

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“POTENCIAL USO DE LA
TÉCNICA DE EMULSIFICACIÓN –
DIFUSIÓN EN LA ELABORACIÓN
DE NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
CÉSAR GUTIÉRREZ ESCAMILLA

ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: CESAR GUTIERREZ
ESCAMILLA

FECHA: 26 SEPT 2005

FIRMA: CG

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Potencial uso de la Técnica de emulsificación-difusión
en la elaboración de nanocápsulas lipídicas

que presenta El pasante: César Gutiérrez Escamilla
con número de cuenta: 9508371-1 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Agosto de 2005

PRESIDENTE MC. Ana Ma. Velázquez Sánchez

VOCAL DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez

SECRETARIO Dr. David Quintanar Guerrero

PRIMER SUPLENTE Dra. Adriana Genem Rondaro

SÉGUNDO SUPLENTE MFC. Cecilia Hernández Barba

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo obtenido a lo largo de estos años para poder alcanzar mis metas y sueños, sin su ayuda no lo hubiera podido lograr. Gracias por su confianza y por creer en mí.

Al Dr. David y a la Dra. Adriana por permitirme formar parte de su equipo y compartirme su experiencia y conocimientos que me sirvieron de base para la realización de este trabajo.

A Lupita, David T. y Eli por toda la ayuda, paciencia y conocimientos proporcionados en la realización del presente trabajo.

Al Técnico Rodolfo Robles por su colaboración y ayuda en la toma de las fotografías de MEB.

A la DGPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto No. IN21400 por el financiamiento otorgado, al cual pertenece esta tesis.

A la Dirección General de Evaluación Educativa (UNAM) a través del programa Probetel por el financiamiento otorgado para la elaboración de esta tesis.

A la UNAM por formarme humana y profesionalmente a lo largo de estos últimos años. Gracias darme la oportunidad de formar parte de esta gran institución.

A mis compañeros y amigos de clase, especialmente a la generación 26 de QFB por todos los momentos compartidos tanto divertidos como estresantes a lo largo de la carrera.

A mis amigos de laboratorio Moni, Marlene, Briza, Magali, Lis, Gemma, Lupita, Eli, David, Luis M., Roberto y Miguel por todos los momentos compartidos y por haber hecho del laboratorio un lugar más agradable para trabajar. Gracias por ser como son.

A mis amigos Lolita, J. Manuel Lozada, Leslie y J. Manuel Junior por todo el aprendizaje, apoyo y consejos que me proporcionaron, ustedes me brindaron su amistad sin esperar nada a cambio. Gracias

DEDICATORIAS

A mis padres, a ti mamá por estar siempre conmigo y soportar todas mis locuras y malos ratos, tú me enseñaste a no rendirme frente a las circunstancias; a ti papá por enseñarme a alcanzar las metas y tomar los problemas como vienen y afrontarlos, a no ser conformista y siempre ir por más. Ambos me ayudaron a salir adelante para que pudiera alcanzar uno de mis sueños por lo que este triunfo también les pertenece. Los amo.

A mis abues Margarita, Juanita y Francisco y mi tía Alfita, aunque ya no están con nosotros me apoyaron todo el tiempo y me impulsaron a estudiar y salir adelante. Este pequeño paso en mi camino va por ustedes. Los amo y los llevo en mi corazón.

A mi hermano Pepe, por que gracias a tus comentarios, me hacías aferrarme más a mis metas y cumplirlas, esta es una muestra de todo el esfuerzo y trabajo involucrado.

A mi pequeño sobrino y ahijado Alex, por haber llegado a nuestras vidas y cambiarlas por completo para bien, chamaco no sabes cuanto te quiero.

A la familia Gutiérrez y Escamilla, por todo el apoyo moral que me dieron a lo largo de estos años. En especial a mis padrinos Beto, Jenny, y Francisco y mi prima Rosa.

A mis queridas amigas Mari y Dulce, por sus consejos y por estar siempre cerca de mi en las buenas y en las malas. Gracias por su amistad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Definiciones.....	5
II.2 Métodos de preparación de Nanopartículas lipídicas.....	8
1. Homogenización de alto corte y ultrasónico.....	11
2. Homogenización a alta presión.....	12
2.1) Homogenización en caliente.....	12
2.2) Homogenización en frío.....	13
3. Emulsificación – evaporación de disolvente.....	13
4. SLN preparadas a partir de Microemulsión.....	14
5. Precipitación de partículas lipídicas.....	15
6. Emulsificación – difusión.....	15
7. Nanopellets y lipoesferas.....	16
II.3 Liberación del principio activo a partir de SLN.....	18
III. OBJETIVOS.....	21
III.1 Objetivo general.....	21
III.2 Objetivos particulares.....	21
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
1 Materiales y reactivos.....	22
1.1 Lípidos.....	22
1.2 Estabilizantes y surfactantes.....	22
1.3 Disolventes.....	22
1.4 Material de laboratorio y equipos.....	22
2. Métodos.....	24

2.1	Determinaciones previas	24
2.1.1	Determinación experimental de la densidad de los lípidos sólidos utilizados.....	24
2.1.2	Determinación de la solubilidad de los lípidos sólidos en diferentes tipos de aceites.....	24
2.1.3	Determinación de la gravedad específica de los aceites utilizados.....	24
2.2	Preparación de las dispersiones de lípidos sólidos y pruebas de evaluación	24
2.2.1	Preparación de las dispersiones por medio del método de emulsificación-difusión a temperatura ambiente para Gelucire® 44/14.....	24
2.2.2	Preparación de las dispersiones por medio de método de emulsificación-difusión a temperatura controlada.....	25
2.2.3	Lavado de las dispersiones de NP.....	27
2.2.4	Determinación del tamaño de partícula.....	27
2.2.5	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	27
2.2.6	Calorimetría diferencial de barrido.....	27
2.3	Determinación de porcentaje encapsulado y perfil de liberación	27
2.3.1	Curva de calibración para OMC/Brij 58 5%.....	27
2.3.2	Curva de calibración para OMC/etanol.....	28
2.3.3	Preparación de dispersiones de NC a diferentes cantidades de Compritol® 888 ATO.....	28
2.3.4	Preparación de la muestra a utilizar y perfiles de liberación para Compritol® 888 ATO.....	28
2.3.5	Determinación del porcentaje encapsulado.....	28
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI.	CONCLUSIONES	52
VII.	PERSPECTIVAS	53

VIII. ANEXOS.....	54
1. Densidades experimentales de los lípidos sólidos utilizados.....	54
2. Solubilidad de los lípidos sólidos en diferentes tipos de aceites.....	56
3. Gravedad específica experimental de los aceites utilizados.....	57
4. Parámetros fotométricos.....	58
4.1 Curva calibración OMC / Brij 58 5%.....	58
4.2 Curva calibración OMC / EtOH.....	60
5. Propiedades y características de los materiales utilizados.....	62
IX. REFERENCIAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ejemplo de representación esquemática de la metodología para preparar NC lipídicas para Compritol® 888 ATO por medio del método de emulsificación-difusión a temperatura controlada.	26
Figura 2.	Mecanismo de formación de NP por el método de emulsificación-difusión.	31
Figura 3.	Mecanismo de formación propuesto para obtener NC por el método de emulsificación-difusión.	32
Figura 4.	Representación esquemática de la adsorción del agente estabilizante y su efecto protector.	34
Figura 5.	Fotografía en microscopía electrónica de barrido de NC de Compritol® 888 ATO y PVAL 7000X.	39
Figura 6.	Fotografía en microscopía electrónica de barrido de NC de Compritol® 888 ATO y PVAL 20000X.	39
Figura 7.	Fotografía en microscopía electrónica de barrido de NC de Compritol® 888 ATO y PVAL 30000X.	40
Figura 8.	Termogramas comparativos de Compritol® 888 ATO bajo diferente tratamiento.	43
Figura 9.	Termogramas comparativos de NC y NE utilizando como lipido sólido Compritol® 888 ATO y como centro oleoso Miglyol® 812 utilizando la técnica de emulsificación-difusión.	44
Figura 10.	Perfil de liberación para NC de Compritol 888 ATO cargadas con OMC, considerando como 100% la cantidad máxima liberada.	46
Figura 11.	Análisis por el modelo de Peppas aplicado a los perfiles de liberación de OMC contenido en NC de Compritol 888 ATO con diferentes cantidades de matriz lipídica.	47
Figura 12.	Análisis por el modelo de Higuchi aplicado a los perfiles de liberación de OMC contenido en NC de Compritol 888 ATO con diferentes cantidades de matriz lipídica.	49
Figura 13.	Cinética de primer orden aplicada a la liberación de OMC contenido en NC de Compritol 888 ATO con diferentes cantidades de matriz lipídica.	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Ejemplos de materiales y fármacos utilizados en la preparación de NC con polímeros.	6
Cuadro 2.	Lípidos y emulsificantes usados para la preparación de SLN.	9
Cuadro 3.	Ejemplos de materiales y fármacos utilizados en distintas preparaciones de SLN.	10
Cuadro 4.	Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Compritol® 888 ATO.	35
Cuadro 5.	Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Geleol®.	36
Cuadro 6.	Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Gelucire® 50/13.	37
Cuadro 7.	Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Gelucire® 44/14.	37
Cuadro 8.	Mecanismo de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de n en el modelo semiempírico de Peppas.	47
Cuadro 9.	Valores de n y coeficientes de correlación para los diferentes lotes de NC preparados con diferentes cantidades de Compritol® 888 ATO. Aplicando el modelo de Peppas.	48
Cuadro 10.	Valores de k_H y coeficientes de correlación para los diferentes lotes de NC preparados con diferentes cantidades de Compritol® 888 ATO. Aplicando el modelo de Higuchi.	49
Cuadro 11.	Valores de n y coeficientes de correlación para los diferentes lotes de NC preparados con diferentes cantidades de Compritol® 888 ATO. Aplicando el modelo de cinética de primer orden.	50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ODN	25-mer-fosforotioate oligonucleotido
NLC	Acarreadores lipídicos nanoestructurados
o/w	Aceite en agua
w/o	Agua en aceite
DSC	Calorimetria Diferencial de barrido
PC	Carbonato de propileno
CMC	Concentración Micelar Critica
EtOH	Etanol
°C	Grados centigrados
IV	Intravenoso
µE	Microemulsión
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mpas	Minipascales
min	Minutos
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
NP	Nanopartículas
SLN	Nanopartículas de lípidos sólidos
NS	No Soluble
OMC	Octil metoxicinamato
Mw	Peso molecular
p/v	Peso/volumen
PCL	Poli-ε-caprolactona
PLA	Poli (D,L-ácido láctico)

INDICE DE ABREVIATURAS

PLGA	Poli láctico glicólico
PVAL	Polivinil alcohol
P-188	Poloxámero 188
P-407	Poloxámero 407
rpm	Revoluciones por minuto
S	Soluble
soln	Solución
T°	Temperatura
UV	Ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes ha llegado a ser más evidente que el desarrollo de nuevas entidades químicas por si solas no es suficiente para asegurar el progreso en la terapia de fármacos, por lo tanto en la actualidad se han desarrollado numerosas técnicas para la producción de nuevos sistemas de soporte y acarreo de fármacos, entre los que se encuentran las nanopartículas, emulsiones, liposomas y micropartículas poliméricas (1).

Desde años recientes, las nanopartículas (NP) han llegado a ser una de las formas de dosificación más prometedoras para controlar la concentración de fármacos. En sus inicios, las NP se producían empleando polímeros, estas surgieron como formulaciones potenciales para la liberación de fármacos en su sitio específico. Sin embargo han demostrado tener ciertas desventajas provocando que falle la terapia farmacológica; entre otras están:

- a) Insuficiente concentración del fármaco debido a la pobre absorción, rápido metabolismo y eliminación; como en el caso de péptidos y proteínas.
- b) La mala distribución del fármaco a otros tejidos combinada con su alta toxicidad, como en el caso de los fármacos anticancerígenos y componentes de la formulación.
- c) Una pobre solubilidad del fármaco excluyendo una inyección intravenosa de una solución acuosa del fármaco.
- d) Una alta fluctuación de los niveles de plasma debido a una impredecible biodisponibilidad después de una administración oral incluyendo la influencia de la comida en los niveles plasmáticos; como en el caso de las ciclosporinas.

Para evitar este tipo de problemas se han desarrollado numerosas técnicas para la elaboración de NP empleando lípidos los cuales evitan las desventajas de las nanopartículas constituidas por polímeros y otros acarreadores coloidales tradicionales, debido a que los lípidos utilizados son bien tolerados por el cuerpo

(2).

Considerando lo anterior se planteó elaborar nanocápsulas (NC) lipídicas mediante la técnica de Emulsificación-Difusión, patentada por Quintanar y cols., la cual se utilizó primeramente en la elaboración de NC con polímeros, utilizando lípidos de bajo costo y con nula toxicidad para el cuerpo humano, con la ventaja de que se pueden utilizar diferentes tipos de agentes estabilizantes, los cuales amplían el margen de administración pudiéndose dosificar en forma oral, parenteral y/o transdérmica.

La importancia de esta técnica radica en los buenos resultados en la elaboración de NC poliméricas ya que presenta muchas ventajas tales como: se puede usar equipo de laboratorio convencional, se emplean disolventes farmacéuticamente aceptables, es posible reciclar los disolventes lo que reduce la contaminación, es de fácil escalamiento y además presenta un alto grado de reproducibilidad y eficiencia (3).

La importancia de este trabajo radica en la posibilidad de elaborar NC utilizando lípidos compatibles con el cuerpo humano utilizando la técnica de emulsificación – difusión, evaluando las variables que afectan el proceso para determinar la factibilidad de elaborarlas utilizando esta técnica.

II. ANTECEDENTES

POTENCIAL USO DE LA TÉCNICA DE EMULSIFICACIÓN DIFUSIÓN EN LA ELABORACIÓN DE NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS

Uno de los principales objetivos en la investigación de nuevos sistemas farmacéuticos es controlar la liberación de fármacos o agentes farmacológicos hacia su sitio de acción a una velocidad y régimen de dosificación terapéuticamente óptimos.

La idea que tuvo Ehrlich acerca de pequeñas partículas (balas mágicas) que tuvieran la habilidad de llevar principios activos a sitios específicos en el cuerpo humano, en el cual su efecto terapéutico sea requerido, ha sido uno de los principales objetivos dentro del ámbito farmacéutico.

Estos sistemas particulados acarreadores de fármacos han sido investigados por muchos años, entre los que se incluyen emulsiones o/w, liposomas, micropartículas y nanopartículas basadas en polímeros sintéticos o macromoléculas naturales.

Las emulsiones o/w fueron satisfactoriamente introducidas en los 50's en las clínicas para nutrición parenteral y poco a poco se fueron introduciendo activos como el diazepam y el etomidato, con la finalidad de reducir los efectos adversos que presentan, sin embargo el número de productos en el mercado es bajo, lo que indica su limitado éxito. Una de las causas por las que su uso es limitado es la escasa estabilidad física.

Por otro lado al dispersar fosfolípidos con suavidad en un medio acuoso, estos se hinchan, se hidratan y forman de manera espontánea vesículas biestratificadas concéntricas multilaminares con capas de medios acuosos que separan los bioestratos lipídicos llamados, liposomas, estos miden alrededor de 25 nm a 4 μ m de diámetro, estas estructuras guardan mucha similitud con las membranas celulares. Se han utilizado este tipo de estructuras como vehículos de fármacos y macromoléculas, debido a que estas sustancias, hidrosolubles o liposolubles, pueden quedar atrapadas en los espacios acuosos o dentro del propio bioestrato. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la concentración iónica y de la presencia de cationes divalentes. Muestran baja permeabilidad a las sustancias iónicas y polares, incluidos numerosos fármacos₍₄₎. El número de productos en el mercado de este tipo de sistema aun es limitado, una de las razones, aparte de los problemas tecnológicos que conlleva su fabricación, es que no existe disponible un liposoma farmacéutico económico.

El número de productos basados en micropartículas poliméricas en el mercado es limitado. Después de la introducción de la primera ola de productos, existe un número limitado de productos basados en esta tecnología₍₂₎. Las micropartículas son pequeñas estructuras de entre 1 a 10 μ m hechas con polímeros, los cuales, al igual que las nanopartículas hechas con los mismos materiales presentan problemas de citotoxicidad, que es derivada de los residuos de los disolventes orgánicos y del polímero mismo, utilizados en el proceso de producción además de la falta de un proceso apropiado de escalamiento que permita su fácil fabricación₍₅₎.

