



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Evaluación de las condiciones óptimas  
para la preparación y estabilización de  
nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de  
manteca de cacao**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**LUZ HILEDY JUÁREZ CHÁVEZ**

**ASESORES:**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DR. RICARDO MOISÉS GONZÁLEZ REZA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2023**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



UNAM  
CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
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 la: **Tesis y Examen Profesional.**

**Evaluación de las condiciones óptimas para la preparación y estabilización de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de manteca de cacao.**

Que presenta la pasante: **Luz Hiledy Juárez Chávez**

Con número de cuenta: **314209294** para obtener el título de: **Licenciada 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 24 de Marzo de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>IQM. Rafael Sampere Morales</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dr. David Quintanar Guerrero</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>I.A. Miriam Alvarez Velasco</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>M. en C. Paulina Fuentes Vázquez</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dr. Luis Eduardo Serrano Mora</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*

## DEDICATORIAS

A Dios, por sus infinitas bendiciones.

A mis padres, con su confianza han puesto a mi alcance todas las herramientas que me han llevado hasta este momento, con su amor elevan mi ánimo, con su impulso y ejemplo me han motivado incluso en los momentos más difíciles. El mérito es de ustedes.

A mi hermana, gracias por tus palabras de ánimo, risas y estar a mi lado incondicionalmente.  
¡Ruuu!

A mis tíos Abelardo y Rocío, por el voto de confianza y apoyo que siempre sin dudar me han brindado. Por ser motivación y ejemplo.

A mi abue Keila (QEPD) lo que un día fue un sueño hoy es un logro, y lo comparto en alma y corazón contigo.

A la familia Hernández Juárez por su acompañamiento, cariño y cuidados.

A Leonardo Ali, por acompañarme en el camino de la licenciatura y de este trabajo, por compartir conmigo el gusto por la ciencia.

A mis amigos, por todos los momentos de diversión que acompañaron las largas jornadas de estudio.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme un lugar entre sus aulas, y el conocimiento de sus docentes.

Al Dr. David Quintanar Guerrero, por la confianza y disposición brindadas al realizar este trabajo.

Al Dr. Ricardo Moisés González Reza, por todo el apoyo, facilidades, consejos y guía brindadas en este trabajo, así como en ámbito personal.

Al Laboratorio de Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán –UNAM y a la Doctora María de la Luz Zambrano Zaragoza, por las facilidades prestadas en la realización de este trabajo experimental.

A todos mis sinodales, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

## FINANCIAMIENTO

El proyecto PAPIIT IN222420 de la UNAM: “Diseño, preparación, evaluación y uso de nanocontenedores a partir de materiales naturales y sustentables”.

El proyecto de Catedra CI2223 de la FESC: “Desarrollo de métodos sustentables para la obtención de nanopartículas y su uso en el diseño de productos comerciales con mayor funcionalidad”.

El proyecto CONACYT 322008: “Fortalecimiento de la infraestructura y consolidación del grupo multidisciplinario de investigación en nuevos sistemas de liberación para aplicación en áreas biológicas siguiendo los principios de química verde”.

Lugar de realización de la tesis:

Laboratorio de Investigación en Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán –UNAM y el Laboratorio de Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán –UNAM.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN.....	ii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Manteca de Cacao.....	1
1.1.1. Generalidades de la manteca de cacao.....	1
1.1.2. Composición de la manteca de cacao.....	1
1.2 Polimorfismo de la manteca de cacao.....	3
1.2.1. Definición de polimorfismo.....	3
1.2.2. Polimorfismo asociado en manteca de cacao.....	4
1.3 Nanotecnología.....	6
1.3.1 Nanopartículas.....	7
1.3.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	8
1.3.3 Ventajas y desventajas del uso de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	8
1.3.4 Estructura de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	9
1.3.5 Estabilidad de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	9
1.3.6 Métodos de preparación de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	10
1.3.7 Procesos para la obtención de NLS.....	11
1.4 Caracterización de Nanopartículas.....	13
1.4.1 Tamaño de Partícula.....	13
1.4.2 Potencial zeta ( $\zeta$ ).....	14
1.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	15
1.5 Actividad Superficial.....	17
1.5.1 Esteres del sorbitán.....	18
1.5.2 Copolímeros Tribloque.....	20
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL.....	22
2.1 Justificación.....	22
2.2 Hipótesis.....	23
2.3 Objetivo General.....	24

2.4	Objetivos Particulares.....	24
2.5	Materiales.....	24
2.6	Preparación de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	25
2.6.1	Acondicionamiento de la Manteca de Cacao.....	25
2.6.2	Preparación de la solución acuosa con tensioactivos.....	25
2.6.3	Preparación de Nanopartículas.....	25
2.6.4	Separación de la manteca de Cacao de la solución.....	26
2.7	Caracterización de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) de Cacao.....	26
2.7.1	Estabilidad física de las NLS.....	26
2.7.2	Tamaño de partícula.....	27
2.7.3	Potencial zeta.....	27
2.7.4	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	27
2.7.5	Análisis estadístico.....	28
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		29
3.1	Evaluación de la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao.....	29
3.2	Efecto de la variación de la concentración (%m/v) y tipo de tensioactivo en la preparación.....	30
3.2.1	Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (IPD).....	31
3.2.2	Potencial zeta y estabilidad.....	34
3.3	Efecto de la concentración (%m/v) de manteca de cacao en la formulación.....	36
3.3.1	Tamaño de partícula (TP) e índice de Polidispersión (IPD).....	37
3.4	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	37
3.5	Reflectancia Difusa.....	41
CONCLUSIONES.....		44
REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.....		46
Anexos.....		51



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la manteca de cacao. ....	2
<b>Tabla 2.</b> Temperaturas de fusión reportadas para cada polimorfo de la manteca de cacao. (Bayés et al., 2017; Declerck et al., 2021). ....	5
<b>Tabla 3.</b> Variables en las características de las NLS. (Serra y Fernández, 2009). ....	11
<b>Tabla 4.</b> Procesos de obtención de NLS y sus generalidades (Martinez, 2019; Arista, 2019). ....	12
<b>Tabla 5.</b> Ejemplos de Esteres de Sorbitán. (Juárez, 2016). ....	19
<b>Tabla 6.</b> Ejemplos de ésteres de sorbitán polietoxilados (Juárez, 2016). ....	20
<b>Tabla 7.</b> Diferentes tratamientos realizados en la formación de Nanopartículas lipídicas Sólidas. ....	26
<b>Tabla 8.</b> Análisis de movimiento electroforético y dispersión dinámica de la luz en los diferentes tratamientos realizados. ....	30
<b>Tabla 9.</b> Valores P obtenidos al aplicar ANOVA a los datos obtenidos por cada Estabilizante y concentración % utilizada. ....	31
<b>Tabla 10.</b> Valores P obtenidos al aplicar ANOVA a los datos obtenidos por cada concentración % de manteca de cacao utilizada. ....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de obtención de la manteca de cacao. ....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular del ácido palmítico. ....	3
<b>Figura 3.</b> Estructura molecular del ácido esteárico. ....	3
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular del ácido oleico. ....	3
<b>Figura 5.</b> a) Cristales de idéntica morfología y diferente hábito: b) Cristales de diferente morfología y mismo hábito. ....	4
<b>Figura 6.</b> Formas cristalinas de los polimorfos de manteca de cacao. ....	5
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de la escala nanométrica. ....	6
<b>Figura 8.</b> Esquematización de diferentes tipos de sistemas nanoparticulados. ....	7

<b>Figura 9.</b> Ventajas y desventajas del uso de NLS .....	8
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática de una NLS .....	9
<b>Figura 11.</b> Esquematización de luz dispersa captada por un detector .....	13
<b>Figura 12.</b> Representación del potencial zeta. ....	15
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática obtenida de termogramas de materia prima, NLS placebo liofilizadas y cargadas. ....	16
<b>Figura 14.</b> Estructura de una molécula anfifílica tensioactiva. ....	17
<b>Figura 15.</b> Formación de micelas. ....	18
<b>Figura 16.</b> Molécula de Sorbitol. ....	18
<b>Figura 17.</b> Estructura General de los tensioactivos Pluronic® .....	21
<b>Figura 18.</b> Proceso realizado en la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao. ....	28
<b>Figura 19.</b> Ejemplificación de la estabilización estérica. ....	33
<b>Figura 20.</b> Ejemplificación de la estabilización electrostática. ....	35
<b>Figura 21.</b> Termograma obtenido para la manteca de cacao utilizada para la formación de NLS. ....	38
<b>Figura 22.</b> Comportamiento térmico obtenido para las NLS con PVAL 5%. ....	39
<b>Figura 23.</b> Comportamiento térmico obtenido para las NLS con Pluronic® 5%. ....	40
<b>Figura 24.</b> Comportamiento térmico obtenido para las NLS con Tween/Span 5%. ....	40
<b>Figura 25.</b> Perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (Manteca de cacao 3% y PVAL 5%) evaluados por reflectancia difusa. ....	41
<b>Figura 26.</b> Perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (Manteca de cacao 3% y Pluronic® 5%) evaluados por reflectancia difusa. ....	42
<b>Figura 27.</b> Perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (Manteca de cacao 3% y Tween/Span 5%) evaluados por reflectancia difusa. ....	42

## RESUMEN.

En nuestros días, la evolución de las industrias farmacéutica y cosmética permiten un aumento en el desarrollo de novedosas formas de administrar los principios activos, lo que tiene por objetivo lograr su mejor y más fácil administración. Actualmente una de las tendencias más marcadas en los pacientes y en los consumidores de cosméticos es buscar productos que destaquen por sus componentes de origen natural, que ayuden a fortalecer su salud, siendo el autocuidado cada vez más importante dentro la sociedad.

