



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Desarrollo, caracterización y optimización de un  
sistema de nanopartículas lipídicas sólidas con  
ácido glicirricínico**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN FARMACIA**

P R E S E N T A:

**BRENDA ARISTA TERRAZAS**

ASESOR:

**Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNAM  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo, caracterización y optimización de un sistema de nanopartículas lipídicas sólidas con ácido glicirricínico.

Que presenta la pasante **Brenda Arista Terrazas**

Con número de cuenta: 311285291 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Septiembre de 2018.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
<b>VOCAL</b>	Dr. David Quintanar Guerrero	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Brígida del C. Camacho Enríquez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. Julio Cesar Botello Pozos	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/jav

---

## AGRADECIMIENTOS

A **la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por mi formación académica recibida desde el bachillerato en el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Azcapotzalco hasta la Licenciatura en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, permitiéndome pertenecer a la máxima casa de estudios.

A los proyectos **PAPIIT-2019143, CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940 y PIAPI 001** por el financiamiento otorgado durante la realización de este trabajo de investigación.

Al **Dr. David Quintanar Guerrero**, por todo el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo y por compartir sus conocimientos en mi formación profesional, por lo cual le agradezco y tiene mi más sincero respeto y admiración.

Al **M. en C. Oscar Escalona Rayo**, por ayudarme y estar al pendiente durante la realización de este trabajo aportándome ideas y observaciones que contribuyeron para lograr los objetivos de esta investigación lo cual agradezco.

A **la M. en C. Samantha Jardón Xicoténcatl** del Laboratorio Biología Celular y Morfología Veterinaria, UNAM-FES Cuautitlán, por ser la precursora de esta investigación aportándome los conocimientos y habilidades necesarios para realizarla y por la confianza que me brindó. También agradezco su ayuda e interés en cada una de las actividades que realice durante esta investigación.

A los miembros de mi jurado, **DESS Rodolfo Cruz Rodríguez, Dr. David Quintanar Guerrero, Q.F.B Brígida del C. Camacho Enríquez, Dr. Julio César Botello Pozos y L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez**, por tomarse el tiempo de revisar y aportar valiosas observaciones a este trabajo.

A **la M. en C. Sofía González Galardo** por el apoyo proporcionado en los estudios de Microscopía Electrónica de Barrido.

---

Al **Ing. Draucin Jiménez Celi** encargado del Taller de soplado de vidrio de la FES-C. Por su apoyo técnico para la fabricación de algunos materiales de vidrio utilizados en este trabajo.

**A mis compañeras y compañeros** del Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo, por permitirme tener una estancia amena en el laboratorio y por ayudarme cuando lo necesitaba.

**A mis familiares** que con cada una de sus palabras me motivaban a seguir adelante. Son un gran apoyo, los quiero mucho.

A **Eileen Arias Ruíz**, por su amistad y apoyo incondicional, por sus palabras de aliento en los momentos indicados las cuales me animaban a seguir adelante, por estar conmigo en momentos importantes, por estar al pendiente de la realización de este trabajo y decirme que yo podía. Gracias por motivarme con tus bellas palabras, te quiero mucho mejor amiga.

A **Iván Muñoz Martínez** por su cariño, comprensión y amor que me ha brindado todo este tiempo, por permitirme compartir esta etapa de mi vida a su lado apoyándome y motivándome en todo momento. Gracias por todo, te amo.

---

## DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo con todo mi cariño y amor **a mi mamá Noemí Terrazas Sánchez** y a **mi papá Carlos Arista García** porque gracias a ellos ha sido posible la culminación de mis estudios profesionales. Gracias por hacer de mí la persona que soy, por estar a mi lado durante toda mi vida apoyándome, motivándome y dedicándome su tiempo, amor, cariño, confianza y sabiduría, han sido mis pilares y mi motor para seguir adelante y no rendirme ante cualquier adversidad, voy a estar agradecida con ustedes toda mi vida por su apoyo incondicional. Soy muy afortunada en tener unos papás como ustedes, los amo.

**A mi hermana Pamela Arista Terrazas**, por estar siempre a mi lado apoyándome en todo lo que necesito, ayudándome a lograr lo que me propongo, y motivándome para ser una mejor persona. Gracias por estar siempre para mí, sé que cuento contigo para todo, así como tú cuentas conmigo. Eres una persona admirable, te quiero mucho.



---

---

3.2.2.2	Potencial zeta .....	20
3.2.2.3	Calorimetría Diferencial de Barrido .....	21
3.2.2.4	Morfología .....	22
3.2.2.5	Eficiencia de carga del fármaco .....	23
IV.	JUSTIFICACIÓN .....	24
V.	HIPÓTESIS.....	25
VI.	OBJETIVOS.....	26
6.1	Objetivo General .....	26
6.2	Objetivos particulares .....	26
VII.	MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	27
7.1	Materiales, equipos e instrumentos.....	27
7.1.1.	Materiales.....	27
7.1.2.	Equipos e instrumentos.....	27
7.2	Diagrama de flujo del procedimiento experimental.....	28
7.3	Preparación de SLN por el método homogeneización con rotor estator .....	29
7.4	Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	30
7.4.1	Tamaño de partícula e índice de polidispersión .....	30
7.4.2	Potencial zeta .....	30
7.4.3	Eficiencia de adsorción.....	30
7.4.4	Evaluación de las interacciones de las nanopartículas optimizadas .....	31
7.4.5	Morfología de las nanopartículas optimizadas .....	31
7.4.6	Estabilidad de las nanopartículas optimizadas.....	31
7.4.6.1	Estabilidad de almacenamiento .....	32
7.4.6.2	Estabilidad con Turbiscan.....	32
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33

---

---

8.1	Preparación y optimización de las nanopartículas.....	33
8.1.1	Tamaño de partícula .....	38
8.1.2	Índice de polidispersión .....	39
8.1.3	Potencial zeta .....	40
8.1.4	Eficiencia de adsorción.....	42
8.2	Caracterización de las nanopartículas optimizadas .....	44
8.3	Estabilidad de las nanopartículas.....	48
8.3.1	Estabilidad de almacenamiento .....	49
8.3.2	Estabilidad con Turbiscan .....	51
IX.	CONCLUSIONES.....	57
X.	PERSPECTIVAS.....	58
XI.	REFERENCIAS.....	59
XII.	ANEXOS .....	63
12.1.	Propiedades fisicoquímicas .....	63
12.1.1.	Propiedades del AG .....	63
12.1.2.	Propiedades del Pluronic F-127 (Poloxámero 407) .....	64
12.1.3.	Propiedades del Gelucire 44/14.....	65
12.1.	Selección de la longitud de onda .....	66
12.2.	Interferencia.....	66
12.2.	Validación del método analítico para cuantificar ácido glicirricínico en las nanopartículas mediante Espectrofotometría UV-Vis .....	67
12.3.	Estabilidad de las nanopartículas optimizadas.....	71

---

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Glycyrrhiza glabra</i> .....	3
Figura 2. Estructura molecular del ácido glicirricínico .....	5
Figura 3. Representación esquemática de la morfología de las nanopartículas.....	10
Figura 4. Tamaño esquemático de los nanosistemas y otras moléculas. ....	11
Figura 5. Representación esquemática de una nanopartícula lipídica sólida (SLN). ....	14
Figura 6. Termograma de materias primas y de SLN placebo y con fármaco. ....	22
Figura 7. Desarrollo experimental para la elaboración de SLN cargadas con AG.....	28
Figura 8. Representación esquemática del proceso de elaboración de las SLN.....	29
Figura 9. Principio de medición de Turbiscan Classic. ....	32
Figura 10. Mezcla de AG + Gelucire 44/14 con temperatura.....	34
Figura 11. Mezcla de AG + Gelucire 44/14 + Poloxámero 407 sin temperatura.....	34
Figura 12. Formulaciones con 1.5 g de AG, 5g de Gelucire 44/14 y cantidad variada de Poloxámero 407. ....	36
Figura 13. Formulaciones con 1.0 g de AG, 5 g de Gelucire 44/14 y cantidad variada de Poloxámero 407. ....	37
Figura 14. Tamaño de partícula de las distintas formulaciones. ....	39
Figura 15. Índice de polidispersión de las formulaciones.....	40
Figura 16. Potencial zeta de las formulaciones.....	41
Figura 17. Eficiencia de adsorción de las formulaciones. ....	43
Figura 18. Micrografía MEB de las SLN optimizadas. En donde A= 3500x, B=5000x y C=8000x.....	45
Figura 19. Termogramas obtenidos por DSC de los componentes puros y formulados en las nanopartículas optimizadas. ....	47
Figura 20. Variación de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad de almacenamiento. Promedio $\pm$ error estándar (n=3).....	51
Figura 21. Prueba agua en Turbiscan Classic. En donde 1) Parte del fondo de la celda, 2) Parte de en medio, 3) Parte superior y 4) Menisco. ....	53

---

---

Figura 22. Perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 1 de SLN optimizadas. Los perfiles se evaluaron en diferentes tiempos de almacenamiento: (A) día 1; (B) día 5; (C) día 10; (D) día 15; (E) día 20 y (F) día 30.....	54
Figura 23. Perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 2 de SLN optimizadas. Los perfiles se evaluaron en diferentes tiempos de almacenamiento: (A) día 1; (B) día 5; (C) día 10; (D) día 15; (E) día 20 y (F) día 30.....	55
Figura 24. Perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 3 de SLN optimizadas. Los perfiles se evaluaron en diferentes tiempos de almacenamiento: (A) día 1; (B) día 5; (C) día 10; (D) día 15; (E) día 20 y (F) día 30.....	56
Figura 25. Espectro de absorción del ácido glicirricínico. ....	66
Figura 26. Espectro de absorción del ácido glicirricínico, excipientes y Lote 1 SLN para descartar interferencias. ....	66
Figura 27. Gráfico que representa la linealidad del sistema .....	68
Figura 28. Gráfico que representa la precisión del sistema. ....	70

---

---

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividades o efectos terapéuticos del ácido glicirricínico.....	6
Tabla 2. Comparación de NPP y SLN.....	13
Tabla 3. Estabilidad de suspensiones en base a su Potencial Z .....	20
Tabla 4. Comportamientos térmicos observados por Calorimetría Diferencial de Barrido. ....	21
Tabla 5: Variables de respuesta observadas en las formulaciones de las nanopartículas.....	35
Tabla 6. Resultados obtenidos de la cuantificación de AG en la SLN .....	44
Tabla 7. Características fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas.....	44
Tabla 8. Adecuabilidad del sistema.....	67
Tabla 9. Coeficientes y límites del intercepto (b) y pendiente (m). .....	68
Tabla 10. Coeficientes de variación y prueba t de student calculadas para evaluar la precisión y exactitud del sistema.....	69
Tabla 11. Resultados obtenidos para los parámetros de desempeño de la validación. ....	71
Tabla 12. Análisis de varianza para las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad. ....	71

---

## ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Ácido glicirricínico
ARN	Ácido ribonucleico
BS	Retrodispersión
cm	Centímetros
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DLS	Dispersión Dinámica de la Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ec.	Ecuación
E.A	Eficiencia de adsorción
IP	Índice de polidispersión
m	Metros
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolt
NL	Nanopartículas lipídicas
nm	Nanómetros
NPP	Nanopartículas poliméricas
NPs	Nanopartículas

---

SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SLN	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
T	Transmisión
T <sub>c</sub>	Temperatura de cristalización
T <sub>f</sub>	Temperatura de fusión
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
TP	Tamaño de partícula
UV- vis	Ultravioleta- visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Ψ <sub>z</sub>	Potencial zeta
μm	Micrómetros

---

## I. RESUMEN

El ácido glicirricínico, que es el ingrediente activo más importante extraído de la raíz de regaliz, se ha utilizado como un agente terapéutico potencial para varias enfermedades, por ello, es importante desarrollar nuevos diseños en la tecnología del suministro o de los sistemas de administración de sustancias activas. En este trabajo se prepararon Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN por sus siglas en inglés, *Solid Lipid Nanoparticles*), mediante el método de homogeneización con rotor estator a concentraciones variables de ácido glicirricínico y de estabilizante (Poloxámero 407), para poder caracterizarlas y optimizar el método. Se caracterizaron de acuerdo al tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de adsorción (%), morfología y comportamiento térmico. La preparación de SLN se optimizó mediante las variables de formulación de tensoactivo y AG para obtener la formulación con mayor eficiencia de adsorción del fármaco y alta estabilidad. También se revisaron aspectos de almacenamiento a diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 40°C) y mediante análisis de dispersión de luz múltiple con la ayuda de Turbiscan Classic durante 1 mes. La cuantificación del fármaco se realizó mediante la técnica de Espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 256 nm. Se obtuvieron SLN con un tamaño de partícula en un intervalo de 89-330 nm, potencial zeta de 16-25 mV, una eficiencia de adsorción menor al 25 % dependiendo de las concentraciones de estabilizante y de fármaco, la formulación optimizada fue estable en cuanto a tamaño de partícula e índice de polidispersión, sin embargo, de acuerdo al potencial zeta mostro una variación significativa después de un mes en almacenamiento. En el análisis de dispersión de luz múltiple se observaron pequeñas variaciones en el tamaño de partícula lo que se concluye como tendencia a coalescencia. Se logró desarrollar, caracterizar y optimizar una formulación de SLN con ácido glicirricínico como una alternativa de nanotransportador el cual podría tener importantes implicaciones en el tratamiento de distintas enfermedades.

---

## II. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el regaliz es una de las plantas medicinales más populares y antiguas en el mundo y cuenta con una variedad de estudios farmacológicos y clínicos. Dichos estudios se realizan con el extracto completo, con extractos desglicirricinados o con algunos principios activos aislados. El principal componente de la raíz de regaliz es una saponina triterpenoide llamada ácido glicirricínico (AG), que desde hace tiempo se le atribuyen efectos farmacológicos como la actividad antiulcerosa, antiinflamatoria, antiviral, antiespasmódica, antioxidante, antialérgica, antidiabética, anticancerígena, antidepresiva, hepatoprotectora, expectorante y en el mejoramiento de la memoria [1].

Durante las últimas décadas, las nanopartículas han sido ampliamente investigadas en el área farmacéutica como sistemas de liberación de principios activos, principalmente, debido a que pueden mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y el direccionamiento de fármacos a un sitio blanco. Asimismo, las NP ofrecen ventajas como potenciar la absorción del fármaco en el tejido diana, reducir los efectos adversos y disminuir la dosificación [2].

A principios de los años 90's, distintos grupos de investigación centraron su atención en una alternativa de preparar las nanopartículas, esta vez hechas de lípidos sólidos, surgiendo así las Nanopartículas Lipídicas Sólidas. Las ventajas que presentan las SLN, con respecto a otros sistemas coloidales, son: alta estabilidad física, capacidad para proteger fármacos lábiles a la degradación, alta tolerancia por parte del organismo para el transporte de fármacos altamente liposolubles, fácil escalamiento, entre otras [3].

Los objetivos principales de este trabajo de investigación fueron desarrollar, caracterizar y optimizar nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con ácido glicirricínico mediante el método de homogeneización con rotor estator para lograr un sistema de transporte alternativo con diversas propiedades farmacológicas.

---

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Ácido glicirricínico

##### 3.1.1 Generalidades

Regaliz u orozus (*Glycyrrhiza glabra* L.) es una leguminosa arbustiva que se encuentra principalmente en regiones subtropicales donde crece de manera silvestre y también bajo condiciones de cultivo. El nombre genérico *Glycyrrhiza* se deriva de los términos griegos *Glykos* que significa dulce y *Rhiza* que significa raíz, “raíz dulce”, mientras que *glabra* alude la ausencia de *Tricomas*. [1].

Se trata de una especie herbácea perenne, de la familia de las fabaceas. Puede alcanzar hasta 1.5 m de altura, su raíz y rizoma, aunque están muy desarrollados no suelen presentar ramificaciones [3]. Presenta tallos erguidos con hojas alternas e imparipinnadas con aproximadamente 13 folíolos ovales (siempre un número impar). Las flores de color azul o púrpura crecen en inflorescencias en racimo, alargados y erguidos. Los frutos en vaina contienen de una a cuatro semillas, pequeñas y arriñonadas (Figura 1).



**Figura 1. *Glycyrrhiza glabra* L.**

La raíz de esta planta es cilíndrica, succulenta, flexible, de rápido crecimiento y sabor dulce. Su corteza es de color marrón grisáceo y está estriada longitudinalmente. Internamente, la

---

---

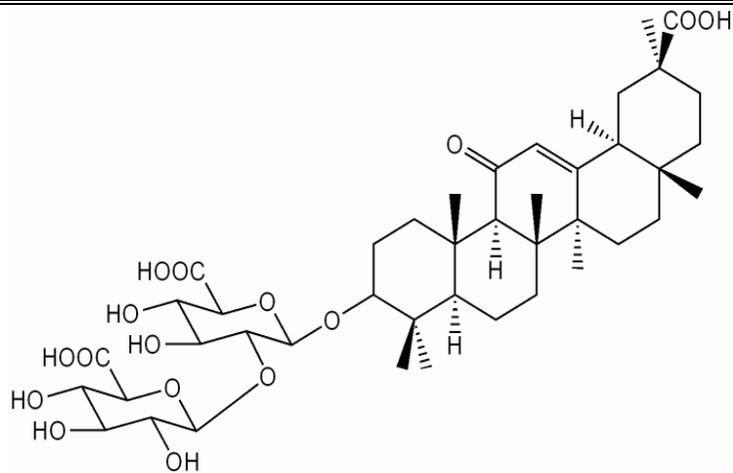
raíz es de color amarillo, la fractura es granulosa y fibrosa. Crece especialmente en terrenos arenosos, cercanos a alguna corriente de agua y es raro encontrarla a más de 50 m de una zona húmeda [4].

La composición aproximada de la raíz de regaliz tiene un 20% de humedad, 5 – 24% de glicirricina (considerado el componente mayoritario), 3 – 16% de azúcares, 30% de almidón y 6% de ceniza [3].

La extracción de la glicirricina a partir de la raíz de regaliz es mediante la maceración de la raíz en agua caliente. En 1907, Tschirch y Cederberg aislaron glicirricina cristalina y describieron sus propiedades físicas y sensoriales. El compuesto libre se caracteriza por presentar un sabor dulce intenso, además la sal de potasio y amonio también son dulces, por lo que se les emplea en confitería. La forma ácida no es soluble en agua, pero su sal de amonio es soluble en agua a un pH mayor a 4.5 [3].

El principal componente de la raíz de regaliz es una sapogenina triterpenoide llamada ácido glicirricínico (AG) ilustrado en la Figura 2, que desde hace tiempo se le conciben los efectos farmacológicos de esta planta; sin embargo, el efecto antiulceroso del extracto de regaliz se atribuye a las fracciones libres de ácido glicirricínico abundantes en flavonoides. Este hallazgo comprobó que los flavonoides también forman parte de las actividades farmacológicas del extracto. Por lo tanto, las saponinas y flavonoides son considerados los mayores componentes bioactivos del regaliz [4].

Químicamente el ácido glicirricínico (AG) es un glicosano triterpenoide activado a nivel de los grupos carboxilos en las posiciones 5, 10 y 20. Una molécula de ácido glicirretínico y dos moléculas de ácido glucurónico forman la glicirricina, saponina que también se encuentra en el extracto acuoso de *G. glabra*. Como extracto acuoso ha sido usado en medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias y otras de importante relevancia terapéutica [1].



**Figura 2. Estructura molecular del ácido glicirricínico**

Al ser una saponina, tiene facultades emolientes, expectorantes y laxantes [1]; sin embargo, no produce hemólisis en células rojas. Forma geles estables en soluciones acuosas y posee excelentes cualidades de dispersión, por lo que se ha sugerido que la glicirricina podría servir como un vehículo eficiente de fármacos [4].

### **3.1.2 Actividad farmacológica**

El uso de la planta regaliz, de donde proviene el ácido glicirricínico, es muy antiguo. se tienen registros de ésta en el Código Hamurabi del año 2100 a. C. Los asirios la ocupaban para el alivio de dolores reumáticos y de otro tipo. La cultura china también conocía los beneficios de esta planta, pues en un escrito llamado “Shen nung Pen t’sao King” el primero de sus tratados sobre herbolaria se incluye al regaliz en la lista de drogas de primera clase que se recomendaban por sus propiedades para prolongar el tiempo y calidad de vida del humano [5].