Los polímeros aceptados para el uso de implantes no son necesariamente bien tolerados en forma de nanopartículas. Esto se debe a que en este rango de tamaño, el polímero del que están hechas las nanopartículas, son ingeridas por los macrófagos, y la degradación de los polímeros dentro de la célula conlleva a los efectos citotóxicos en el caso de los polímeros de poliésteres. Un 100% de la

mortalidad de cultivos celulares se encontró cuando estas células se incubaron con 0.5% de nanopartículas hechas con el polímero ácido poliláctico glicólico⁽³⁾.

II.1 Definiciones

Las nanopartículas (NP) pueden definirse como partículas sólidas coloidales, las cuales contienen una sustancia activa y son producidas por medios mecánicos o químicos. La talla de partícula obtenida generalmente oscila entre 100 a 500 nm. Generalmente se les da el nombre de nanopartículas a las nanoesferas y a las nanocápsulas. La diferencia entre ambas formas radica en su morfología y su arquitectura. Las nanoesferas (NE) están formadas por una densa matriz polimérica mientras que las nanocápsulas (NC) están compuestas por un centro oleoso cubierto con una membrana polimérica.

Desde el punto de vista farmacéutico las nanocápsulas son atractivas porque su cavidad central basada en aceite permite un alto nivel de encapsulación para sustancias lipofílicas y un aumento en la liberación de fármacos

Los métodos de producción de NP de polímeros pueden clasificarse en cuatro categorías: emulsión evaporación, salting out, desplazamiento de disolvente y la emulsificación difusión. Estas diferentes metodologías son similares entre sí, ya que se involucra una solución orgánica la cual contiene los componentes de las NP la cual funciona como fase interna durante la preparación y una fase acuosa que contiene a los agentes estabilizantes y constituye el medio de dispersión para las NP; estos materiales se ilustran en el cuadro 1.

POLIMERO	AGENTE ESTABILIZANTE	MATERIAL ENCAPSULADO	SOLVENTE	REFERENCIA
Poli(ε-caprolactona	Polivinil alcohol(PVAL) y Gelatina	Clorambucil	Alcohol benzílico	6
Poli D,L-ácido láctico (PLA)	PVAL y P188		Carbonato de propileno (PC)	7
Ftalato de Hidroxipropilmetil celulosa	Texapon		Acetona	8
Eudragit E-100	PVAL y Poloxámero 407 (P-407)		Acetato de etilo y 2-butanona	9
PLA	PVAL	ODN	Alcohol benzílico, cloruro de metileno	10
Poli láctico glicólico (PLGA)	PVAL	β-Estradiol	PC	11
Poli-ε-caprolactona (PCL)	PVAL	Indometacina	Acetato de etilo	12
PLGA	Poloxámero 188 (P-188)		Metil etil cetona, acetato de etilo	13
Monostearina	PVAL	Clobetasol propionato	Acetona/Etanol	14
PLGA y PLA	PVAL	Porfirina	Alcohol Benzílico	15

Cuadro 1. Ejemplos de materiales y fármacos utilizados en la preparación de NC con polímeros

Las NP se preparan generalmente por polimerización de monómeros dispersos o por dispersión de polímeros preformados. La preparación de NP a partir de la polimerización de monómeros presenta diversos inconvenientes pues los productos de la reacción pueden ser no compatibles entre sí o con el activo o incluso provocan irritación, además de dejar residuos más o menos tóxicos tales como monómeros, oligómeros, catalizadores e iniciadores. Además son probables las reacciones cruzadas con el activo o la degradación de los componentes cuando se recurre a la radiación para inducir la polimerización.

La mayoría de las técnicas que involucran la dispersión de polímeros preformados requieren del uso de disolventes más o menos tóxicos, estos disolventes son generalmente acetona para el método de precipitación, disolventes clorados para el método de emulsificación- evaporación. Además las NP tienen que ser extensivamente purificadas para proveer formulaciones libres de disolvente dada la relativa toxicidad de la mayoría de los disolventes utilizados⁽⁶⁾. La desventaja de este tipo de acarreadores coloidales es la alta toxicidad que presentan las matrices para el organismo humano.

El objetivo de producir nanopartículas de lípidos sólidos (SLN) radica en la combinación de las ventajas de otros acarreadores coloidales entre las cuales se incluyen: ⁽⁵⁾

- a) Posibilidad de una liberación controlada y llegar al sitio receptor.
- b) Incrementar la estabilidad del fármaco.
- c) Una alta carga útil de fármaco
- d) Incorporación de fármacos hidrofílicos y lipofílicos disponibles.
- e) No hay biotoxicidad del acarreador
- f) Evita el uso de solventes orgánicos tóxicos.
- g) No existen problemas con el escalamiento de producción y esterilización.

II.2 Métodos de preparación de nanopartículas lipídicas

Existen en la actualidad diferentes metodologías en la preparación de dispersiones lipídicas sólidas las cuales han sido desarrolladas por varios grupos de investigación. 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 estas 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 nanopartículas lipídicas sólidas, que después de los liposomas son los acarreadores coloidales lipídicos más ampliamente estudiados.

Los ingredientes generales para la producción de SLN son agua, emulsificantes y/o estabilizantes, lípidos sólidos. Entre los lípidos sólidos comúnmente utilizados se encuentran triglicéridos, glicéridos parciales, ácidos grasos, esteroideos y ceras₍₅₎. Ver cuadro 2

LÍPIDOS Y EMULSIFICANTES	EJEMPLOS
Triglicéridos	Tricaprin / Trilaurin / Trimyristin / Tripalmitin Tristearin / Coco-glicérides hidrogenados (Softisan® 142)
Lípidos duros	Witepsol W 35® / Witepsol H 35® / Witepsol H 42® / Witepsol E 85® Glyceryl monostearato (Imwitor 900®) / Glyceryl behenate (Compritol 888 ATO®) / Glyceryl palmitostearate (Precirol ATO 5®) Cetil palmitato / Ácido estearico / Ácido Palmítico / Ácido Decanoico / Ácido Behenico / Acidan N12
Emulsificantes / Co-emulsificantes	Lecitina de soja (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 Butirico Dioctil sulfosuccinato de sodio Monoctilfosfato de sodio

Cuadro 2. Lípidos y emulsificantes usados para la preparación de SLN. (9)

Para preparar dispersiones de lípidos sólidos es necesario conocer para que vía de administración va a ser esta destinada, debido a la gran variedad de agentes emulsificantes y/o estabilizantes que se pueden utilizar, ya que algunos son tóxicos si se aplican por vía intra venosa (I.V). El cuadro 3 nos muestra algunos ejemplos de materiales y fármacos utilizados en distintos tipos de preparaciones.

MÉTODO DE PREPARACIÓN	LÍPIDO SÓLIDO	FÁRMACO	AGENTE ESTABILIZANTE	REFERENCIA
Homogenización de alto corte y ultrasónico	Monoestearato de glicerilo	Mifepristona	Tween 80	1
Difusión de disolvente	Monoestearina	Clobetasol	PVAL	14
Microemulsión	Ácido esteárico	Diazepam y Trealosa	Poloxámero 188	20
Homogenización a alta presión en caliente	Glicerol Benhenato		Poloxámero 188	22
Precipitación de partículas lipídicas	Lecitina de soya	Magnetita	Tween 80	23
Homogenización a alta presión en caliente	Monoestearato de glicerilo, cutina y glicerol palmitoestearato		Poloxámero 188 y 407, trioleato de sorbitan	24
Homogenización a alta presión en caliente	Cetil palmitato	Oxibenzona	Polisorbato 80	25
Microemulsión	Triglicéridos		Polisorbato 80	26
Microemulsión	Ácido esteárico y Fosfatidil colina	Ciclosporina A	Tauocolato de sodio	6

Cuadro 3. Ejemplos de materiales y fármacos utilizados en distintas preparaciones de SLN

Los métodos para preparar nanopartículas de lípidos sólidos (SLN) se pueden clasificar en:

- 1) Homogenización de alto corte y ultrasónico.
- 2) Homogenización a alta presión.
 - 2.1) Homogenización en caliente.
 - 2.2) Homogenización en frío.
- 3) Emulsificación – evaporación de solvente.
- 4) Microemulsión basada en preparaciones de SLN.
- 5) Precipitación de partículas lipídicas.
- 6) Nanopellets y lipoesferas.

1.- Homogenización de alto corte y ultrasónico.

Son técnicas de dispersión las cuales inicialmente fueron utilizadas para la producción de nanodispersiones de lípidos sólidos. Ambos son métodos ampliamente utilizados, sin embargo la calidad de la dispersión es regularmente influenciada por la presencia de micropartículas, además debe de considerarse la contaminación con metal si el método ultrasónico es utilizado.⁽³⁾

Ahlin y col.⁽¹⁶⁾ utilizaron un homogenizador rotor estator Lak-Tek[®] para producir SLN por emulsificación-fusión. Ellos investigaron la influencia de diferentes parámetros del proceso incluyendo el tiempo de emulsificación, velocidad de agitación y condiciones de enfriamiento en el tamaño de partícula y el potencial zeta. Encontraron que una alta velocidad de agitación no cambia significativamente el tamaño de partícula pero incrementaba un poco el índice de polidispersión. En general, no encontraron una regla que derivara en las diferencias del establecimiento óptimo de emulsificación y condiciones de enfriamiento. El tamaño de partícula obtenido por este método tiene un rango entre 100-200 nm en la mayoría de los casos.

2.- Homogenización a alta presión.

La homogenización a alta presión ha sido utilizada para la producción de nanoemulsiones para nutrición parenteral, es una técnica de fácil escalamiento en comparación con otras técnicas debido a que no representa ningún problema tecnológico.

Los homogenizadores de alta presión empujan un líquido a alta presión (100-200 bar) a través de una estrecha hendidura (en un rango de unos cuantos micrómetros). El fluido se acelera en una distancia muy corta a una alta velocidad (por arriba de los 1000 Km/h). Altas fuerzas de tensión de corte y fuerzas de cizalla rompen a las partículas a rangos submicrónicos. Concentraciones del 5-10% no representan problema para el homogenizador, altas concentraciones de lípidos (arriba del 40%) han sido homogenizadas para nanodispersiones lipídicas.

Existen dos técnicas generales para preparar SLN por éste método la homogenización en caliente y la homogenización en frío. En ambos casos el paso preparatorio involucra la incorporación del fármaco dentro de la matriz lipídica, disolviendo o dispersando el fármaco en el lípido sólido caliente.

2.1 Homogenización en caliente.

Esta técnica se lleva a cabo a temperaturas por arriba del punto de fusión del lípido y puede de este modo observarse como la homogenización de una emulsión. Una pre-emulsión del fármaco cargado en el lípido fundido y la fase acuosa del emulsificante (a la misma temperatura) se obtiene por dispositivos de corte de alta eficiencia (ultraturrax®).

En general a temperaturas altas se obtienen menores tallas de partículas debido a la disminución de la viscosidad de la fase interna. Sin embargo, a altas temperaturas pueden también incrementar la velocidad de degradación del fármaco y del acarreador. La homogenización puede repetirse varias veces, tomando en cuenta que la homogenización a alta presión incrementa la

temperatura de la muestra en aproximadamente 10 °C por 500 bar. En la mayoría de los casos, 3-5 ciclos de homogenización a 500 bar es suficiente. Al incrementar la presión de homogenización o el número de ciclos regularmente resulta en un incremento del tamaño de partícula debido a la coalescencia de partículas la cual ocurre como resultado de una elevada energía cinética de las partículas.

El primer producto de la homogenización en caliente es una nanoemulsión debido al estado líquido del lípido. Las partículas sólidas se forman por el siguiente paso que consiste en enfriar la muestra a temperatura ambiente o temperaturas menores.

2.2 Homogenización en frío

La homogenización en frío se lleva a cabo con el lípido sólido y representa, por lo tanto, una molienda a alta presión de la suspensión. Un control efectivo y la regulación del proceso es necesario para asegurar que el lípido no funda al incrementarse la temperatura durante la homogenización.

El primer paso al igual que la técnica anterior incluye la solubilización del fármaco o su dispersión en el lípido fundido. Esta mezcla se enfría rápidamente (por medio de hielo o nitrógeno líquido). La alta velocidad de enfriamiento favorece una distribución homogénea del fármaco dentro de la matriz lipídica, ésta se muele hasta obtener una talla de micropartículas. Temperaturas bajas incrementan la fragilidad del lípido y favorece su rompimiento. Las SLN son dispersadas en una solución de emulsificante helada. La pre-suspensión es sujeta a una homogenización a alta presión por arriba o por debajo de la temperatura ambiente.

3.- Emulsificación – evaporación de disolvente.

En este método se propone la producción de SLN por medio de la precipitación de una emulsión aceite en agua (o/w)₍₁₇₎. El material lipídico se disuelve en un disolvente inmiscible en agua (p.e. ciclohexano), éste se emulsifica en una fase acuosa con ayuda de un molino coloidal, seguido de homogenización 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. El diámetro medio de las partículas es de 25 nm con acetato de colesterol como fármaco modelo y una mezcla de lecitina / glicolato de sodio como emulsificante. La reproducibilidad de este método es confirmada posteriormente (18), sólo que en este caso el disolvente usado fue cloroformo y para la formación de la emulsión se usó un homogenizador 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.

Una de las ventajas que presenta esta técnica es la ausencia de cualquier aumento de la temperatura en el proceso. Por otro lado estas suspensiones pueden ser moderadamente diluidas, debido a la limitada solubilidad de los lípidos en los solventes orgánicos utilizados. Además, este método puede crear problemas toxicológicos surgidos de residuos provenientes de los solventes(27).

La ventaja de este procedimiento sobre la homogenización en frío es la ausencia de estrés térmico. Una clara desventaja es el uso de disolventes orgánicos.

4.- SLN preparadas a partir de Microemulsión (μ E).

La preparación de SLN por medio de este método consiste en dispersar una microemulsión (μ E) caliente (aceite en agua -o/w-) en un medio acuoso frío bajo agitación mecánica(19). La μ E está compuesta del lípido (p.e. ácido esteárico), surfactante (p.e. polisorbato 20, polisorbato 60 y fosfatidilcolina de soja), co-surfactante(s) (p.e. 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 μ E. La μ E (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 razones entre la μ E y el agua son de 1:25 a 1:50(20)(21).

Un método alternativo para la preparación de SLN consiste en disolver en una fase orgánica (p.e. cloroformo) el material lipídico, los fosfolípidos (estabilizante) y/o el fármaco. Después de que se remueve la fase orgánica se forma una capa lipídica que se hidrata en una solución salina, y se agita por 5 min. a 50 °C. Finalmente la emulsión obtenida (diámetro de entre 1–2 μm) se homogeniza por medio de un *homogenizador de alta presión* (aproximadamente cinco ciclos a 60–70°C y 15 000 psi) para obtener las SLN.

5.- Precipitación de partículas lipídicas.

SLN pueden ser también preparadas por este método que también es comparable con la producción de nanopartículas poliméricas por medio del método de evaporación de solvente⁽¹⁸⁾. Este método se caracteriza por la necesidad de utilizar disolventes. El lípido es disuelto en un disolvente orgánico (p.j. cloroformo) y esta solución se emulsifica en una fase acuosa. Después de la evaporación del solvente el lípido precipita formando NP.

Una de las desventajas de utilizar esta técnica es el uso de disolventes orgánicos.

6.- Emulsificación – difusión.

El método de emulsificación-difusión 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 (para retirar el exceso de sales) así como los problemas relacionados con la compatibilidad entre los fármacos y los electrolitos empleados. La originalidad del método de emulsificación-difusión consiste en el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua y farmacéuticamente aceptables. Al desarrollar este método para la preparación de NP's poliméricas se usó alcohol bencílico como disolvente⁽⁶⁾. Las NP's se prepararon al formar una emulsión (o/w) 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.