En este ámbito, los sistemas de nanopartículas ofrecen ventajas para ser utilizados y obtener los fines antes mencionados, ya que en su elaboración se pueden utilizar materias primas de origen natural, aprobadas para su uso en humanos, las cuales no generan toxicidad y además ofrecen una amplia gama de aplicaciones para ser utilizados como vehículos para principios activos con solubilidades bajas y biodisponibilidad deficiente.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo experimental, se sintetizaron Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) de manteca de cacao a través del método de rotor estator y se evaluó su proceso de obtención a través del control de la concentración de tensioactivo y la concentración de lípido, para determinar su efecto sobre las propiedades físicas de las nanopartículas a través de los parámetros de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial Z y calorimetría, así como se determinó la estabilidad del sistema nanoparticulado a través de un análisis de dispersión de luz múltiple.

Se generaron 6 formulaciones, con un tamaño de partícula de entre 183.3 nm y 709.2 nm. En cuanto a la concentración de lípido se concluyó que esta influye en el tamaño de partícula, potencial Z y estabilidad, por lo que su óptima concentración es del 3 %. Para el caso de la concentración de tensioactivos, se concluyó que los mejores resultados se obtuvieron al utilizar en conjunto tensioactivo y co-tensioactivo, en una concentración del 3%, que permitió una mayor estabilidad y menor tamaño de partícula.

## INTRODUCCIÓN.

La manteca de cacao, derivada de las semillas del árbol de *Theobroma cacao* es uno de los principales componentes en la fabricación de chocolate, pero también se utiliza ampliamente en productos para el cuidado personal como lo son cosméticos y diferentes productos farmacéuticos (Beg et al., 2017). Dichas capacidades de uso se deben a que la manteca de cacao tiene una mejor biocompatibilidad y menor toxicidad *in vivo* que los lípidos semisintéticos, además de que contiene 40% o más ácidos grasos insaturados (Kim et al., 2005). A pesar de su composición simple, la manteca de cacao muestra un comportamiento estructural muy complejo, resultante del polimorfismo de los triacilglicéridos que la conforman.

El polimorfismo de la manteca de cacao está bien descrito en la literatura y definido por seis formas polimórficas diferentes. Estos son I (sub- $\alpha$ ), II ( $\alpha$ ), III ( $\beta 2'$ ), IV ( $\beta 1'$ ), V ( $\beta 2$ ), VI ( $\beta 1$ ), en orden creciente de puntos de fusión y estabilidad (Shtay, 2018). Por su parte, las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) han atraído cada vez más la atención como un potencial vehículo de administración de fármacos y diferentes sustancias bioactivas (Aditya, 2015). Debido a sus múltiples ventajas, como la posibilidad de realizar grandes escalas de producción, presentar una baja toxicidad, alta estabilidad química y física, tienen la capacidad de mejorar la biodisponibilidad, liberación sostenida y además proporcionan protección a moléculas sensibles a efectos ambientales, como la oxidación (Patidar et al., 2010).

Las ventajas del uso de NLS se deben principalmente a la matriz lipídica solidificada, (Salminen et al., 2020) dicha matriz limita el transporte de masa de los ingredientes incorporados hacia la superficie de la partícula, donde el oxígeno y otros pro-oxidantes están en abundancia, lo que limita la oxidación de los ingredientes incorporados (Weiss et al., 2008). Sin embargo, existen diversas desventajas comunes relacionadas al uso de nanopartículas lipídicas sólidas, como la agregación y gelificación de las suspensiones en producción y/o condiciones de almacenamiento (Helgason et al., 2008). En el proceso de preparación de NLS, para lograr una correcta estabilización es indispensable la selección adecuada de lípidos y emulsionantes, ya que los lípidos sólidos son propensos a la transición

polimórfica, que describe los cambios en la morfología de los cristales de lípidos y empaquetamiento de un cristal  $\alpha$  termodinámicamente inestable a un cristal  $\beta$  termodinámicamente estable (Sato y Garti, 1998). El uso de compuestos biocompatibles para la preparación de NLS, como lo es el uso de la manteca de cacao, permite evitar problemas de toxicidad, que a menudo son asociados a la administración de nanopartículas poliméricas, las cuales pueden contener monómeros tóxicos, residuos o disolventes, y pueden formar productos de degradación tóxicos (Müller et al., 2000).

## CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.

### 1.1. Manteca de Cacao.

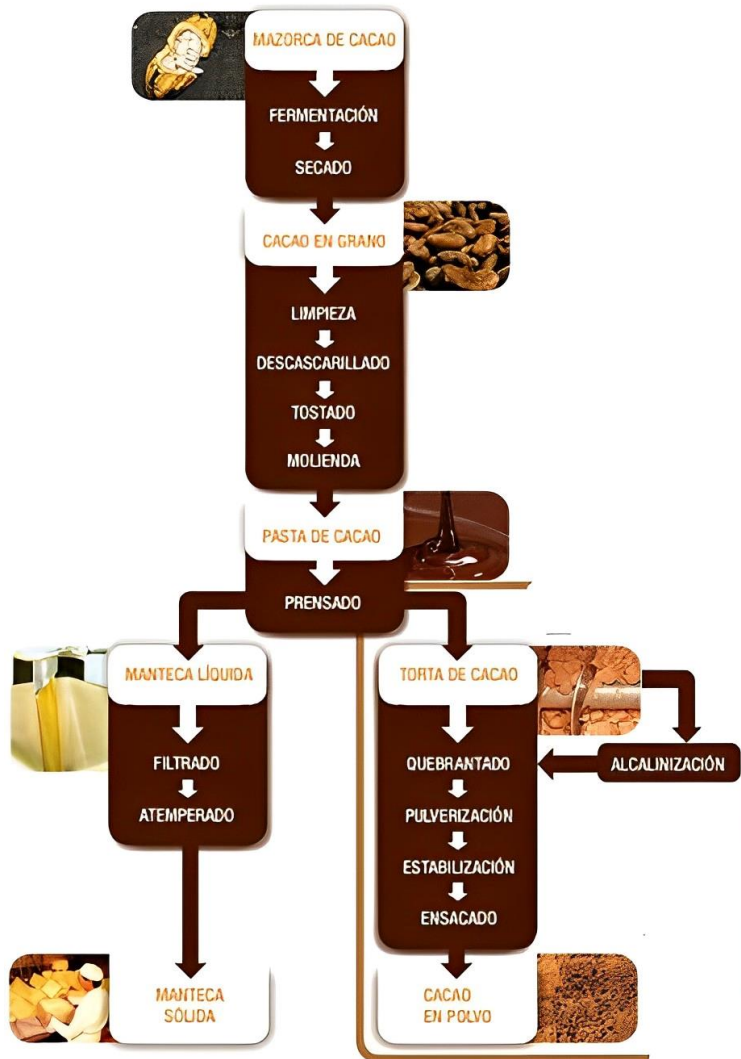
#### 1.1.1. Generalidades de la manteca de cacao.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2013, de las especificaciones sanitarias y denominación comercial del cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao, refiere como manteca de cacao, al producto semisólido, de aspecto graso a temperatura ambiente, de color blanco o ligeramente amarillento, obtenido por el procesamiento de las semillas del árbol *Theobroma cacao*, que se obtiene por extracción mecánica o por solventes.

La manteca se obtiene a partir de las semillas del arbusto del cacao (*Theobroma cacao*). Se someten a un proceso de fermentado, tostado, descascarillado, pulverizado y prensado. El cacao es el residuo seco que se separa de la manteca durante el proceso de prensado. (Fernández, 2007). Ver figura 1.

#### 1.1.2. Composición de la manteca de cacao.

La manteca de cacao está básicamente constituida por triacilgliceroles, la molécula de triacilglicerol consiste en un triéster de un glicerol con tres ácidos grasos (cadenas). La nomenclatura utilizada para designar e identificar los triacilgliceroles se basa en la secuencia de los ácidos grasos que los constituyen. De este modo, los tres triacilgliceroles básicos de la manteca de cacao son el POP, POS y SOS, constituidos por ácido palmítico (P), oleico (O) y esteárico (S) (Bayés et al., 2017).