Posteriormente cuando se extendió la fama de esta planta desde Mesopotamia, los griegos como Hipócrates, Teofrasto y después Cayo Plinio Segundo reportaron su efecto curativo en las úlceras. De manera relevante, generaciones sucesivas de médicos o herbolarios se vieron influenciados por los escritos de Dioscórides, por mencionar algunos el

farmacognoscista árabe Ibn Baithar (siglo XIII), Conrad von Mungenberg (siglo XIV) y Paracelso, Gerard, Mattiolo y Culpepper (siglos XVI y XVII). Así que esta planta y los compuestos que se obtienen de ella son ampliamente empleados aún en nuestros días en la medicina tradicional de diversas culturas [3].

El regaliz es una de las plantas medicinales que cuenta con mayor número de estudios farmacológicos y clínicos. Dichos estudios se realizan con el extracto completo, con extractos desglicirricinados o con algunos principios activos aislados; en la mayoría de las ocasiones se ha visto que la actividad farmacológica estudiada es mayor en los extractos completos que en los componentes aislados, por lo que la acción global del regaliz probablemente se debe al conjunto de los diferentes principios activos [6].

Los diversos usos que se le da, ya sea a las raíces de esta planta sola o en combinación con otros componentes son: antiulceroso, expectorante, analgésico, colagogo, antiséptico, despigmentante, antioxidante, antialérgico, anticanceroso, antiviral y tónico para tratar afecciones en los pulmones, tracto respiratorio, estómago, riñones y otros órganos [5].

**Tabla 1. Actividades o efectos terapéuticos del ácido glicirricínico**

<b>Actividad o efecto terapéutico</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Estudios en animales o en líneas celulares</b>
Antiviral (Virus de Marburg varicela zoster, virus de inmunodeficiencia, influenza A, herpes simple 1 y 2, SARS, PRRS, dengue, encefalitis japonesa, fiebre amarilla y Epstein-Barr)	Actúa sobre virus <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , ya que impide la replicación de virus ADN y ARN en un estadio temprano, evitando la salida del virión de su cápside y con esto la penetración en las células.	Células MARC-145 con PRRS. [3]

**Tabla 1. (Continuación) Actividades o efectos terapéuticos del ácido glicirricínico**

<p>Antiulceroso  (Efecto antiúlceras péptica y protector de la mucosa gástrica).</p>	<p>Este efecto se debe principalmente a las saponinas, y a otros principios activos, como los flavonoides. Reduce las secreciones gástricas, con lo que previene la formación de úlceras y el ácido glicirretínico actúa inhibiendo una serie de enzimas del grupo de las deshidrogenasas y reductasas lo que se traduce en un aumento de los valores de prostaglandinas y, en consecuencia, un aumento en la secreción de mucus, de efecto protector y de la proliferación celular de la mucosa gástrica, lo que favorece la cicatrización y regeneración de tejidos dañados.</p>	<p>Actualmente se está comprobando mediante estudios <i>in vivo</i> su eficacia frente a las cepas resistentes a la claritromicina y al metronidazol. Estudios <i>in vitro</i> confirman la eficacia bactericida frente a <i>Helicobacter pylori</i>. [5].</p>
<p>Expectorante y antitusiva</p>	<p>Las raíces y rizomas de <i>Glycyrrhiza glabra</i> por su contenido en saponinas poseen propiedades demulcentes, antitusivos y expectorantes que facilitan la expulsión de las secreciones bronquiales en afecciones del tracto respiratorio superior.</p>	<p>En ratones sensibilizados con ovoalbúmina. [30]</p>
<p>Antiinflamatoria y antiagregante plaquetario</p>	<p>Inhibe enzimas implicadas en la cascada del ácido araquidónico, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa y peroxidasa plaquetarias, por lo que también inhibe la formación de eicosanoides como la PGE<sub>2</sub> y el tromboxano B<sub>2</sub>. Por este motivo, también ejerce un efecto antiagregante plaquetario. Por otra parte, el ácido 18-betaglicirretínico inhibe la producción de interleucina-8 (IL-8), que es otro mediador proinflamatorio</p>	<p>Rodajas de hígado cortadas con precisión de la carpa mediante la inhibición de la ruta de NF-kB.[4]</p>
<p>Antioxidante (Capacidad antioxidante y captadora de radicales libres)</p>	<p>Los flavonoides y las saponinas actúan como potentes antioxidantes algunos isoflavonoides como la hispaglabridina A y B inhiben la peroxidación lipídica mitocondrial inducida por Fe<sup>3+</sup>. Disminuye significativamente la peroxidación lipídica hepática.</p>	<p>Estudios <i>in vitro</i> en hepatocitos de rata. [5]</p>

---

---

**Tabla 1. (Continuación) Actividades o efectos terapéuticos del ácido glicirricínico**

Anticanceroso	Inhibe la proliferación celular, carcinogénesis y crecimiento tumoral en modelos de cáncer de mama, hígado y piel. Así mismo se ha constatado que el extracto de regaliz, así como su principio activo liquiritigenina, poseen un efecto citoprotector frente a la apoptosis inducida por cadmio.	Modelos de cáncer de mama, hígado y piel. [7]
Despigmentante	Esta actividad se basa en la similitud estructural de principios activos del regaliz como la glabridina, hispaglabridina e isoliquiritina, con los compuestos de tipo hidroxibenceno que poseen propiedades blanqueadoras (hidroquinona, resorcinol o pirocatecol) y cuyo mecanismo de acción es, por una parte, la inhibición de la enzima tirosinasa, así como una ligera acción reductora de la melanina y sus precursores coloreados. [1]	Aún no ha sido probado.

### 3.1.3 Contraindicaciones y efectos adversos

La sobredosis y consumo a largo plazo de la raíz de regaliz por sus componentes activos que son conocidos por generar efectos secundarios como mineralocorticoides causa pérdida de potasio acompañada de hipertensión, edema e hipopotasemia, cataratas, retención de sales y líquidos, enfermedades hepáticas y colestásicas, cirrosis hepática, insuficiencia renal grave y en casos aislados, mioglobinuria. La glabridina es un inhibidor potencial de una enzima que juega un rol importante en el metabolismo de muchas medicinas comunes. A través de la desactivación de una enzima, el ácido glicirricínico también aumenta los niveles de cortisol en la sangre, que puede causar presión arterial alta. Por lo tanto, no se recomienda para personas con problemas de corazón [7].

Debido a la actividad estrogénica de la raíz de regaliz, las mujeres embarazadas deberían evitarla [5].

---

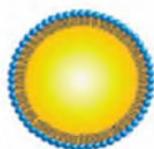
### **3.2 Nanotecnología**

La nanotecnología es un área multidisciplinaria que consiste en la creación y utilización de materiales, dispositivos o sistemas de escala nanométrica. En la actualidad la nanotecnología juega un papel muy importante en el cuidado de la salud iniciando un proceso cuya finalidad es sustituir la manera tradicional de administrar fármacos, enfocándose en la formulación de agentes terapéuticos en nanoacarreadores biocompatibles como lo son las nanopartículas, sistemas micelares, dendrímeros, entre otros, ya que una de las principales ventajas que nos ofrece es la liberación del fármaco dirigida al sitio de afección [8].

La nanotecnología farmacéutica se centra principalmente en la formulación de nanotransportadores cargados con agentes terapéuticos, con tamaños que oscilan de 10–1000 nm y pueden ser de diferentes tipos, principalmente nanopartículas poliméricas, lipídicas y metálicas, nanoliposomas, nanomicelas, nanogeles, entre otras, como se muestra en la figura 3 [9].

---

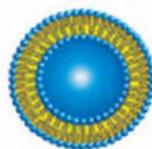
### Sistemas Nanoparticulados Lipídicos



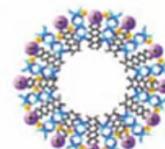
Nanopartícula lipídica sólida



Acarreador lipídico nanoestructurado



Nanoliposoma



Lipoplex

### Sistemas Nanoparticulados Poliméricos

*Nanoesfera*



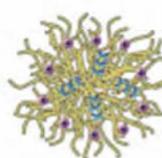
*Nanocápsula*



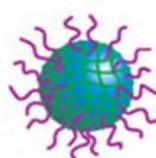
Nanopartículas



Nanomicela polimérica

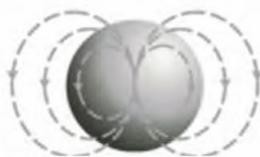


Poliplex



Nanogel

### Sistemas Nanoparticulados Inorgánicos



Nanopartícula magnética



Nanopartícula de oro



Nanopartícula de sílica

**Figura 3. Representación esquemática de la morfología de las nanopartículas.**

Tomada de (Escalona, 2017).

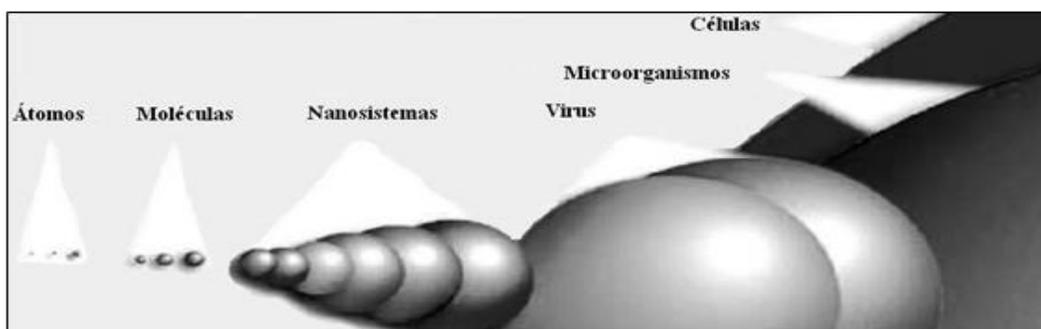
### 3.2.1 Nanopartículas

Las nanopartículas con propósitos farmacéuticos son definidas por Kreuter en 1983 y esta definición fue adoptada por la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica en la cual se establece que son partículas coloidales que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000nm (1 $\mu$ m), generalmente entre 10 y 500 nm, las cuales consisten de materiales macromoleculares y pueden ser usadas terapéuticamente como acarreadores de fármacos, en las cuales el activo (fármaco o material biológicamente activo) está disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula [10].

---

Las nanopartículas han sido usadas como potenciales sistemas de liberación de fármacos debido a su capacidad de disolver compuestos hidrofóbicos, mejorando su biodisponibilidad y protegiéndolos de la degradación biológica, física o química; además de poder ser dirigidas alrededor de un órgano en particular y, debido a su tamaño, atravesar barreras biológicas [11].

Como sistemas nanométricos que son, permiten que el fármaco que llevan asociado pueda atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo lo cual no se podría realizar con los sistemas convencionales de liberación ya que en éstos son fundamentalmente las propiedades fisicoquímicas las que condicionan su absorción y biodistribución. Los sistemas nanoscópicos son mayores que las moléculas típicas y algunos más pequeños que los virus. En tamaño son similares a muchas proteínas lo que constituye una de las razones por las que pueden interactuar en el interior de las células [8].



**Figura 4. Tamaño esquemático de los nanosistemas y otras moléculas.**

Tomada de (Medina, 2010).

Las nanopartículas (NPs) pueden viajar dentro del organismo a sitios específicos sin sedimentar u ocluir la microvasculatura, pueden penetrar tumores y otros tejidos con extravasación y pueden ingresar a nivel celular por endocitosis. También ya son usadas para transportar agentes de contraste o terapéuticos en el tratamiento del cáncer. En general los componentes de estos sistemas de liberación de fármacos son, del centro hacia afuera: fármaco, capa de material que sirve de cubierta al fármaco (polímeros, liposomas, entre otros) y a veces, sobre esta capa otras estructuras de compuestos que sirven para facilitar la solubilidad y la dirección a los organismos o tejidos blancos [3].

---

---

Las nanopartículas terapéuticas fueron elaboradas por primera vez por Speiser y colaboradores durante la década de los 70's, pensando en desarrollarlas como sistemas de liberación de moléculas activas y vacunas [10]. Actualmente sus aplicaciones terapéuticas son tan diversas como las vías por las cuales pueden ser administradas destacando dentro de ellas la vía oral, pulmonar, oftálmica, endovenosa, intramuscular, intraocular e intraarticular, entre otras [1].

Las ventajas de usar nanopartículas como sistemas de liberación son:

- a) El tamaño de partícula y las características de la superficie son fácilmente manipulables.
- b) El control sobre la liberación del fármaco durante la transportación hasta llegar al sitio específico de acción, logrando una mayor eficacia del fármaco y reduciendo los efectos adversos y la toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.
- c) La liberación controlada y las características de degradación de las partículas pueden ser modificadas por cambios en los constituyentes de la matriz.
- d) La localización en un sitio específico puede ser alterada mediante la unión de ligandos en la superficie de las partículas o usando guías magnéticas.
- e) El sistema puede ser usado para varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc.
- f) La posibilidad de disolver activos hidrofóbicos.
- g) Mejorar la estabilidad física y química de los principios activos encapsulados.
- h) Aumentar la absorción de moléculas activas, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad.

El método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso de que lo posea, influenciarán su funcionalidad y efectividad [8].

Los métodos de preparación de nanopartículas son actualmente muy numerosos pudiendo agruparlos en aquellos en los que se realiza una polimerización a partir de monómeros o bien aquellos que parten del polímero. La elección del método de preparación depende de las características del material formador del sistema y de las características de solubilidad

del principio activo que se desea incorporar. Las propiedades del material en aspectos como la biocompatibilidad, características de degradación, características de liberación deseadas para el principio activo son fundamentales a la hora de definir el tipo de aplicación biomédica. De estas consideraciones es evidente que la formulación y método de preparación a utilizar requiera una definición inicial precisa de las necesidades y objetivos que se desean alcanzar [8].

Las nanopartículas con fines farmacéuticos son elaboradas principalmente con polímeros y lípidos. En la Tabla 2 se enlistan algunas características que le confieren estos materiales al sistema nanoacarreador comparando a las nanopartículas poliméricas (NPP) con las nanopartículas lipídicas sólidas [1].

**Tabla 2. Comparación de NPP y SLN.**

	<b>NPP</b>	<b>SLN</b>
Liberación parenteral	Posible	Posible
Liberación oral	Posible	Posible
Liberación pulmonar	Posible	Posible
Liberación de fármacos hidrofílicos y lipofílicos	Si	Si
Estabilidad física	Alta	Alta
Estabilidad biológica	Alta	Moderada
Biocompatibilidad	Moderada	Alta
Fácil esterilización	Moderada	Moderada
Vectorización	Moderada	Moderada
Carga de fármaco	Moderada	De baja a moderada
Fácil comercialización	Baja	Moderada
Aceptación de excipientes	Baja	Alta

Tomado de (Santino, 2013).

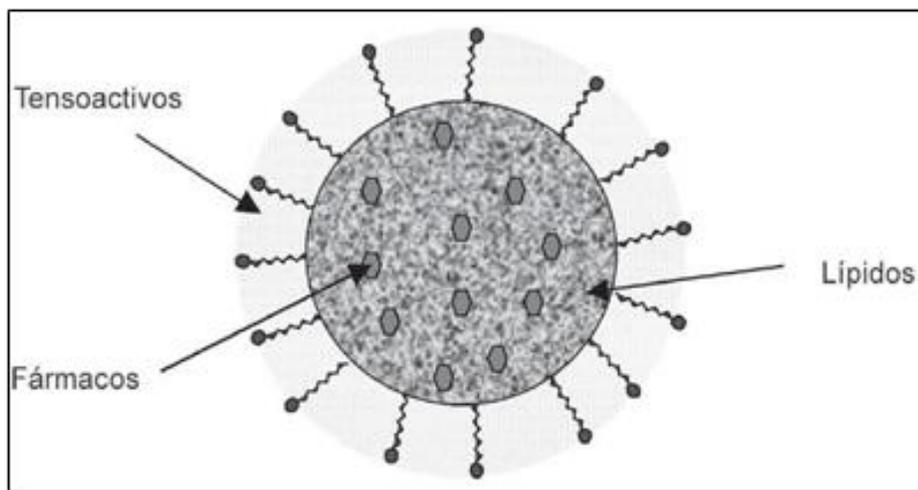
### **3.2.1.1 Nanopartículas lipídicas sólidas**

A principios de los años 90, distintos grupos de investigación centraron su atención en una alternativa de preparar las NPs, esta vez hechas de lípidos sólidos, surgiendo así las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (*SLN* por sus siglas en inglés, *Solid Lipid Nanoparticles*) [3].

---

Son sistemas coloidales con una alta proporción de agua (70-95%), elaborados principalmente a partir de lípidos fisiológicos sólidos que tienden a gelificar y a expulsar el fármaco durante el almacenamiento, presentan capacidad de carga limitada, son biodegradables y tienen buena tolerancia [12].

Las SLN consisten en matrices formadas por un lípido solidificado con patrones cristalinos específicos, que podrían incluir nanocompartimentos conteniendo el lípido líquido. Presentan un tamaño de 50-1000 nm y se mantienen estabilizadas en suspensión acuosa mediante concentraciones relativamente altas de tensoactivos o polímeros hidrofílicos [13]. En la figura 5 se muestra una representación esquemática de una nanopartícula lipídica sólida.



**Figura 5. Representación esquemática de una nanopartícula lipídica sólida (SLN).**

Tomada de: (Villafuerte et al, 2008).

Las SLN se han generado simplemente intercambiando el lípido líquido de las emulsiones por un lípido sólido, lo que significa que las SLN son sólidas a temperatura ambiente, así como a la temperatura del cuerpo.

Las ventajas que presentan las SLN, con respecto a otros sistemas coloidales, son:

- Alta estabilidad física
- Capacidad para proteger fármacos lábiles a la degradación
- Alta tolerancia por parte del organismo

- 
- Transporte de fármacos altamente liposolubles
  - La posibilidad de evitar el uso de solventes orgánicos en su preparación.
  - Un espectro de utilización amplio ya que se emplean para la administración sobre la piel, por vía oral y por vía intravenosa.
  - Fácil escalamiento, entre otras.

Por otro lado, entre sus desventajas estarían el crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, una tendencia hacia una gelificación impredecible, cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de los fármacos debido a la estructura cristalina del lípido sólido [13].

Aunado a lo anterior, las SLN tienen la ventaja que, si son cuidadosamente diseñadas con respecto al sitio específico de acción al que van dirigidas y a la ruta de administración, ayudarán a resolver problemas relacionados a la liberación de nuevas clases de moléculas (p. ej. péptidos, proteínas, genes y oligonucleótidos) o a mejorar el potencial terapéutico de otros principios activos existentes [8].

Desde que fueron desarrolladas en la década de los 90, se constituyeron como un sistema acarreador de fármacos muy prometedor, dadas las ventajas que se mencionaron arriba, aunado a que comparadas con formulaciones que contienen un lípido líquido (como las nanoemulsiones) mantienen por más tiempo al fármaco en su interior ya que la movilidad de éste es menor; y comparadas con las nanopartículas poliméricas, tienen mejor biocompatibilidad ya que los lípidos de los que están hechas son similares a los que tenemos en el organismo, lo cual reduce su toxicidad [11].

### **3.2.1.2 Métodos de preparación de SLN**

Para preparar nanopartículas lipídicas (NL) se deben considerar tres pasos:

El primero es la preparación de la fase oleosa mediante la fusión o disolución de los lípidos, los lípidos que formarán la matriz de la nanopartícula deberán seleccionarse considerando su capacidad para disolver el fármaco que constituye la carga. Dado que el fármaco queda disperso o disuelto en la fase oleosa, su concentración en la matriz pudiera tener un efecto

---

---

significativo en el tamaño y en la estructura de la partícula [8]. Es aconsejable que los lípidos seleccionados sean analizados por calorimetría diferencial de barrido (DSC), con el propósito de conocer la posible depresión del punto de fusión que puedan sufrir en la mezcla, las transformaciones polimórficas que presente la matriz del lípido en función de su capacidad de carga y el carácter cristalino de la sustancia activa incorporada [12].

La segunda etapa del proceso consiste en la preparación de la fase acuosa, la cual generalmente es una disolución de alta concentración de tensoactivos, combinados con co-emulsificantes o con polímeros estabilizadores [12].