Posteriormente, introdujeron 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⁽⁷⁾. La técnica consiste en la formación de una emulsión (o/w), entre la solución de un polímero biodegradable (según el método propuesto inicialmente) en el disolvente saturado con agua (p.e. propilencarbonato) y una fase acuosa que contiene el estabilizante (p.e. poli(vinil alcohol) 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 nanopartículas 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: (1) se puede usar equipo de laboratorio convencional – el usar un homogeneizador de alta velocidad es opcional; (2) se emplean disolventes farmacéuticamente aceptables; (3) es posible reciclar los disolventes; (4) es adaptable a varios tipos de polímeros; (5) es de fácil escalamiento; además presenta un alto grado de reproducibilidad y eficiencia. Por lo que es una buena opción para preparar NC con una matriz de origen lipídico. Las ventajas que presenta esta técnica aunadas con las ventajas que presentan los nuevos sistemas nanoparticulados lipídicos constituyen una nueva generación de acarreadores coloidales, que permitirán la liberación de fármacos liposolubles en su sitio de acción y evitarían los efectos nocivos que se presentan las matrices poliméricas.

7.- Nanopellets y lipoesferas.

7.1 Los nanopellets, desarrollados al inicio de los 90's para la administración oral son producidos al dispersar un lípido fundido en una solución de surfactante por medio de agitación o sonicación⁽²⁾. Las dispersiones obtenidas por medio de este método contienen altas cantidades de micropartículas. La obtención del tamaño nanométrico depende del poder de la agitación. En general, se obtienen mezclas de micropartículas y nanopartículas. Estas tallas de partícula no representan

ningún problema para la administración oral, pero cuando se trata de administración intravenosa las micropartículas no son una buena opción. Para la obtención selectiva de nanopartículas se deben emplear concentraciones altas de surfactante, lo cual no podría representar algún riesgo para la administración oral pero podría causar algunos problemas en otras vías de administración como la IV.

7.2 Las lipoesferas son micropartículas sólidas insolubles en agua que tienen una capa de fosfolípidos embebida en la superficie, es decir, estos sistemas tienen un centro sólido (a temperatura ambiente) hidrofóbico rodeado por fosfolípidos⁽²⁾. 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.

Las técnicas comúnmente utilizadas para la preparación de SLN están basadas en la homogenización a altas presiones, dilución de microemulsiones o remoción de disolventes de emulsiones o/w. Existen dos consideraciones generales en la técnica de homogenización en frío y en caliente, en ambos casos el paso preliminar involucra la incorporación del fármaco dentro del lípido caliente, lo que produce un choque térmico que puede dañar la estructura del fármaco. La homogenización en caliente se puede observar como la homogenización de una emulsión mientras que la homogenización en frío es efectivamente la molienda de una suspensión a alta presión. La mayoría de SLN producidas por homogenización en caliente están caracterizadas por un tamaño de partícula por debajo de los 500 nm y un bajo contenido de micropartículas, en cambio las producidas por homogenización en frío se puede observar un tamaño de partícula grande y una amplia distribución⁽²⁷⁾.

Gasco y cols.⁽¹⁹⁾ desarrollaron la técnica de preparación de SLN basada en la dilución en agua fría de una microemulsión o/w. Para que se forme una microemulsión basada en lípidos sólidos a temperatura ambiente, esta debe ser calentada por arriba del punto de fusión del lípido sólido. Surfactantes y co-surfactantes incluidos la lecitina y sales biliares son poco favorables en términos regulatorios. La subsiguiente adición de agua a la microemulsión lleva a la precipitación de la fase lipídica formando partículas finas.

Uno de los principales problemas en la producción de SLN ha sido la limitada capacidad de carga de fármacos, el ajuste de un perfil de liberación y la potencial expulsión del fármaco durante el tiempo de almacenamiento, Müller y cols.⁽²⁸⁾ han reportado una nueva generación de acarreadores coloidales a los que llamó acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC), los cuales según su propuesta es una mezcla de lípidos sólidos con lípidos líquidos incompatibles entre sí. En este informe no se encuentra una evidencia física como tal que nos demuestre la formación de estas partículas con la técnica propuesta, únicamente nos muestra diferentes tipos de estructuras de cómo se encontraría en teoría el aceite que contiene disuelto el principio activo, además de que hace notar una pobre eficiencia de atrapamiento de los fármacos utilizados.⁽²⁸⁾

11.3 Liberación del principio activo a partir de SLN

Un número considerable de avances han sido realizados recientemente en el desarrollo de nuevas técnicas para la liberación de fármacos. Estas técnicas son capaces de regular la velocidad en la liberación del fármaco, sostener la duración de la acción terapéutica y/o evaluar la cantidad de fármaco liberado en un lugar específico. Estos avances han llevado al desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos los cuales proveen los siguientes beneficios: administración controlada de una dosis terapéutica a una velocidad deseable de liberación, mantenimiento de la concentración del fármaco con un rango terapéutico óptimo para una prolongada duración del tratamiento, maximización de la relación dosis-

eficacia, una reducción de los efectos adversos, minimización de las frecuentes necesidades de toma de dosis.⁽⁴⁷⁾

La liberación del principio activo puede ocurrir por:

- a) Desorción del activo adherido a la superficie
- b) Difusión a través de la matriz de NP
- c) En caso de NC, difusión a través de la pared polimérica
- d) Erosión de la matriz de NP
- e) Combinación de los procesos erosión y difusión.

El mecanismo de liberación, coeficiente de difusión y velocidad de biodegradación son los factores principales que determinan la velocidad de liberación del fármaco. Esta velocidad es asimismo influenciada por el medio biológico, de hecho, esta influencia es mayor en las NP respecto a otras formas de dosificación más grandes. Las NP pueden ser atrapadas por las proteínas del plasma y esto constituirá una barrera adicional de difusión y salida del fármaco, con lo que se retarda su liberación.

Las NP también pueden interactuar por contacto directo con membranas biológicas o artificiales, en este caso llevando a una liberación aumentada del activo a través de estas membranas en comparación a una solución simple. En consecuencia, la liberación "in vitro" puede ser diferente a la liberación "in vivo", como ha sido frecuentemente observado. No obstante, para los propósitos de caracterización y por razones de control de calidad es importante determinar la liberación "in vitro" de dichos sistemas.

Para determinar de la liberación "in vitro" han sido utilizados los siguientes métodos:

- a) Difusión en celdas con membranas artificiales o biológicas.

- b) Técnica de difusión en bolsas de diálisis.
- c) Técnica de saco diálisis inversa.
- d) Ultracentrifugación.
- e) Ultrafiltración.
- f) Técnica de centrifugación ultrafiltración.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general.

Elaborar, caracterizar y evaluar nanocápsulas lipídicas mediante la técnica de emulsificación-difusión utilizando diferentes tipos de lípidos sólidos para encapsular principios activos lipofílicos.

III.2 Objetivos particulares.

- ✦ Elaborar nanocápsulas lipídicas utilizando diferentes tipos de lípidos sólidos mediante la técnica de emulsificación-difusión para encontrar la mejor suspensión con mayor tiempo de estabilidad.
- ✦ Elaborar y caracterizar la morfología de nanocápsulas lipídicas y evaluar las diferentes variables involucradas en el proceso para asegurar la correcta optimización del proceso.
- ✦ Encapsular un principio activo modelo (aceite) y evaluar su encapsulación real para determinar su posible mecanismo de liberación.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1 MATERIALES Y REACTIVOS

1.1 Lípidos.

- ↓ Compritol[®] ATO 888 (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México).
- ↓ Geleol[®] (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México).
- ↓ Gelucire[®] 44/14 (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México).
- ↓ Gelucire[®] 50/13 (Gattefossé, Francia donado por Multiquim, México).
- ↓ Miglyol[®] 812 (Hüls AG; Alemania).
- ↓ Octil metoxicinamato (Escalor[®] 557) (Donado por Multiquim, México).

1.2 Estabilizantes y surfactantes.

- ↓ Mowiol[®] - Poli(alcohol vinílico)- Mw 26 000 Frankfort, Alemania).
- ↓ Tween[®] 80 - Polisorbato 80- (ICI Surfactants; Wilmington, EUA).
- ↓ Pluronic[®] F68 -Poloxámero 188- (Sigma; Steinheim, Alemania).
- ↓ Pluronic[®] F127 -Poloxámero 407- (Sigma; Steinheim, Alemania).
- ↓ Brij[®] 58 (Polioxietileno(20)cetil eter) (ICI Specialty Chemicals).

1.3 Disolventes.

- ↓ Acetato de etilo GA (Aldrich; Milwaukee, EUA)
- ↓ Agua destilada GA (Milli Q)
- ↓ Etanol (Productos químicos Monterrey, S.A., México)
- ↓ Isopropanol (Productos químicos Monterrey, S.A., México)

1.4 Material de laboratorio y Equipos.

- ↓ Agitador de velocidad variable (Caframo[®] RZR-1; Canadá)
- ↓ Balanza Analítica (Boeco[®] BBC32; Alemania)
- ↓ Baño de agua (Polyscience[®] 5L, EUA)
- ↓ Sonificador (Bransonic[®] Branson 5210, EUA)
- ↓ Microscopio electrónico de barrido (JEOL[®] JMS-25SII, Japón)

- ↳ Contador submicrónico de partículas (Coulter® N4 Plus, EUA)
- ↳ Rotaevaporador (Laborota® Heidolph 4000, Alemania)
- ↳ Ultracentrífuga (Beckman® Optima LE-80K, EUA)
- ↳ Espectrofotómetro UV – Vis. (Varian®, Cary IE 95031003, Australia)
- ↳ Agitador magnético multiplaza (Velp® Scientific; Italia)
- ↳ Parrilla Eléctrica (SP 46925, Barnstead/ Thermolyne; EUA)
- ↳ Membrana de Policarbonato 0.1 μm (Advantec® MFS, Inc; Japón)
- ↳ Calorímetro diferencial de Barrido (DSC Q10 TA Instruments, Canadá)
- ↳ Material diverso de laboratorio.

2 METODOLOGÍA.

2.1 DETERMINACIONES PREVIAS

2.1.1 Determinación experimental de la densidad de los lípidos utilizados.

Se pesaron aproximadamente 500 mg de lípido en una balanza analítica. Posteriormente se comprimió en una tableteadora monopunzónica manual (conver Press C), obteniendo tabletas cilíndricas. Se le midió el diámetro y la altura para obtener su volumen. Con el dato de volumen y peso se hizo el cálculo de la densidad. Este procedimiento se repitió 10 veces y se obtuvo un promedio para cada lípido utilizado.

2.1.2 Determinación de la solubilidad de los lípidos en diferentes tipos de aceites.

Se colocó en un vial aproximadamente 10 mg de lípido sólido, posteriormente se le añadieron 10 mL de aceite elegido, se le colocó una barra magnética y se dejó agitándose por 24 hrs. Al terminar el tiempo se hizo la revisión visual de cada uno de los viales y se determinó si este había sido disuelto o dispersado. Este procedimiento se realizó para cada uno de los diferentes lípidos sólidos.

2.1.3 Determinación de la gravedad específica de los aceites utilizados

La determinación se hizo con base en la técnica reportada en la USP 24 NF 19.

2.2 PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES DE LÍPIDOS SÓLIDOS Y PRUEBAS DE EVALUACIÓN

2.2.1 Preparación de las dispersiones por medio del método de emulsificación-difusión a temperatura ambiente para Gelucire® 44/14.

Se puso a saturar acetato de etilo y agua en un embudo de separación, posteriormente, 200 mg del lípido y 0.5 mL de aceite se disolvieron en 20 mL del disolvente, previamente saturado con agua, esta fase orgánica fue emulsificada con 40 mL de una fase acuosa saturada previamente con el disolvente la cual contenía al agente estabilizante con concentración del 5% p/v. 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 adicionaron 160 mL de agua destilada manteniendo la agitación por 10 min. Finalmente se retiró el exceso de disolvente por medio de un rotaevaporador, hasta que el volumen de la dispersión es de aproximadamente 100 mL.

2.2.2 Preparación de las dispersiones por medio de método de emulsificación-difusión a temperatura controlada

200 mg de lípido a utilizar y 0.5 mL de aceite se disuelven en 20 mL del disolvente previamente saturado de agua a la temperatura indicada para cada lípido según lo reportado por un trabajo previo realizado en este laboratorio⁽²⁹⁾ (60°C para Compritol® 888 ATO, 45°C para Geleol® y 55°C para Gelucire® 55/13). Esta fase orgánica se emulsificó con 40 mL de una fase acuosa saturada de disolvente que contiene al agente estabilizante con concentración del 5% p/v el cual se encuentra a la misma temperatura que la fase orgánica. Posteriormente se sometió a emulsificación con un agitador de velocidad variable a 1800 rpm 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 adicionaron 160 mL de agua destilada también a la temperatura de trabajo, manteniendo la agitación por 10 min más. Posteriormente se dejó enfriar hasta 30 °C bajo agitación constante. Finalmente se retiró el exceso de disolvente por medio de un rotaevaporador, hasta que el volumen de la dispersión sea aproximadamente 100 mL (ver Figura 1).

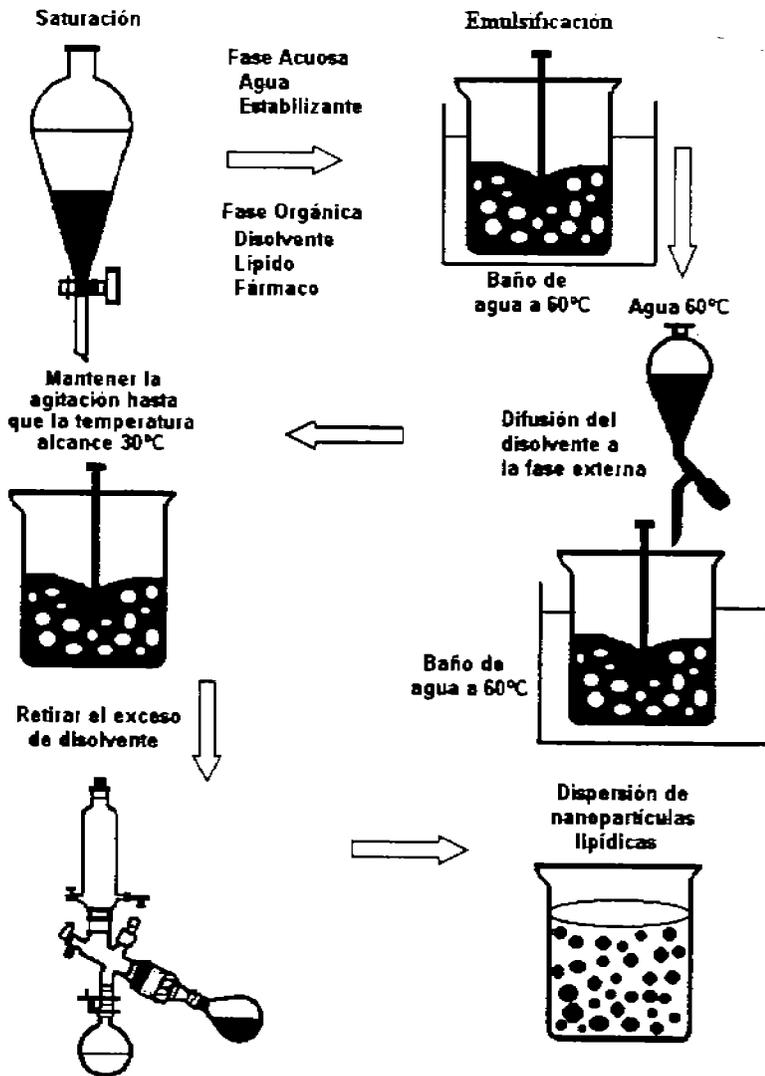


Fig 1. Ejemplo de representación esquemática de la metodología para preparar NC lipídicas para compritor® 888 ATO por medio del método de emulsificación-difusión a temperatura controlada

2.2.3 Lavado de las dispersiones de NP

Las dispersiones obtenidas se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 min y el paquete formado se resuspendió en agua destilada y se volvió a centrifugar, este procedimiento se repitió por triplicado, con la finalidad de retirar el exceso de PVAL de la suspensión y que pudiera interferir en las evaluaciones posteriores.

2.2.4 Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de las NP's se determinó empleando un contador submicrónico de dispersión de rayo láser (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*). Todas las medidas se hicieron por triplicado (n=3) y se calculó su desviación estándar y coeficiente de variación.

2.2.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Una película de las nanopartículas diluida previamente lavada, se aplicó sobre papel o vidrio, y se dejó secar. Finalmente la película se recubrió con una película fina de oro (≈ 20 nm) y la superficie se evaluó con un microscopio electrónico de barrido a 12.5 kV.