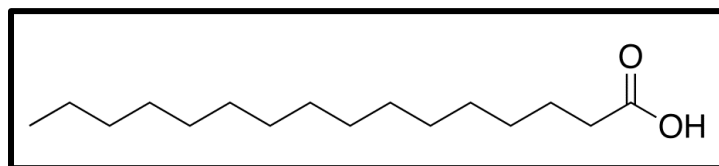


**Figura 1.** Proceso de obtención de la manteca de cacao. (Doporto, 2013).

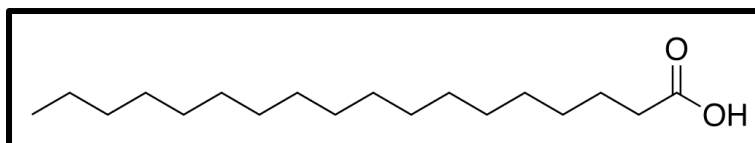
La composición aproximada de los ácidos grasos en la manteca de cacao es de 24.4% palmítico (Figura 2), 35.4% esteárico (Figura 3), 38.1% de ácido oleico (Figura 4). (Codini et al., 2004)

**Tabla 1.** Composición de la manteca de cacao.

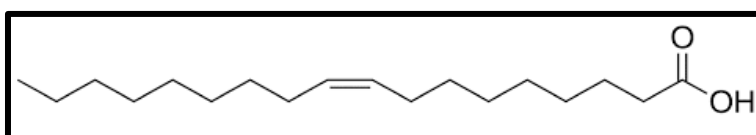
Composición	Porcentaje (%)
Triacilglicéridos	98
Ácidos grasos libres	1
Diglicéridos	0.3- 0.5
Monoglicéridos	0.1



**Figura 2.** Estructura molecular del ácido palmítico. (UNIQUM, 2016a).



**Figura 3.** Estructura molecular del ácido esteárico.(UNIQUM, 2016b).



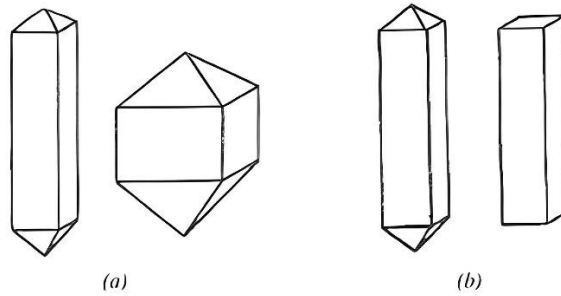
**Figura 4.** Estructura molecular del ácido oleico. (UNIQUM, 2016c).

## 1.2 Polimorfismo de la manteca de cacao.

### 1.2.1. Definición de polimorfismo.

En química, el polimorfismo se define como la capacidad de una especie química para existir en más de una forma o estructura cristalina. En el estado cristalino, las moléculas presentan un alto orden estructural, dando lugar a la celdilla unidad, que puede ser monoclinica, triclinica, tetragonal, hexagonal, romboidal, ortorrómbica y cúbica, la repetición de la celdilla unidad en las tres direcciones espaciales da lugar a la forma macroscópica del cristal, que es lo que llamamos hábito cristalino, que se refiere al modo de crecimiento que define la forma externa de un cristal (Figura 5).





**Figura 5.** a) Cristales de idéntica morfología y diferente hábito: b) Cristales de diferente morfología y mismo hábito. (Fernández, 2007).

Cada polimorfo posee propiedades fisicoquímicas que en algunos casos pueden variar notablemente, como la solubilidad, la densidad, la dureza del cristal, el punto de fusión, la forma y el color (Fernández, 2007).

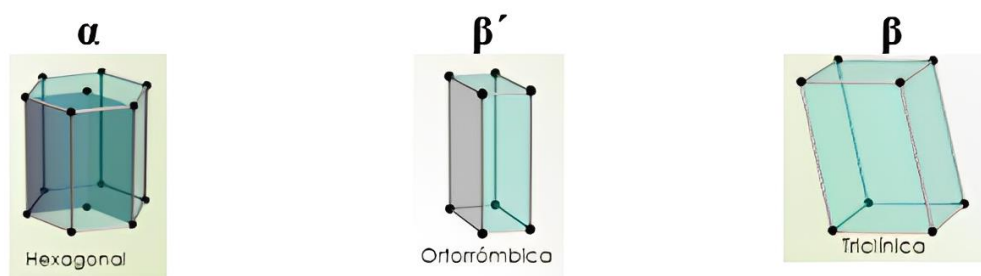
#### 1.2.2. Polimorfismo asociado en manteca de cacao.

Cuando los triacilgliceroles POP, POS y SOS se encuentran mezclados en la manteca de cacao, ésta exhibe un comportamiento polimórfico; Wille y Lutton en 1966 estudiaron extensamente las formas polimórficas de la manteca de cacao y encontraron seis formas cristalinas identificadas por los números romanos I a VI en orden de estabilidad creciente. La forma I menos estable, con una estructura cristalina distinta, tiene un punto de fusión de 17.3 ° C. Tiene una vida útil corta y se transforma rápidamente en las formas II, III, IV y V que se obtienen directamente de la masa fundida, los polimorfos de mayor estabilidad requieren temperaturas de cristalización más altas y períodos de tiempo más largos para formarse.

Van Malssen y colaboradores en 1999 llevaron a cabo un estudio de transición de fase de la manteca de cacao en condiciones isotérmicas, observaron cuatro formas polimórficas:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta'$  y  $\beta$ . Se encontró que las formas  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\beta'$  cristalizaban directamente de la masa fundida y todas se transformaban con el tiempo en fases de mayor estabilidad. Se encontró que la forma  $\beta'$  existe como una forma transitoria en lugar de como las dos formas distintas, III y IV, como informaron Wille y Lutton. A diferencia de las otras formas polimórficas, la fase  $\beta$  no se

forma directamente a partir de la masa fundida, sino a partir de la transformación de la forma  $\beta'$  metaestable. Las formas V y VI fueron encontradas por Wille y Lutton, y son consideradas por Van Malssen como subfases del polimorfo  $\beta$  (Ghazani y Marangoni, 2021).

Continuando con la nomenclatura de los polimorfos, la clasificación utilizada mediante letras del alfabeto griego denota la forma del cristal polimórfico,  $\alpha$  una forma hexagonal,  $\beta'$  una forma perpendicular ortorrómbica, y  $\beta$  una forma triclinica (Figura 6) (Declerck et al., 2021).



**Figura 6.** Formas cristalinas de los polimorfos de manteca de cacao. (Declerck et al., 2021).

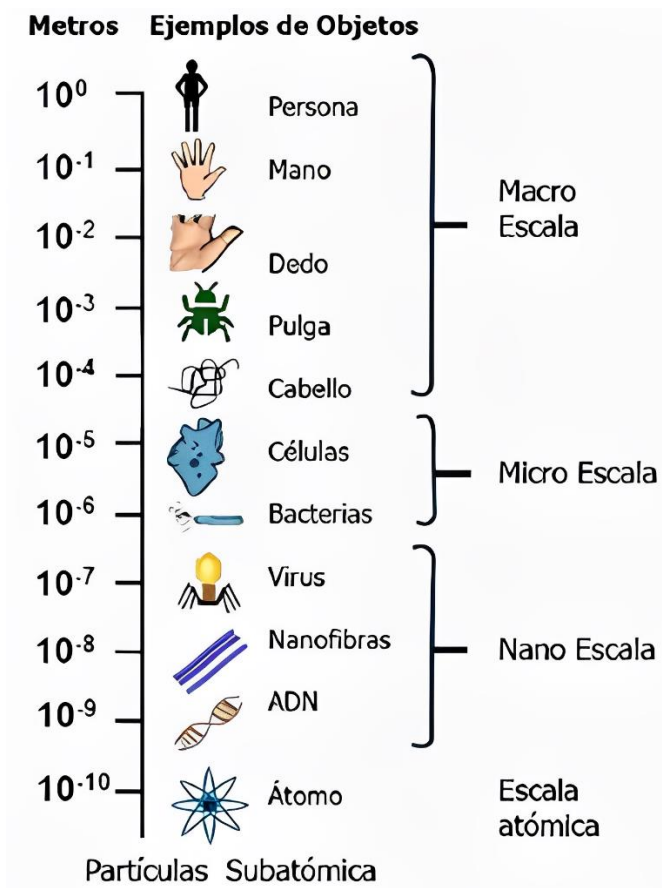
La forma VI, con un punto de fusión de 36 ° C, se obtiene mediante la transformación de la forma V mediante la solidificación directa de la masa fundida. Esta transformación implica un cambio muy pequeño en la estructura cristalina. Cada forma presenta un punto de fusión distinto (ver tabla 2) y, de todas ellas, la que es promocionada por la industria alimentaria, cosmética e incluso farmacéutica es la forma V( $\beta_2$ ), puesto que funde a una temperatura de 32-33°C, que coincide con la temperatura de nuestro cuerpo (Bayés et al., 2017).

**Tabla 2.** Temperaturas de fusión reportadas para cada polimorfo de la manteca de cacao. (Bayés et al., 2017; Declerck et al., 2021).

Polimorfo	T fusión (°C)	Rango de fusión (°C)
I ( <i>sub-<math>\alpha</math></i> )	17	13-18
II ( $\alpha$ )	23	17-24
III ( $\beta_2'$ )	25	22-28
IV ( $\beta_1'$ )	27	21-33
V ( $\beta_2$ )	33	30-34
VI ( $\beta_1$ )	36	33-36

### 1.3 Nanotecnología.

La nanotecnología se define como el estudio de las propiedades de la materia en la escala nanométrica, donde se puede hacer la manipulación de las propiedades de una molécula para obtener propiedades nuevas o diferentes de los materiales en escala macro o micro. La Figura 7, muestra una representación general de los tamaños de partícula de diferentes materiales.



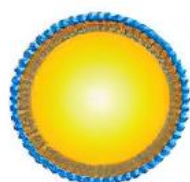
**Figura 7.** Representación gráfica de la escala nanométrica. (Padilla et al., 2018).

La nanotecnología tiene el potencial de optimizar procesos industriales, crear productos innovadores y aportar soluciones a problemáticas críticas para la sociedad, ya que ofrece la posibilidad de crear y diseñar nanopartículas con requisitos específicos (Padilla et al., 2018).