Los tensoactivos tienen un gran impacto en la calidad de las SLN, puesto que son adsorbidos en la superficie de las gotas de grasa, formando una barrera estérica que les imparte estabilidad [8].

La tercera etapa en la elaboración de las NL consiste en la formación de una pre-emulsión, mezclando ambas fases en frío o en caliente, mediante agitación vigorosa o ultrasonido. La disgregación de las gotas del lípido (fundido o disuelto) en partículas nanométricas requiere de suficiente energía, por lo que la homogeneización a alta velocidad o a presión debe continuar durante varios ciclos [12].

La última etapa consiste en la concentración de la dispersión acuosa de NL mediante procesos de evaporación, centrifugación, ultrafiltración, secado o liofilización, lo que hace más fácil su manejo y administración [12].

Se han incorporado diferentes tipos de fármacos en las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), incluyendo fármacos lipofílicos, así como fármacos hidrofílicos [13].

Hasta el momento se han preparado formulaciones basadas en SLN para distintas vías de administración, por ejemplo: parenteral, oral, tópica, ocular, pulmonar y rectal en las que se han empleado distintos métodos de preparación. En esta investigación se propone el método de enfriamiento de una microemulsión para obtener las SLN [10].

A continuación, se describen algunos métodos para preparar nanopartículas lipídicas sólidas.

---

### **3.2.1.2.1 Método de emulsificación- evaporación y emulsificación- difusión de disoluciones lipídicas**

En los métodos de emulsificación de lípidos a partir de sus disoluciones se debe asegurar el equilibrio termodinámico inicial en ambas fases, llevando a cabo la saturación del disolvente con el agua, y del agua con el disolvente. En el proceso de emulsificación- evaporación los componentes lipídicos y el fármaco se mezclan en un disolvente inmisible en agua (por ejemplo, cloroformo o tolueno) previamente saturado, emulsificándolo a altas temperaturas con una disolución de tensoactivo en el agua saturada. Posteriormente el disolvente se evapora a presión reducida, induciendo la precipitación del lípido y la formación de suspensiones casi transparentes conteniendo SLN cercanas a 100 nm, con un intervalo de dispersión estrecho. La obtención de partículas más pequeñas (hasta de 30 nm) dependerá de la carga y del tipo de emulsificante utilizado. Este método permite la incorporación de fármacos termolábiles en las SLN. [12].

### **3.2.1.2.2 Método de microemulsificación**

La preparación de SLN por el método de microemulsificación permite obtener partículas termodinámicamente estables, ópticamente isotrópicas y con un tamaño que puede ser controlado en el momento de la emulsificación. El proceso es fácilmente escalable sin necesidad de equipo especializado y con bajo consumo de energía. Las nanoemulsiones obtenidas por este método contienen altas concentraciones de tensoactivos y co-tensoactivos, por lo que su uso en humanos se encuentra sujeto a regulaciones sanitarias [8].

La elaboración de SLN por microemulsificación se logra debido a la cristalización de las gotas de lípido dentro del medio acuoso. El tamaño de partícula dependerá principalmente del tipo de tensoactivos y co-tensoactivos, y de las condiciones experimentales [8].

Una microemulsión típica para obtener SLN se elabora a partir de 10% de lípido sólido fundido, 15% de tensoactivo y 10% de co-tensoactivo. La fase oleosa tibia se adiciona con

---

---

flujo lento o mediante inyección con una jeringa termosellada, dentro de un exceso de agua fría (1:50), dispersando con agitación fuerte o ultrasonido hasta lograr la formación de gotas del lípido y su posterior precipitación. El exceso de agua se remueve por ultrafiltración o por liofilización [12].

### **3.2.1.2.3 Método de homogeneización a alta presión**

El método general de homogeneización a alta presión en caliente consiste en calentar la mezcla de lípido y fármaco entre 5°C-10°C por arriba del punto de fusión del lípido y adicinarla, mediante agitación mecánica a alta velocidad o ultrasonido, a una solución acuosa de tensoactivo mantenida a la misma temperatura. En general se recomienda destruir cualquier núcleo cristalino de la materia prima oleosa mediante un calentamiento prolongado antes de la adición del fármaco, con el propósito de que se forme una masa sólida totalmente diferente durante el enfriamiento. La pre-emulsión obtenida de este modo se procesa en un homogeneizador a alta presión (300-500 bar) de 3 a 5 ciclos, a temperatura controlada. Cuando la nanoemulsión se enfría a temperatura ambiente cristaliza en forma de SLN. La presión y el número de ciclos utilizados en el proceso de homogeneización determinan el tamaño de partícula [12].

El método utilizado en este trabajo en lugar de utilizar un homogeneizador a alta presión se utilizó un homogeneizador tipo rotor-estator.

De manera general, para obtener las SLN, el lípido se funde y se adiciona una cierta cantidad del fármaco para obtener una solución clara. Los estabilizantes se disuelven en agua que se encuentra a la misma temperatura que el lípido. La fase lipídica caliente se vacía a la solución acuosa a la misma temperatura y se dispersa con homogeneizadores de tipo rotor-estator (o incluso bajo agitación mecánica) a velocidades mayores a 3000 rpm. Esta mezcla se enfría para obtener las nanopartículas debido a la cristalización del lípido [12].

Este método presenta algunas ventajas notables con respecto a otros; como bajo costo, reproducibilidad, fácil escalamiento, y ausencia de solventes orgánicos [12]. Asimismo, es posible lograr altas eficiencias de encapsulamiento, especialmente para fármacos insolubles

---

---

en agua, y sobre su superficie pueden adsorberse diferentes estructuras químicas que actúen como ligandos de células [8].

### **3.2.2 Caracterización de las nanopartículas**

Las nanopartículas pueden ser caracterizadas por diferentes técnicas fisicoquímicas. Los parámetros fisicoquímicos de mayor importancia en este tipo de sistemas a determinar son la morfología, el tamaño de partícula, el  $\Psi_z$ , la carga de fármaco y la eficiencia de encapsulamiento [9].

#### **3.2.2.1 Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula (TP) y la distribución del tamaño de partícula (PDI) son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección; además de influenciar en la carga del fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas [9].

La Espectroscopía de Correlación de Fotones o también llamada Dispersión Dinámica de la Luz es una de las técnicas más populares para caracterizar en sistemas coloidales el tamaño de partícula; midiendo la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida la cual es causada por el movimiento browniano de la partícula. Por esta razón, el tamaño de partícula está influenciado por la interacción de las partículas con el medio en el que se encuentran, por lo cual debe conocerse la viscosidad del mismo [1].

Los datos se pueden analizar suponiendo una forma esférica y expresarse como el diámetro efectivo, el cual se puede denominar como el diámetro promedio-z, y con un valor de dispersión de ese tamaño (índice de polidispersión - PI). El PI es un parámetro para la amplitud de la dispersión de la distribución del tamaño de las partículas. Para un sistema monodisperso su valor sería de 0 [12].

---

---

### 3.2.2.2 Potencial zeta ( $\Psi_z$ )

El  $\Psi_z$  es una propiedad física que poseen todas las partículas en suspensión, específicamente en sistemas coloidales. Dicho potencial se obtiene usando la combinación de técnicas de medición: Electroforesis y Velocimetría Láser Doppler. Este método mide qué tan rápido se mueve una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado se puede obtener el  $\Psi_z$  mediante el uso de otras constantes de la muestra analizada (viscosidad y constante dieléctrica) [14].

La medida del potencial zeta permite hacer predicciones acerca de la estabilidad de la dispersión coloidal. En general, la agregación de las partículas es menor en aquellas que están cargadas (potencial zeta alto) debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no puede aplicarse estrictamente a los sistemas que contienen estabilizantes, ya que la adsorción de los estabilizantes disminuirá el potencial zeta debido al cambio en la superficie de la nanopartícula [15].

El potencial zeta de una nanopartícula es utilizado para caracterizar la carga de la superficie; este refleja el potencial eléctrico de las partículas y es influenciado por la composición de la matriz y por el medio en el que son dispersadas. En la tabla 3 se muestra la estabilidad de las suspensiones en base a su  $\Psi_z$ , en donde podemos observar que las suspensiones que presentan muy buena estabilidad son las que se encuentran entre -100 a -60 mV. El potencial Z puede ser usado para determinar si un material con carga activa se encuentra encapsulado en el centro de una nanopartícula o adsorbido en la superficie [16].

**Tabla 3. Estabilidad de suspensiones en base a su Potencial Z**

<b>Estabilidad</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>
Muy buena	-100 a -60
Buena	-60 a -40
Moderada	-40 a -30
Umbral de dispersión	-30 a -15
Umbral de aglomeración	-15 a -10
Fuerte aglomeración y <u>precipitación</u>	-5 a +5

*Tipo de estabilidad de acuerdo con el potencial zeta Riddick, Control of Colloid Stability through Zeta Potential. Zeta-Meter Inc. New York. 1968*

---

### 3.2.2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido

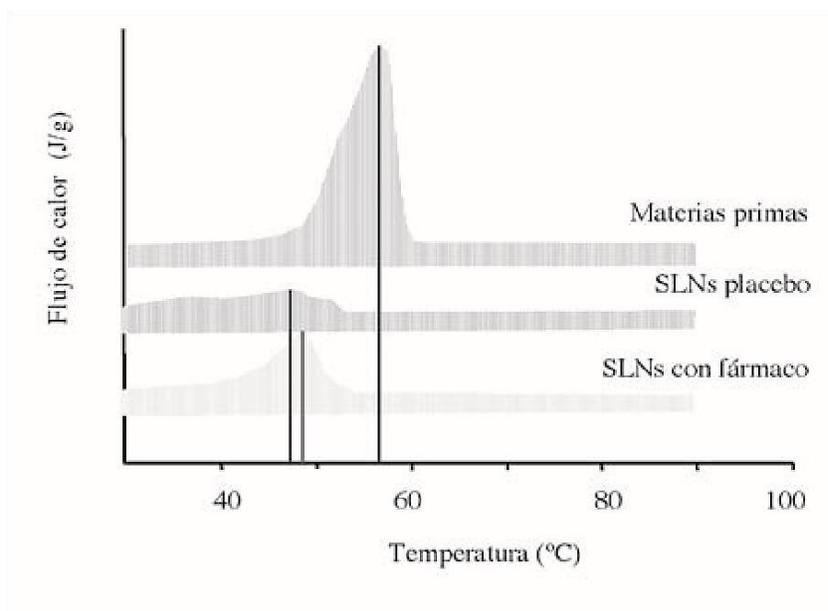
La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC por sus siglas en inglés) es una técnica bien establecida de análisis térmico dentro de las ciencias farmacéuticas. Se puede usar para caracterizar los eventos físicos y químicos a través de cambios en la entalpía o en la capacidad calorífica de una muestra. En particular, las aplicaciones incluyen la detección de polimorfismo, la medición de la reacción y la cinética de descomposición, la evaluación de la compatibilidad de los constituyentes en la formulación, determinación de la pureza y estudios de la temperatura de transición vítrea [1].

Los eventos térmicos que son detectables por DSC (Tabla 4) pueden ser endotérmicos, exotérmicos o pueden implicar un cambio en la capacidad calorífica de una muestra [1].

**Tabla 4. Comportamientos térmicos observados por Calorimetría Diferencial de Barrido.**

<b>Endotérmicos</b>	<b>Exotérmicos</b>
Fusión	Cristalización
Vaporización	Condensación
Sublimación	Solidificación
Degradación	Oxidación
Transición vítrea	Descomposición

En la Figura 6 se muestra un termograma de materias primas y SLN placebo liofilizadas y otras cargadas con un fármaco (2 mg/ml) señalando la temperatura del máximo flujo y del área o cantidad de calor para cada muestra. La velocidad de calentamiento fue de 5 K/min [13].



**Figura 6. Termograma de materias primas y de SLN placebo y con fármaco.**

Tomada de Villafuerte et al. 2008

#### 3.2.2.4 Morfología

La Microscopía Electrónica de Barrido es una técnica que proporciona información morfológica del material analizado mediante un microscopio electrónico de barrido. En la MEB la muestra es recubierta con una capa de metal delgado y después se hace incidir un haz de electrones acelerados enviados desde un cañón. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de ésta; la señal emitida por los electrones y la radiación resultante del impacto se recoge mediante un detector y se simplifica. Este microscopio tiene una resolución de 3 a 20 nm y un rango de aumentos que varía desde 10 hasta 200 000 con una distancia focal de 35 mm. Las principales ventajas de la MEB son la alta resolución ( $= 100 \text{ \AA}$ ), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y a la sencilla preparación de las muestras [3].

---

### 3.2.2.5 Eficiencia de carga del fármaco

Idealmente, un buen sistema nanoparticulado debe de poseer una alta capacidad de carga con lo que se reduce la cantidad de material que forma la matriz en la administración. La carga y la eficiencia de encapsulamiento del fármaco dependen de la solubilidad en el estado sólido de éste en la matriz, el cual se relaciona con la composición de polímero o lípido, el peso molecular y la interacción fármaco- matriz [8].

La carga del fármaco puede llevarse a cabo por dos métodos:

1. Incorporación durante la elaboración de las nanopartículas (método de incorporación).
2. Adsorción del fármaco después de la formación de las nanopartículas por incubación con una solución concentrada del fármaco (método de adsorción/absorción) [17].

El fármaco o material biológicamente activo se puede encontrar disuelto, entrampado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula [1].

---

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Una alternativa tecnológica para lograr ingresar de manera más eficaz a algún órgano es mediante la creación de sistemas nanométricos de administración de fármacos para resolver problemas relacionados con la baja biodisponibilidad, efectos adversos, así como también, inestabilidad y problemas de dosificación. Estos nanotransportadores de fármacos presentan diversas ventajas tales como tamaño de partícula en el intervalo de 1 – 1000 nm, capacidad para incorporar fármacos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, controlar la liberación de los fármacos, estabilidad en fluidos biológicos y mejorar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos.

En el ámbito farmacéutico, el uso de nanopartículas tiene gran potencial como vehículo para transportar fármacos que mejoren la selectividad del tratamiento, esto significa que permiten que se localice mejor el sitio de acción dónde se debe liberar el medicamento, con una eficacia de tan sólo segundos, en comparación con fármacos que pueden hacer efecto después de 10 o 15 minutos.

El AG tiene diversos usos, como antiulceroso, expectorante, analgésico, colagógico, antiséptico, despigmentante, antioxidante, antialérgico, anticanceroso, antiviral y tónico para tratar afecciones en los pulmones, tracto respiratorio, estómago, riñones y otros órganos por lo que es importante crear una alternativa tecnológica que logre que el ácido glicirricínico ingrese de manera más eficaz a algún órgano y esto es mediante la creación de formulaciones farmacéuticas nanoparticuladas.

Existen formulaciones de nanopartículas lipídicas sólidas con AG, sin embargo, al ser un fármaco hidrosoluble se muestran bajas eficiencias de adsorción. Por todo lo anterior en este trabajo se busca desarrollar y caracterizar una formulación de nanopartículas que contengan AG optimizándolas para lograr la mayor eficiencia de adsorción y con propiedades fisicoquímicas adecuadas.

---

## **V. HIPÓTESIS**

El desarrollo de nanopartículas lipídicas sólidas, con propiedades fisicoquímicas adecuadas, alta estabilidad tanto física como química permitirá la obtención de un nanotransportador capaz de absorber fármacos hidrosolubles el cual podría tener importantes implicaciones en el tratamiento de distintas enfermedades.

---

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Desarrollar nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con ácido glicirricínico mediante el control de las variables de formulación para obtener un nanoacarreador de fármacos hidrosolubles.

### 6.2 Objetivos particulares

- Preparar nanopartículas lipídicas sólidas mediante el método de homogeneización con rotor estator.
- Incorporar el ácido glicirricínico a las nanopartículas lipídicas sólidas mediante un proceso de adsorción.
- Implementar un método analítico para la cuantificación de ácido glicirricínico en las nanopartículas lipídicas sólidas mediante espectrofotometría UV-Vis.
- Optimizar las variables de formulación de las nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con ácido glicirricínico mediante tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y eficiencia de adsorción.
- Caracterizar las nanopartículas optimizadas en términos de tamaño, distribución de tamaño, potencial zeta, eficiencia de adsorción, morfología y el estado físico de los componentes en la formulación.
- Evaluar la estabilidad de las nanopartículas lipídicas sólidas optimizadas mediante su almacenamiento a diferentes temperaturas y mediante análisis de dispersión de luz múltiple para observar sus propiedades fisicoquímicas en función del tiempo.

---

## **VII. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **7.1 Materiales, equipos e instrumentos.**

#### **7.1.1. Materiales**

- Ácido glicirricínico (Sigma- Aldrich)
- Gelucire 44/14 (GATTEFOSSÉ)
- Pluronic F-127 (Sigma- Aldrich)

#### **7.1.2. Equipos e instrumentos**

- Agitador mecánico de velocidad variable (IKA® RW 20 digital)
- Balanza analítica (BOECO® BBC32, Alemania)
- Ultracentrífuga (BECKMAN Optima LE-80K)
- Purificador de agua (MILLIPORE, MLLI-Q)
- Zetasizer (MALVERN INSTRUMENTS, Nano-ZS)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Cary IE95031003, EUA).
- Calorímetro Diferencial de Barrido (TA INSTRUMENTAL ANALYSIS)
- Microscopio electrónico de barrido (LV-SEM JSM-5600, JEOL).
- Turbiscan™ Classic (MA 2000)

---

## 7.2 Diagrama de flujo del procedimiento experimental

La Figura 7 muestra de manera general los procedimientos experimentales de esta investigación. Primero seleccionar los materiales para poder preparar las SLN y una vez preparadas se optimizaron. Se realizó la caracterización fisicoquímica de las SLN optimizadas mediante tamaño de partícula, potencial zeta, índice de polidispersión, morfología, interacción de los componentes y eficiencia de adsorción. Y al mismo tiempo se realizó una prueba de estabilidad de almacenamiento y un análisis de dispersión de luz múltiple con la ayuda de Turbiscan Classic

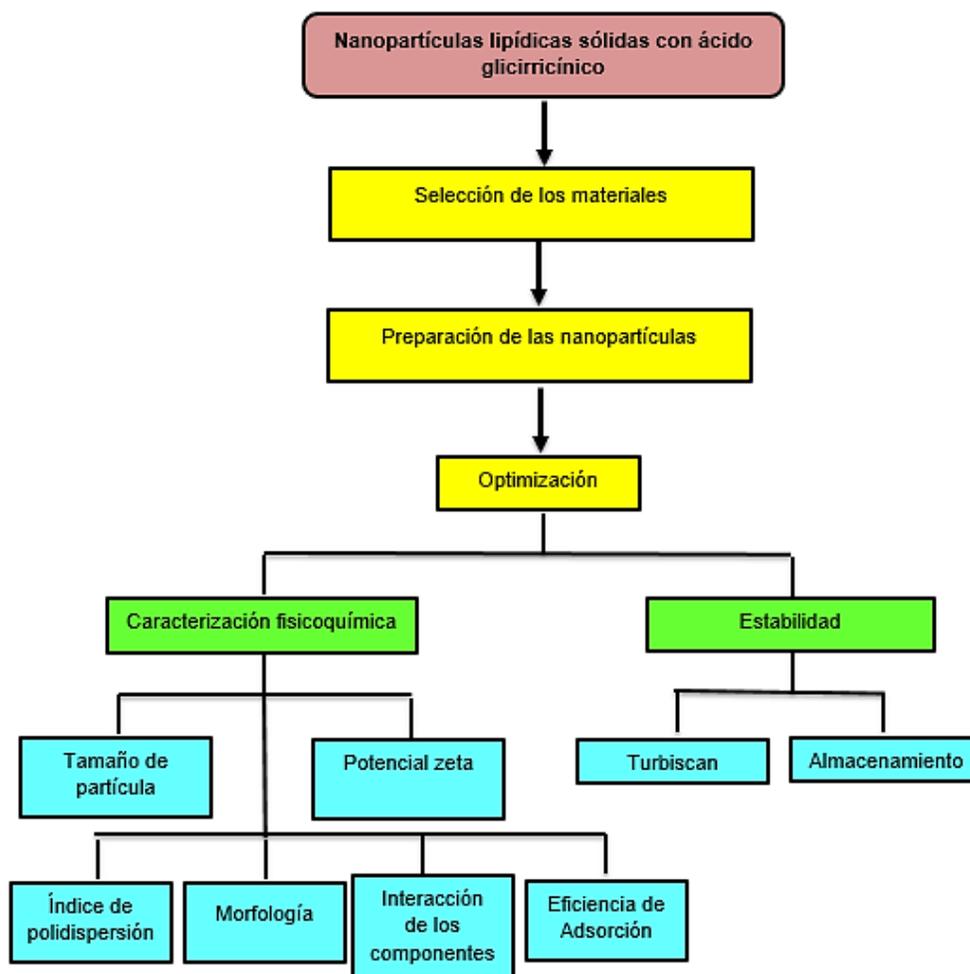


Figura 7. Desarrollo experimental para la elaboración de SLN cargadas con AG.