2.2.6 Calorimetría diferencial de barrido

Los termogramas de cada una de las diferentes preparaciones de dispersiones lipídicas así como la muestra física de Compritol® 888 ATO con Miglyol® 812 y el Compritol® 888 ATO sin tratamiento previo se analizaron en un calorímetro diferencial de barrido DSC Q10 TA. Utilizando una rampa de 0 a 120°C a una velocidad de calentamiento de 5°C/min.

2.3 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE ENCAPSULADO Y PERFIL DE LIBERACIÓN.

2.3.1 Curva de calibración para OMC/Brij 58 5%

Se prepararon 9 sistemas a diferentes concentraciones de octal metoxi cinamato (OMC), por triplicado, en una solución de Brij 58 al 5% utilizando como referencia

una solución a una concentración de 0.1052 mg/mL de OMC. Se determinaron los parámetros estadísticos y se construyó el gráfico correspondiente.

2.3.2 Curva de calibración para OMC/etanol

Se prepararon 9 sistemas a diferentes concentraciones de OMC, por triplicado, en etanol utilizando una solución madre a una concentración de 0.0964 mg/mL de OMC. Se determinaron los parámetros estadísticos y se construyó el gráfico correspondiente.

2.3.3 Preparación de dispersiones de NC a diferentes cantidades de Compritol® 888 ATO

Los lotes se prepararon en base al punto 2.2.2 para Compritol® 888 ATO utilizando 200, 400 y 600 mg de lípido sólido y como centro oleoso 0.5 mL de OMC

2.3.4 Preparación de la muestra a utilizar y perfiles de liberación para Compritol® 888 ATO

De los lotes obtenidos en el punto anterior se lavaron tres veces y la pastilla resultante se resuspendió en 40 mL de agua destilada, de esta suspensión se tomó 0.2 mL y se llevaron a un volumen de aforo de 25 mL en una solución de Brij 58 al 5%. De esta solución resultante se tomaron 2 mL y se colocaron en el compartimiento donador de una celda de permeación vertical tipo Franz por triplicado, en el compartimiento receptor se colocaron 2 mL de solución de Brij 58 al 5%, esta celda contiene entre ambos compartimentos una membrana de policarbonato de 0.1 μm .

El muestreo se realizó a diferentes tiempos, tomando el volumen completo del compartimiento receptor y reponiendo dicho volumen con solución nueva. El comportamiento se siguió por aproximadamente 400 hrs.

2.3.5 Determinación del porcentaje encapsulado

Se evaluó el porcentaje encapsulado de los diferentes lotes preparados en el punto 2.3.3, se utilizó un pesafiltros previamente lavado y libre de grasa, se pesó y

se colocó una pequeña cantidad de suspensión de NC aproximadamente 4 mL y se dejó secar. El contenido del pesafiltros se digirió con etanol, se filtró y la solución obtenida se llevó a un volumen de aforo de 50 mL con etanol y se le hicieron diluciones tomando 0.2 mL de la solución anterior y aforando a 10 mL con el mismo diluyente. Esta última dilución se llevó a leer al espectrofotómetro UV-vis y se realizaron los cálculos correspondientes.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo del proyecto de prepararon diferentes lotes de NP empleando lípidos sólidos de distinta composición química, con la finalidad de encontrar una suspensión estable que nos permitiera demostrar que es posible obtener NC mediante el método de emulsificación-difusión empleando diferentes técnicas para su caracterización que nos fueran viables a las condiciones de laboratorio y nos permitieran obtener resultados fehacientes de su formación, entre estas técnicas se encuentran: la obtención del tamaño de partícula, porcentaje encapsulado, morfología y la calorimetría diferencial de barrido.

En el mecanismo de formación de las NP por este método, ha sido revisado bajo diferentes condiciones por Quintanar Guerrero y colaboradores⁽³⁰⁾ en donde se propone que por cada gota de la emulsión, formada previamente a la adición del exceso de agua, produce varias nanopartículas y que éstas se forman por un fenómeno interfacial durante la difusión del disolvente. Sin embargo éste fenómeno no puede ser completamente explicado por los efectos de convección causados por la turbulencia interfacial. Por tanto, se sugiere que las NP's 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*"). 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 "*pronanopartículas*" por la presencia de un estabilizante es muy importante para evitar su coalescencia y con ello la formación de aglomerados. De este modo, 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 resultando en la formación de NP (ver Figura 2).

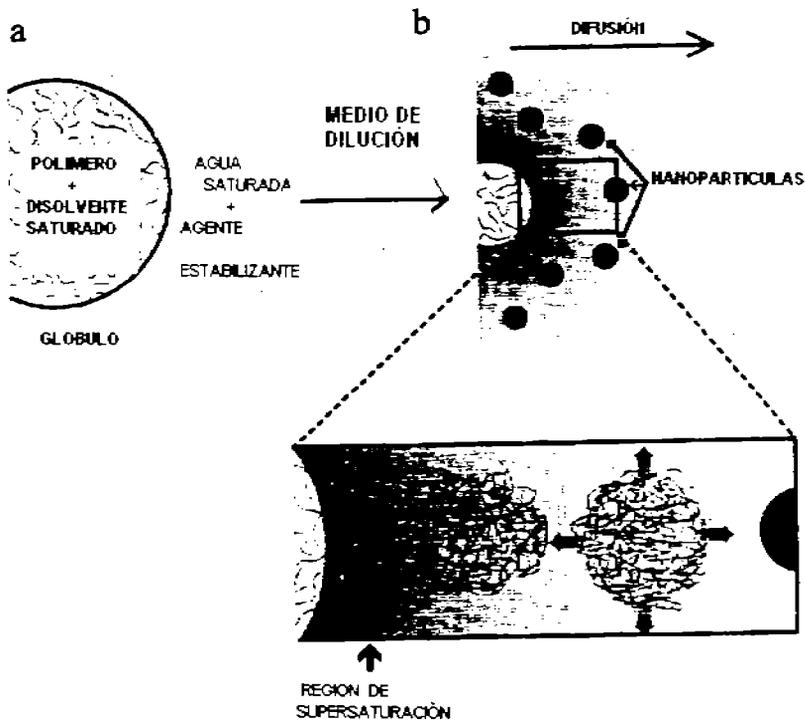


Fig 2. Mecanismo de formación de NP por el método de Emulsificación – Difusión. a) antes del paso de difusión, b) durante el paso de difusión

La hipótesis del mecanismo de formación de NP por el método de emulsificación-difusión también se extiende para la formación de NC, ya que la difusión del disolvente desde los glóbulos previamente estabilizados dentro del agua acarrea moléculas de aceite y lípido sólido, formando regiones de supersaturación. Se propone que esta supersaturación no puede persistir y que las nanogotas que contienen aceite con el fármaco disuelto, el lípido sólido y probablemente algún remanente del disolvente son formados y rápidamente estabilizados por el agente activo de superficie. Esta descripción se representa en la figura 3.

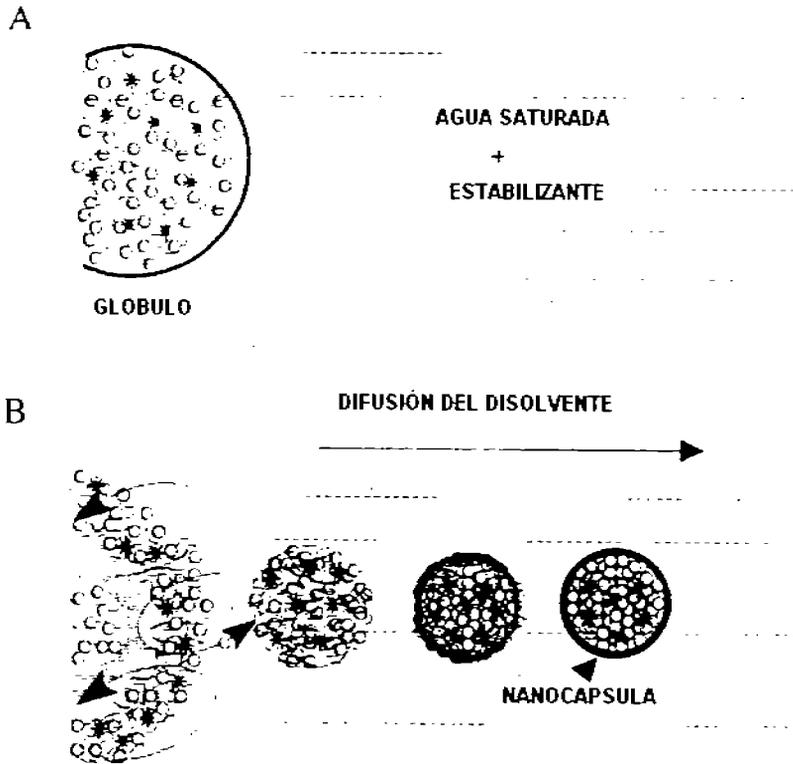


Fig 3. Mecanismo de formación propuesto para obtener NC por el método de emulsificación-difusión. A) antes del paso de difusión, B) durante el paso de difusión.

En una investigación previa realizada en el laboratorio⁽²⁹⁾ se encontró que es posible obtener NE a base de lípidos sólidos mediante esta técnica, lo que llevó a la tarea de revisar la posibilidad de obtener NC, en esta investigación previa, se evaluaron los distintos parámetros que afectan el tamaño de partícula y la formación de las mismas como son: concentración de cada uno de los materiales utilizados, tipo de solvente y las variables de la preparación como la velocidad de agitación, volumen del exceso de agua y tiempo de agitación.

Uno de los factores primordiales en la preparación de NC lipídicas es la insolubilidad entre el aceite y el lípido sólido debido a que si existe solubilidad entre ellos la estabilidad de las NC se vería disminuida trayendo como consecuencia la liberación de la porción líquida que se encuentra en el interior de la NP. Ver anexo 2.

Una observación importante radica en el momento de lavar las NC debido a que dependiendo de la densidad del aceite a encapsular estas tendían a formar una pastilla en el caso de aceites con una densidad mayor a la del lípido o bien se formaba una especie de nata en la parte superior para aceites con densidades iguales o menores al lípido. Demostrando de esta forma que es posible encapsular aceite en matrices lipídicas.

A partir de esta información se prepararon diferentes lotes de NC utilizando como lípidos sólidos Compritol® 888 ATO, Gelucire® 50/13, Gelucire® 44/14 y Geleol® y como centro oleoso aceite mineral y Miglyol® 812. El disolvente utilizado fue acetato de etilo debido a que este es uno de los solventes que es farmacéuticamente aceptable y con baja toxicidad, además del uso de diferentes tipos de agentes estabilizantes y emulsificantes como PVAL, P-188, P-402, Tween 80 debido a su solubilidad en agua y por su conveniencia en la administración por diferentes vías.

La efectividad del agente estabilizante radica en su capacidad de evitar la coalescencia de los glóbulos durante la difusión y evaporación del solvente así como durante su almacenamiento, además de facilitar la formación de la emulsión.

En un sistema estabilizado por agentes no iónicos, las partículas tienen un efecto protector por impedimento estérico, pero en un sistema estabilizado por agentes iónicos, las partículas son estabilizadas no únicamente por impedimento estérico si no también por repulsión electrostática₍₁₁₎. En consecuencia y con base en la

información reportada el efecto protector que se utilizó para la elaboración de NC por el método de emulsificación-difusión es por impedimento estérico, debido a que estos coloides protectores de elevado peso molecular, se adsorben en la superficie de la partícula por medio de un grupo ancla (lipofilo), quedando libre la parte hidrofílica formando un efecto estérico o de rebote, lo que impide que los glóbulos coalescan. En la figura 4 se puede apreciar la representación esquemática de este efecto protector que se sugiere se presenta en la elaboración de NC lipídicas en donde se puede observar en forma ampliada la adsorción del agente estabilizante y el efecto de rebote que impide que las NP coalescan.

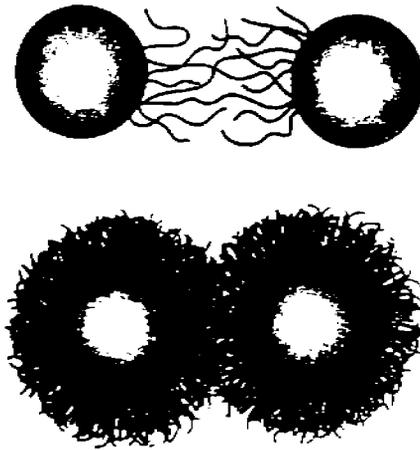


Fig. 4. Representación esquemática de la adsorción del agente estabilizante y su efecto protector.

Para Compritol® 888 ATO, ver cuadro 4, los mejores tamaños de partícula se pueden observar al utilizar el PVAL, P-188 y sus respectivas mezclas con Tween 80. Debido a que se obtiene un tamaño de partícula homogéneo con una sola población, se han reportado que dispersiones con este tipo de lipido sólido con P-188 al 5% p/v han dado buenos resultados en la elaboración de NE, además una mezcla de agentes estabilizantes dan como resultado suspensiones con menor

tamaño de partícula y una alta estabilidad en comparación con un solo surfactante⁽⁵⁾, esto se pudo demostrar en la elaboración de NC por esta metodología en la que se puede observar una disminución ligera del tamaño de partícula al utilizar la mezcla para P-188.

	Tween 80	PVAL	P-188	P-407	Tween/PVAL	Tween/P188	Tween/P407
Lectura 1	1795.4	514.8	306.1	303.9	313.5	284.2	179.9
Lectura 2	3579.5	484.7	340.8	306.9	300	293.4	177
Lectura 3	6843.2	515.4	325.8	315	333.4	259.4	163.9
SD	2559.786	17.554	17.403	5.742	16.801	17.586	8.524
PROMEDIO	4072.7	505.0	324.2	308.6	315.6	279.0	173.6
CV	62.85232	5.756	5.3674	1.8606	5.323	6.303	4.910

Cuadro 4. Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Compritol[®] 888 ATO (nm).

En el caso de los lotes de P-407 y su mezcla con Tween se encontraron al realizar las lecturas dos poblaciones una de las cuales correspondía a una población muy pequeña, por abajo de los 50 nm, lo que nos hace suponer que no todo el estabilizante esta realizando su tarea protectora y una parte queda formando micelas provocando estas lecturas tan pequeñas. En los resultados reportados, únicamente se tomaron los resultados de la población más grande. Cabe destacar que con este último agente estabilizante también es posible formar NC, con tallas de partícula por debajo de los 500 nm.

Como se mencionó anteriormente los agentes estabilizantes son adsorbidos en la gran área interfacial creada durante la formación de la emulsión y su efecto protector va a radicar en la capacidad de mantenerse adsorbido durante el proceso de desestabilización de la emulsión, que nos va a llevar a la formación de las NC.

En el caso del Tween 80 este efecto no se llevó a cabo, en investigaciones anteriores con matrices poliméricas⁽⁷⁾ se encontró que no existe un efecto protector, ya que no previene la coalescencia de los glóbulos durante la difusión del disolvente, como se puede observar en la tabla 1 el tamaño de partícula obtenido para este agente estabilizante es mayor a 1 μ m. La lectura de cada una

de las repeticiones nos reporta poblaciones por debajo de los 100 nm, en investigaciones anteriores en la elaboración de NE con este tipo de agente estabilizante se realizó un estudio en el cual se requería purificar la suspensión, la lectura obtenida de la suspensión de NE nos muestra dos poblaciones con estas mismas características, las cuales nos marcan tamaños de partícula menores a los 100 nm. Esta investigación previa nos dice que los tamaños de partícula muy pequeños se tratan de micelas de Tween 80 que se forman al sobrepasar su concentración micelar crítica (CMC), lo que deja desprotegidos a los glóbulos formados durante la emulsión ocasionando una separación de fases.

Para el caso de Geleol[®] se observó que para todas las preparaciones realizadas el efecto protector de los agentes estabilizantes no se llevaba a cabo o bien este se rompía muy rápido. Como se puede observar en el cuadro 5, el tamaño de partícula es muy heterogéneo para los diferentes tipos de estabilizantes, sin embargo se pudo obtener tamaños de partícula muy pequeños para el caso del P-188 aunque no homogéneo; para el caso de P-407 y la mezcla de Tween/PVAL se pudieron obtener tamaños de partícula más o menos homogéneos, por lo que tal vez se necesite una mayor concentración del estabilizante, lo reportado en la literatura nos dice que altas concentraciones del emulsificante reducen la tensión interfacial y facilitan la formación de las partículas durante la emulsificación⁽⁵⁾.