### 1.3.1 Nanopartículas.

En el área farmacéutica, la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica establece que las nanopartículas son partículas sólidas coloidales de materiales macromoleculares que contienen una sustancia activa (fármaco o material biológicamente activo) disuelto, entrampado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula (Arista, 2019), se producen mecánicamente o químicamente y cuyo tamaño de partícula oscila entre 1 y 1000 nm (Martinez, 2019). La Figura 8, muestra la esquematización de diferentes tipos de sistemas nanoparticulados.

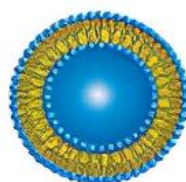
#### Sistemas Nanoparticulados Lipídicos



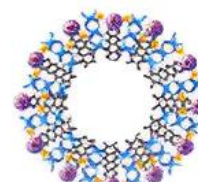
Nanopartícula lipídica sólida



Acarreador lipídico nanoestructurado



Nanoliposoma



Lipoplex

#### Sistemas Nanoparticulados Poliméricos

*Nanoesfera*



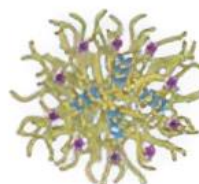
*Nanocápsula*



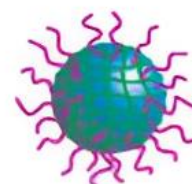
Nanopartículas



Nanomicela polimérica



Poliplex



Nanogel

#### Sistemas Nanoparticulados Inorgánicos



Nanopartícula magnética



Nanopartícula de oro



Nanopartícula de sílice

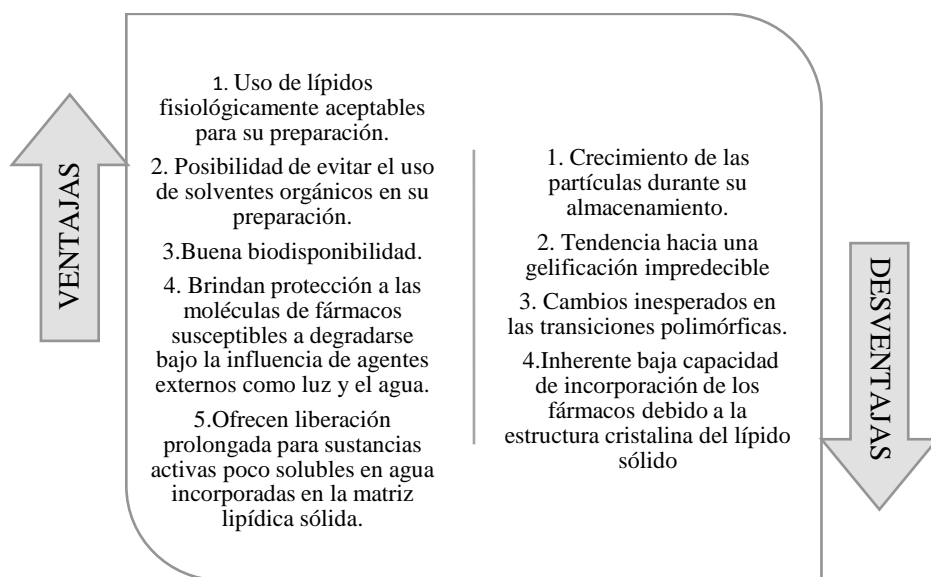
**Figura 8.** Esquematización de diferentes tipos de sistemas nanoparticulados. (Arista, 2019).

### 1.3.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) se desarrollaron a principios de 1990. Son sistemas coloidales con una alta proporción de agua (70-95%), elaborados principalmente a partir de lípidos sólidos con patrones cristalinos específicos, presentan un tamaño de 50-1000 nm y se mantienen estabilizadas en suspensión acuosa mediante concentraciones relativamente altas de tensioactivos o polímeros hidrofílicos (Garzón et al., 2008). En su fabricación se conjuntan las ventajas de las partículas sólidas con las de las emulsiones y las de los liposomas. Las NLS se generan a partir del intercambio del lípido líquido de las emulsiones por un lípido sólido, lo que significa que las NLS son sólidas a temperatura ambiente, así como a la temperatura del cuerpo (Villafuerte et al., 2008). Como características generales, las NLS tienden a gelificar y a expulsar el fármaco durante el almacenamiento, presentan capacidad de carga limitada, son biodegradables y tienen buena tolerancia (Kim et al., 2005).

### 1.3.3 Ventajas y desventajas del uso de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

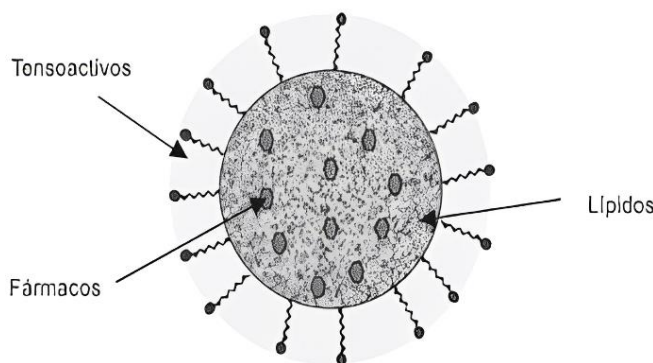
Existen diversas ventajas y algunas desventajas en el uso de NLS como transportadores, las cuales se conjuntan en el siguiente recuadro (Figura 9):



**Figura 9.** Ventajas y desventajas del uso de NLS. (Villafuerte et al., 2008).

#### 1.3.4 Estructura de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).

Las NLS muestran una estructura con un núcleo sólido lipídico que puede solubilizar fármacos lipofílicos. El núcleo lipídico se estabiliza con tensioactivos o emulsificantes, dado que son adsorbidos en la superficie de las gotas de grasa formando una barrera esférica. Es posible incorporar diferentes tipos de fármacos en las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), entre los cuales se pueden incluir fármacos lipofílicos, fármacos hidrofílicos (conjugados con sustancias lipídicas), e inclusive aceites volátiles a los cuales se puede proteger de la degradación y orientar hacia un objetivo específico a través de las NLS. Ver figura 10.



**Figura 10.** Representación esquemática de una NLS. (Villafuerte et al., 2008).

Para la incorporación de fármacos a las NLS es imprescindible conocer la capacidad de carga, la cual se expresa como un porcentaje relativo a la fase lipídica (matriz lipídica + fármaco). Generalmente se considera típico un porcentaje entre 1 y 5 para las NLS (Villafuerte et al., 2008).

#### 1.3.5 Estabilidad de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

Es de suma importancia hacer una revisión acerca de la estabilidad fisicoquímica en las dispersiones de partículas lipídicas que presentan un diámetro nanométrico, ya que durante el almacenamiento de las dispersiones de NLS por periodos prolongados, podría ocurrir la agregación de las partículas, esto debido a que las partículas individuales difunden en el

medio de dispersión, provocando choques que pueden conducir a una floculación pericinética (colisiones causadas por el movimiento browniano). Este fenómeno puede evitarse al hacer una adecuada selección de tensioactivo o una mezcla de tensioactivos a concentraciones convenientes (Villafuerte et al., 2008).

Las mezclas de tensioactivos generalmente tienen un efecto de sinergia, produciendo una película interfacial con alta capacidad de recubrimiento y con viscosidad suficiente para disminuir la agregación de las partículas durante la producción y el almacenamiento. De igual manera es posible mejorar la estabilidad física de las partículas al incrementar los efectos estéricos y la rigidez de la película externa, y al modificar la carga superficial de las partículas, a través del uso de co-emulsificantes (Garzón et al., 2008).

Es importante considerar que el tipo de tensioactivo que se elija en la preparación puede influir en la temperatura de cristalización de la fase dispersa. La temperatura de cristalización y las transiciones polimórficas son parámetros importantes para la preparación de nanopartículas de triacilglicéridos. La transición hacia un polimorfo más estable de los triacilglicéridos se acompaña de un rearrreglo de las moléculas y de un aumento en la densidad de la celda cristalina. A su vez, el tipo de cristal que se obtiene puede influir sobre la estabilidad de las dispersiones y su capacidad para cargar fármacos (Bunjes et al., 2003)

#### 1.3.6 Métodos de preparación de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

La elaboración de Nanopartículas lipídicas sólidas consiste esencialmente en cuatro etapas, de las cuales la primera es la preparación de la fase oleosa que conformará la parte lipídica de las nanopartículas, ésta se prepara mediante la fusión de las grasas, es importante mencionar que la concentración de lípidos tiene una influencia significativa en el tamaño y estructura de las partículas.

La segunda etapa que conforma el proceso de preparación de las nanopartículas es la preparación de la fase acuosa, la cual la conforma una disolución de tensioactivos que a su vez puede incluir co-emulsificantes o polímeros estabilizadores. La tercera etapa es la

formación de una pre-emulsión, mezclando ambas fases ya sea en frío o en caliente mediante una agitación vigorosa o ultrasónica durante varios ciclos.

La cuarta etapa de la preparación consiste en la concentración de la dispersión acuosa de nanopartículas lipídicas mediante procesos como la evaporación, centrifugación o secado, de esta manera su manejo y administración es más sencillo (Garzón et al., 2008). En el siguiente diagrama (Tabla 3) se muestran las diferentes variables que afectan las características finales de las nanopartículas en cada etapa del proceso para su mejor entendimiento.