### 7.3 Preparación de SLN por el método homogeneización con rotor estator

Las SLN cargadas con ácido glicirricínico se prepararon mediante el método de homogeneización con rotor estator como se muestra en la figura 8. Primero se calentaron 45 mL de agua hasta 80 °C y se agregó el estabilizante (Poloxámero 407) a una velocidad de 800 rpm. Una vez disuelto el estabilizante se agregó AG bajo agitación moderada (1200 rpm) hasta su disolución total. Se mantuvo esta fase durante todo el proceso a esta temperatura. Por otro lado, se fundieron 5 g de Gelucire® 44/14 a 80 °C y se vertieron sobre la fase acuosa que se encontraba a la misma temperatura y bajo agitación constante mediante un agitador mecánico a 1650 rpm durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la dispersión se transfirió a un baño de agua helada (5°C) y se continuó agitando por 3 minutos a 1250 rpm. Una vez obtenidas las SLN, se procedió a separarlas por ultracentrifugación con dos ciclos a 50,000 rpm durante 1 h a 25°C y se caracterizaron en cuanto a tamaño, morfología, carga de la partícula (potencial Z), análisis térmico, estabilidad y carga del fármaco.

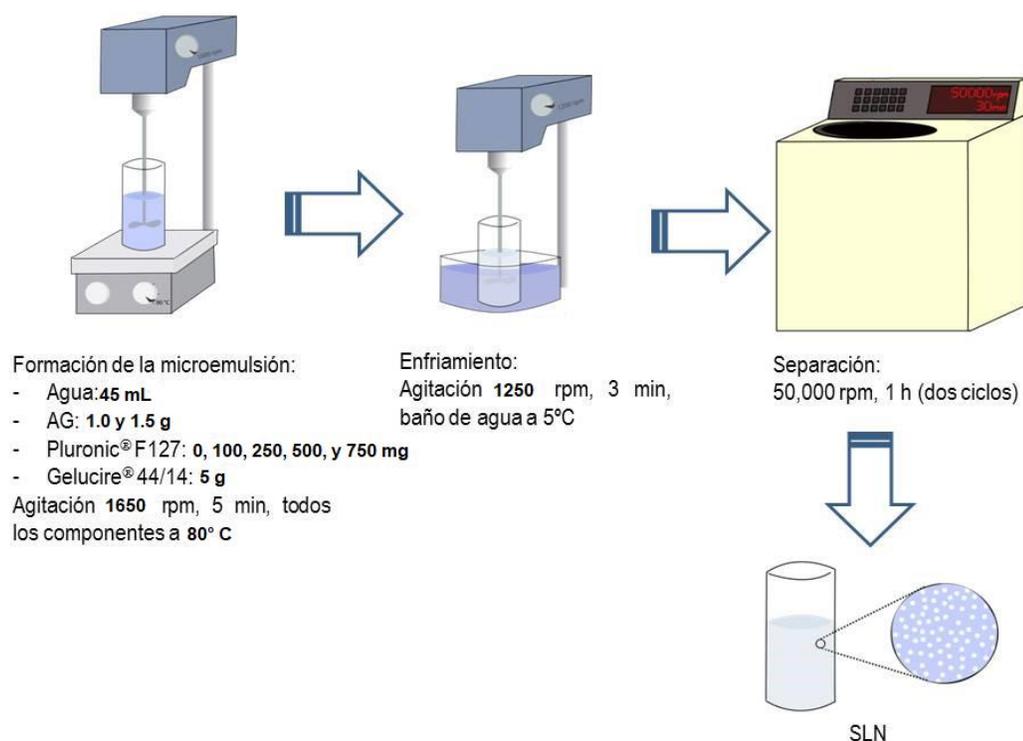


Figura 8. Representación esquemática del proceso de elaboración de las SLN.

---

## 7.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

### 7.4.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

El tamaño de partícula promedio de los sistemas y su índice de polidispersión se determinaron mediante la técnica Dispersión Dinámica de la Luz mediante el uso del equipo Zetasizer (ZEN3600, Malvern Instruments Limited R.U) a un ángulo de 173° por 180 segundos y a una temperatura de 25°C. Los sistemas se diluyeron con agua ultrapura (Simplicity UV®, Millipore, EUA). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 7.4.2 Potencial zeta

El potencial zeta se determinó mediante micro-electroforesis láser Doppler y análisis de fase de dispersión de luz en un instrumento Malvern Zetasizer Nano HS (Malvern, RU), el cual emplea un láser de He/Ne de longitud de onda de 633 nm y 4mW. Se realizaron un promedio de 50 lecturas empleando como disolvente agua ultrapura a una temperatura de 25°C. Las lecturas se realizan por triplicado por cada sistema.

### 7.4.3 Eficiencia de adsorción

La eficiencia de adsorción (EA) se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis. Se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido de la centrifugación y se llevó a un volumen de 100 mL, se tomó una alícuota de 3 mL y se llevó a un volumen final de 25 mL. La solución se filtró a través de filtros de tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore®, EUA) y se colocó en una celda de cuarzo, la longitud de onda fue de 256 nm. La E.A del ácido glicirricínico se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EA (\%) = \frac{\text{Peso de AG adicionado} - \text{Peso de AG calculado}}{\text{Peso de AG adicionado}} \times 100$$

---

#### **7.4.4 Evaluación de las interacciones de las nanopartículas optimizadas**

Las interacciones de los componentes de las nanopartículas optimizadas se evaluaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un calorímetro (DSCQ10, de TA Instruments, EUA). Las muestras evaluadas fueron: Ácido glicirricínico, Gelucire® 44/14, Pluronic® F127, como materias primas; mezcla física de AG, Gelucire y Pluronic F-127 (1.5, 5 y 0.75% respectivamente); y SLN cargadas de ácido glicirricínico. Se pesaron de 3 a 6 mg de cada uno de los sistemas y componentes en celdas de aluminio herméticas. Las celdas fueron selladas y colocadas en el equipo previamente calibrado y ajustado. Se sometieron a una rampa de calentamiento de 0 a 280 °C, con una velocidad de 10 °C/min y con un flujo de nitrógeno de 50 mL/min. La calibración se realizó con un estándar de indio.

#### **7.4.5 Morfología de las nanopartículas optimizadas**

Se observó la morfología de la superficie de las nanopartículas optimizadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). La preparación de las muestras consistió en esparcir una gota de la suspensión de las nanopartículas sobre la superficie de un cubreobjetos dejándola secar a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con una película de oro (~20 nm de grosor) utilizando un evaporador catódico *Sputter Coater* (JFC-1100, JEOL, Japón) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (LV-SEM JSM-5600, JEOL, Japón) con resolución de 5 nm, voltaje de 20 kV y de 12 – 20 Pa de presión de la cámara. Las micrografías se observaron a diferentes aumentos.

#### **7.4.6 Estabilidad de las nanopartículas optimizadas**

Los estudios de estabilidad de las nanopartículas optimizadas se realizaron mediante estabilidad de almacenamiento y Turbiscan CLASSIC (MA 2000 Formulation Smart scientific analysis).

---

#### 7.4.6.1 Estabilidad de almacenamiento

Las SLN optimizadas se almacenaron a 3 diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 40°C). Se midió el TP, PDI y  $\Psi_z$  a los días 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y 30 de su preparación. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado en tres diferentes lotes de la formulación optimizada.

#### 7.4.6.2 Estabilidad con Turbiscan

Esta prueba se realizó mediante Turbiscan CLASSIC en modo escáner automático. Se colocaron 5 mL de las nanopartículas en un tubo de vidrio cilíndrico. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un diodo electroluminiscente en el infrarrojo a una longitud de onda de 880 nm. Los sensores ópticos sincrónicos recibieron respectivamente luz transmitida a través de la muestra a un ángulo de 180° (desde la luz incidente, sensor de transmisión) y luz retrodispersada por la muestra a un ángulo de 45° (desde la radiación incidente, detector de retrodispersión). El cabezal de lectura óptica escanea la longitud de la muestra (hasta 80 mm), adquiriendo datos de transmisión y retrodispersión cada 40  $\mu\text{m}$ . Las mediciones se realizaron durante 30 min cada minuto en tres diferentes lotes de la formulación optimizada a los días 1, 5, 10, 15, 20 y 30.

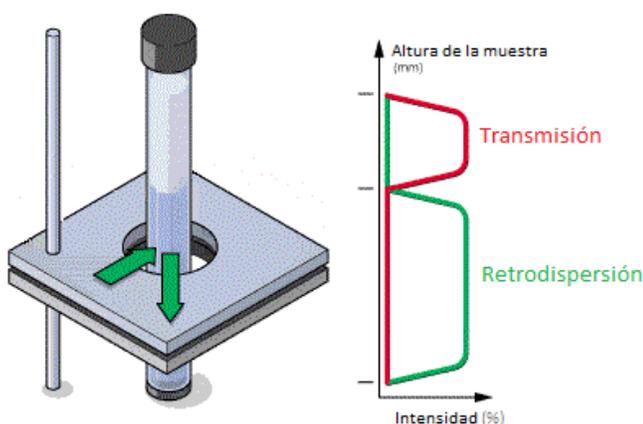


Figura 9. Principio de medición de Turbiscan Classic.

---

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Preparación y optimización de las nanopartículas

Se prepararon nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con AG mediante el método de homogeneización con rotor estator el cual es un método que presenta algunas ventajas notables con respecto a otros; como bajo costo, reproducibilidad, fácil escalamiento, y ausencia de disolventes orgánicos [3]. En el proceso de obtención de las SLN, la sal de amonio del AG, se disolvió en una solución acuosa de tensoactivo calentada a la misma temperatura que el lípido fundido (90°C). El lípido se fundió para destruir cualquier núcleo cristalino y se vertió a la fase acuosa bajo agitación mecánica. De manera espontánea se observó la formación de una pre-emulsión, la cual fue enfriada en un baño de agua a 5°C bajo agitación constante para cristalizar y formar las SLN. La estabilización de estas nanopartículas por la presencia de un agente estabilizante (tensoactivos) es de suma importancia para evitar la coalescencia y la formación de aglomerados [18].

Como se mencionó anteriormente, para formar las nanopartículas se requieren de uno o más tensoactivos y, en la mayoría de los casos, un co-surfactante. En la formulación el Poloxámero 407 (Pluronic® F127) y el mismo AG, funcionaron como tensoactivos; la razón de ello es que el AG al poseer porciones hidrofílicas e hidrofóbicas en su estructura química, y al ser una saponina, se comporta como un agente activo de superficie [20].

Es importante mencionar que cuando se colocaron en la formulación solo AG con Gelucire® como se muestra en la figura 10 no se formaba ninguna dispersión blanca azulada al enfriar, característica de la presencia de las SLN (y NPs en general) y la formulación es demasiado inestable, al igual que si se realiza la formulación a temperatura ambiente tampoco se forman las nanopartículas ya que se obtiene un tamaño de partícula mayor a 1000 nm y la formulación también muestra una inestabilidad como se muestra en la figura 11, en la cual se observan dos fases en el sistema.

Lo que indica que es necesaria la presencia de los tres compuestos y de la temperatura para la formación de las SLN y para mantener su estabilidad.



**Figura 10. Mezcla de AG + Gelucire 44/14 con temperatura.**



**Figura 11. Mezcla de AG + Gelucire 44/14 + Poloxámero 407 sin temperatura.**

La temperatura de preparación de SLN modifica la energía cinética del sistema, por lo que afecta de forma importante el tamaño de partícula, la eficiencia de la encapsulación y la carga [12].

La purificación, la cual es una etapa posterior a la preparación de las nanopartículas, es un proceso que impacta sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. Por lo que se requiere la optimización de los parámetros de proceso y formulación para preparar nanopartículas con tamaños de partícula deseados, con estrechos índices de polidispersión, potenciales zeta adecuados y altas eficiencias de entrapamiento de fármacos [21].

Durante el proceso de desarrollo de la formulación se evaluaron distintas concentraciones de fármaco y tensoactivo, manteniéndose constante la concentración del lípido (5% p/p). Estas formulaciones se optimizaron en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y eficiencia de encapsulamiento para encontrar la mejor formulación. Las variables de respuesta obtenidas de las formulaciones de SLN se muestran en la tabla 5.

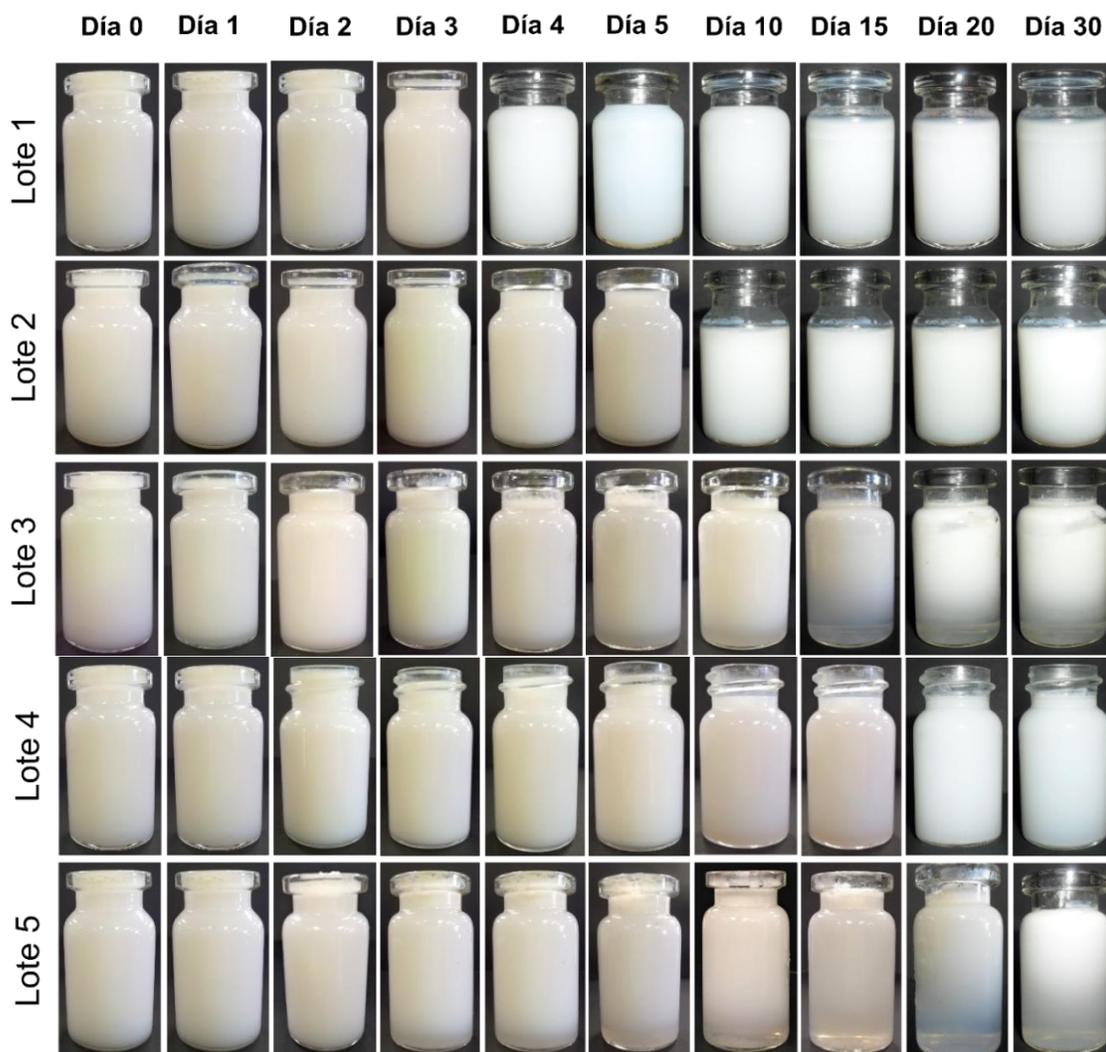
**Tabla 5: Variables de respuesta observadas en las formulaciones de las nanopartículas**

Formulación	TP (nm)	IP	PZ (mV)	E.A (%)
1	171.6 ± 1.39	0.197 ± 0.004	-18.23 ± 0.21	25.05 ± 2.42
2	158.1 ± 0.57	0.03 ± 0.005	-18.53 ± 0.47	10.23 ± 0.04
3	250.2 ± 2.08	0.14 ± 0.01	-19.47 ± 0.25	9.23 ± 0.09
4	145.2 ± 0.47	0.04 ± 0.02	-19.93 ± 0.15	7.53 ± 0.05
5	251.2 ± 2.38	0.204 ± 0.002	-20.53 ± 0.06	7.43 ± 0.05
6	89.3 ± 0.47	0.079 ± 0.03	-16.43 ± 0.25	19.59 ± 0.08
7	99.1 ± 0.64	0.052 ± 0.02	-20.57 ± 0.25	19.39 ± 0.08
8	206.8 ± 1.19	0.093 ± 0.02	-26.43 ± 0.61	14.26 ± 0.05
9	327.5 ± 2.31	0.244 ± 0.02	-28.67 ± 0.47	7.30 ± 0.06
10	238 ± 0.61	0.22 ± 0.01	-29.10 ± 0.30	4.60 ± 0.09

Notas: TP = Tamaño de partícula. IP = Índice de polidispersión. PZ = Potencial zeta.  
E.A = Eficiencia de adsorción. Promedio ± desviación estándar (n = 3).

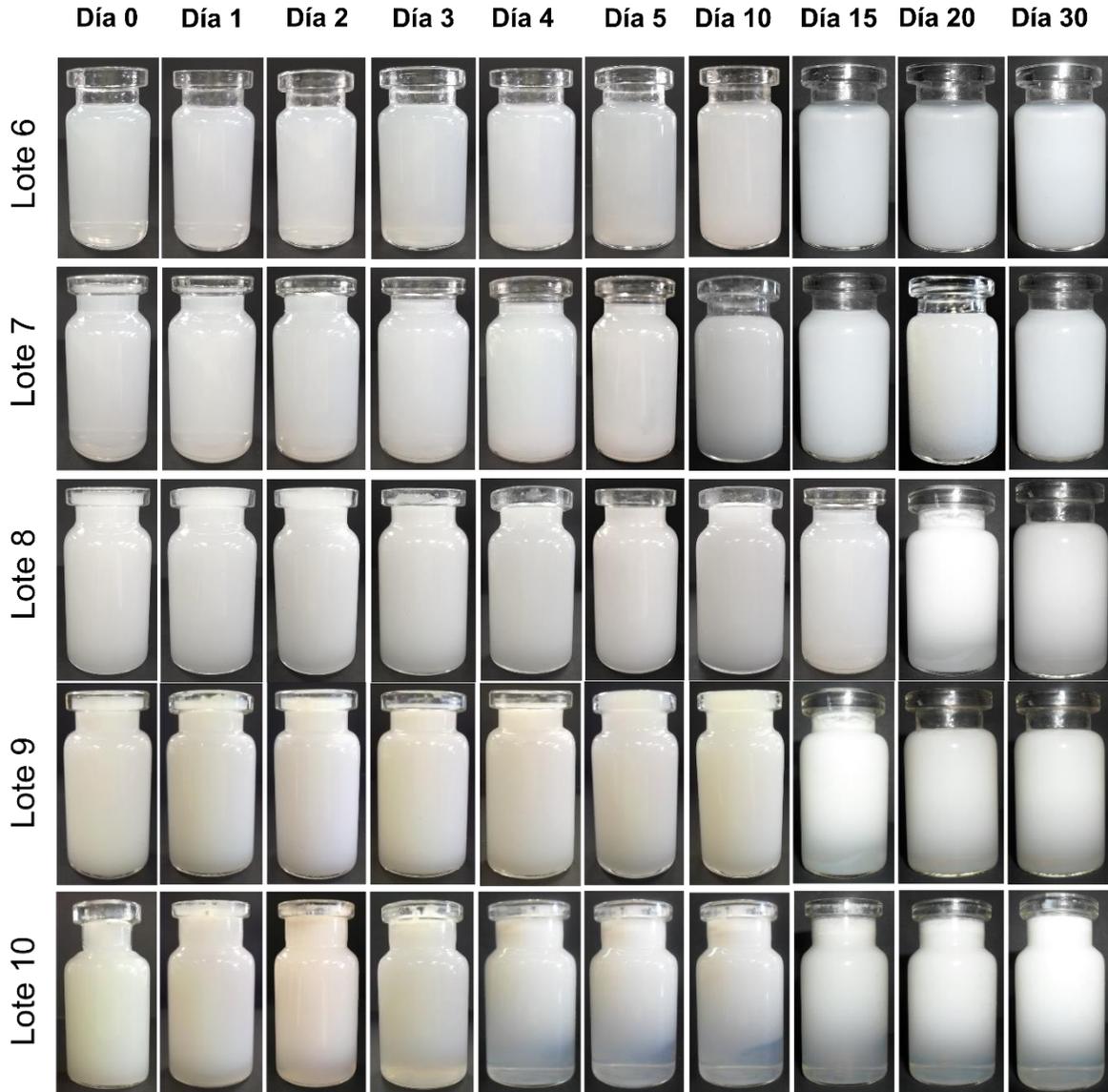
Para encontrar la mejor formulación también se tomó en cuenta el aspecto físico de la formulación por lo que se monitorearon y fotografiaron las diez formulaciones durante 30 días para observar los cambios físicos que pudieran presentar.