	Tween 80	PVAL	P-188	P-407	Tween/PVAL	Tween/P188	Tween/P407
Lectura 1	667.6	2314.6	308.8	380.9	259.3	163.2	9762.3
Lectura 2	2585.6	1849.9	284.1	295.5	286.8	587.9	9830.6
Lectura 3	2906.2	4016.5	120.9	279.4	239.3	991.1	7181.1
SD	1210.56	1140.65	102.103	54.5506	23.848	413.996	1510.359
PROMEDIO	2053.1	2727.0	237.9	318.6	261.8	580.7	8924.7
CV	58.964	41.8282	42.9126	17.1219	9.109426	71.2684	16.9234

Cuadro 5. Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Geleol[®] (nm).

Como se puede observar en el cuadro 6, los lotes elaborados con Gelucire[®] 50/13 tienen un tamaño de partícula en el rango nanométrico, para todos los agentes estabilizantes utilizados, con lo que se puede afirmar que se están formando NC,

destacando que es posible obtener NC con Tween 80, la única desventaja que se observó que al igual que con los lotes elaborados a partir de Geleof[®], éstos se desestabilizaban rápidamente observándose grumos en las paredes del frasco contenedor de la suspensión al cabo de unas horas, lo que nos llevó a desechar este tipo de preparación para las evaluaciones posteriores.

	Tween 80	PVAL	P-188	P-407	Tween/PVAL	Tween/P188	Tween/P407
Lectura 1	258.8	308.3	276.5	413.3	252.4	167	259
Lectura 2	219.8	306.7	272.3	351	221.3	163	638.4
Lectura 3	266.9	302.4	263.5	346.6	351.9	177.1	423.5
SD	25.182	3.056	6.634	37.304	68.220	7.266	190.257
PROMEDIO	248.5	305.8	270.8	370.3	275.2	169.0	440.3
CV	10.133	0.997	2.450	10.073	24.789	4.298	43.210

Cuadro 6. Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Gelucire[®] 50/13 (nm).

En el caso de los lotes elaborados con Gelucire[®] 44/14 los tamaños de partícula obtenidos fueron muy similares a los obtenidos en las preparaciones de Gelucire[®] 50/13, como se puede observar en el cuadro 7, el tamaño de partícula obtenido oscila en el rango nanométrico, obteniéndose dispersiones en una sola población, en observaciones realizadas durante el manejo del lípido sólido se encontró que este tiende a fundirse a temperatura ambiente, esto nos hace suponer que el lípido se encuentra formando micelas y no cápsulas.

	Tween 80	PVAL	P-188	P-407	Tween/PVAL	Tween/P188	Tween/P407
Lectura 1	251.4	460.1	251.5	299	298.4	262.7	183.6
Lectura 2	250.4	423.5	260.9	295.9	267	261.5	142.3
Lectura 3	251.2	240.6	246.9	295.9	282.8	272.7	258.6
SD	0.529	117.595	7.136	1.790	15.700	6.149	58.958
PROMEDIO	251.0	374.7	253.1	296.9	282.7	265.6	194.8
CV	0.211	31.381	2.819	0.603	5.553	2.315	30.261

Tabla 7. Tamaño de partícula para los lotes elaborados con Gelucire[®] 44/14 (nm).

Una vez terminado el proceso de preparación de las suspensiones de NC se puede tener un indicio si éstas se están formando, o bien si el efecto protector del agente estabilizante es el adecuado ya que se puede observar físicamente una suspensión lechosa y homogénea, al contrario si no se están formando se

observan grumos lo que nos indica coalescencia y/o aglomeración de las partículas.

Con base en los resultados del tamaño de partícula obtenidos se eligió una preparación, la cual resultó ser la más estable y homogénea que nos permitiera, realizar los siguientes estudios de caracterización que nos sirvieran para demostrar la formación de NC con lípidos sólidos.

Mediante un análisis por microscopía electrónica de barrido se pudo revisar la morfología de las NC obtenidas por el método de emulsificación-difusión; determinando su tamaño y forma.

Para su realización se utilizó una suspensión de NC utilizando como matriz Compritol[®] 888 ATO, como agente estabilizante PVAL y como centro oleoso Miglyol[®] 812. En la figura 5, se muestra una fotografía electrónica de barrido en la que se puede observar la estructura rígida y esférica de las NC, la barra inferior equivale a 1 μm , con lo cual podemos comprobar que el tamaño medido directamente en el nanoziser corresponde a lo visto mediante microscopía electrónica de barrido.

En las figuras 6 y 7 se puede observar desde distintos aumentos la estructura de la nanocápsula, en donde se ve claramente la cavidad hueca en donde se almacena el fármaco disuelto en el aceite. Es importante mencionar que para realizar estas observaciones se requirieron de varias preparaciones sobre papel y vidrio, siendo estas últimas en las que mejor se pudieron observar.

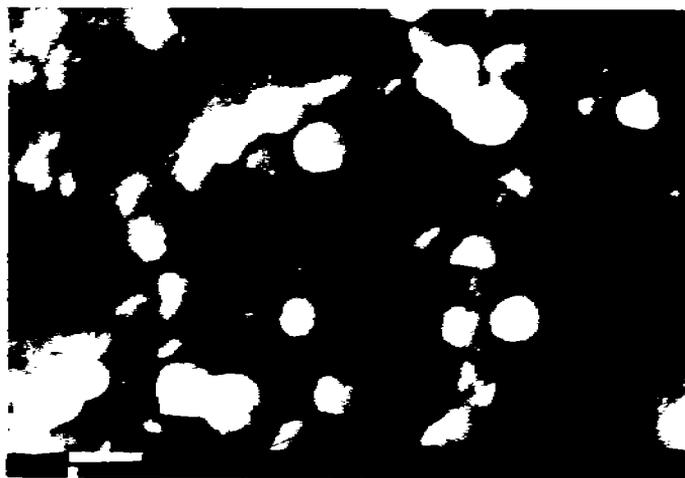


Fig 5. Fotografía en microscopía electrónica de barrido de NC de Compritol® 888 ATO y PVAL 7000X. La barra nos indica 1 μm .



Fig 6. Fotografía en microscopía electrónica de barrido de NC de Compritol® 888 ATO y PVAL 20000X. La barra nos indica 1 μm .



Fig 7. Fotografía en microscopia electrónica de barrido de NC de Compritor® 888 ATO y PVAL 30000X.

Se han tratado en la actualidad de encapsular diferentes tipos de fármacos por diferentes metodologías siendo los fármacos lipídicos los mas difíciles de encapsular, entre los fármacos que se han trabajado por diferentes tipos de metodologías se encuentran reinol, oxacepam, progesterona, vitamina E, entre otros⁽⁵⁾. Según los resultados obtenidos la cantidad de fármaco encapsulada asciende a 64.27 % de lo colocado inicialmente, esto se debe a que la solubilidad del fármaco es mayor en aceite que en el lípido sólido, además durante el proceso de difusión cierta cantidad de aceite que contenía al fármaco, quedo atrapada dentro del agente estabilizante y al momento de hacer los lavados este se eliminó quedando únicamente las NC. Este porcentaje de encapsulamiento resulta sorprendente debido a que se han reportado numerosos estudios en los que no se logra atrapar sino hasta un 5% de fármaco, la mayoría de las metodologías para fabricar SLN no encapsula al fármaco, únicamente lo mezclan con la matriz lipídica.

En un estudio realizado por R. H. Müller y cols., en donde él propone que en las NP se forman pequeños compartimentos en donde se deposita el aceite, a lo que él les llamó acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)₍₂₈₎ y nos dice que en esos compartimentos la solubilidad del fármaco es mayor. En los estudios que él hace se propone encapsular retinol utilizando como matriz lipídica Compritol[®] 888 ATO y Miglyol[®] 812, logrando encapsular únicamente el 1%, por medio de la técnica de homogenización a altas presiones, lo que nos hace ver que estas técnicas además de llevar fármaco durante el proceso de fabricación a temperaturas muy altas que probablemente lleve a su degradación también tienen un pobre encapsulamiento del principio activo.

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido son utilizados generalmente para entender las dispersiones sólidas como las simples mezclas eutécticas o como en este caso las interacciones fármaco / lipido.

Es importante mencionar que con este tipo de prueba por sí sola no es posible determinar el arreglo de las moléculas, ya que se tienen que realizar otro tipo de metodologías que nos permitan conocer la conformación de los materiales como lo son la resonancia magnética nuclear de alta resolución (HNMR) y los rayos X.

Para este estudio se utilizaron Compritol[®] 888 ATO como matriz lipídica y como centro oleoso Miglyol[®] 812. Esta mezcla resultó ideal debido a que existe una buena miscibilidad entre ellos además que el aceite es un buen vehículo en donde se pueden disolver fármacos insolubles en agua, así como la alta miscibilidad entre ambos a la temperatura de trabajo.

Se realizaron varias corridas bajo diferentes condiciones de la muestra las cuales nos ayudaron a determinar en forma general si existía algún cambio en las propiedades de la matriz de acuerdo a su tratamiento y composición de la muestra.

En la figura 8 se pueden observar los termogramas en donde se hace un comparativo entre la matriz lipídica sin tratamiento alguno, una mezcla física la cual es una combinación en forma proporcional de acuerdo a la formulación de las NC de lipido sólido y aceite, NC y NE, estas últimas utilizando como matriz lipídica Compritol® 888 ATO. En ella podemos observar el pico de fusión del lipido sólido en 72.5 °C.

En el caso de las NE en comparación con el termograma del Compritol® 888 ATO podemos observar que el proceso no afecta prácticamente el estado cristalino del lipido sólido debido a que el pico de fusión no sufre alteración alguna, aunque también se puede observar una pequeña protuberancia a una temperatura mayor a la del punto de fusión, la literatura nos dice que se trata de un segundo polimorfo del lipido sólido, lo que nos hace suponer que después de la difusión, el lipido sólido sufre un pequeño reacomodo en su estructura (7). En el caso de la mezcla física hay un abatimiento y una depresión del pico de fusión lo que nos hace suponer que el aceite juega un papel importante en la mezcla debido a que el aceite cubre las moléculas de lipido sólido enmascarando su punto de fusión.

Al hacer la comparación de los termogramas anteriores con el termograma de NC podemos observar dos picos de fusión en los cuales se puede suponer que después de la difusión del disolvente y la subsecuente cristalización y enfriamiento de la suspensión el lipido sólido sufrió un disturbio masivo en el ordenamiento de los cristales quedando moléculas de aceite atrapadas entre la matriz lipídica cambiando su conformación, otra hipótesis nos hace suponer en un rompimiento de las NC en el primer pico de fusión y la subsecuente fusión del lipido sólido (segundo pico de fusión). Como ya se mencionó anteriormente estos planteamientos pueden ser evaluados mas a fondo con las técnicas de Rayos X y HNRM.

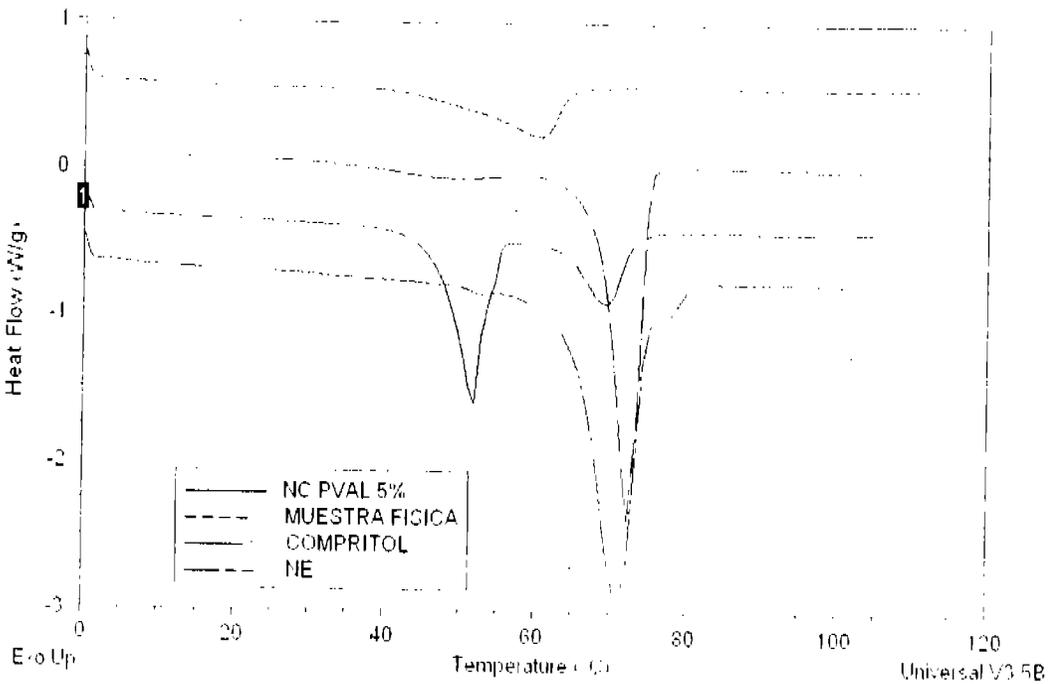


Fig 8. Termogramas comparativos de Compritol® 888 ATO bajo diferente tratamiento utilizando una rampa de 0-120 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/ min.

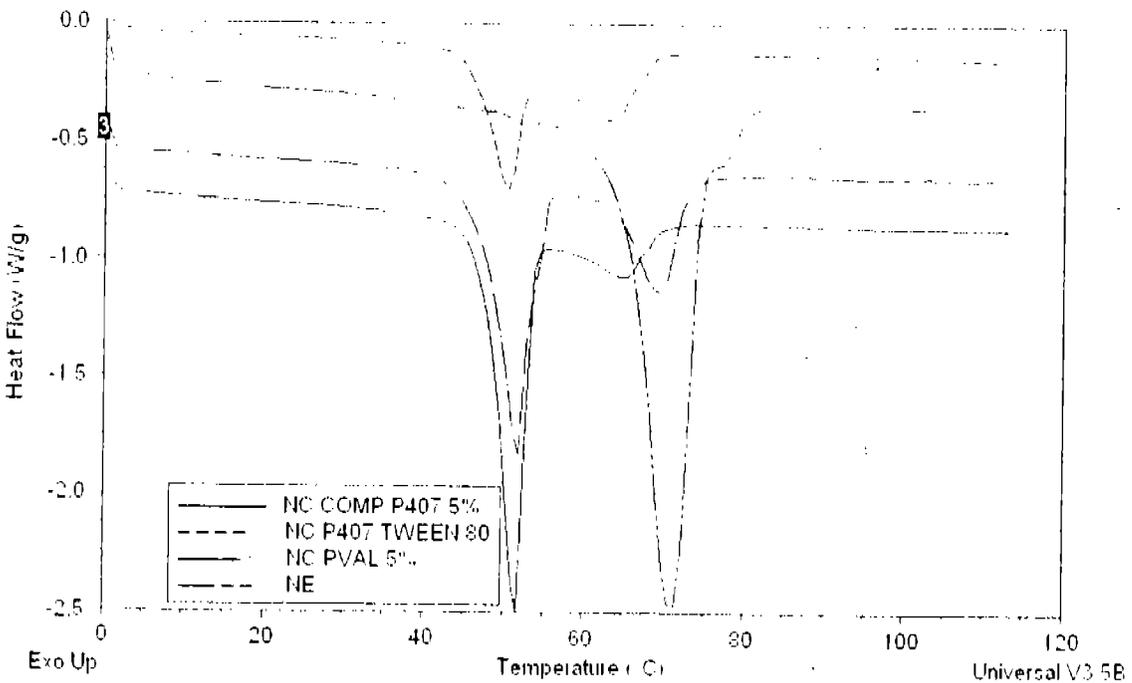


Fig 9. Termogramas comparativos de NC y NE utilizando como lípido sólido Compritol® 888 ATO y como centro oleoso Miglyol® 812 utilizando la técnica de emulsificación - difusión.

En la figura 9 se hizo la comparación entre diferentes formulaciones de NC en donde se cambió únicamente el tipo de agente estabilizante con respecto a una formulación de NE y podemos observar la misma tendencia para cada uno de los lotes de NC con relación a la figura anterior y vemos que el tipo y/o mezcla de agentes estabilizantes no tiene un efecto en el arreglo de las moléculas de aceite y lipido sólido.