**Tabla 3.** Variables en las características de las NLS (Serra y Fernández, 2009).

Fusión o disolución de grasas	Preparación de fase acuosa	Pre-emulsión	Dispersión
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Naturaleza de las grasas</li> <li>•Temperatura de fusión</li> <li>•Concentración de lípido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Naturaleza de los tensioactivos</li> <li>•Concentración de tensioactivos o uso de co-emulsificantes</li> <li>•Naturaleza de la fase acuosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Temperatura de las fases</li> <li>•Velocidad y número de ciclos</li> <li>•Presión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Temperatura de las fases</li> <li>•Velocidad</li> <li>•Temperatura de sublimación (liofilización y secado)</li> </ul>

### 1.3.7 Procesos para la obtención de NLS.

A continuación, en la Tabla 4, se muestran los procesos reportados para la obtención de Nanopartículas Lipídicas Sólidas, así como sus generalidades.



**Tabla 4.** Procesos de obtención de NLS y sus generalidades (Martinez, 2019; Arista, 2019).

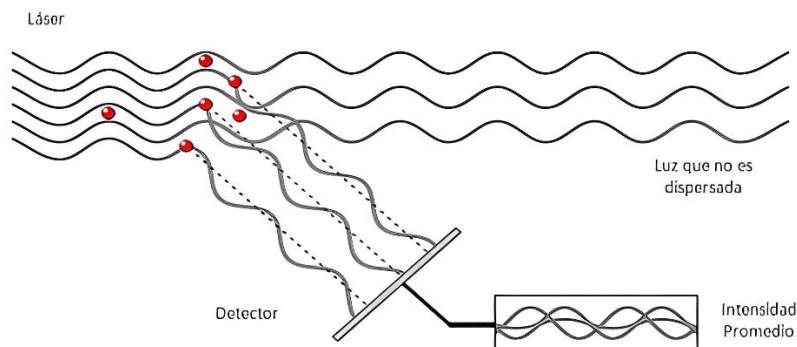
<b>Nombre del Proceso</b>	<b>Generalidades del Procedimiento</b>
<b>Homogeneización a alta presión</b>	En este proceso se alcanzan altas fuerzas de corte favorecen la reducción de una pre-emulsión. Obteniendo tamaños de partícula nanométricos, que dependen de la presión y número de ciclos utilizados durante el proceso. Como ventajas, puede llevarse a cabo en caliente o en frío.
<b>Emulsificación- Evaporación</b>	Los componentes lipídicos se disuelven en un disolvente inmisible en agua (por ejemplo cloroformo o tolueno) previamente saturado, emulsificándolo a altas temperaturas con una disolución saturada de tensoactivo en agua. Posteriormente el disolvente se evapora a presión reducida, induciendo la precipitación del lípido y la formación de suspensiones de NLS.
<b>Emulsificación- Difusión</b>	Se utilizan disolventes con alta miscibilidad en agua, y se busca dar lugar a la rápida precipitación de las gotas de lípido mediante un aumento en la velocidad de agitación, que incrementa la velocidad de dispersión del disolvente para permitir la obtención de suspensiones de NLS. La adición de un exceso de fase acuosa acelera la difusión del disolvente hacia la fase continua, favoreciendo la precipitación de las NLS.
<b>Microfluidización</b>	Implica el flujo de los sistemas lipídico y solución acuosa tensioactiva y mediante un aumento de la presión y alta velocidad, el proceso reduce significativamente el tamaño de las gotas de las nanopartículas y proporciona una distribución de tamaño de partícula uniforme.

## 1.4 Caracterización de Nanopartículas.

Se utilizan diferentes técnicas para caracterizar a las nanopartículas a través de parámetros fisicoquímicos como la morfología, el tamaño de partícula, el potencial zeta ( $\zeta$ ) (Arista, 2019).

### 1.4.1 Tamaño de Partícula.

Uno de los factores que presentan un efecto significativo sobre la estabilidad de las NLS es el tamaño de las partículas, lo cual es fundamental, ya que si no se conociera su tamaño resultaría imposible afirmar que son nanopartículas, para determinar el tamaño y la distribución de las NLS, uno de los métodos más utilizados es la espectroscopia de correlación de fotones (PCS), también conocido como la dispersión dinámica de luz (DLS), es un método que no mide directamente el tamaño de las partículas sino que detecta los efectos de dispersión de luz, los cuales son utilizados para calcular el tamaño de las partículas. (Figura 11). De esta manera, se mide la fluctuación de la intensidad de la luz que se dispersa por el movimiento browniano (movimiento de partículas debido a la colisión aleatoria con las moléculas de líquido que rodea la partícula), ya que las partículas suspendidas en un líquido nunca son estacionarias. Una característica de dicho movimiento para DLS es que las partículas pequeñas se mueven, rápidamente y las partículas grandes lentamente (Salas, 2013).



**Figura 11.** Esquematación de luz dispersa captada por un detector. (Salas, 2013).

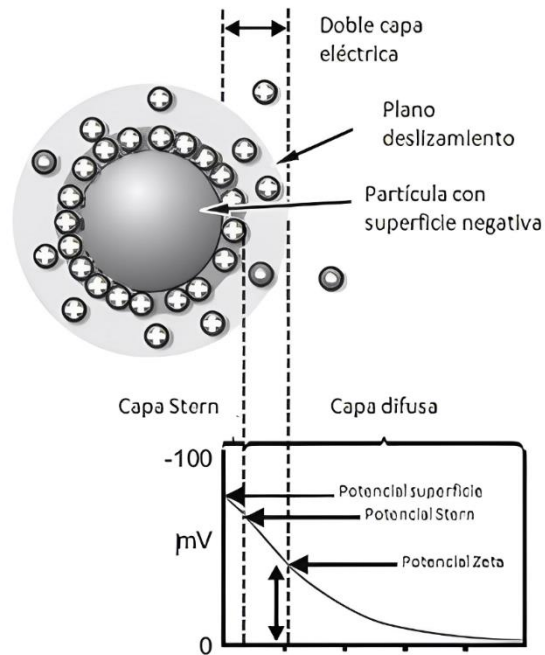
El método PCS cubre tamaños entre algunos nanómetros y 3 micras, sin embargo, no detecta partículas mayores. Se ha utilizado para determinar el efecto de las características químicas del lípido, la proporción tensioactivo/lípido y de la proporción molar tensioactivo/co-tensioactivo sobre la distribución del tamaño de nanopartículas lipídicas.

Los datos obtenidos por este método se pueden analizar suponiendo una forma esférica de la nanopartícula y expresarse como el diámetro efectivo, y con un valor de dispersión de ese tamaño (índice de polidispersión IPD). El IPD 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 (Villafuerte et al., 2008).

#### 1.4.2 Potencial zeta ( $\zeta$ ).

El potencial zeta es una propiedad de los materiales que miden el potencial electrocinético en sistemas coloidales; se denota por lo general con la letra griega zeta ( $\zeta$ ). Esta propiedad puede explicarse de la siguiente manera, en partículas suspendidas la carga neta en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región circundante interfacial, resultando en un aumento de la concentración de contraiones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. Entonces existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula.

La capa de líquido que rodea la partícula existe en forma de dos partes; una región interior, llamada la capa de Stern, donde los iones están fuertemente ligados y una exterior, región difusa, donde son menos fuertes. En la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro de la frontera se mueven con él, pero los iones más allá de la frontera no viajan con la partícula. Este límite es la superficie de cizallamiento hidrodinámico o plano de deslizamiento, y la diferencia de potencial eléctrico en este límite es conocido como el potencial zeta (Salas, 2013). Ver figura 12.



**Figura 12.** Representación del potencial zeta. (Salas, 2013).

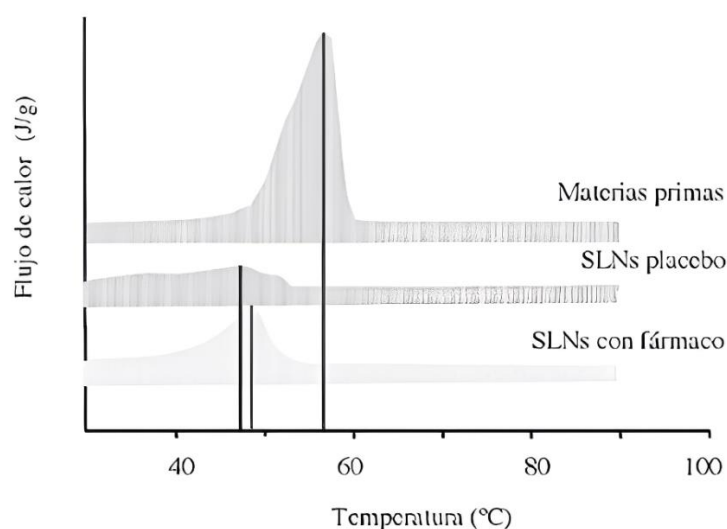
La importancia del potencial zeta yace en que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. Ya que indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión. Para las partículas pequeñas, un alto potencial zeta les confiere estabilidad, de esta manera la dispersión resistirá a la agregación. De manera contraria, cuando el potencial zeta es bajo, existe una atracción entre las partículas que supera a la repulsión por lo que se forman flóculos, en lugar de dispersiones (Mayoral et al., 2014).

Es crucial mencionar que el potencial zeta al reflejar el potencial eléctrico de las partículas es influenciado por la composición de la matriz y por el medio en el que son dispersadas, de esta manera, 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 (Arista, 2019).

#### 1.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido es una herramienta para investigar la fusión y el comportamiento de recristalización de materiales cristalinos como las NLS (Villafuerte et al., 2008). El propósito de los instrumentos térmicos diferenciales es registrar la diferencia entre el cambio de entalpía que ocurre en una muestra y un material inerte de referencia cuando ambos se calientan.