En la figura 12 se muestran los lotes de preparación de SLN variando la cantidad de Poloxámero 407 (750, 500, 250, 100 y 0 mg respectivamente) y manteniendo constante el ácido glicirricínico (1.5 g) y Gelucire 44/14 (5 g). En las cuales se observa que el lote 5 que no tiene estabilizante (Poloxámero 407) empieza a ser inestable desde el día 3 observándose una separación de fases, así como el lote 3 en el cual también se observa una separación. Los lotes 1, 2 y 4 se observan homogéneos.



**Figura 12. Formulaciones con 1.5 g de AG, 5g de Gelucire 44/14 y cantidad variada de Poloxámero 407.**

En los lotes 6-10 (figura 13) se varió también la cantidad de AG (1 g) con respecto a las formulaciones anteriores, esto fue para comprobar si con menos cantidad de AG hay formación de SLN y así evitar un gasto mayor de fármaco. Se observó que, sí hay formación de SLN, sin embargo, el tamaño de partícula en el lote 6 y 7 es menor a 100 por lo que al momento de centrifugar las nanopartículas la separación casi no se distingue y es muy difícil separarlas del sobrenadante. Y en las formulaciones 8, 9 y 10 se observa una separación de fases, notándose más en la formulación 10 desde el día 3, la cual no tiene estabilizante.



**Figura 13. Formulaciones con 1.0 g de AG, 5 g de Gelucire 44/14 y cantidad variada de Poloxámero 407.**

Con estas 10 formulaciones se encontró que la mejor proporción que formaba las nanopartículas fue: 5 g de Gelucire®, 0.75 g Pluronic® F127, 1.5 g AG y 45 mL de agua; tratándose de una nanoemulsión aceite en agua (o/w).

---

---

Las propiedades de las nanopartículas tienen que ser optimizadas dependiendo de la vía de administración y cuya finalidad es conseguir el tamaño de partícula, el  $\Psi_z$  y la eficiencia de encapsulamiento de interés por lo que el método de preparación juega un papel vital en su obtención. Sabemos que la capacidad de liberación de las SLN está influenciada por el tamaño de partícula ya que éste determina su interacción con las membranas celulares y su penetración a través de las barreras fisiológicas, por lo tanto, el tamaño requerido para el cruce de diferentes barreras biológicas dependerá de la morfofisiología del sitio de acción [21].

Las características principales de las SLN tales como: tamaño de partícula, grado de dispersión del tamaño, potencial zeta y eficiencia de carga, están determinadas por la naturaleza de la matriz de lípido, por la mezcla de tensoactivos, la viscosidad de la fase lipídica y de la fase acuosa en el momento de la emulsificación, y también por los parámetros de producción, principalmente por las condiciones de homogeneización y la temperatura [22].

### **8.1.1 Tamaño de partícula**

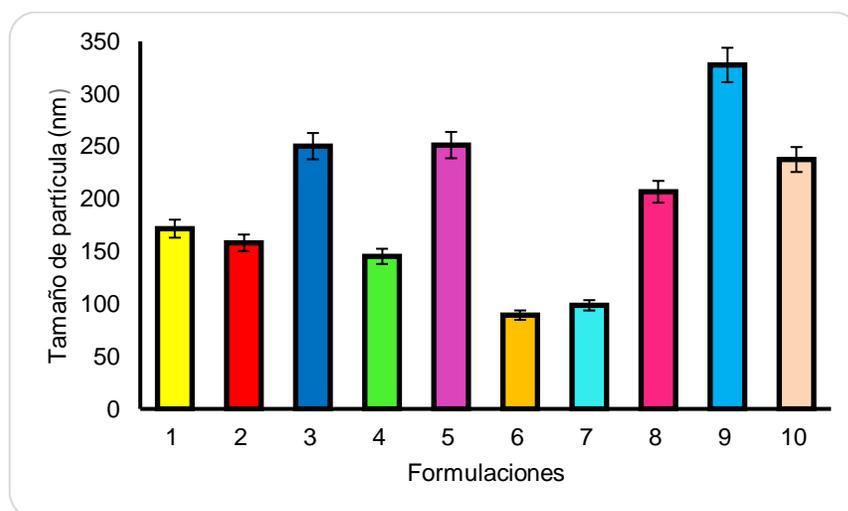
El tamaño de partícula (TP) y la distribución del tamaño de partícula son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, su tiempo de vida media, la captación celular, la biodistribución además de influenciar en la carga de fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas [23]. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita la rápida liberación a diferencia de partículas grandes que poseen un mayor núcleo por lo que la difusión del fármaco será lenta. Normalmente, cuanto menor sea el TP, más rápida será la velocidad de liberación [8].

Con respecto al TP de las SLN, éste se mantuvo en un intervalo de 89-330 nm por 30 días. Después de este tiempo, se observó un cambio físico en la dispersión al mostrarse cada vez más blanca, lo que indica que el lípido cristalizó y formó aglomerados. El Gelucire® es una mezcla de mono-, di- y triglicéridos, con diferentes longitudes de cadena, y es bien sabido

---

que los glicéridos presentan polimorfismo por lo que sufrirán cambios en su acomodo espacial teniendo como consecuencia la salida o desorción del fármaco cuyo efecto final es la inestabilidad de la formulación [20].

Con respecto al tamaño, se ha observado que nanopartículas entre 100-200 nm mejoran su absorción celular en células Caco-2. Por otra parte, NPs con tamaños inferiores a 100 nm son eliminadas por el RES, lo que reduce la eficiencia de captación debido al corto tiempo de circulación [9].

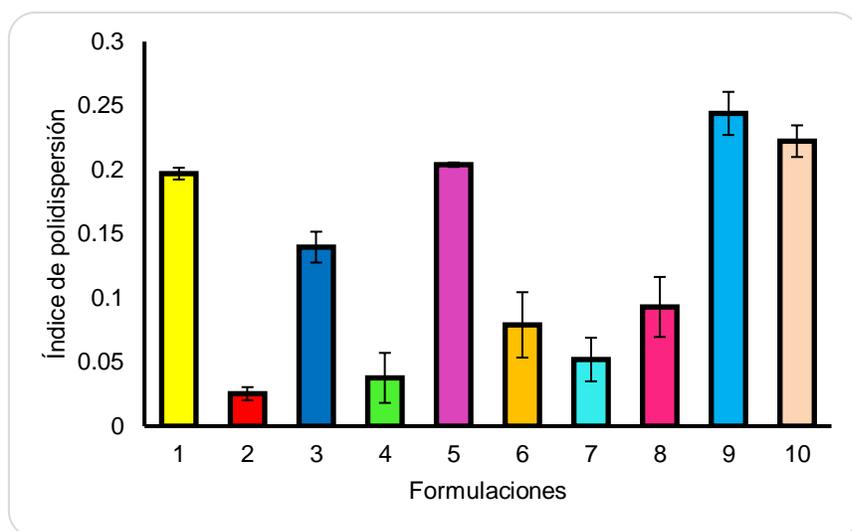


**Figura 14. Tamaño de partícula de las distintas formulaciones.**

### 8.1.2 Índice de polidispersión

El índice de polidispersión (IP) es una propiedad importante que se utiliza para describir la variación del tamaño en una población de partículas. Con mayor frecuencia, el tamaño de partícula sigue una distribución multimodal. Cuando el valor de IP es cercano a 1, el rango de tamaño tiene una mayor dispersión, mientras que un valor cercano a 0 es lo óptimo e indica que la distribución de tamaño es homogénea [10].

Los valores de índice de polidispersión fueron inferiores a 0.3 como se muestra en la figura 15 indicando que la distribución de tamaños de partícula es estrecha y las formulaciones son monodispersas.



**Figura 15. Índice de polidispersión de las formulaciones.**

### 8.1.3 Potencial zeta

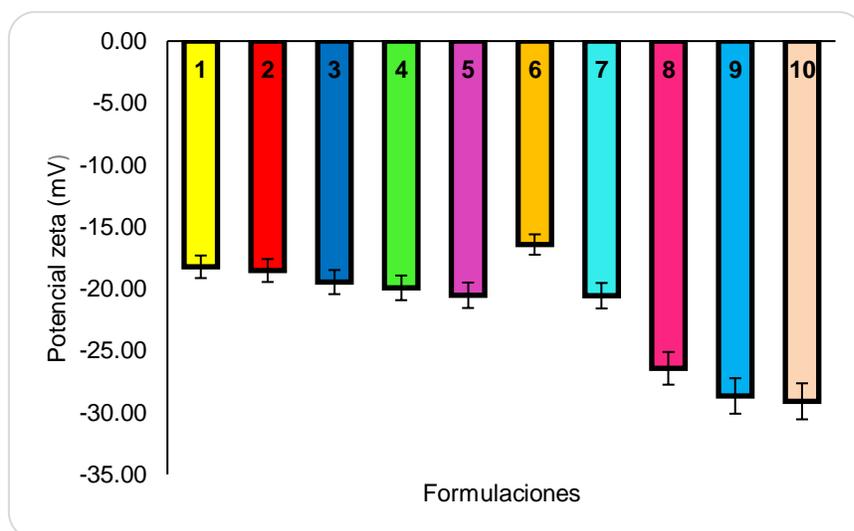
El potencial electrostático también conocido como potencial zeta ( $\Psi_z$ ) es una característica que ofrece información importante sobre la carga superficial de la nanopartícula y la estabilidad de las dispersiones coloidales. Ésta a su vez, condiciona las interacciones entre estos sistemas y las membranas celulares. Se crea por la carga eléctrica presente en la superficie de las nanopartículas [12]. Las nanopartículas con  $\Psi_z$  de -10 mV a +10 mV se consideran neutras. Por otro lado, un  $\Psi_z$  inferior a -30 mV o superior a +30 mV es un indicador de una dispersión muy estable. A mayores valores de  $\Psi_z$ , las fuerzas repulsivas entre partículas de carga similar impiden su agregación lo que aumenta su estabilidad. Sin embargo, para el pasaje a través de barreras biológicas, tales como la BHE, se prefieren nanopartículas con  $\Psi_z$  neutro [9].

Dependiendo de la naturaleza del agente estabilizante utilizado en la formulación de las nanopartículas existen dos mecanismos principales a través de los cuales pueden ser estabilizadas: la repulsión electrostática y la estabilización estérica. Estos dos mecanismos se pueden lograr mediante el empleo de agentes estabilizantes iónicos y no iónicos

---

respectivamente, en el caso de la estabilización por la repulsión electrostática las fuerzas repulsivas son originadas por la superposición [23].

El rango del  $\Psi_z$  en las 10 formulaciones preparadas varió de  $-28.67 \pm 0.47$  (F-9) a  $-16.43 \pm 0.25$  (F-6). De acuerdo con lo observado, las concentraciones de AG y Poloxámero 407 influyen en el  $\Psi_z$ . Como observa en la figura 16 las formulaciones 1 a la 5 que contienen 1.5 g de AG tienen menor  $\Psi_z$  que las formulaciones que contienen menor cantidad de AG como lo son de la 6-10, así mismo, la adición de Poloxámero 407 disminuye el  $\Psi_z$ . El Poloxámero 407 es un estabilizante no-iónico compuesto por copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno [24], el cual forma una capa protectora alrededor de las nanopartículas y, como se mencionó anteriormente, a pesar de lavados repetidos, no puede ser completamente eliminado de la superficie de las partículas. Este efecto puede ser observado en la formulación 6 (1.5% Poloxámero 407), la cual presentó un  $\Psi_z$  menos negativo ( $-16.43 \pm 0.25$  mV) en comparación con la formulación 10 (0% Poloxámero 407) donde su  $\Psi_z$  fue de  $-29.10 \pm 0.30$  mV. Esto se puede deber a que el Poloxámero 407 enmascara la carga superficial de las nanopartículas.



**Figura 16. Potencial zeta de las formulaciones.**

El valor de potencial zeta (menor a 30 mV en todos los lotes) puede indicar una estabilidad baja en la dispersión, pero en este caso la estabilización de las partículas fue debido a la

---

---

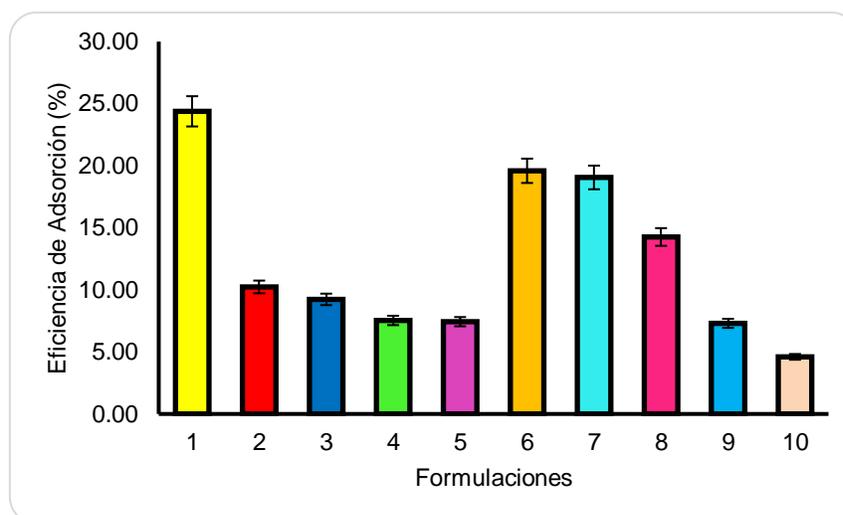
estabilización estérica ejercida por el estabilizante de tipo tribloque copolímero (Poloxámero 407), un tensoactivo no iónico que ejerce su efecto por repulsión estérica de las cadenas hidrofílicas que lo conforman (polioxietileno), y por lo tanto, las partículas se mantienen separadas, entonces la regla general que dice que valores mayores a  $|30|$  mV indican una dispersión estable, no puede aplicarse estrictamente porque la adsorción de los estabilizantes estéricos disminuirá el  $\Psi_z$  debido a un cambio en el plano de deslizamiento de la partícula [1].

#### 8.1.4 Eficiencia de adsorción

La cantidad de fármaco adsorbido puede ser determinado mediante diversas metodologías analíticas como HPLC, HPTLC o espectrofotometría ultravioleta. Para ello es necesario implementar y validar un apropiado proceso de extracción del fármaco atrapado, ya sea de manera directa (rompiendo las nanopartículas) o indirecta (fármaco no adsorbido en la fase continua). En ambos casos es necesario realizar ultracentrifugación para separar las nanopartículas de la fase continua. Una vez cuantificada la muestra, es posible determinar la eficiencia de adsorción (%) que define la relación entre la cantidad de fármaco adsorbido y aquel que fue añadido durante la elaboración de las nanopartículas. Por último, es posible determinar el rendimiento del proceso, considerando la cantidad de materia prima empleada durante el proceso de elaboración de nanopartículas y la cantidad de nanopartículas que es posible recuperar una vez que éstas han sido elaboradas. [25]. En este trabajo se determinó la cantidad de AG adsorbido en las nanopartículas de manera indirecta, es decir, cuantificando la cantidad de AG no adsorbido en la fase continua y mediante la siguiente se obtuvo la eficiencia de adsorción:

$$EA (\%) = \frac{\text{Peso de AG adicionado} - \text{Peso de AG calculado}}{\text{Peso de AG adicionado}} \times 100$$

La figura 17 muestra que la formulación con mayor eficiencia de adsorción fue la 1 con  $24.38\% \pm 1.85$  y que a mayor cantidad de estabilizante mayor eficiencia de adsorción por lo que podemos decir que la cantidad de Poloxámero 407 si afecta en la formulación. Sin embargo, las 10 formulaciones indican un porcentaje bajo de AG ( $>25\%$ ) adsorbido lo que indica que el método de homogeneización con rotor estator es adecuado para preparar nanopartículas lipídicas sólidas, pero no eficiente.



**Figura 17. Eficiencia de adsorción de las formulaciones.**

La mala eficiencia de incorporación del AG en las SLN bajo las condiciones de esta investigación se debe al pH de la fase acuosa que influye en la ionización del fármaco y por lo tanto en su solubilidad [26], por consiguiente, es probable que la disminución del pH de la fase acuosa reduzca la solubilidad del AG lo que podría mejorar la captura del fármaco en las nanopartículas [1].

Sun *et al.* (2007) en su proceso de extracción de AG de la raíz de regaliz explican el comportamiento de esta molécula bajo diferentes pH's. Bajo condiciones extremadamente ácidas ( $\text{pH} < 3$ ) el AG existe como forma molecular, mientras que la forma disociada del AG predomina en  $\text{pH} > 6$ . A valores altos de pH (por encima de sus  $\text{pK}_a$ 's) el AG es desprotonado y su comportamiento es como el de una molécula hidrofílica que es fácilmente solubilizada en agua, lo que sugiere que la forma molecular es más hidrofóbica que la forma disociada [1]. El pH de la formulación de SLN fue de 4.86 por lo que se encuentra por encima de los  $\text{pK}_a$ 's del AG (2.76, 2.81, 4.71) y como se mencionó anteriormente su comportamiento es fácilmente solubilizado en agua por lo que tuvo afinidad a la fase acuosa en lugar de quedar adsorbido en el lípido de la formulación.

**Tabla 6. Resultados obtenidos de la cuantificación de AG en la SLN**

<b>Evaluaciones</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Cantidad de AG pesada	1.5006	
Cantidad de AG en el sobrenadante	1.1247	74.95
Cantidad de AG en las SLN	0.3759	-
E. A.	-	25.05

Estos resultados son satisfactorios ya que se han reportado % E. E. para el AG de hasta 4.5% empleando el método doble emulsión ( $w_1/o/w_2$ ) en nanopartículas poliméricas [1] y de 8.27% con el método de ultrasonido con película de evaporador rotatorio en nanopartículas lipídicas sólidas [4].

La selección de una formulación en este estudio se basó en aquella que proporcionó un tamaño de partícula,  $\Psi_z$ , e índice de polidispersión óptimos, buena estabilidad, y la mayor cantidad de carga de fármaco y % E. A.

