridos.

Solubilidad

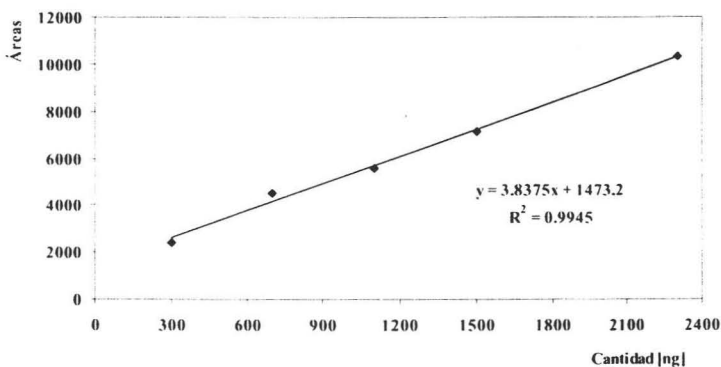
Soluble en cloroformo, acetato de etilo, etanol (95%) éter, aceites vegetales y minerales.

Insoluble en agua ($S \approx 10^{-6}$ M)

11.2 DETECCIÓN DE OMAPATRILAT DISUELTO EN LA FASE ACUOSA

Curva de calibración

| Cantidad [ng] | | Áreas | | Promedio ± DE | CV |
|---------------|-------|-------|-------|---------------|-----|
| 2300 | 10156 | 10495 | 10328 | 10326 ± 169 | 1.6 |
| 1500 | 7237 | 7001 | 7123 | 7121 ± 118 | 1.7 |
| 1100 | 5514 | 5623 | 5684 | 5607 ± 86 | 1.5 |
| 700 | 4647 | 4626 | 4309 | 4527 ± 189 | 4.2 |
| 300 | 2405 | 2427 | 2448 | 2427 ± 21 | 0.9 |



11.3 PRUEBA PARA LA ESTABILIDAD DEL OMAPATRILAT FORMULADO EN LAS DISPERSIONES LIPÍDICAS DE MONOLEÍNA

Para determinar si se habían formado productos de degradación como consecuencia del proceso de preparación de las DL se preparó una placa de CCF como de la misma manera que en el caso mencionado previamente. Sin embargo en esta ocasión en la placa se colocaron: el control, la muestra de las DLMO y una mezcla de ambos. La placa se eluyó y se reveló de la misma forma en que se describió anteriormente.

| Muestras | Rf |
|----------|------|
| DLMO | 0.67 |
| DLMO-OMA | 0.68 |
| OMA | 0.69 |

11.4 GUÍA SOBRE IMPUREZAS DE DISOLVENTES RESIDUALES PARA LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano según la ICH (*International Conference on Harmonisation*). Esta guía representa la opinión actual de la FDA (*Food and Drug Administration*) sobre el tema. En la guía se hace una clasificación de los disolventes según su grado de toxicidad y hay cuatro clases:

Disolventes Clase 1: Disolventes que tienen que ser evitados. Conocidos por carcinógenos y por su alto peligro para el medio ambiente

Disolventes Clase 2: Disolventes que deben ser usados bajo ciertos límites. Posibles causantes de efectos tóxicos irreversibles como neurotoxicidad o teratogenicidad.

Disolventes clase 3: Los disolventes Clase 3 son considerados como los disolventes menos tóxicos y con menor riesgo para la salud humana. La clase 3 no incluye disolventes conocidos como dañinos para la salud en los niveles aceptados para el uso farmacéutico. La cantidad residual de estos disolventes que puede ser aceptada sin justificación debe de ser de 50 mg por día o menos. Cantidades mayores pueden aceptarse si se considera que éstas son prácticas con relación a las capacidades de producción y las buenas prácticas de manufactura.

Tabla de disolventes Clase 3.

| Disolventes | |
|----------------------|-----------------------|
| Ácido Acético | Heptano |
| Acetona | Acetato de Isobutilo |
| Anisol | Acetato de Isopropilo |
| 1-Butanol | Acetato de metilo |
| 2-Butanol | 3-Metil-1-butanol |
| Acetato de Butil | Metiltil cetona |
| tert-Butilmetil éter | Metilisobutil cetona |
| Cumene | 2-Metil-1-propanol |
| Dimetil sulfóxido | Pentano |
| Etanol | 1-Pentanol |
| Acetato de etilo | 1-Propanol |
| Éter Etilico | 2-Propanol |
| Formiato de Etilo | Acetato de Propilo |
| Ácido fórmico | Tetrahidrofurano |

Tabla de dosis letal cincuenta para los cuatro disolvente utilizados en este trabajo (Ref. 25).

| Disolvente | DL ₅₀ |
|------------|------------------|
| MEC | 6.86 ml/kg |
| AM | > 5 g/kg |
| AE | 11.3 ml/kg |
| AIP | 6.75 g/kg |