En el DSC, se utilizan una muestra y una referencia (Indio), las cuales se calientan independientemente, y se puede medir directamente la diferencia en flujo de calor para mantener una temperatura igual en ambas. Así, los datos se obtienen en forma de entradas diferenciales de calor ( $dH/dt$ ) en función de la temperatura. Con estos datos se pueden obtener temperaturas y entalpías de transición o de reacción (Sandoval et al., 2005).

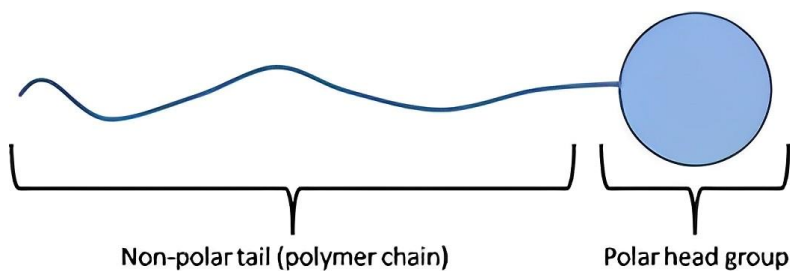


**Figura 13.** Representación esquemática obtenida de termogramas de materia prima, NLS placebo liofilizadas y cargadas. (Villafuerte et al., 2008).

En particular, las aplicaciones de la DSC 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 (Hernández, 2013). Ver Figura 13.

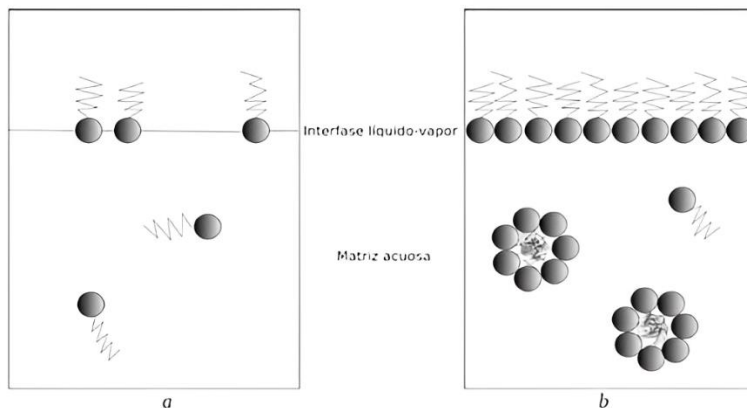
## 1.5 Actividad Superficial.

La tensión superficial se puede expresar como la fuerza por unidad de longitud que debe aplicarse a la superficie para contrarrestar la atracción interna de la red, derivada de las fuerzas intermoleculares del disolvente, tiene unidades de acuerdo con el sistema internacional de unidades (N/m) (Soto, 2018). La mayoría de los compuestos orgánicos solubles en agua abaten la tensión superficial pero el efecto es generalmente mucho menos pronunciado que el de los tensioactivos (Tadros, 2014). La estructura general de una molécula con actividad superficial muestra dos zonas de comportamiento antagónico, una de ellas, la de mayor tamaño y correspondiente a un hidrocarburo, es hidrófoba y la otra región es hidrofílica; por esta dualidad se emplea el término anfífilo como sinónimo de tensioactivo. Ver figura 14.



**Figura 14.** Estructura de una molécula anfifílica tensioactiva. (Juárez, 2016).

Toda molécula con actividad superficial migra a la interfase líquido-vapor, conforme la interfase se satura, al seno de la fase acuosa los monómeros se organizan para formar estructuras micelares, esto sucede cuando se alcanza la concentración micelar crítica (CMC) (Juárez, 2016).

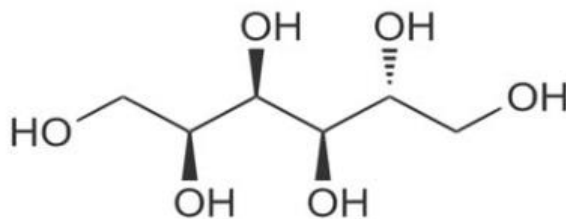


**Figura 15.** Formación de micelas. (Juárez, 2016).

En la Figura 15, se observa en la parte *a*, el sistema general del sistema vapor-agua-tensioactivo. Mientras que en la parte *b* se muestra la saturación de la interfase que provoca la formación de estructuras micelares al seno del líquido (Juárez, 2016).

#### 1.5.1 Esteres del sorbitán.

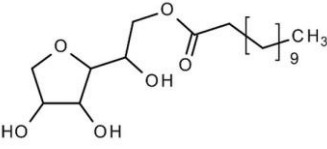
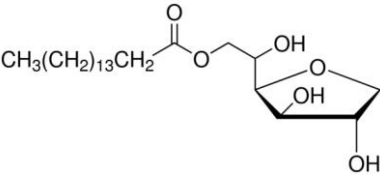
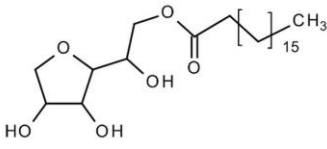
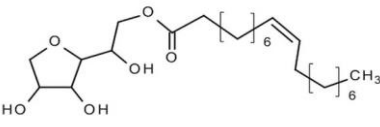
Los ésteres de sorbitán son tensioactivos de tipo no iónico que se obtienen por adición de un ácido graso al sorbitán (ver Figura 16); las moléculas obtenidas pertenecen a una familia de moléculas de baja toxicidad por derivarse de compuestos biológicos, de manera genérica se les conoce como ésteres de sorbitán, que sólo son dispersables en agua, favoreciendo emulsiones agua en aceite (W/O) (Salager, 2002).



**Figura 16.** Molécula de Sorbitol. (Juárez, 2016).

A continuación, se muestran algunos ejemplos de ésteres de sorbitán (Tabla 5).

**Tabla 5.** Ejemplos de Ésteres de Sorbitán. (Juárez, 2016).

Ácido graso esterificado en el sorbitán	Nombre Comercial	Estructura molecular	HLB
Ácido Láurico C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	Span <sup>®</sup> 20		8.6
Ácido Palmítico C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Span <sup>®</sup> 40		6.7
Ácido Estéarico C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Span <sup>®</sup> 60		4.7
Ácido Oléico C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Span <sup>®</sup> 80		2.1

La adición de óxido de etileno a los ésteres de Sorbitán genera la obtención de una serie de compuestos conocidos como ésteres de Sorbitán polietoxilados, comercialmente conocidos como Tween<sup>®</sup>, los cuales se obtienen por la adición de 20 moléculas, en promedio, de óxido de etileno a los Span<sup>®</sup>. Los Tween<sup>®</sup> son menos hidrófobos que sus antecesores Span<sup>®</sup>, favorecen emulsiones del tipo aceite en agua (O/W) y son los compuestos más empleados en el campo farmacéutico. (Tadros, 2014). A continuación, en la Tabla 6, se muestran algunos ejemplos de ésteres de sorbitán polietoxilados:



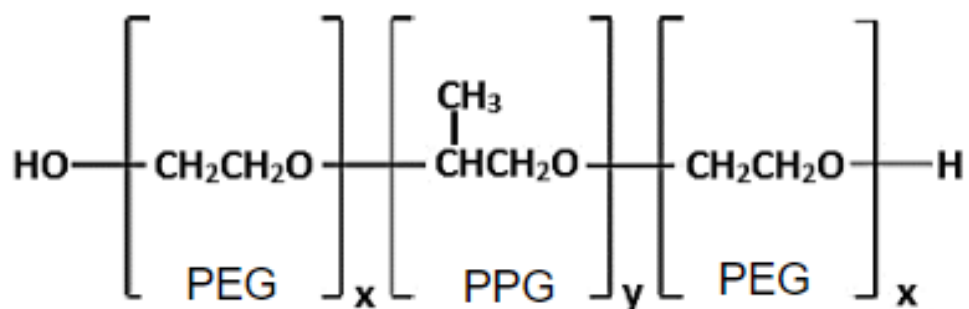
**Tabla 6.** Ejemplos de ésteres de sorbitán polietoxilados (Juárez, 2016).

Span <sup>®</sup> de Base	Nombre comercial	Estructura molecular	HLB
20	Tween <sup>®</sup> 20	<p><math>w + x + y + z = 20</math></p>	16.7
40	Tween <sup>®</sup> 40	<p><math>w + x + y + z = 20</math></p>	15.6
60	Tween <sup>®</sup> 60	<p><math>w - x + y + z = 20</math></p>	14.9
80	Tween <sup>®</sup> 80	<p><math>w + x + y + z = 20</math></p>	15

### 1.5.2 Copolímeros Tribloque.

Este tipo de tensioactivos poliméricos, conocidos generalmente como Pluronic<sup>®</sup> están compuestos por cadenas de polietilenglicol (parte hidrofóbica) y polipropilenglicol (parte hidrofílica) (Soto, 2018) El acomodo de la molécula es en eslabones hidrofílicos que se acoplan entre ellos para formar un grupo hidrofílico, y los eslabones lipofílicos hacen lo mismo. Se tiene por lo tanto un surfactante macromolecular, pero con zonas bien definidas (Salager, 2002). Este tipo de tensioactivos generalmente suelen ser muy poco solubles en

agua y resultan tener propiedades sumamente interesantes, debido a que tienen la capacidad de formar micelas poliméricas utilizadas como agentes en la liberación controlada de fármacos. Generalmente su estructura es del tipo PEG<sub>x</sub>-PPG<sub>y</sub>-PEG<sub>x</sub>, como se muestra a continuación en la Figura 17 (Soto, 2018).