### 8.2 Caracterización de las nanopartículas optimizadas

Con base en los valores de los parámetros de formulación optimizados en el presente trabajo, se eligió la formulación 1 y se caracterizó en los términos de TP, PDI, PZ, EE, morfología por microscopía electrónica de barrido (MEB) y sus interacciones mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los datos obtenidos en términos de TP, PDI, PZ, EE se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Características fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas.**

<b>Sistema</b>	<b>TP (nm)</b>	<b>IP</b>	<b>PZ (mV)</b>	<b>EA (%)</b>
1	171.6 ± 1.39	0.197 ± 0.005	-18.23 ± 0.21	25.05 ± 2.42
2	180.97 ± 0.21	0.09 ± 0.002	-18.63 ± 0.66	20.82 ± 0.01
3	160.13 ± 0.47	0.07 ± 0.02	-16.83 ± 1.52	19.24 ± 0.05

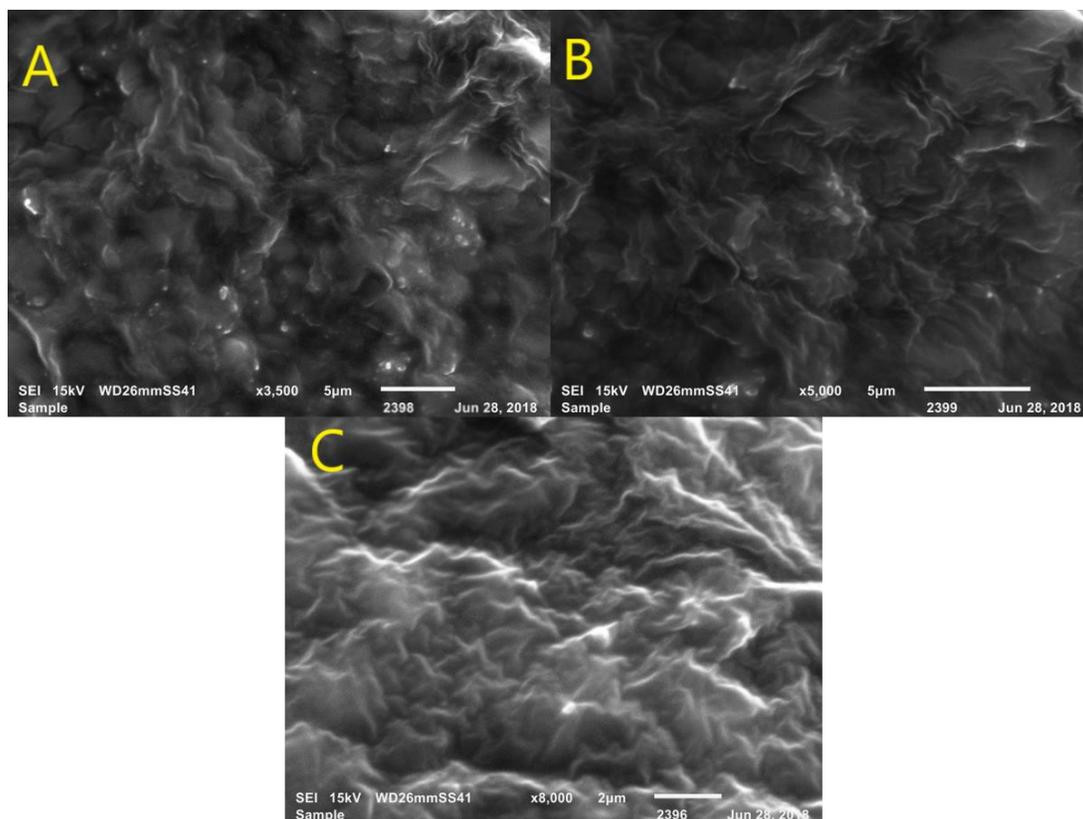
Notas: TP = Tamaño de partícula. PDI = Índice de polidispersión. PZ = Potencial zeta. EA = Eficiencia de adsorción. Promedio ± desviación estándar (n = 3).

---

Se determinó que el TP se encontraba en el rango de 160 – 181 nm, con PDI < 0.2 (monodispersas Figura 17), PZ de -18 a -16 mV y EE de 19 – 25 %.

Considerando la importancia de las propiedades superficiales y características fisicoquímicas de las nanopartículas, éstas deben ser caracterizadas durante su elaboración, para poder asociar estas propiedades con el comportamiento *in vitro/in vivo*. Teniendo en cuenta el reducido tamaño de las nanopartículas, el diámetro medio debe ser evaluado a través de métodos altamente sensibles como lo es la difracción láser (light scattering). Existen otras técnicas que además de entregar información con respecto al diámetro medio proporcionan datos relacionados con la forma de las partículas, dentro de ellas se encuentra la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) [27].

En la siguiente figura (Figura 18) se muestran las micrografías de los sistemas preparados de SLN de la formulación optimizada.

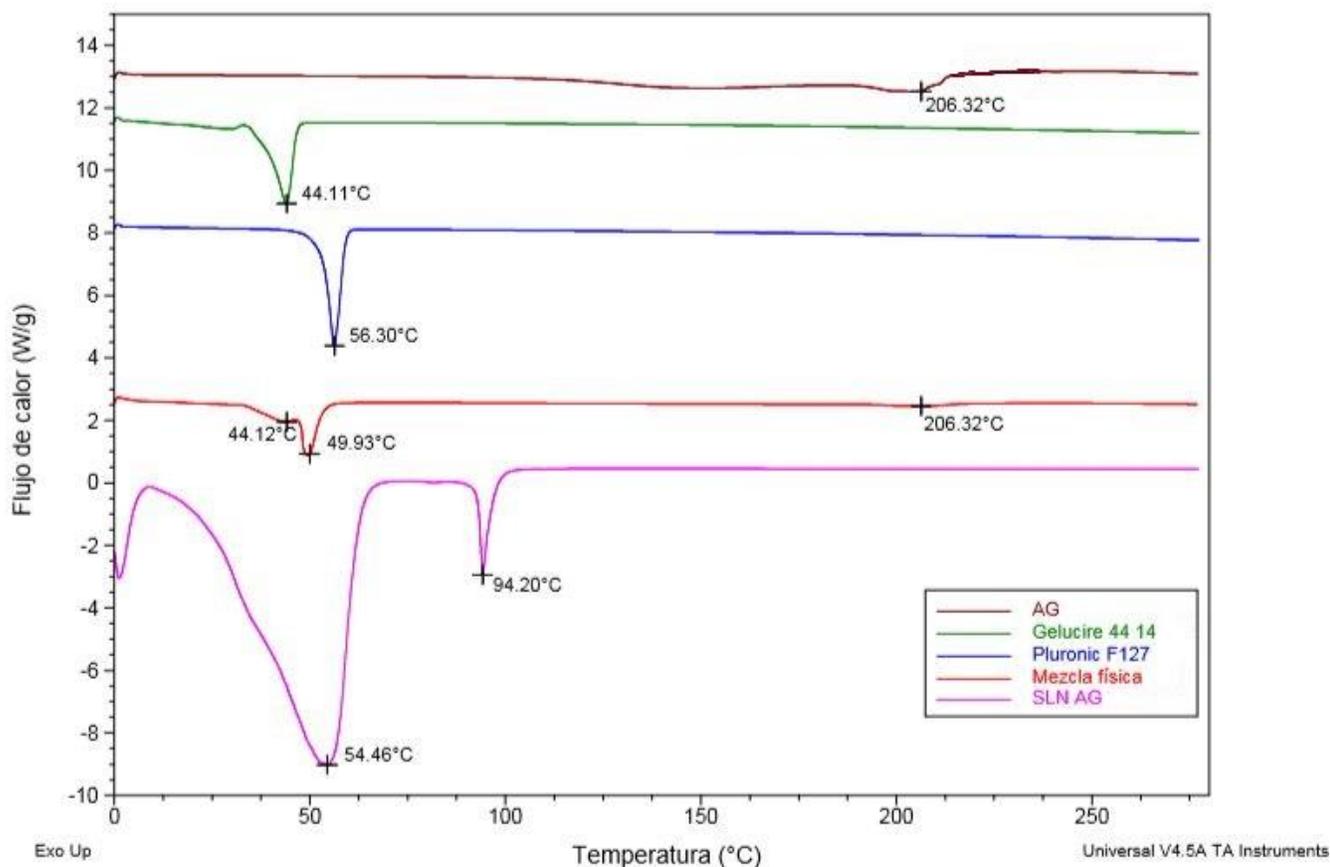


**Figura 18. Micrografía MEB de las SLN optimizadas. En donde A= 3500x, B=5000x y C=8000x**

---

En la figura 18 se muestra la morfología externa de las nanopartículas preparadas en condiciones óptimas en donde se observa que las nanopartículas (puntos blancos brillantes) son sólidas, compactas, de forma esférica, sin embargo, se observan muy escasas debido a que no se dejó secar el tiempo necesario y se podían observar algunos aglomerados. Teniendo así que el tamaño que indica la barra blanca en las micrografías es mayor a la esperada debido a que no localizó el tamaño de las nanopartículas si no el de los aglomerados.

Se realizaron estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido con la finalidad de evaluar cambios en las estructuras químicas de los componentes de la formulación y la existencia de posibles interacciones que en cierto momento puedan indicar inestabilidad o formación de dispersiones moleculares. En la Figura 19 se representan los termogramas obtenidos por DSC del ácido glicirricínico, Gelucire 44/14, Poloxámero 407 (Pluronic F-127), de la mezcla física de los componentes mencionados anteriormente y de las nanopartículas con ácido glicirricínico. Para el caso del AG se observa la entalpía de fusión a 206.32 °C, el cual es atribuido al punto de fusión del principio activo, que coincide con los datos teóricos, seguida de unas señales cercanas a los 220°C correspondientes a la descomposición de la fracción de ácido glucurónico por el tratamiento térmico convirtiéndose a ácido glicirretínico [1]. El lípido de la formulación, Gelucire® 44/14 presenta una endoterma con una temperatura de fusión inicial de 38.2 ° C y una temperatura máxima de fusión de 44.11 ° C característico al punto de fusión del Gelucire 44/14 el cual es de 44°C referenciado al primer número de su nombre [28]. Este comportamiento térmico puede explicarse por la composición del excipiente, una mezcla de acilgliceroles y ésteres PEG [29].



**Figura 19. Termogramas obtenidos por DSC de los componentes puros y formulados en las nanopartículas optimizadas.**

Para el Pluronic® F127 se muestra su punto de fusión a 56.30°C, el cual coincide con lo reportado en la literatura a aproximadamente 50°C. En esta misma figura se muestran los termogramas de la mezcla física de AG con cada uno de los componentes (Gelucire 44/14 y Pluronic F 127) en proporciones equivalentes a la formulación, se observa que la endoterma perteneciente al punto de fusión del AG no sufrió ningún cambio, al igual que se puede observar el endoterma a 44.12°C perteneciente al Gelucire 44/14 y otro a 49.93°C que como ya se mencionó anteriormente corresponde al Pluronic F127 por lo que no existe interacción de los componentes al mezclarlos físicamente ya que se observó el punto de fusión característico de cada componente. Para el caso del termograma de las SLN se observa un evento térmico a 94.20°C atribuible a la evaporación del agua y otro a 54.46°C. Cuando la materia prima se transforma en SLN se deprime el punto de fusión, sin importar si las SLN

---

---

son placebo o se encuentran cargadas con el fármaco. La disminución de la temperatura se puede atribuir a un efecto del tamaño muy pequeño de las nanopartículas [29]. El pico del AG desaparece totalmente evidenciando la ausencia de fármaco cristalino en las muestras o una baja adsorción del fármaco en las SLN [1].

### 8.3 Estabilidad de las nanopartículas

Las formulaciones de nanopartículas aumentan su superficie en varios órdenes de magnitud y esto puede conducir a una agregación después de largos períodos de almacenamiento. Esta mala estabilidad a largo plazo puede deberse a diferentes factores físicos y químicos que pueden desestabilizar el sistema [9].

El TP, IP y  $\Psi_z$  de las partículas son propiedades importantes de las dispersiones coloidales, ya que la tendencia al sedimento está determinada por los cambios en estos parámetros. Además, estas propiedades de las partículas influyen en sus comportamientos *in vitro/in vivo* [34].

La desestabilización de las nanoemulsiones solo es debida al fenómeno de transferencia de masa entre las gotas a través de la fase gruesa (continua), lo cual es descrito en la literatura como el crecimiento de Ostwal en las emulsiones. En teoría, en este proceso de desestabilización, cualquier cambio en el radio de las gotas (partículas) induce diferencias en el potencial químico del material dentro de las partículas. La reducción de la energía libre en la emulsión es resultado de la reducción del área interfacial, y por lo tanto del crecimiento de grandes gotas en la emulsión a expensas de algunas pequeñas. Como consecuencia, la difusión del material inerte de las partículas disminuye lentamente, reduciendo el grado de crecimiento [35].

Entre los principales problemas de diseño de las nanopartículas se encuentra la estabilidad física, la cual se manifiesta como un aumento del tamaño de las partículas y la formación de geles [13].

En este trabajo se realizó la prueba de estabilidad de dos diferentes formas: mediante almacenamiento y mediante el uso del equipo Turbiscan Classic MA2000, para ver el

---

---

comportamiento de las nanopartículas durante un mes. Después de cuatro semanas de almacenamiento a 25 °C, no hubo cambios significativos en el TP e IP. A continuación, se muestran los resultados de las pruebas mencionadas anteriormente.

### **8.3.1 Estabilidad de almacenamiento**

Durante el almacenamiento de las dispersiones de SLN, por periodos prolongados, podría ocurrir la agregación de las partículas. Las partículas individuales difunden en el medio de dispersión, provocando choques que pueden conducir a una floculación pericinética.[13].

Entre los mayores problemas de estabilidad durante el almacenamiento de las SLN se encuentran fenómenos de gelificación, aumento en el tamaño de las partículas y la expulsión del fármaco desde la matriz lipídica. Existe una relación cercana entre la modificación cristalina de los lípidos y la gelificación, la agregación de las partículas y la expulsión de los fármacos. El primer producto obtenido después de la homogeneización en caliente es una nanoemulsión de un material fundido superenfriado la cual se caracteriza por gotas de lípido esféricas con elevada capacidad de incorporación de fármacos. La transformación del lípido fundido a un lípido sólido cristalino disminuye su capacidad de carga y con esto, su estabilidad. La estabilidad de las dispersiones de SLN disminuye conforme la estructura cristalina de los lípidos se estabiliza. [36].

Los factores desestabilizantes del tamaño de las partículas durante el almacenamiento actúan en el siguiente orden: luz solar > luz artificial > oscuridad [13].

Las muestras fueron almacenadas a 4°C, 25°C y 40°C, durante 1 mes a condiciones de luz artificial. No mostraron cambios; su estructura se mantuvo estable sin mostrar fenómenos de inestabilidad.

En la figura 20 se observa que la muestra almacenada a 4°C aumento su tamaño de partícula del día 1 (137.8 nm) al día 5 (150.1 nm) sin embargo, del día 5 al día 30 no hubo un cambio significativo en el tamaño de partícula almacenada en refrigeración. Las SLN almacenadas a 25°C y a 40°C no tuvieron diferencia significativa de tamaño de partícula sin embargo tuvo menor diferencia la formulación almacenada a 40°C por lo que se consideraría la temperatura óptima para almacenarlas. Por lo que se puede decir que las SLN aumentan

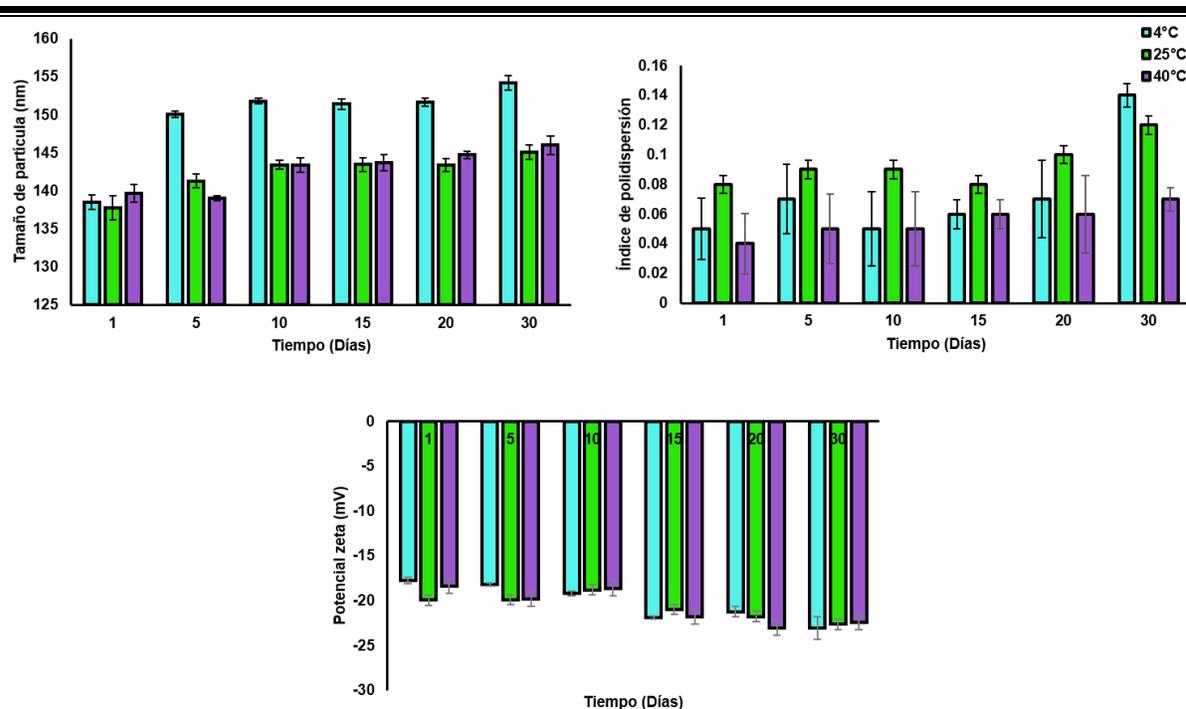
---

---

su tamaño rápidamente a temperaturas bajas, mientras que a temperaturas altas como las de estufa se mantienen estables por 30 días. El índice de polidispersión tampoco tuvo cambios significativos durante los 30 días sin embargo al día 30 se observa un aumento en la formulación almacenada a 4°C seguida de 25°C y la que menos aumento fue la formulación almacenada a 40°C. El análisis de varianza mostrado en la tabla 12 del anexo 12.3 muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el TP y IP durante el tiempo de almacenamiento ya que el valor P es mayor a 0.05 con un nivel del 95.0% de confianza por lo tanto la formulación es estable de acuerdo con el tamaño de partícula e índice de polidispersión.

Con respecto al  $\Psi_z$  se nota un aumento en la formulación almacenada en refrigeración(4°C) seguido de temperatura ambiente (25°C) y por último el almacenado en la estufa (40°C). Este resultado explicaría un aumento importante en el tamaño de partícula que se observa a esta temperatura. Se considera que entra demasiada energía cinética al sistema, lo que le desestabilizaría. El potencial Z inicial de las dispersiones indica que se trata de un sistema inestable; sin embargo, al contener la formulación un estabilizante que trabaja por efecto estérico, la carga eléctrica de la partícula puede despreciarse. Las interacciones entre los componentes de las SLN se estudiaron por DSC y se observó que la presencia del fármaco modifica la estructura de las nanopartículas por interacciones que se generan entre los componentes.

El análisis de varianza mostrado en la tabla 12 del anexo 12.3 muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa en el PZ durante el tiempo de almacenamiento.



**Figura 20. Variación de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad de almacenamiento. Promedio  $\pm$  error estándar (n=3).**

### 8.3.2 Estabilidad con Turbiscan

En la industria, los productos generalmente no sufren un solo fenómeno de inestabilidad, sino varios al mismo tiempo. El lapso necesario para la identificación de fenómenos de inestabilidad puede acortarse dramáticamente con la ayuda de un analizador óptico antes de la aparición de una modificación física a escala macroscópica de suspensiones coloidales [37].

El analizador óptico Turbiscan™ Classic MA 2000 es un instrumento que permite una visualización macroscópica de la estabilidad de las dispersiones coloidales opacas y concentradas midiendo la retrodispersión y la transmisión de partículas dispersas en solución basado en un mecanismo de análisis de dispersión de luz múltiple [38].