Con respecto a los estudios de liberación *in vitro* a partir de NC cargadas con OMC se prepararon tres lotes en los cuales únicamente se varió la concentración de lipido, los cuales se colocaron en una celda de difusión tipo Franz según el procedimiento descrito en el apartado 2.3.4 de la metodología, en el cual cada una de las preparaciones se llevó a cabo por triplicado. Esta metodología resultó atractiva debido a que el OMC, dadas sus propiedades, es un aceite con buena detección espectrofotométrica

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos para la liberación de OMC para los diferentes lotes preparados, el porcentaje liberado se obtuvo considerando la cantidad liberada (M_t) a un tiempo t dividido entre la cantidad máxima liberada en el sistema (M_∞) multiplicado por 100, en el cual se observa al inicio una liberación rápida debido a que el 60% de OMC se libera en las primeras horas la cual disminuye hasta hacerse prácticamente constante alrededor de las 200 h aproximadamente, lo cual nos indica que el aceite encapsulado ha sido liberado en su totalidad. Por otro lado no se puede apreciar una diferencia significativa entre los tres perfiles, únicamente podemos observar una liberación un poco más rápida a partir de la hora 47 para después acoplarse alrededor de la hora 147 para el lote de 400 mg de compritol® 888 ATO. En teoría al haber una cantidad mayor de matriz esperaríamos una pared mucho mas gruesa que nos controlara y/o impidiera la liberación del activo, en este caso esto no sucede ya que los perfiles prácticamente se sobreponen, por lo que podemos suponer que la

liberación no sigue un mecanismo de difusión fickiano dado por el gradiente de concentración.

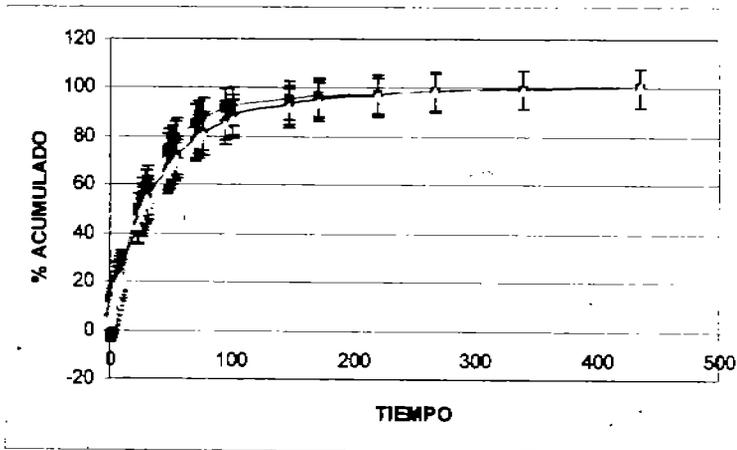


Fig 10. Perfil de liberación para NC de compritol 888 ATO cargadas con OMC, considerando como 100% la cantidad máxima liberada. → 200 mg Compritol® 888 ATO, → 400 mg de Compritol® 888 ATO, -▲- 600 mg Compritol® 888 ATO.

Para tener una idea mas clara del tipo de mecanismo de liberación que siguen los perfiles estudiados se aplicó el modelo semiempirico propuesto por Peppas, el cual solo se consideran los resultados hasta el 60% de la liberación, este modelo nos explica que de acuerdo a la fracción liberada de una sustancia depende de una constante y un exponente difusional n que indica el probable mecanismo y el tipo de liberación.

De acuerdo a este modelo se graficaron $\ln (M_t/M_\infty)$ vs $\ln t$, donde M_t es la cantidad liberada a un tiempo t y M_∞ es la cantidad máxima liberada. En el cuadro 8 se puede apreciar el mecanismo y tipo de liberación de acuerdo al exponente difusional n del modelo semiempirico de Peppas.

Valor de "n"	Mecanismo de Transporte	Tipo de liberación
0.5	Difusión fickiana	Dependiente del tiempo $F(t^{1/2})$
$0.5 < n < 1$	Transporte no Kickiano (Anómalo)	Dependiente del tiempo $F(t^{n-1})$
1	Transporte caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Transporte super caso II	Dependiente del tiempo $F(t^{n-1})$

Cuadro 8. Mecanismo de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de n en el modelo semiempírico de Peppas

En la figura 11 y en el cuadro 9 se pueden observar los resultados obtenidos aplicando el modelo de Peppas

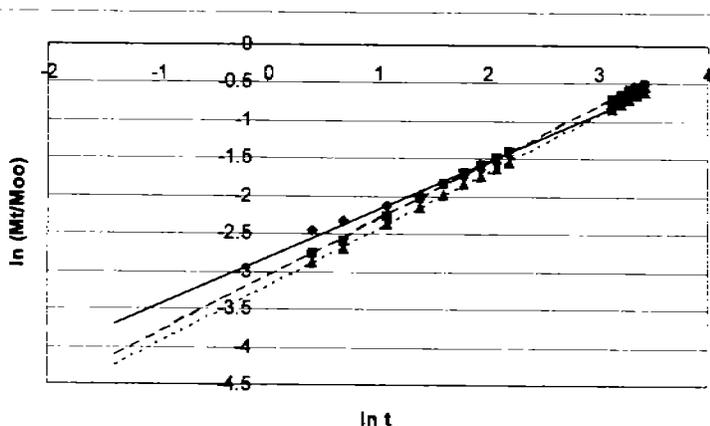


Fig 11. Análisis por el modelo de Peppas aplicado a los perfiles de liberación de OMC contenido en NC de Compritol 888 ATO con diferentes cantidades de matriz lipídica. \circ - 200 mg Compritol® 888 ATO, \square - 400 mg de Compritol® 888 ATO, \triangle - 600 mg Compritol® 888 ATO.

Lotes preparados	n	r ²
200 mg Compritol® 888 ATO	0.6599	0.9965
400 mg Compritol® 888 ATO	0.75	0.9992
600 mg Compritol® 888 ATO	0.7554	0.9998

Cuadro 9. Valores de n y coeficientes de correlación obtenidos del modelo de Peppas para los diferentes lotes de NC preparados con diferentes cantidades de compritol® 888 ATO

Como podemos observar, los resultados obtenidos indican que todos los sistemas calculados presentan un tipo de liberación dependiente del tiempo y un tipo de transporte no fickiano (anómalo), por lo que podemos decir que nuestros sistemas se comportan como un sistema erosionable. Se ha reportado que la liberación de principios activos a partir de matrices lipídicas están controlados por los mecanismos de difusión y erosión y prevalece uno u otro según las características del fármaco y de la matriz lipídica propiamente (31).

Los resultados de las liberaciones también fueron tratados de acuerdo al modelo de Higuchi el cual estudia la liberación de los fármacos a partir de sistemas matriciales. Este modelo nos explica que al entrar en contacto la matriz con el medio de disolución, este último es capaz de entrar formando una capa de hidratación. Cuando sólo una cara de la matriz esta expuesta al medio de disolución, el grosor de la capa de hidratación aumenta de manera unidireccional, sin embargo la hidratación relativa disminuye al incrementarse la profundidad de la penetración del medio. Si la velocidad de hidratación de la matriz es menor que la de la disolución del fármaco contenido en la matriz, la liberación obedece el modelo de la raíz cuadrada de Higuchi.

En la figura 12 y cuadro 10 se pueden observar los resultados obtenidos aplicando el modelo de Higuchi. Este modelo asume que el activo se encuentra disperso homogéneamente en toda la matriz, de manera que el fármaco que sale primero es aquel que se encuentra localizado en la parte mas superficial de la matriz, y posteriormente el que se encuentra en la región mas interna. De acuerdo con esto podemos observar que nuestros sistemas al realizarles la regresión lineal

encontramos unos coeficientes de determinación mayores de 0.98 para todas las preparaciones. Por lo que podemos decir que el fármaco que sale primero es aquel que se encuentra en la parte superficial de la matriz, esto es entendible debido a recientes investigaciones han demostrado que los lípidos tienen un cierto grado de porosidad en los cuales pudiera haber una cierta cantidad de aceite atrapado, que permite la penetración inicial del medio de disolución y, en consecuencia la disolución y difusión del principio activo del mismo

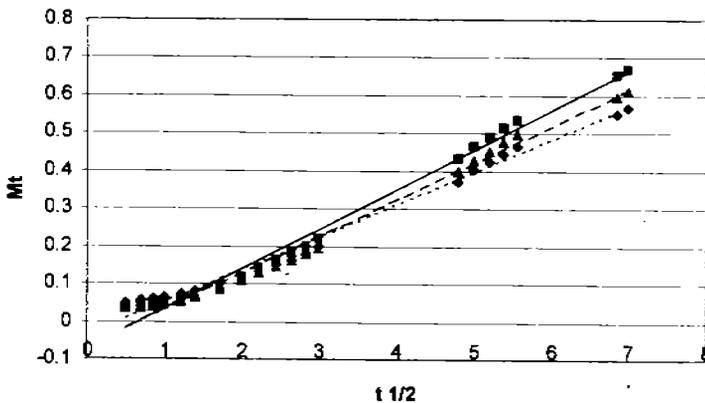


Fig 12. Análisis por el modelo de Higuchi aplicado a los perfiles de liberación de OMC contenido en NC de compritol 888 ATO con diferentes cantidades de matriz lipídica. \blacktriangle 200 mg Compritol[®] 888 ATO, \blacksquare 400 mg de Compritol[®] 888 ATO, \blacktriangledown 600 mg Compritol[®] 888 ATO.

Lotes preparados	k_H	r^2
200 mg Compritol [®] 888 ATO	0.0859	0.9867
400 mg Compritol [®] 888 ATO	0.1058	0.9856
600 mg Compritol [®] 888 ATO	0.0958	0.9839

Cuadro 10 Valores de k_H y coeficientes de correlación para los diferentes lotes de NC preparados con diferentes cantidades de compritol[®] 888 ATO, aplicando el modelo de Higuchi.

Por otro lado es importante conocer el tipo de cinética a la cual obedecen los resultados de liberación presentados, por lo que se analizaron de acuerdo a una cinética de primer orden obteniendo el grafico mostrado en la figura 13.

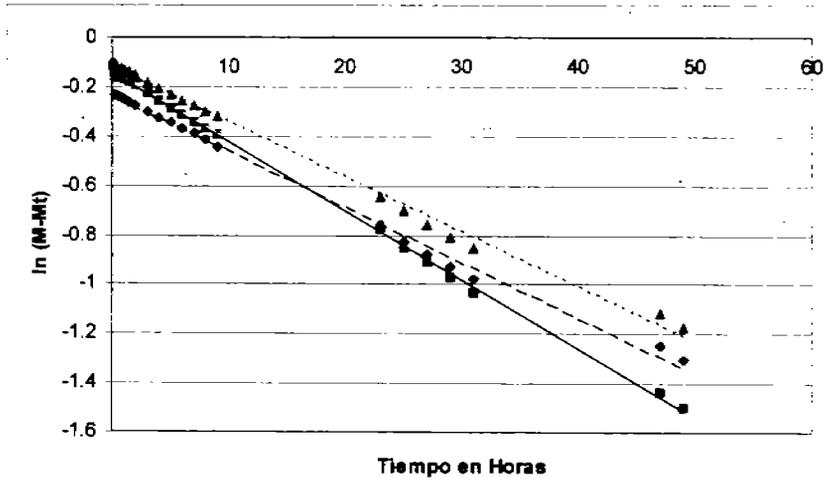


Fig 13. Cinética de primer orden aplicada a la liberación de OMC contenido en NC de comprimido 888 ATO con diferentes cantidades de matriz lipídica. \rightarrow 200 mg Compritol® 888 ATO, \square 400 mg de Compritol® 888 ATO, \blacktriangledown 600 mg Compritol® 888 ATO.

Lotes preparados	n	r ²
200 mg Compritol® 888 ATO	0.026	0.8648
400 mg Compritol® 888 ATO	0.028	0.9996
600 mg Compritol® 888 ATO	0.023	0.998

Cuadro 11 Valores de n y coeficientes de correlación para los diferentes lotes de NC preparados con diferentes cantidades de comprimido® 888 ATO. Aplicando el modelo de cinética de primer orden.

La tendencia observada en los tres sistemas es lineal (cuadro 11) por lo que podemos decir que el sistema sigue una cinética de primer orden, lo cual implica que la liberación de OMC contenido en la NC depende de la concentración

existente en el sistema y esto se aplica únicamente para la primera parte del perfil de liberación.

VI. CONCLUSIONES

- ✚ Es posible obtener nanocápsulas por medio de la técnica de emulsificación-difusión.
- ✚ Esta técnica resultó útil en la preparación de NC lipídicas debido a que es de fácil proceso lo que nos permite utilizar temperatura por abajo del punto de fusión del lípido que impide la degradación de fármacos termosensibles.
- ✚ El conocer la insolubilidad entre el lípido y el aceite nos permite asegurar una mayor estabilidad de la dispersión por lo que aseguramos que la porción líquida no saldrá de la nanocápsula.
- ✚ El uso de diferentes agentes estabilizantes nos permite tener un amplio panorama para su aplicación por diferentes vías de administración. Siendo las mezclas las que mejor resultado dieron.
- ✚ Se pudo observar que el uso de Tween 80 como agente estabilizante no es una buena opción para obtener nanocápsulas por medio de esta técnica.
- ✚ Esta técnica ofrece un alto grado de encapsulación de fármacos lipofílicos, siendo éstos los más difíciles de trabajar.
- ✚ El análisis por medio de microscopía electrónica de barrido nos permitió observar una pared rígida y esférica, además de que fue posible corroborar el tamaño de partícula de las dispersiones con los resultados medidos inicialmente con el nanosizer.
- ✚ No es posible determinar el arreglo que sufren las moléculas de lípido y aceite únicamente por medio de DSC.
- ✚ Los estudios en DSC nos permitieron conocer las interacciones entre el lípido y el aceite, encontrándose una clara diferencia entre las muestras analizadas.
- ✚ El mecanismo de liberación de las NC de acuerdo al modelo de Peppas se comportan como un sistema erosionable y no flikiano.

VII. PERSPECTIVAS

- ↓ Evaluar el tiempo de estabilidad de las NC utilizando diferentes tipos de agentes estabilizantes bajo diferentes condiciones de stress.
- ↓ Emplear diferentes técnicas espectroscópicas para determinar el arreglo que sufren las moléculas del lípido sólido con el aceite.
- ↓ Emplear diferentes disolventes de toxicidad baja y determinar si es posible obtener NC por medio de esta técnica.
- ↓ Evaluar la penetración de este nuevo tipo de acarreador coloidal en sistemas in vivo e in vitro.
- ↓ Implementar el uso de este nuevo sistema acarreador en una formulación cosmética y/o farmacéutica.