**Figura 17.** Estructura General de los tensioactivos Pluronic<sup>®</sup>. (Soto, 2018).

## CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

### 2.1 Justificación.

Con los avances tecnológicos de los últimos años, las nanopartículas han demostrado poseer un enorme potencial para su aplicación farmacéutica, cosmética y alimenticia. Los sistemas lipídicos son los de uso más extendido ya que presentan propiedades óptimas en cuanto a biocompatibilidad y biodegradabilidad, esto al compararlos frente al uso de otros nanomateriales de aplicación biomédica y alimenticia, de los cuales hay cada vez más estudios donde se ha probado que comúnmente tienen propiedades citotóxicas. El uso de nanopartículas permite una liberación controlada prolongada, protección del fármaco, compatibilidad, conversión de líquido a sólido, reduce su toxicidad, y mejora su olor y sabor. Un objetivo de su uso es encapsular fármacos poco solubles en agua, específicamente para administrarlos de forma oral, debido a sus propiedades de absorción, solubilidad y biodisponibilidad. Para medicamentos que van a ser administrados de forma oral, es de suma importancia que los excipientes no sean tóxicos y que sean biodegradables al momento de ser absorbidos por el cuerpo, por lo que se sugiere el uso de lípidos que provienen de alimentos.

En la formulación de NLS es necesario incluir tensioactivos y lípidos sólidos, los cuales, pueden ser lípidos semi-sintéticos, sin embargo, en los últimos años las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética han optado por desarrollar entre sus productos novedosos aquellos que presenten un mayor contenido de ingredientes de origen natural en sus formulaciones, esto debido a la demanda de productos de este tipo y a su vez por el éxito que tienen al momento de su comercialización, en un ambiente social en donde se ha impuesto la ideología de vivir de manera sustentable y “amigable” con el medio ambiente. Por dichas razones, el uso de manteca de cacao, un lípido que se obtiene directamente de las semillas del cacao, es una excelente opción para continuar con el avance nanotecnológico, ya que cumple con el requisito de demanda, al ser un producto económico, de origen natural,

no citotóxico, biodegradable y al mismo tiempo que permite la formulación de NLS que pueden integrarse a diversas aplicaciones farmacéuticas, alimenticias y cosméticas.

Sumado a esto, México es un país rico en materiales naturales con posibles aplicaciones biomédicas, tal es el caso del cacao, cuyo uso es además beneficiado por una de sus propiedades más importantes, la propiedad antioxidante, originada por una alta concentración de flavonoides, antioxidantes de origen natural con propiedades poliméricas, donde su monómero más importante es la procianidina. El cacao, y por ende la manteca de cacao previene el envejecimiento celular y puede tener una potencial aplicación como biopolímero para la nano encapsulación de fármacos y principios activos en general.

Sin embargo, un constante problema con el uso de este lípido sólido es su polimorfismo, ya que variaciones en la estructura cristalina del lípido, llevan a la gelificación del sistema, debido al cambio en la estructura cristalina, que aumenta el área de superficie de las partículas, y si en la formulación no están presentes cantidades suficientes de emulsionante para adsorber a estas interfaces recién creadas, y como consecuencia las partículas se agregan o incluso gelifican. Considerando el inconveniente del polimorfismo en la manteca de cacao, se propone experimentar con diversas cantidades y proporciones de lípido (manteca de cacao) y tensioactivo, para así hacer la propuesta de una formulación óptima que permita obtener NLS estables al almacenamiento.

## 2.2 Hipótesis.

Si se establecen las condiciones óptimas en cuanto a concentración de manteca de cacao y concentración de tensioactivo, entonces se obtendrán nanopartículas lipídicas sólidas de tamaño adecuado, con un potencial zeta e índice de polidispersión que permitan su estabilidad como sistema coloidal.

### 2.3 Objetivo General.

Evaluar el proceso de obtención de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de manteca de cacao mediante el control de dos variables de preparación: Concentración de tensioactivo y concentración de lípido para evaluar su efecto sobre las propiedades del sistema y su estabilidad física.

### 2.4 Objetivos Particulares.

- Establecer una metodología de preparación de nanopartículas lipídicas sólidas donde el lípido sea manteca de cacao.
- Evaluar la estabilidad de las nanopartículas lipídicas sólidas mediante un análisis de dispersión de luz múltiple.
- Evaluar el efecto de la variación de la concentración de tensioactivo en la preparación de las nanopartículas lipídicas sólidas sobre los parámetros de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y propiedades calorimétricas que permitan la evaluación de su estabilidad física.
- Evaluar el efecto de la variación de la concentración de manteca de cacao en la preparación de las nanopartículas lipídicas sólidas sobre los parámetros de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y propiedades calorimétricas que permitan la evaluación de su estabilidad física.

### 2.5 Materiales.

Manteca de Cacao de Droguería Cosmopolita (México) fue utilizado como matriz oleosa para las NLS. Agentes estabilizantes Polivinil Alcohol (PVAL) ( $P_M \approx 89 - 98$  kDa,  $\mu = 11.6-15.4$  cP a 40 g/L en H<sub>2</sub>O a 20 °C) y Pluronic<sup>®</sup> F-127, fueron suministrados por Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Tween<sup>®</sup> 80 (monooleato de sorbitán polioxietileno (20)),  $P_M = 1310$  g/mol HLB = 15,  $\mu \approx 425$  mPas a 25 °C) fue obtenido de ICI Surfactantes de México. Span<sup>®</sup> 80 de Sigma Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, Missouri, EE.UU.).

## 2.6 Preparación de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).

Las nanopartículas de manteca de cacao se prepararon mediante el método de homogeneización en caliente utilizando un rotor estator de acuerdo con la metodología propuesta por Zambrano-Zaragoza et al., (2013) con algunas modificaciones, para su preparación se siguieron las siguientes etapas: Acondicionamiento de la manteca de cacao, preparación de soluciones tensioactivas, preparación de nanopartículas, separación de manteca de cacao y caracterización de las nanopartículas. Las cuales se detallan a continuación y se ilustra el proceso en la figura 18.

### 2.6.1 Acondicionamiento de la Manteca de Cacao.

En una balanza calibrada y con ayuda de un vaso de precipitados de 25 mL y una espátula se pesó la cantidad necesaria de manteca de cacao sólida correspondiente a la concentración de NLS deseada para cada tratamiento. Posteriormente se colocó en baño maría el vaso de precipitados con la manteca de cacao sobre una parrilla termoeléctrica precalentada a 85 °C para permitir que la manteca se fundiera cuidándose que no obtenga una coloración oscura.

### 2.6.2 Preparación de la solución acuosa con tensioactivos.

En una balanza calibrada y con ayuda de un vaso de precipitados de 100 mL y una espátula se pesó la cantidad necesaria de tensioactivos deseada para cada tratamiento. Se adicionaron 50 mL de agua destilada a los tensioactivos, posteriormente se mezclaron con un agitador magnético hasta su disolución. Se calentó en la parrilla termoeléctrica hasta alcanzar los 80-85°C.

### 2.6.3 Preparación de Nanopartículas.

En un vaso de precipitados metálico con capacidad para 250 mL se adicionó la solución de tensioactivos verificando que su temperatura se encuentre de 80-85°C y una vez fundida la manteca se verificó que su temperatura estuviera en el mismo rango, posteriormente se vertió lentamente a la solución acuosa de tensioactivos. Una vez vertida la manteca de cacao

fundida se comenzó la agitación con el ultra agitador de rotor estator Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 (IKA WERKE, Staufen, Alemania) a 21 000 rpm cuidándose que la temperatura se mantenga de 85-90°C. Se agitó la muestra por 5 minutos y se dejó reposar por 5 minutos. Se repitió la agitación por 3 ciclos. Una vez terminados los ciclos de agitación se dejó enfriar la mezcla y se continuó con agitación magnética a una velocidad de 100rpm hasta lograr una temperatura de 25°C. Utilizando un matraz de Bunsen y papel filtro, se filtró al vacío la mezcla. La Tabla 7, muestra los diferentes tratamientos realizados en el presente trabajo experimental.

**Tabla 7.** Diferentes tratamientos realizados en la formación de Nanopartículas lipídicas Sólidas.

<b>Manteca de Cacao (%)</b>	<b>PVAL (%)</b>	<b>Pluronic<sup>®</sup> (%)</b>	<b>Tween<sup>®</sup>/ Span<sup>®</sup> (%)</b>
3	3	3	3
5	5	5	5

#### 2.6.4 Separación de la manteca de Cacao de la solución.

En una centrífuga con enfriamiento (Hermle Z323K, Labortechnik GMBH, Wehingen, Alemania), las nanopartículas lipídicas sólidas se purificaron mediante tres ciclos de centrifugación (25 000 x g durante 20 min a 5 °C). Una vez terminado el primer ciclo de centrifugación se desechó la fase acuosa y se recuperó el pellet de las muestras, se enjuagó con agua destilada y se resuspendió. Se repitió este paso tres veces. El pellet se utilizó para lectura de calorimetría y la fase acuosa para las lecturas espectrofotométricas.