El principio consiste en enviar fotones (luz) a la muestra. Estos fotones, después de ser dispersados muchas veces por objetos en suspensión (gotitas, partículas sólidas, burbujas

---

---

de gas) emergen de la muestra y son detectados por el dispositivo. Un cabezal de lectura móvil compuesto por un diodo de infrarrojo cercano (NIR) y dos detectores, transmisión (T) y retrodispersión (BS), escanea una celda de vidrio que contiene la muestra. El software Turbiscan luego permite interpretar los datos obtenidos fácilmente [37]. Esta medición se basa en la variación de la fracción de volumen (migración) o tamaño (coalescencia), lo que da como resultado la variación de la retrodispersión y las señales de transmisión. La modificación de una señal de retrodispersión puede producirse en función del tiempo y la migración de partículas y se informa gráficamente en forma de picos positivos (aumento de retrodispersión) o negativos (disminución de retrodispersión) [37].

Los escaneos se repiten a lo largo del tiempo, cada uno proporciona una curva y todas las curvas se superponen en un gráfico para mostrar la estabilidad a lo largo del tiempo. La transmisión se usa para analizar dispersiones claras a turbias y la retrodispersión se usa para analizar dispersiones opacas [39].

Cuando se compara con otros métodos analíticos ópticos, como microscopía, tamaño de partícula y potencial zeta, el análisis de Turbiscan tiene la ventaja de ser un método no destructivo (sin dilución de muestra) y no requiere preparación de la muestra. Además, proporciona información sobre el tipo de proceso de desestabilización que está teniendo lugar, pudiendo discriminar entre la migración de partículas (cremosa o sedimentación), que es un proceso reversible, y la variación del tamaño de las partículas (coalescencia), que a menudo es irreversible. De hecho, para partículas más pequeñas que la longitud de onda incidente, aumentan los tramos de escala para aumentar el perfil de retrodispersión [37]. Las variaciones mayores del 10%, ya sea como un valor positivo o negativo en la escala gráfica de retrodispersión, son representativas de una formulación inestable. [40]

De hecho, Turbiscan Classic tiene la ventaja de acortar el tiempo de análisis y preservar muestras de la degradación al ser utilizado con mayor frecuencia en ciencias farmacéuticas, cosmeceúticas, petróleo y alimentos para predecir la estabilidad a largo plazo de nanomateriales inorgánicos, orgánicos y formulaciones. [38]

La estabilidad de las nanopartículas en esta investigación se evaluó usando Turbiscan Classic MA 2000 a una temperatura de  $25 \pm 2$  ° C durante 30 días en tres lotes de la formulación optimizada.

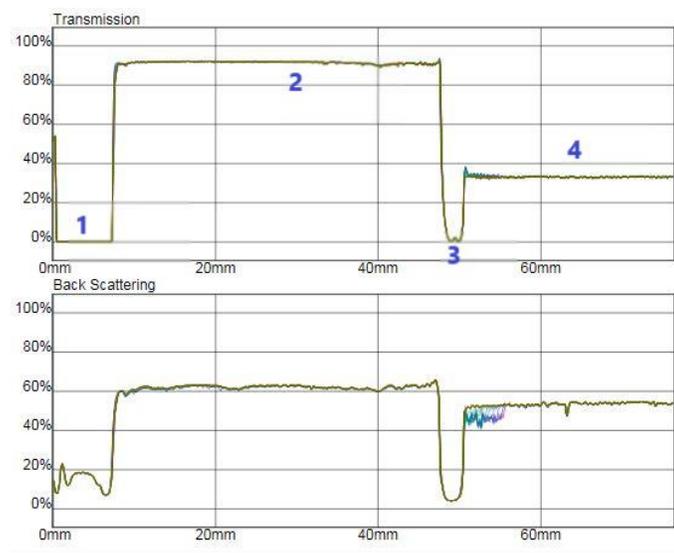
---

Es importante tener en cuenta que, en el caso de una señal en la transmisión, también hay una señal en la retrodispersión en la misma zona. Esto se debe a reflejos secundarios de la luz en la celda de vidrio. [39].

Al analizar los perfiles de Turbiscan, podemos cortar el gráfico en tres partes: inferior, medio y superior. Las variaciones en la parte inferior y superior de la muestra están relacionadas con los fenómenos de migración. Las variaciones en el medio se deben a las variaciones de tamaño de partícula [40].

Para visualizar mejor la señal de Turbiscan, los perfiles de transmisión y retrodispersión del agua se usaron como referencia. Estos parámetros de BS y T permitieron predecir la estabilidad de las SLN cargadas con ácido glicirricínico.

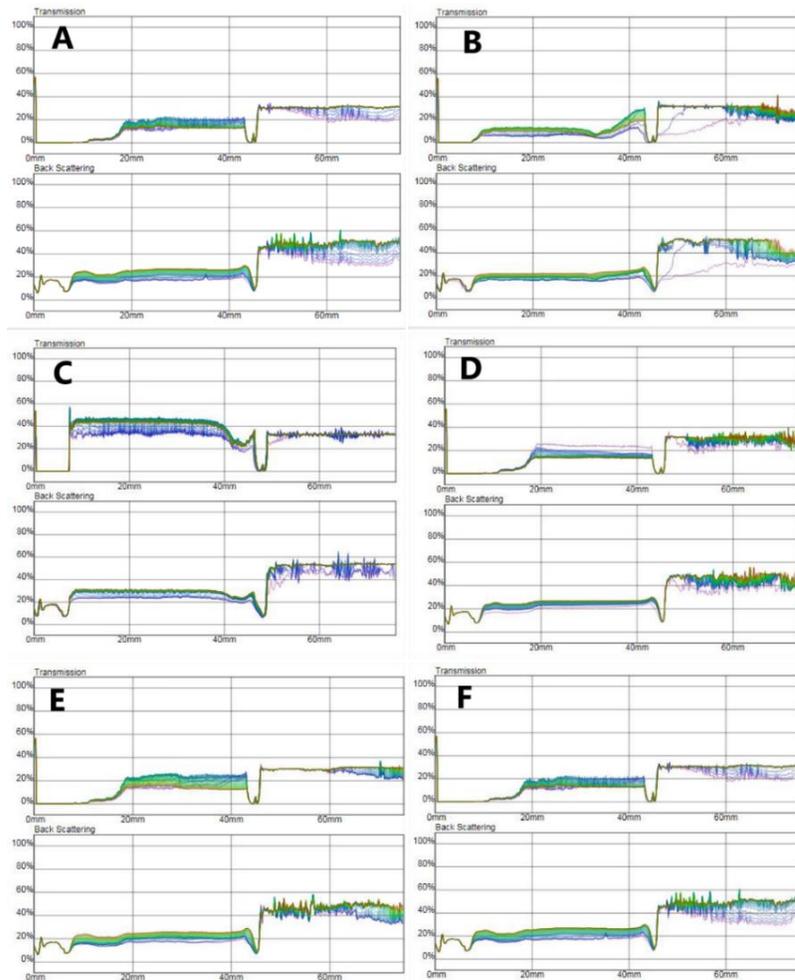
En la figura 21 se observan los perfiles de transmisión y retrodispersión del agua en el cual en el perfil de transmisión se indica que parte del gráfico correspondiente a la distribución en la celda.



**Figura 21. Prueba agua en Turbiscan Classic. En donde 1) Parte del fondo de la celda, 2) Parte de en medio, 3) Parte superior y 4) Menisco.**

En la figura 22 se muestra el perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 1 de SLN optimizadas. Como podemos observar los perfiles de BS y T demostraron que las muestras no presentan cremación ni sedimentación, pero si un aumento en el

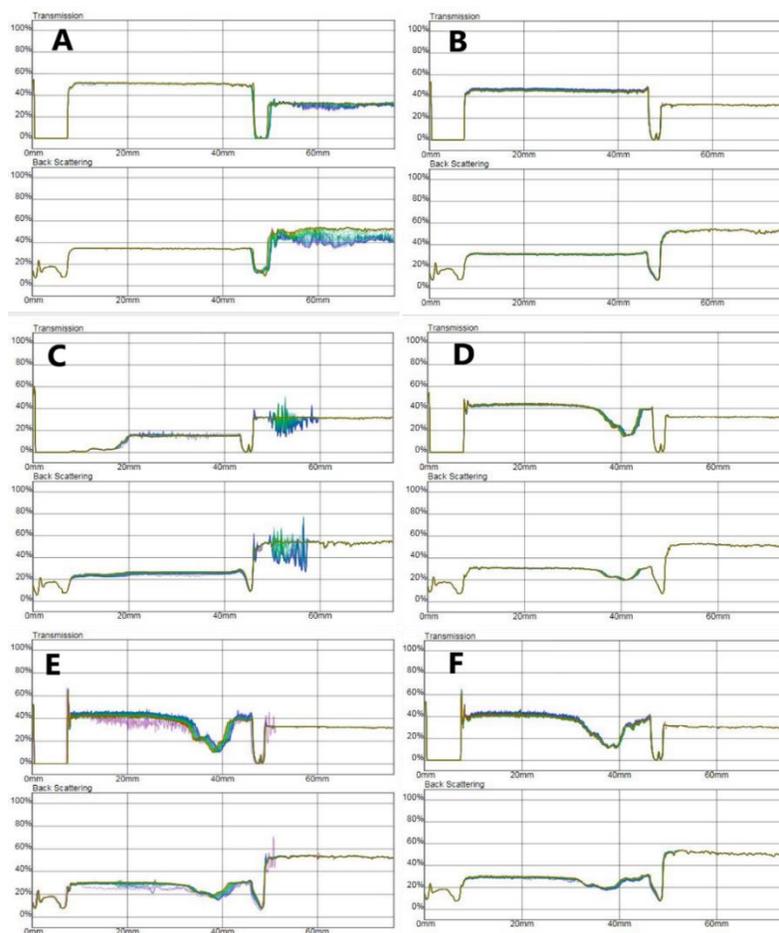
tamaño de partícula (coalescencia) que se muestra en la variación de los perfiles en la parte de en medio del tubo en ambos perfiles. También se observa que la calidad del menisco fue mala al mostrar una variedad en el gráfico debido a que tal vez las muestras fueron movidas al momento de hacer la medición. Las muestras no mostraron gran variación a lo largo de los 30 días con respecto al día 1.



**Figura 22. Perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 1 de SLN optimizadas. Los perfiles se evaluaron en diferentes tiempos de almacenamiento: (A) día 1; (B) día 5; (C) día 10; (D) día 15; (E) día 20 y (F) día 30.**

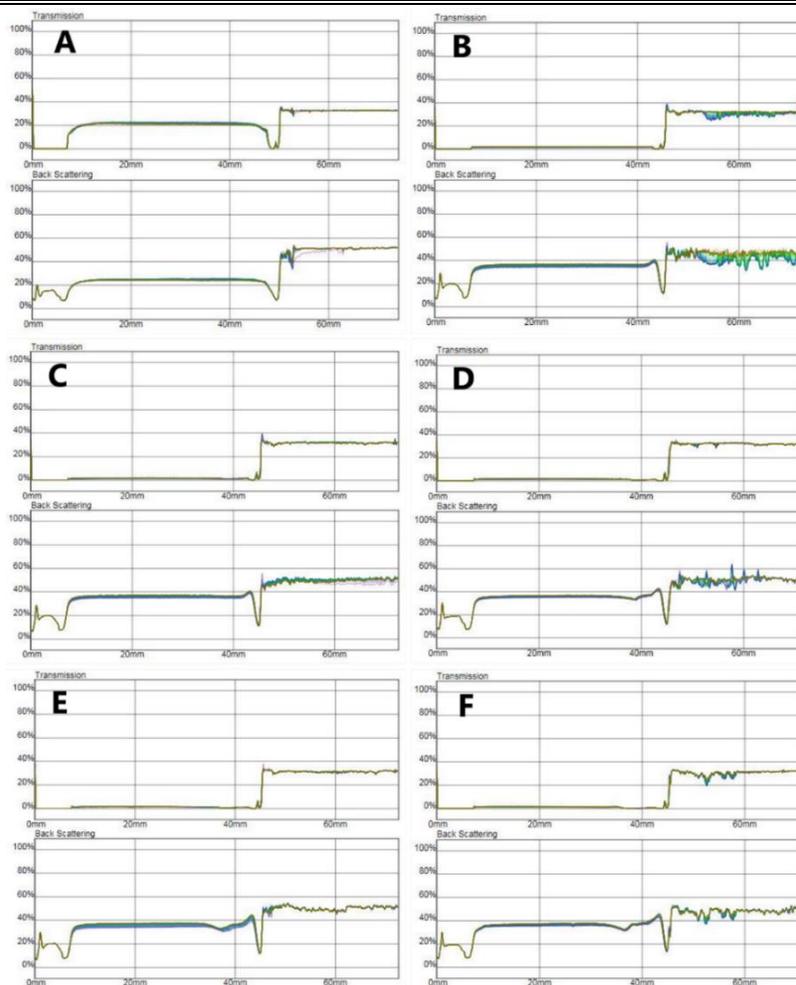
Los perfiles de la figura 23 corresponden al segundo sistema de SLN optimizadas en donde podemos observar que el fondo del tubo no presentó cambios, el perfil de transmisión se encontraba en un 50% el día 1 y 5 sin mostrar variaciones en el tamaño de partícula, al día

10 disminuye a 20%, para el día 15 vuelve a aumentar a 40%, para el día 30 disminuyó a 30% manteniéndose un comportamiento similar en el gráfico observándose una pequeña variación en el tamaño de partícula hasta el día 20. El perfil de BS mantuvo un comportamiento similar los 30 días sin mostrar variaciones significativas. Se obtuvo un buen menisco excepto los días 1 y 15.



**Figura 23. Perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 2 de SLN optimizadas. Los perfiles se evaluaron en diferentes tiempos de almacenamiento: (A) día 1; (B) día 5; (C) día 10; (D) día 15; (E) día 20 y (F) día 30.**

En los perfiles del sistema 3 (figura 24) se observó que el día 1 tenía 20 % de transmisión en el fondo del tubo, sin variación en el tamaño de partícula y buen menisco, al día 5 se observa una disminución del perfil T al 0% y este comportamiento se mantuvo durante los 30 días. El perfil de BS aumentó un 20% del día 1 al día 30.



**Figura 24. Perfil cinético de retrodispersión (BS) y transmisión (T) para el sistema 3 de SLN optimizadas. Los perfiles se evaluaron en diferentes tiempos de almacenamiento: (A) día 1; (B) día 5; (C) día 10; (D) día 15; (E) día 20 y (F) día 30.**

Con estos datos obtenido con Turbiscan Classic se observa que las SLN no presentan sedimentación ni cremación, sin embargo, presentó una variación en el tamaño de partícula que concuerda con los datos obtenidos en el análisis de estabilidad de almacenamiento en donde el tamaño de partícula aumentó del día 1 al 30 aproximadamente 30 nm y por eso en los perfiles de BS y T mostro una variación pequeña que se presenta como una coalescencia de las partículas. Por lo que las SLN son estables a simple vista, pero tienden a un aumento de partícula conforme pasa el tiempo siendo inestables al ser analizadas con un analizador óptico como lo es el Turbiscan Classic al presentar coalescencia de las partículas.

---

## IX. CONCLUSIONES

Se prepararon nanopartículas lipídicas sólidas mediante el método homogeneización con rotor estator cargadas con ácido glicirricínico y se caracterizaron en cuanto a tamaño de partícula, potencial zeta, calorimetría de barrido diferencial, microscopía electrónica de barrido, eficiencia de adsorción y estabilidad.

El método homogeneización con rotor estator mostró ser ineficaz para adsorber AG en las SLN al mostrar un bajo % E.A. sin embargo, fue mayor a los reportados en la literatura. El método para cuantificar AG en las nanopartículas mostró ser lineal, preciso y exacto.

La selección de una formulación en este estudio se basó en aquella que proporcionó un tamaño partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, estabilidad y un %E. A óptimos.

La formulación óptima se caracterizó con respecto a tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial Z, %E.A., morfología e interacciones entre componentes. La Dispersión Dinámica de la Luz puso en evidencia el tamaño de las partículas (130-155 nm) y que además éste aumenta ligeramente con el tiempo; el potencial Z inicial de las dispersiones indica que se encuentran en un umbral de dispersión de acuerdo con el potencial zeta Riddick; por MEB se observaron partículas esféricas con presencia de aglomerados, se obtuvo un %E.A de 25.05 y mediante DSC se observó que los componentes no tienen interacción entre sí al mezclarlos físicamente, sin embargo, en las nanopartículas lipídicas sólidas si modifica su estructura mostrando un solo endoterma.

Las nanopartículas optimizadas presentaron una buena estabilidad física y química en cuanto a tamaño de partícula e índice de polidispersión cuando éstas se sometieron al estudio de estabilidad de almacenamiento

Los datos obtenidos mediante Turbiscan Classic demostraron que es una herramienta válida, no invasiva y que no consume mucho tiempo para estudiar las propiedades de estabilidad de formulaciones coloidales. Se concluyó que se obtuvieron nanopartículas lipídicas sólidas sin presencia de fenómenos de inestabilidad con variaciones en el tamaño de partícula.

---

## X. PROSPECTIVAS

- A) Caracterizar las nanopartículas lipídicas sólidas mediante Infrarrojo para poder observar las interacciones de unión del fármaco con el lípido.
- B) Emplear el uso de estabilizantes catiónicos observando si aumenta la eficiencia de adsorción.
- C) Evaluar en líneas celulares el sistema ya optimizado, para determinar la viabilidad de emplearlo en el área de la medicina veterinaria como un nanoacarreador del AG con uso principalmente antiviral.
- D) Someter a ensayos clínicos las formulaciones obtenidas con el objetivo de demostrar el efecto de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sobre la biodistribución *in vitro-in vivo*.

---

## XI. REFERENCIAS

1. Hernández R.S. (2013). *Desarrollo y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con un fármaco hidrofílico modelo (ácido glicirricínico) por los métodos de desplazamiento del solvente y doble emulsión*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
2. Naranjos, N. (2011). Preparación de nanopartículas poliméricas con aplicación farmacéutica usando técnicas basadas en emulsificación, *REVISTA MEXICANA DE FÍSICA*, 57(2), 41–43.
3. Urbán Z. (2015). *Evaluación de la actividad terapéutica del ácido glicirricínico formulado en sistemas submicrónicos contra el virus de PRRS*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
4. Jun H. (2008). Formulation and preparation of glycyrrhizic acid solid lipid nanoparticles. *CNKI*, 11, 25-41.
5. Siedento U. (2008). El regaliz, una planta medicinal eficaz para la tos y las afecciones de estómago. *Revista Internacional de Acupuntura*, 251-252.
6. Chuanhua M. (2013). Immunoregulatory effects of Glycyrrhizic acid exerts antiasthmatic effects via modulation of Th1/Th2 cytokines and enhancement of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in ovalbumin-sensitized mice, *El Sevier*, 148(3), 755-762.
7. Xitong S., Lei W., Mingming H., Wenxiang D., Meng X. & Peng Z. (2017). Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy. *El Sevier*, 95, 670-678.
8. Medina, M. (2010). *Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas (investigación bibliográfica)*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
9. Escalona, O. (2017). *Desarrollo y caracterización de nanopartículas con superficie modificada como potenciales transportadores de fármacos a través de la barrera hematoencefálica*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- 
10. Müller, R.H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 161-177.
  11. Mehnert W. & Mader K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *El sevier*. 47, 165–196.
  12. Garzón M.L, Hernández A., Vázquez M. L., Villafuerte L. & García B. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). (2008). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(4), 50-66.
  13. Villafuerte R. García B. F., Hernández A. L. & Vázquez M.L. (2008). Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39 (1) 38-52.
  14. Zetasizer Nano Series User Manual. (2003).
  15. Batalla J., Cuadros A., Martínez S. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin American Journal of Physics Education*, 8(4), 4319-1- 4319-6
  16. Riddick, T.M. (1968). *Control of Colloid Stability through Zeta Potential: With a Closing Chapter on its Relationship to Cardiocasvular Disease. Published for Zeta-Meter, Inc., by Livingston Pub. Co.*
  17. Gómez C. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. (2014). *Rev. Farmacol. Chile* 7(2), 7-1.
  18. Asasutjarit R., Lorenzen S., Sirivichayakul S., Ruxrungtham K., Ruktanonchai U. & Ritthidej C. (2007). Effect of Solid Lipid Nanoparticles Formulation Compositions on Their Size, Zeta Potential and Potential for In Vitro pHIS-HIV-Hugag Transfection. *Pharmaceutical Research*, 24(6), 1098-1107.
  19. Fernández R.A. (2009). Efecto de un agente dispersante sobre la liberación de albendazol desde una matriz lipídica. Tesis de grado Universidad Austral de Chile.
  20. Müller, R.H., Runge, S.A., Ravelli, V., Thunemann, A.F., Mehnert, W. & Souto, E.B. (2008). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 535-544.
  21. Deep P., Lakshmi T., Hitesh K., Bharathi B.R. & Ramakrishna S. (2016). Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *El Sevier*, 6, 15-19.