VIII. ANEXOS

ANEXO # 1

DENSIDADES EXPERIMENTALES DE LOS LÍPIDOS SÓLIDOS UTILIZADOS

Compritol® 888 ATO

PESO (g)	DIAMETRO (mm)	ESPESOR (mm)	VOLUMEN (cm ³)	DENSIDAD g/cm ³
0.4848	11.297	5.104	0.5115	0.9478
0.4333	11.308	4.559	0.4578	0.9464
0.4805	11.304	5.050	0.5068	0.9481
0.4772	11.310	5.040	0.5063	0.9425
0.4532	11.299	4.770	0.4782	0.9477
0.4237	11.254	4.465	0.4441	0.9540
0.4821	11.276	5.055	0.5048	0.9550
0.4792	11.285	5.015	0.5015	0.9555
0.4509	11.305	4.817	0.4834	0.9327
0.4674	11.277	4.917	0.4910	0.9519

Densidad promedio 0.9481 g/cm³

Geleol

PESO (g)	DIAMETRO (mm)	ESPESOR (mm)	VOLUMEN (cm ³)	DENSIDAD g/cm ³
0.4824	11.290	4.777	0.4782	1.0088
0.4782	11.275	4.730	0.4721	1.0129
0.4803	11.290	4.744	0.4749	1.0114
0.4728	11.281	4.688	0.4685	1.0092
0.5249	11.273	5.181	0.5170	1.0153
0.5212	11.280	5.138	0.5134	1.0152
0.4951	11.280	4.897	0.4893	1.0118
0.5048	11.297	4.979	0.4990	1.0116
0.5431	11.295	5.356	0.5365	1.0123
0.4724	11.281	4.701	0.4698	1.0055

Densidad promedio 1.0114 g/cm³

Gelucire 50/13

PESO (g)	DIAMETRO (mm)	ESPEJOR (mm)	VOLUMEN (cm ³)	DENSIDAD g/cm ³
0.4876	11.228	4.555	0.4510	1.0809
0.4761	11.299	4.508	0.4519	1.0535
0.4929	11.215	4.632	0.4575	1.0774
0.4801	11.253	4.544	0.4518	1.0626
0.4731	11.289	4.436	0.4439	1.0658
0.4652	11.206	4.455	0.4394	1.0587
0.5018	11.230	4.720	0.4675	1.0734
0.4868	11.235	4.657	0.4616	1.0545
0.4967	11.221	4.665	0.4612	1.0770
0.4818	11.248	4.584	0.4555	1.0577

Densidad promedio 1.0661 g/cm³

ANEXO # 2

SOLUBILIDAD DE LOS LÍPIDOS SÓLIDOS EN DIFERENTES TIPOS DE ACEITES

Lípido Sólido Aceite	Compritol [®] 888 ATO	Gelucire [®] 44/14	Geleol [®]	Gelucire [®] 50/13
Aceite de Ricino	NS	S	NS	NS
Aceite mineral	NS	NS	NS	NS
Ácido oleico	NS	S	S	S
Aceite de almendras dulces	NS	NS	NS	NS
Vaselina	NS	NS	NS	NS
Miglyol	NS	NS	NS	NS

S = Soluble

NS = No soluble

ANEXO # 3

GRAVEDAD ESPECÍFICA EXPERIMENTAL DE LOS ACEITES UTILIZADOS

Tipo de aceite	Gravedad Específica (g/cm³)
Aceite de ricino	0.9585
Aceite mineral	0.8571
Acido oleico	0.8925
Aceite de almendras dulces	0.9156
Vaselina	0.8307
Miglyol	0.9436
OMC	1.0119

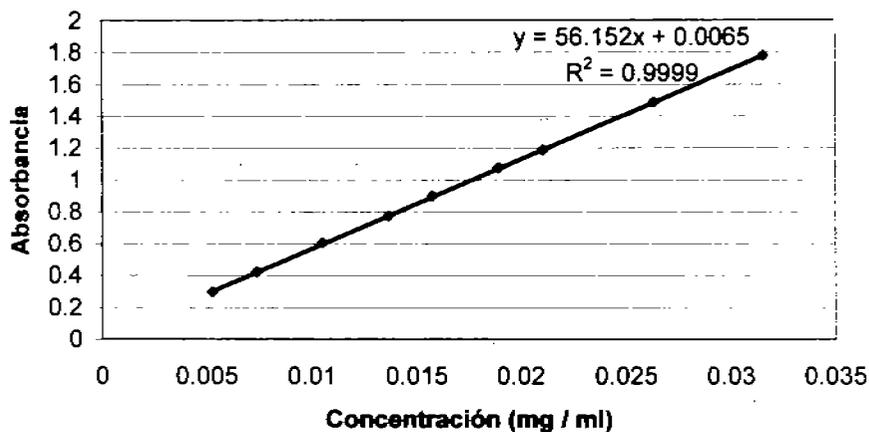
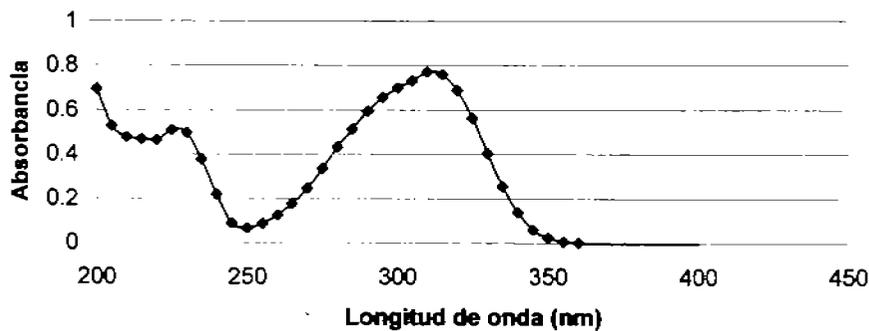
ANEXO # 4

PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA OMC

4.1 CURVA CALIBRACIÓN OMC / BRIJ 58 5%

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Promedio absorbancia
0.00526	0.2871	0.2946
0.00526	0.2892	
0.00526	0.3076	
0.007364	0.4338	0.4206
0.007364	0.4116	
0.007364	0.4164	
0.01052	0.5964	0.6038
0.01052	0.6057	
0.01052	0.6093	
0.013676	0.7726	0.7715
0.013676	0.7711	
0.013676	0.7708	
0.01578	0.8825	0.8971
0.01578	0.8867	
0.01578	0.922	
0.018936	1.0673	1.0724
0.018936	1.0721	
0.018936	1.0778	
0.02104	1.1862	1.1858
0.02104	1.1883	
0.02104	1.183	
0.0263	1.4875	1.4842
0.0263	1.491	
0.0263	1.4742	
0.03156	1.7696	1.7755
0.03156	1.7786	
0.03156	1.7784	

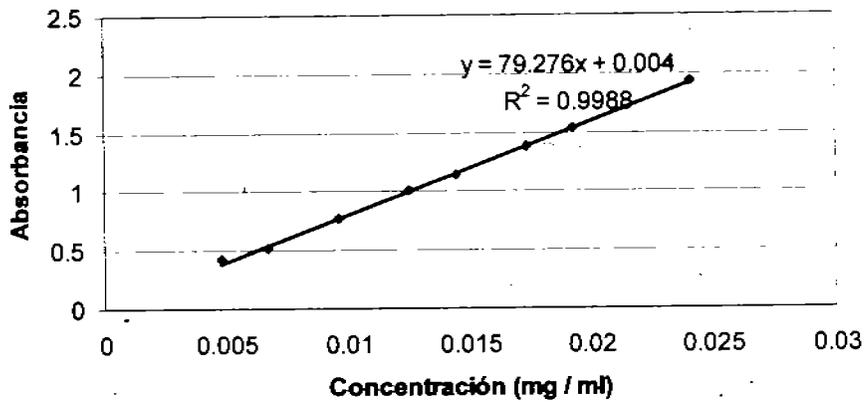
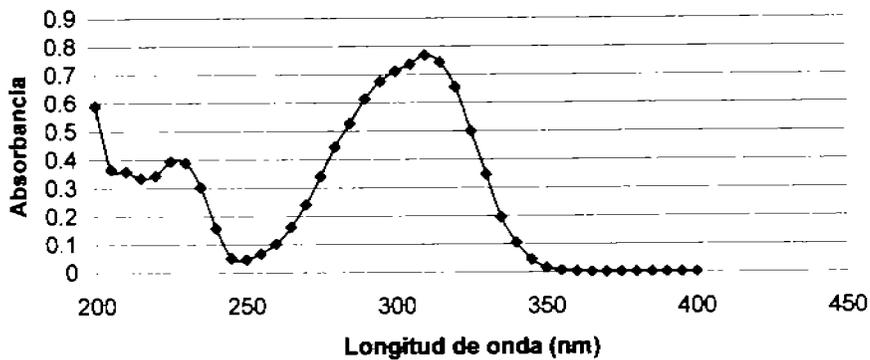
CV = 1.66%	m= 56.15	r²=0.9999
b = 0.0064678	r= 0.9998	

Curva calibración OMC/Brij 58 5%**Barrido espectrofotométrico de OMC en Brij 58 al 5% en región UV**

4.2 CURVA CALIBRACIÓN OMC / EtOH

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Promedio absorbancia
0.00482	0.3855	0.4168
0.00482	0.4199	
0.00482	0.4449	
0.006748	0.5168	0.5096
0.006748	0.5106	
0.006748	0.5014	
0.00964	0.7762	0.7723
0.00964	0.7834	
0.00964	0.7572	
0.012532	1.021	0.9993
0.012532	0.9802	
0.012532	0.9968	
0.01446	1.1295	1.1352
0.01446	1.135	
0.01446	1.1412	
0.017352	1.3734	1.3796
0.017352	1.3967	
0.017352	1.3686	
0.01928	1.5291	1.5295
0.01928	1.5303	
0.01928	1.5269	
0.0241	1.9119	1.9256
0.0241	1.9457	
0.0241	1.9192	

CV = 3.02%	m= 80.04	r²=0.9987
b = -0.0098523	r = 0.9993	

Curva calibración OMC / EtOH**Barrido espectrofotométrico de OMC el Etanol en región UV**

ANEXO # 5**PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS MATERIALES UTILIZADOS****MIGLYOL® 812****Descripción.**

Forma parte de un grupo de aceites con buenas propiedades para uso farmacéutico y cosmético, es un aceite neutro, compuesto de triglicérido cáprico de ácidos grasos vegetales fraccionados.

Propiedades.

Los aceites neutros de Miglyol® son claros, virtualmente incoloros, líquidos con olor y sabor neutral, además de que son puros debido a la selección de sus materias primas. Como resultados de su proceso de fabricación, contienen muy pocos microorganismos y son libres de aditivos como antioxidantes, solventes y residuos de catálisis.

Tiene las siguientes ventajas en comparación con los aceites naturales:

- Alta estabilidad frente a la oxidación.
- Es líquido a 0° C.
- Es muy fácil de ser untado en la piel y buena absorción cutánea.
- No obstruye la respiración cutánea además de que no le causa algún tipo de irritación.
- Tiene buenas propiedades promotoras, emolientes y suavizantes.
- Muy buena solubilidad.

Solubilidad.

Es soluble a 20° C en los siguientes solventes: hexano, tolueno, dietil éter, acetato de etilo, acetona, isopropanol, etanol 96%. Es miscible en cualquier proporción de hidrocarburos de parafina y aceites naturales.

Valores característicos.

Especificación	Descripción
Índice de acidez (mg KOH/g)	Máximo 0.1
Índice de yodo (g I ₂ /100g)	Máximo 0.5
Índice de saponificación (mg KOH/g)	325-345
Índice de peróxido (mequi O/kg):	Máximo 1.0
Índice de hidroxilo (mg KOH/g):	Máximo 5
Color (APHA):	Máximo 100
Agua (%):	Máximo 0.1
Índice de refracción n ²⁰ _D	1.449-1.451
Densidad a 20 ^o C (g/cm ³)	0.94-0.95
Viscosidad a 20 ^o C (mPas • s)	27-33
Sustancias reactivas alcalinas (ml HCL/2 g)	Máximo 0.15
Metales pesados (ppm)	Máximo 10
Cenizas totales (%)	Máximo 0.1
Materia insaponificable (%)	Máximo 0.3

Aplicaciones.

Farmacia: Puede ser utilizado en formulaciones orales, parenterales, tópicas, rectales y dietéticas, como acarreadores, disolventes, antiadhesivos, promotores de absorción, agente dispersante, etc.

Cosmética: En esta área puede ser utilizado como cosmético para el cuidado de la piel, cosmético decorativo, cosmético de limpieza, en bloqueadores solares, en perfumes: como emoliente no grasoso, agente dispersante, fijador, etc.

Toxicidad.

Es no irritante debido a que tiene un índice de irritación de 0.

Tolerancia oral: DL₅₀ > 5 g/kg

Tolerancia parenteral intraperitoneal: DL₅₀ > 2 g/kg en ratones

DL₅₀ > 8 g/kg en ratas

Por vía intramuscular e inhalatoria no presenta resultados histopatológicos.

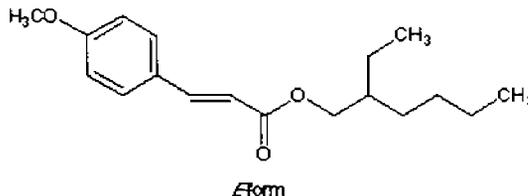
Este aceite es rápidamente biodegradable, muestra el mismo comportamiento que los productos grasos naturales de estructura como los triglicéridos.

OCTIL METOXICINAMATO (ESCALOL® 557)**Nombre químico.**

3-(4-metoxifenil)ácido-2-propenoico-2-etil hexil ester p-metoxicinamato

Fórmula Química. C₁₈H₂₆O₃

Peso molecular. 290.4 g/mol

Fórmula estructural:**Descripción.**

Líquido amarillo pálido, olor suave característico.

Aplicaciones cosméticas.

Se absorbe ampliamente en el rango UV-B y ha ganado aceptación mundial como excelente filtro solar para personas sensibles a otros activos. Este líquido incoloro y que no mancha es virtualmente inodoro a la vez que imparte suave emolencia a las emulsiones sin ser pegajoso ni aceitoso. Su insolubilidad en agua lo hace de elección natural para formulaciones de filtros solares resistentes al agua.

Solubilidad.

Soluble al 5% a 25° C en aceite de cacahuete, aceite mineral, alcohol etílico al 95%, alcohol etílico puro, polietilén glicol, aceite de castor, miristrato de isopropilo,

ciclotricona. Insoluble en agua, glicerina, propilenglicol, sorbitol 70%, alcohol etílico 70%.

HLB requerido. de 6-8.

Punto de ebullición. A 1 mbar 185-195^o, a 0.1 mbar 140-150^o.

Clasificación. Absorbente químico de radiación UV-B.

Categoría e incompatibilidad.

Escalol[®] 557 es un filtro solar categoría 1 UV-B que no mancha, con amplia aceptación y amplia compatibilidad con la mayoría de los ingredientes cosméticos.

Seguridad.

Puede utilizarse con plena confianza ya que no es mutagénico en la prueba de Ames y presenta un excelente perfil de seguridad.

Algunas propiedades fisicoquímicas

Especificación	Descripción
Gravedad específica 25 ^o C	1.005-1.013
Índice de acidez	1 máx
Índice de saponificación	189 mín
Índice de refracción	1.5420-1.5480
Pureza	98% mín

COMPRITOL 888 ATO®**Descripción.**

Está compuesto por una mezcla de ácidos grasos principalmente Dibehenato de glicerilo pulverizado, fabricado con materiales de estricto origen vegetal.

Usos.

En el área farmacéutica se utiliza como lubricante para tabletas y cápsulas (de 1-3%), como matriz lipofílica para liberación de sustancias en tabletas y cápsulas (mayor al 10%), agente enlazante para compresión directa.

En el área cosmética como agente viscosante para las fases oleosas (1-5%) en emulsiones w/o ó o/w (a un 10-15% para geles de silicón), como agente compactante para polvos compactos, mejora la estabilidad a la temperatura de las emulsiones y permite a los químicos gelificar todo tipo de aceites (5-15%).

Estabilidad.

Prevenir la exposición al aire, luz, calor y humedad. Almacenar por abajo de los 35 °C

Toxicidad.

Toxicidad aguda por vía oral (puro): $DL_{50} > 2000$ mg/kg

Iritación ocular reversibilidad (puro): Medianamente irritante

Iritación primaria cutánea y corrosividad (puro): escasamente irritante

Iritación ocular (5% de aceite de nuez): bien tolerado

Solubilidad.

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

Composición y algunas propiedades fisicoquímicas

Especificación	Descripción
Punto de goteo	69-74°C
Índice de Acidez	< 4.00 mg KOH/g
Índice 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 (C24:0)	< 3.0%
Ácido erucico (C22:1)	< 3.0%

GELEOL®

Descripción.

Monoestearato de glicerilo 40-55. Es una mezcla de mono-, di- y tri-glicéridos del ácido esteárico y palmítico. Este contiene al menos 40% y no más de 50% de monoglicéridos (2,3-dihidroxipropil estearato - $C_{21}H_{42}O_4$). Producto de origen vegetal.

Usos.

Agente emulsificante, estabilizante, solubilizante; lubricante en tabletas y cápsulas, emoliente.

Es un emulsificante no-iónico que puede formar emulsiones o/w o w/o. Se usa también como ingrediente de tabletas de liberación sostenida de fármacos.

Toxicidad.

Ratones administrados vía IP: $DL_{50} = 0.2g/kg$

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
Apariencia	Sólido ceroso
Punto de goteo	54.5-58.5 °C
HLB *	3.8
Índice de Acidez	< 3.0 mg KOH/g

Índice de saponificación	158 a 177 mg KOH/g
Índice de yodo	<3.0g 12/100
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%

GELUCIRE 44/14®

Descripción.

Es una mezcla bien definida de mono, di y triglicéridos y de diésteres de ácidos grasos del polietilenglicol. Su origen es vegetal y petroquímico.

Usos.