- 
22. Battaglia, L., Gallarate, M., Panciani, P.P., Ugazio, E., Sapino, S., Peira, E., & Chirio, D. (2014). Techniques for the preparation of solid lipid nano and microparticles, en Application of Nanotechnology in Drug Delivery. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.5772/58405>
  23. Gasco, M.R. (1993) U.S. Patent No. 5250236, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.
  24. Ficha de información técnica del Pluronic F127. Recuperada de: [http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/7065634109dfb6dfd04fae8889492f4e56c2cb5bbccd/main/files/Poloxamer\\_\\_Pluronic\\_F\\_127\\_.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/7065634109dfb6dfd04fae8889492f4e56c2cb5bbccd/main/files/Poloxamer__Pluronic_F_127_.pdf).
  25. Camacho E. A. (2010). *Evaluación de uso de nanopartículas lipídicas sólidas como modificadores de las propiedades de recubrimientos farmacéuticos acuosos*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
  26. Bargrizan, S. Smernik, R. Fitzpatrick, R. Mosley, L.M. (2018). The application of a spectrophotometric method to determine pH in acidic (pH<5) soils. *Talanta*, 186, 15, 421-426.
  27. Tian, H. Zhuoyan, L. Danfeng L. Jing, H. (2018). Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 248, 78-85.
  28. Otun, SO. (2015). The use of quasi-isothermal modulated temperature differential scanning calorimetry for the characterization of slow crystallization processes in lipid-based solid self-emulsifying systems, *Pharm Res.* 32(4), 1316–1324.
  29. Jannin V. (2009). Lauroyl polyoxylglycerides, functionalized coconut oil, enhancing the bioavailability of poorly soluble active substances. *Pharmaceutical R&D, Gattefossé S.A.S., Saint-Priest, 69804, France*, 16(4), 267 – 272.
  30. Raíz de Regaliz: propiedades, beneficios para la salud, efectos secundarios y dosis recomendada. (2015). Nutrioptima. Recuperada de: <https://www.nutrioptima.com/guia/hierbas/raiz-de-regaliz-propiedades-beneficios/>
  31. Chambin O. (2005). Interest of Multifunctional Lipid Excipients: Case of Gelucire 44/14. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31, 527–534.
  32. Mohamed A, Dissolution and bioavailability enhancement of Atorvastatin: Gelucire semi-solid binary system, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2017; 43.
  33. Otun S. (2014). The Use of Quasi-Isothermal Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry for the Characterization of Slow Crystallization Processes in Lipid-Based Solid Self-Emulsifying Systems, *Pharmaceutical Research*, 32(4).

- 
34. Chad Curtis, C. Toghiani, D. Wong, B. Nance, E. (2018). Colloidal stability as a determinant of nanoparticle behavior in the brain. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, (1), 673-682.
  35. Post, P. Bierwirth, M. Weber A. P. (2018). Mechanical stability measurements of surface modified nanoparticle agglomerates. *Journal of Aerosole Science*, 80, 78-87.
  36. Tian, H. Zhuoyan, L. Danfeng L.Jing, H. (2018). Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 248, 78-85.
  37. Locatelli M., Christian C., Cilurzo F., Cosco D., Gentile E., Scalise D., Carafa M., Fleury M., Tisserand C. & Barbacane R. (2015). Long Term Stability Evaluation of Prostacyclin Released from Biomedical Device Through Turbiscan Lab Expert, *Med Chem*, 11(4), 391–399.
  38. Trapasso E., Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009; 72, 155–160.
  39. Turbiscan CLASSIC – User Guide ©Formulation.
  40. Xiang F. & Huang JL. (2011). Turbiscan Lab® Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 214-221.
  41. CNQFB, Comisión de validación de métodos analíticos. Guía de Validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C.: Comisión de validación de métodos analíticos. 123 páginas.

---

## XII. ANEXOS

### 12.1. Propiedades fisicoquímicas

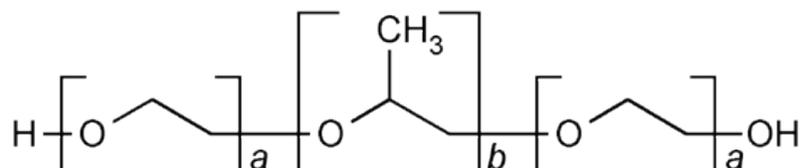
#### 12.1.1. Propiedades del AG

<b>Nombre IUPAC</b>	(3 $\beta$ ,18 $\alpha$ )-30-hidroxi-11,30-dioxoolean-12-en-3-yl 2-O- $\beta$ -D- glucopiranosililo - $\beta$ -D- ácido glucopiranosidurónico								
<b>Fórmula condensada</b>	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>								
<b>Masa molecular</b>	822.93g/mol								
<b>Naturaleza química y constante de disociación</b>	Ácida, con 3 pK <sub>a</sub> s: 2.76, 2.81, 4.71								
<b>Apariencia física</b>	Polvo blanco								
<b>Solubilidad a 25°C</b>	Soluble en etanol, dimetilsulfóxido (DMSO); poco insoluble en agua. <table border="1"><thead><tr><th>Solvente</th><th>Cantidad</th></tr></thead><tbody><tr><td>Etanol</td><td>8.25mg/mL</td></tr><tr><td>DMSO</td><td>117mg/mL</td></tr><tr><td>Agua</td><td>1mg/mL</td></tr></tbody></table>	Solvente	Cantidad	Etanol	8.25mg/mL	DMSO	117mg/mL	Agua	1mg/mL
Solvente	Cantidad								
Etanol	8.25mg/mL								
DMSO	117mg/mL								
Agua	1mg/mL								
<b>Naturaleza química</b>	Saponina tripenoide de origen natural, semipolar.								
<b>Punto de fusión</b>	206°C								
<b>Longitud de onda reportada en la literatura</b>	Solución acuosa: 256nm								

Información tomada de: Jun H. (2008). Formulation and preparation of glycyrrhizic acid solid lipid nanoparticles. *CNKI*,11, 25-41.

### 12.1.2. Propiedades del Pluronic F-127 (Poloxámero 407)

Estructura química:



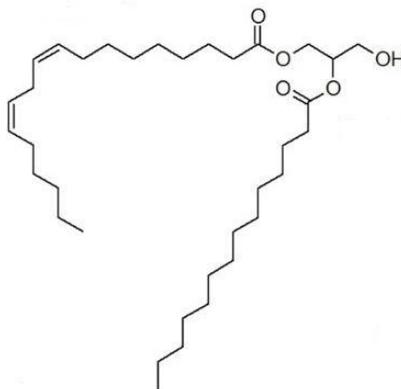
<b>INCI:</b>	Poloxámero 407
<b>Fórmula condensada:</b>	HO(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>a</sub> (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O) <sub>b</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>a</sub> H Donde a = 95-105 y b = 54-60
<b>Peso molecular:</b>	9840-14600g/mol (masa molecular relativa media)
<b>Descripción:</b>	Copolímero del polietilen-propilenglicol.
<b>Apariencia física:</b>	Polvo céreo, microperlas céricas, o copos céreos, blancos o casi blancos.
<b>Solubilidad:</b>	Muy soluble en agua y en etanol al 96 por ciento, prácticamente insoluble petróleo ligero (50-70 °C).
<b>Punto de fusión:</b>	Aprox. 50 °C.
<b>Aplicaciones:</b>	Estabilizante, agente de mojado, lubricante de tabletas, agente de solubilización y agente dispersante.
<b>DSC reportado en la literatura</b>	

Información tomada de: [http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/706563409dfb6dfd04fae8889492f4e56c2cb5bbccd/main/files/Poloxamer\\_\\_Pluronic\\_F\\_127\\_.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/706563409dfb6dfd04fae8889492f4e56c2cb5bbccd/main/files/Poloxamer__Pluronic_F_127_.pdf).

---

### 12.1.3. Propiedades del Gelucire 44/14

Estructura química:



<b>Ítem</b>	Lauroyl polyoxyl-32 glycerides
<b>Apariencia física:</b>	Cristalino semisólido
<b>HLB</b>	14
<b>Punto de fusión:</b>	44°C
<b>Aplicaciones:</b>	Excipiente que se utiliza para aumentar la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles en agua.
<b>DSC reportado en la literatura</b>	<p>Heat flow</p> <p>Peak 49°C ΔH= -338.2 J/g</p> <p>Temperature (°C)</p> <p>Gelucire 44/14</p> <p>G41</p>

Información tomada de: Chambin O. (2005). Interest of Multifunctional Lipid Excipients: Case of Gelucire 44/14. Drug Development and Industrial Pharmacy, 31, 527–534.

---

### 12.1. Selección de la longitud de onda

Se realizó un espectro de absorción de 200-400 nm, en donde la longitud de onda máxima del ácido glicirricínico se determinó en 256 nm.

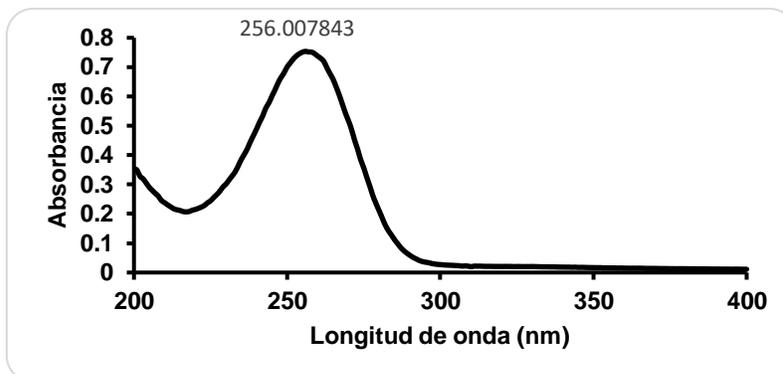


Figura 25. Espectro de absorción del ácido glicirricínico.

### 12.2. Interferencia

Para poder demostrar aditividad se comparó el espectro de absorción obtenido del ácido glicirricínico, el de la formulación de SLN y el de los excipientes. En la figura 26 se muestra esta comparación y podemos observar que la mezcla de ácido glicirricínico con excipientes (SLN) y el del ácido glicirricínico es prácticamente igual y que el espectro de absorción de los excipientes no muestra absorbancia a la longitud de onda máxima del AG (256nm) por lo tanto no presentan interferencias.

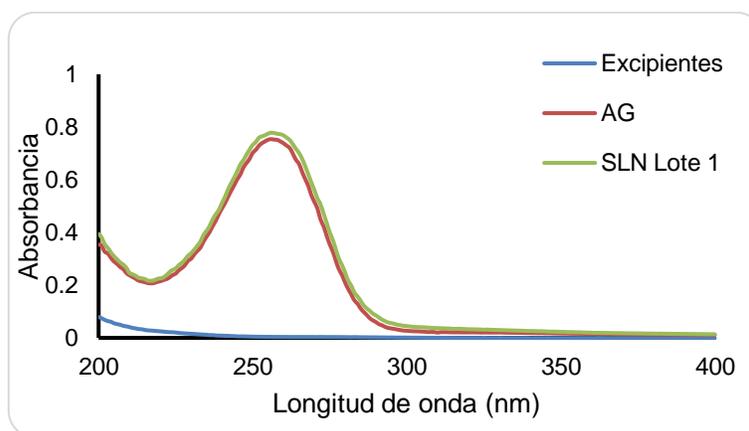


Figura 26. Espectro de absorción del ácido glicirricínico, excipientes y Lote 1 SLN para descartar interferencias.

---

## 12.2. Validación del método analítico para cuantificar ácido glicirricínico en las nanopartículas mediante Espectrofotometría UV-Vis

La validación del método analítico se realizó con base en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB y la guía ICH.

La adecuabilidad del sistema de medición de la respuesta analítica se evaluó leyendo por sextuplicado una solución de ácido glicirricínico a una concentración de 40 µg/mL, obteniendo la respuesta del analito y el coeficiente de variación, Tabla 5.

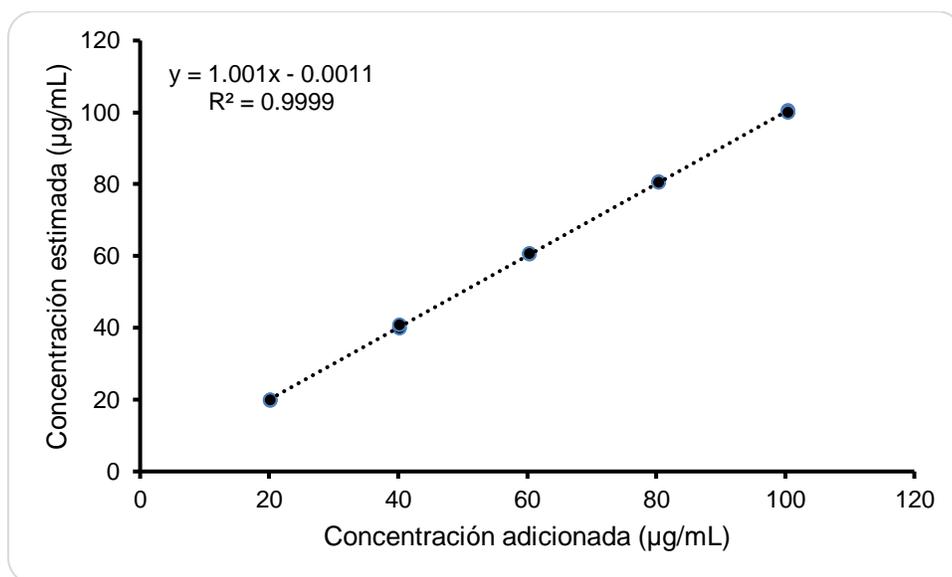
**Tabla 8. Adecuabilidad del sistema**

	Concentración	Absorbancia
	40	0.5006
	40.2	0.4998
	40.8	0.4994
	40.8	0.5035
	40.8	0.4995
	40.6	0.5123
Promedio	40.5333333	0.50251667
Desvest	0.35023801	0.00503087
% CV	0.86407405	1.00113523

La linealidad del sistema se determinó con el coeficiente de correlación en un rango de concentraciones de soluciones estándar de 20 a 100 µg/mL, utilizando una curva de calibración por triplicado, conformada por cinco puntos. Las absorbancias obtenidas fueron transformadas matemáticamente para estimar su concentración y se graficaron en función de la concentración de analito adicionada (Figura 26). Adicionalmente, para evaluar si el intercepto contiene el cero y si la pendiente es cercana a uno, se obtuvieron los coeficientes de ambos, así como sus límites inferiores y superiores (Tabla 9).

**Tabla 9. Coeficientes y límites del intercepto (b) y pendiente (m).**

	<b>Coeficientes</b>	<b>Límite Inferior 95%</b>	<b>Límite Superior 95%</b>
<b>Intercepción (b)</b>	0.130488889	-0.38628986	0.64726763
<b>Pendiente (m)</b>	0.999344843	0.99182545	1.00686424



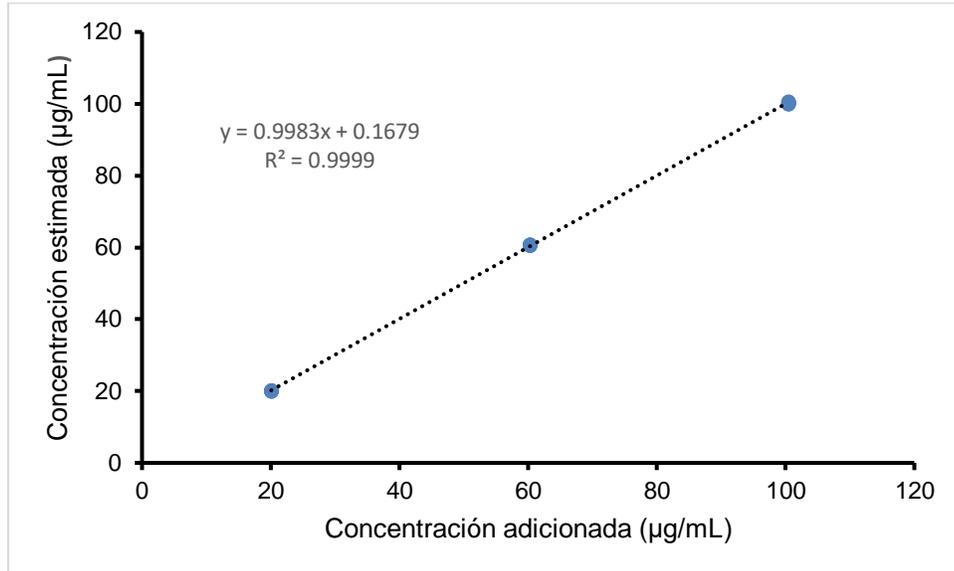
**Figura 27. Gráfico que representa la linealidad del sistema**

La precisión y exactitud del sistema fue evaluada con el coeficiente de variación de la respuesta analítica para tres niveles de concentración correspondientes al 80, 100 y 120 %. Se obtuvieron las respuestas del analito y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración (Tabla 10). Adicionalmente se reporta el coeficiente de variación global para la curva de calibración.

**Tabla 10. Coeficientes de variación y prueba t de student calculadas para evaluar la precisión y exactitud del sistema.**

<b>Concentración</b>	<b>Concentración real</b>	<b>Concentración estimada</b>	<b>CV %</b>	<b>t tab</b>	<b>T cal</b>
	20.08	20.05			
	20.08	20.03			
	20.08	20.15			
80	20.08	20.11	0.32	2.57	0.96
	20.08	20.01			
	20.08	19.98			
	60.24	60.56			
	60.24	60.72			
100	60.24	60.69	0.16	2.57	-9.95
	60.24	60.49			
	60.24	60.58			
	60.24	60.71			
	100.4	100.06			
	100.4	100.49			
120	100.4	99.93	0.25	2.57	1.57
	100.4	100.51			
	100.4	100.38			
	100.4	100.07			

Como se observa en los resultados anteriores el coeficiente de variación para determinar la precisión del sistema es menor al 2% y la t cal es menor que la t tab por lo que se cumple con el criterio para decir que el sistema es preciso y exacto, en las 3 concentraciones evaluadas.



**Figura 28. Gráfico que representa la precisión del sistema.**

Los límites de detección y cuantificación se determinaron a partir de la desviación estándar de la curva de regresión, empleando las ecuaciones descritas en la Guía de Validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Resultados obtenidos para los parámetros de desempeño de la validación.**

<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Observaciones</b>
Adecuabilidad del sistema	% CV ≤ 2.0	1.001%	Cumple
Linealidad del sistema	R <sup>2</sup> ≥ 0.98 IC (b) no debe incluir el cero	R <sup>2</sup> = 0.9999 LIC = -0.3862 LSC = 0.6473	Cumple
Precisión del sistema	% CV ≤ 2.0	0.16%	Cumple
Exactitud	t calculada < t tablas	-9.95 < 2.57	Cumple
LD	R <sup>2</sup> ≥ 0.98 IC (m) no debe incluir el cero	LIC = 0.9998 LSC = 3.6	Cumple
LC	R <sup>2</sup> ≥ 0.98 IC (m) no debe incluir el cero	LIC = 0.9998 LSC = 1.188	Cumple

### 12.3. Estabilidad de las nanopartículas optimizadas

**Tabla 12. Análisis de varianza para las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad.**

<b>Respuesta</b>	<b>Razón- F</b>	<b>Razón-F tab</b>	<b>Razón- P</b>
<b>TP (nm)</b>	1.89	3.11	0.17
<b>IP</b>	1.99	3.11	0.15
<b>PZ (mV)</b>	<b>16.14</b>	3.11	<b>5.78x10<sup>-5</sup></b>

Valores-P menores o igual que 0.05 indican que existe una diferencia estadísticamente significativa en el TP, PDI y PZ durante el tiempo de almacenamiento con un nivel del 95.0% de confianza.