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. Permite la formulación de formas farmacéuticas sólidas con activos líquidos.

Toxicidad.

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

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

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.

Composición y algunas propiedades fisicoquímicas.

Especificación	Descripción
Punto de goteo	42.5 a 47.5°C
Índice de Acidez	< 2.00 mg KOH/g
Índice de saponificación	79 a 93 mg/kg
Índice de yodo	<2g 12/100g
Índice de peróxido	<6.0 meq O ₂ /kg
Impurezas alcalinas	<80 ppm NaOH
Contenido de agua	< 0.5 %
Contenido de glicerol libre	< 3 %
Ácido caprílico (C8)	< 15 %
Ácido cáprico (C10)	< 12 %

Ácido láurico (C12)	30 a 50 %
Ácido mirístico (C14)	5 a 25 %
Ácido palmítico (C16)	4 a 25 %
Ácido esteárico (C18)	5 a 35 %

GELUCIRE 50/13®**Descripción.**

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. Su origen es vegetal y petroquímico.

Usos.

Se usa como excipiente para cápsulas de gelatina dura, mejora 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.

Toxicidad.

Toxicidad aguda por vía oral en ratas: $DL_{50} > 20$ g/kg

Solubilidad.

Soluble en cloroformo y cloruro de metileno; en agua es dispersable y es insoluble en etanol (96°) y en aceites minerales.

Composición y algunas propiedades fisicoquímicas.

Especificación	Descripción
Punto de goteo	46.0 a 51.0 °C
Índice de Acidez	< 2.00 mg KOH/g
Índice 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 %

POLIVINIL ALCOHOL) MOWIOL® 4-88

Nombre químico. Etanol Homopolimero

Fórmula Química. $(C_2H_4O)_n$

Peso molecular. 26000 g/mol

Descripción.

Es un polimero sintético soluble en agua. El valor de n para materiales comercialmente disponibles esta entre 500-5000, equivalente al rango de peso molecular en aproximadamente 30 000 a 200 000. Es inodoro, de color blanco a crema y tiene forma de polvo granular.

Categoría funcional.

Agente de recubrimiento, lubricante, agente estabilizante y como agente para incrementar viscosidad.

Solubilidad.

Soluble en agua, insoluble en solventes orgánicos. Su disolución requiere de una dispersión del sólido en agua a temperatura ambiente seguida de un calentamiento a aproximadamente 90° C por aproximadamente 5 min.

Seguridad.

Es considerado como un material no tóxico. Este material no irrita la piel ni los ojos a concentraciones mayores a 10% y a concentraciones mayores del 7% son utilizadas en cosméticos.

Estudios en ratas han demostrado que una solución acuosa al 5% de PVAL inyectada subcutáneamente puede causar anemia.

La LD₅₀ para ratones y ratas administradas por vía oral es 14.7 g/kg y >20 g/kg respectivamente.

Algunas propiedades fisicoquímicas

Especificación	Descripción
Gravedad específica 25 ^o C	1.19-1.31 para el sólido 1.02 para una soln. al 10% p/v
pH (4% soln acuosa)	5.0-8.0
Sustancias insolubles en agua	≤ 0.1 %
Viscosidad (dinámica)	4-7 mpas (4% p/v)

POLOXÁMERO 188 Y 407 (PLURONIC® F-68 y F-127)**Descripción.**

Los poloxámeros generalmente son gránulos blancos y cerosos, prácticamente insaboros e inodoros. Se utilizan como agentes dispersantes, emulsificantes y coemulsificantes, como agentes solubilizantes, lubricantes de tabletas y como agentes humidificantes.

Nombre químico.

α -Hidro- ω -hidroxipoli(oxietileno)poli(oxipropileno)poli(oxietileno)copolimero

Fórmula empírica y peso molecular.

Para poloxámero 188 los valores de a y b son 80 y 27 respectivamente y el peso molecular es de 7680-9510.

Para poloxámero 407 los valores de a y b son 101 y 56 respectivamente y el peso molecular es de 9840 -14 600.

Aplicaciones farmacéuticas.

Los poloxámeros son copolímeros no iónicos de polioxietileno-polioxipropileno utilizados primariamente en formulaciones farmacéuticas como agente emulsificante o solubilizante. El segmento polioxietileno es hidrofílico mientras que el segmento polioxipropileno es hidrofóbico. Todos los poloxámeros son en composición similares químicamente, difieren únicamente en lo relativo a las cantidades de óxidos de propileno y etileno adicionados durante su manufactura. Sus propiedades físicas y de superficie activa varían sobre un rango ancho.

Son utilizados como agentes emulsificantes en emulsiones de aceite para dosificarse en forma intravenosa y como agentes solubilizantes y estabilizantes para mantener la transparencia de elixires y jarabes. También son utilizados como agentes de mojado en ungüentos, bases para supositorios, geles y como aglutinante y recubrimiento en tabletas.

Poloxámero 188 es también utilizado como agente emulsificante para fluorocarbonos utilizados como sustitutos de sangre artificial y en la preparación de sistemas de dispersiones sólidas. Terapéuticamente es administrado por vía oral como agente de humectante y lubricante en el tratamiento de la constipación.

El poloxámero 407 es utilizado en soluciones para el cuidado de los lentes de contacto.

Solubilidad.

El poloxámero 188 es fácilmente soluble en etanol 95% y en agua al igual que el poloxámero 407, este último también es soluble en propan-2-ol

Incompatibilidades.

Poloxámero 188 es incompatible con fenoles y parabenos.

Seguridad.

Los poloxámeros son utilizados en una variedad de formulaciones farmacéuticas orales, parenterales y tópicas y generalmente reconocidas como materiales no tóxicos y no irritantes para el cuerpo.

Estudios de toxicidad en animales con perros y conejos han demostrado que los poloxámeros son no irritantes y no sensibilizantes cuando se aplican a concentraciones del 5% y 10% p/v, en los ojos, encías y piel.

POLISORBATO 80 (Tween® 80)**Descripción.**

Los polisorbatos tienen un olor característico y con sabor amargo. El polisorbato 80 es un líquido amarillento a 25° C.

Nombre químico.

Polioxietilen 20 sorbitan monooleato

Fórmula empírica y peso molecular.

$C_{64}H_{124}O_{28}$, y un peso molecular de 1310 g/mol

Aplicaciones farmacéuticas.

Los polisorbatos son series parciales de ésteres ácidos grasos de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con aproximadamente 20, 5 o 4 moles de óxido de etileno por cada mol de sorbitol y sus anhídridos. El producto resultante es por eso una combinación de moléculas de varios tamaños que forman una mezcla de un químico simple.

Los polisorbatos contienen 20 unidades de oxietileno que son surfactantes hidrofílicos no iónicos los cuales son utilizados extensamente como agentes emulsificantes en la preparación de emulsiones farmacéuticas o/w estables. También pueden ser utilizadas como agentes solubilizantes para una variedad de sustancias incluyendo aceites esenciales y vitaminas solubles en aceites, también como agentes humectantes en la formulación de suspensiones orales y parenterales.

Solubilidad.

El polisorbato 80 es fácilmente soluble en etanol y agua es insoluble en aceite mineral y aceite vegetal.

Incompatibilidades.

La decoloración y/o precipitación con varias sustancias especialmente fenoles, taninos, alquitrán y/o materiales parecidos al alquitrán. La actividad antimicrobiana de los parabenos es reducida con la presencia de polisorbatos.

Seguridad.

Los polisorbatos son ampliamente utilizados en cosméticos, productos alimenticios y en una variedad de formulaciones farmacéuticas orales, parenterales y tópicas y generalmente reconocidas como materiales no tóxicos y no irritantes para el cuerpo. Ha habido reportes ocasionales de irritación e hipersensibilidad después de una administración tópica.

Los polisorbatos han sido asociados con varios efectos adversos serios, incluyendo algunas muertes.

DL₅₀ (ratón oral) = 25 g/kg. Existe una toxicidad moderada por administración IV, medianamente tóxico por ingestión. Irritación ocular.

Valores característicos:

Especificación	Descripción
Índice de acidez (mg KOH/g)	≤ 2.2
Índice de yodo (g I ₂ /100g)	18-24
Índice de saponificación (mg KOH/g)	45-55
Contenido de humedad	3.0
Índice de hidroxilo (mg KOH/g):	65-80
Valor HLB	10.0
Agua (%):	≤ 3.0 %
Densidad a 20 ^o C (g/cm ³)	1.08
Viscosidad a 20 ^o C (mPas • s)	425
Metales pesados (ppm)	≤ 0.001%
Cenizas totales (%)	≤ 0.25 %

IX. REFERENCIAS

1. F. Chavez, B.I. Olvera, A. Ganem, D. Quintanar, Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas, *Rev. Soc. Quím. de México*, 4 (2002) 349-356
2. R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Solid Lipid nanoparticles for controlled drug delivery –a review of state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50 (2000) 161-177
3. D. Quintanar Étude de nouvelles techniques d'obtention de suspensions de nanoparticules à partir de polymères préformés. Tesis Doctoral. Universidad de Génova. 1997b
4. A. R. Genaro, Remington farmacia, Tomo II, Ed Médica Panamericana, 19 Ed. Argentina 1999
5. W. Mehenert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles, characterization and applications, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 47 (2001) 165-196
6. J.C.,Leroux, E. Allémann, E. Doelker, R. Gurny, New approach for the preparation of nanoparticles by Emulsification – Diffusion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41(1) (1995) 14-18
7. D.Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allémann, E. Doelker, Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, 143 (1996) 133-141
8. O. Thioune, H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant, *Int. J. Pharm.*, 146 (1997) 233-238
9. D. Quintanar-Guerrero, E. Alléman, H. Fessi, E. Doelker, Pseudolatex preparation using novel emulsion-diffusion method involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation, *Int. J. Pharm.*, 188 (1999) 155-164

10. F. Delie, et al, Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide in the poly(D,L-lactic acid) particles, *Int. J. Pharm.*, 214 (2001) 25-30
11. H. Y. Kwon, J.Y. Lee, S.W. Choi, Y. Jang, J.H. Kim, Preparation of PLGA nanoparticles containing strogen by emulsification-difusion method, *Colloids and Surfaces A*, 182 (2001) 123-130
12. S. Guinebretiere, S. Brianon, H. Fessi, V.S. Teodorescu, M.G. Blanchin, Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy, *Materials Science and Engineering C*, 21 (2002) 137-142
13. S. Wook, H.Y. Kwon, W.S. Kim, J.H. Kim, Thermodynamic parameters on poly (D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process, *Colloids and Surfaces*, 201 (2002) 283-289
14. F.Q. Hu, H. Yuan, H.H. Zhang, M. Fang, Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization, *Int. J. Pharm.*, 239 (2002) 121-128
15. Y. Niamen, R. Cerny, J. Favet, M. Berton, R. Gurny, E. Allemann, Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin loaded nanoparticles for photodynamic therapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55 (2003) 115-124
16. P. Ahlin, J. Kristl, M. Sentjure, J. Strancar, S. Pecar, Influence of spin probe structure on its distribution on SLN dispersions, *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 241-244
17. B. Sjöström, B. Bergenstahl, Preparation of submicron drug particles in lecitin - stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int J. Pharm.*, 88 (1992) 53-62
18. B. Siekmann, K. Westensen, Investigations on Solid Lipid Nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (1996) 104-109

19. M. R. Gasco, Method for producing Solid Lipid Microspheres having a narrow size distribution. USA Patent 1993 USS 188 837
20. R. Cavalli, O. Caputo, M.E. Carlotti, M. Trotta, C. Scamecchia, M.R. Gasco, Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loading solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 148 (1997) 47-54
21. R. Cavalli, O. Caputo, M.R. Gasco, Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel, *Eu. J. of Pharm. Sciences*, 10 (2000) 305-309
22. R. H. Müller, S. Maassen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes, *J. Controlled Release*, 47 (1997) 261-269
23. M. Igartua, P. Saulnier, B. Heurtault, B. Pech, J.E. Proust, J.L. Pedraz, J.P. Benoit, Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite, *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 149-157
24. E. Zimmermann, R. H. Müller, Electrolyte - and - pH stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 52 (2001) 203-210
25. S. A. Wissing, R. H. Müller, Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, *J. Controlled Release*, 81 (2002) 225-233
26. A. V. Heydenreich, R. Westmeier, N. Pedersen, H.S. Poulsen, H.G. Kristensen, Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres-effects on particle size, physical stability and cell toxicity, *Int. J. Pharm.*, 254 (2003) 83-87
27. M. Trotta, F. Debernardi, O. Caputo, Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, 257 (2003) 153-160
28. R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, 242 (2002) 121-128

29. D. Tamayo, Preparación de dispersiones lipídicas de talla submicrónica por medio del método de emulsificación - difusión, Tesis de maestría, UNAM (2005)
30. D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allemann, E. Doelker, Influence of stabilizing agent and preparative variables on the formation of poly (D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm* 143 (1996) 133-141
31. J. L. Villa, *Tecnología Farmacéutica Vol II: Formas Farmacéuticas*, Síntesis, Madrid, 2001, pp 432-433
32. D. Hou, C. Xie, K. Huang, C. Zhu, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs), *Biomaterials*, 24 (2003) 1781-1785
33. V. Jennings, K. Mäder, S.H. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study, *Int. J. Pharm.*, 205 (2000) 15-21
34. V. Jennings, A.F. Thünemann, S.H. Gohla, Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, *Int. J. Pharm.*, 199 (2000) 166-177
35. P. Shahgaldian, J. Gualbert, K. Aïssa, A.W. Coleman, A study of freeze-drying conditions of calixarene based on solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 55 (2003) 181-184
36. F. Dalencon, Y. Amjaud, C. Lafforgue, F. Derouin, H. Fessi, Atavacuone and rifabutine - loaded nanocapsules: formulation studies, *Int. J. Pharm.*, 153 (1997) 127-130
37. V. Jennings, S. Gohla, Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN[®]), *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 219-222
38. C. Freitas, R. H. Müller, Correlation between long - term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 47 (1999) 125-132
39. C. Freitas, R. H. Müller, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions, *Int. J. Pharm.*, 168 (1998) 221-229

40. N. C. Perkins, C. M. Heard, In vitro dermal and transdermal delivery of doxycycline from ethanol/migliol 840 vehicles, *Int. J. Pharm.*, 190 (1999) 155-164
41. A. Lippacher, R.H Müller, K. Mäder, Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers, *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 227-230
42. H. Sah, Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects on its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres, *J. Controlled Release*, 47 (1997) 233-245
43. P. Shahgaldian, E. Da Silva, A.W. Coleman, B. Rather, M. J. Zaworotko, Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters, *Int. J. Pharm.*, 253 (2003) 23-38
44. K. Westensen, H. Bunjes, M.H.J.Koch, Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained drug release potential, *J. of Controlled Release*, 48 (1997) 223-236
45. M. A. Shubert, C.C. Müller-Goymann, Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55 (2003) 125-131
46. B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier, J.E. Proust, R. Phan, J.P. Benoit, The influence of lipid nanocapsule on their size distribution, *Eur. J. Pharm. Sciences.*, 18 (2003) 55-61
47. S. A. Wissing, R. H. Müller, Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 254 (2003) 65-68
48. G. Yener, et al., Importance of using solid lipid microspheres as carriers UV filters on the example octyl methoxy cinnamate, *Int. J. Pharm.*, 258 (2003) 203-207
49. J. Kristl, et al., Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR, *Int. J. Pharm.*, 256 (2003) 133-140
50. K. Westesen, B. Siekmann, Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 151 (1997) 35-45

51. A. J. Almeida, S. Runge, R.H. Müller, Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence production parameters, *Int. J. Pharm.*, 149 (1997) 255-265
52. A. Lippacher, R.H. Müller, K. Mäder, Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 214 (2001) 9-12
53. N. Schöler, et al., Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct nor indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages, *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 235-239
54. A. Mühlen, et al., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- Drug release and release mechanism, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45 (1998) 149-155
55. C. Santos, et al., Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 165-167
56. M. Berton, et al., Uptake of oligonucleotide-loaded nanoparticles in prostatic cancer cells and their intracellular localization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 47 (1999) 119-123
57. E. Ugazio, R. Cavalli, M.R. Gasco, Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 241 (2002) 341-344
58. Handbook of pharmaceutical Excipients, Third edition, Edited by Arthur H. Kibbe, American Pharmaceutical Association (APhA), Washington DC. USA. 2000