### 2.7 Caracterización de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) de Cacao.

#### 2.7.1 Estabilidad física de las NLS.

Se determinó la estabilidad de las nanopartículas lipídicas sólidas con un Turbiscan MA2000 (Formulation, Toulouse, Francia). Las suspensiones se transfirieron a una celda de muestra cilíndrica de vidrio de fondo plano para la medición. La desestabilización de las muestras se analizó utilizando perfiles de transmisión y de retrodispersión, mediante la aplicación de

pulsos cercanos de una fuente de luz infrarroja a 880 nm cada 8 minutos durante 24 horas, teniendo dos detectores sincrónicos: un detector de transmisión y un detector de retrodispersión. El detector de transmisión recibirá la luz que se mueve a través de la muestra (a 0° del haz incidente), mientras que el detector de retrodispersión recibirá la luz que se dispersa hacia atrás por la muestra (a 135° vaivén del haz incidente). Las muestras se analizaron a 25 °C (González et al., 2018).

### 2.7.2 Tamaño de partícula.

El tamaño de partícula (TP) y el índice de polidispersión (IPD) de las nanopartículas lipídicas sólidas se determinaron por la técnica de dispersión de luz láser en un ángulo fijo de 273°, a una temperatura de 25 °C utilizando un Z-sizer Nano ZS90 (Malvern Ltd., Enigma Business Park, Grovewood Road, UK). Las dispersiones se diluyeron con agua Milli-Q® para obtener los histogramas de frecuencias de volumen.

### 2.7.3 Potencial zeta.

El potencial zeta ( $\zeta$ ) se determinó para la evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas lipídicas sólidas utilizando un Z-sizer Nano ZS90 (Malvern Ltd., Enigma Business Park, Grovewood Road, UK) una vez diluidas con agua Milli-Q®. El valor del potencial zeta fue normalizado con dispersión patrón de poliestireno ( $\zeta = -55$  mV). Las mediciones se realizaron a 25 °C por triplicado (González et al., 2015).

### 2.7.4 Calorimetría Diferencial de Barrido

El comportamiento térmico de las nanopartículas lipídicas sólidas se evaluó utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10, TA Instruments, New Castle, Delaware, EE. UU.). Todas las muestras (3-5 mg) se colocaron en recipientes de aluminio herméticamente cerrados y se colocaron en la cámara del equipo a temperatura ambiente. Se empleó gas nitrógeno a un flujo de 50 mL/min en la línea de purga para controlar el entorno local alrededor de la muestra. La temperatura se estableció en un rango de 25 a 300 °C con una



rampa de calentamiento de 10 °C/min. El instrumento se calibró para el flujo de calor y la temperatura utilizando agua destilada (punto de fusión 0 °C;  $\Delta H=334$  kJ/kg) e indio (punto de fusión 156,5 °C;  $\Delta H=28.5$  kJ/kg). Los datos se analizaron con el software de análisis universal proporcionado junto con el instrumento DSC.

### 2.7.5 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para los resultados en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta obtenidos de cada formulación. Se utilizó una significancia del 95% ( $\alpha = 0.05$ ) donde la Hipótesis nula ( $H_0$ ) supone que las medias calculadas no difieren significativamente para cada una de las variables, por lo que un valor de  $p \leq$  al nivel de significancia implica que la hipótesis nula es falsa y la diferencia es significativa; un valor de  $p >$  al nivel de significancia supone que la hipótesis nula es verdadera y los resultados no son significativamente diferentes. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.



**Figura 18.** Proceso realizado en la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao.

## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Evaluación de la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao.

Se prepararon 6 sistemas experimentales con la finalidad de obtener nanopartículas lipídicas sólidas aplicando el método rotor estator el cual es un método de fácil aplicación y que ofrece excelentes resultados. En la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao es de suma importancia ser cuidadoso al fundir la manteca, ya que variaciones de temperatura podrían oxidarla o bien predisponerla a un cambio de conformación debido a su naturaleza polimórfica, por lo que en el proceso se utilizó una misma temperatura de fusión para todos los sistemas (85°C). Como estabilizantes se utilizaron tensioactivos de diferente naturaleza para cada formulación, y diferentes concentraciones de estos 3% m/v y 5% m/v, de la misma manera diferentes concentraciones de manteca de cacao 3% m/v y 5% m/v (Tabla 8).

Como parte del proceso, una vez fundida la manteca, se calentó a 85°C la fase acuosa, con la finalidad de que no existieran variaciones en la temperatura de ambas fases para que la manteca no iniciara un proceso de cristalización; de esta manera se vertió la manteca en la fase acuosa durante el proceso de agitación mecánica, manteniendo todo el tiempo la temperatura a 85°C, así se hicieron 3 ciclos de agitación y posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente el sistema hasta que su temperatura marcó 20°C.

Se encuentra reportado en la literatura, que la selección de tensioactivos en el sistema es vital para obtener estabilidad, puesto que son adsorbidos en la superficie de las gotas del lípido, formando una barrera estérica que les imparte estabilidad, lo que justifica las 3 diferentes formulaciones propuestas en este trabajo, la primera con el tensioactivo Polivinil alcohol, un surfactante polimérico sintético que forma una barrera mecánica y termodinámica en la interfase de las nanopartículas lipídicas, actuando como un polímero protector, lo que retarda su coalescencia (Serra y Fernández, 2009). La segunda formulación, con Pluronic<sup>®</sup>, un tensioactivo formado por copolímeros tribloque anfifílicos, bio compatibles y de carácter neutro, compuesto de óxido de polietileno (EO) y óxido de propileno (PO); la tercera, una

mezcla de surfactantes, Tween<sup>®</sup> 80 (polisorbato 80), el cual es un surfactante no iónico, que por la presencia en su estructura molecular de grupos hidrófilos no se ioniza en agua, lo cual lo hace excelente para utilizarlo en conjunto con otros estabilizantes, como el Span<sup>®</sup> 80, que presenta la misma naturaleza no iónica, esta mezcla de tensioactivos se propone ya que está reportado que las mezclas de tensioactivos generalmente tienen un efecto sinergista, produciendo una película interfacial con alta capacidad de recubrimiento y con viscosidad suficiente para disminuir la agregación de las partículas durante la producción y el almacenamiento, esto como resultado de que dificultan el acercamiento de las partículas, estabilizando el sistema al disminuir la velocidad de coalescencia (Garzón et al., 2009)

**Tabla 8.** Análisis de movimiento electroforético y dispersión dinámica de la luz en los diferentes tratamientos realizados.

Tensioactivo (%m/v)	Manteca de			
	Cacao (%m/v)	TP (nm)	IPD (-)	ζ (-mV)
PVAL 3%	3	709.2 ± 14.78	0.4±0.07	-2.7± 0.30
PVAL 5%	5	532.6± 179.53	0.28±0.03	-3.8± 3.10
Pluronic <sup>®</sup> 3%	3	523.4± 32.05	0.7±0.01	-5.7±0.18
Pluronic <sup>®</sup> 5%	5	403.6 ±138.98	0.25±0.01	-9.4±3.74
Tween <sup>®</sup> / Span <sup>®</sup> 3%	3	183.3±25.02	0.3± 0.11	-17.8±1.05
Tween <sup>®</sup> / Span <sup>®</sup> 5%	5	237.9± 30.93	0.214± 0.041	-13.41±8.14

\*TP: Tamaño de partícula, IPD: Índice de Polidispersión, ζ: Potencial zeta. Promedio ± desviación estándar.

### 3.2 Efecto de la variación de la concentración (%m/v) y tipo de tensioactivo en la preparación.

El análisis de varianza ANOVA (Tabla 9) revela valores  $p \leq 0.05$ , lo que demuestra diferencia significativa entre sistemas en su tamaño de partícula (TP), índice de polidispersión (IPD) y potencial zeta (ζ) al variar el tipo y concentración de tensioactivo.

**Tabla 9.** Valores P obtenidos al aplicar ANOVA a los datos obtenidos por cada Estabilizante y concentración % utilizada.

<b>TP</b>	<b>IPD</b>	$\zeta$	<b>REFERENCIA</b>
0.000	0.0004	0.000	0.05
Significante	Significante	Significante	$p \leq 0.05$

### 3.2.1 Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (IPD).

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño (indicada por el índice de polidispersión, IPD) son características cruciales en la producción y estabilidad de las NLS. Estas características dependen en gran medida de la composición de las partículas. Se encuentra reportado que, al incrementar la concentración de tensioactivos, el tamaño de la nanopartícula decrece, por la disminución de la tensión interfacial. Dicha afirmación se comprueba con lo obtenido experimentalmente, ya que en la Tabla 8, se puede observar que al aumentar la concentración de 3% m/v a 5% m/v en las formulaciones para cada tensioactivo se obtienen tamaños de partícula menores, lo cual es resultado de una mayor disponibilidad de moléculas anfóteras que permitieran la formación de nanopartículas en conjunto con la manteca de cacao disponible para cada sistema.

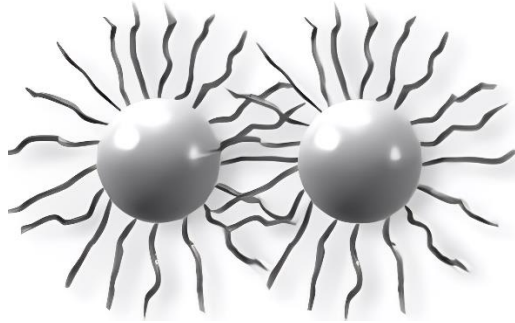
El índice de polidispersión es una indicación del ancho de la distribución del tamaño de partícula. El valor de IPD que refleja la calidad de la dispersión suele oscilar entre 0 y 1. Los valores de  $IPD \leq 0.1$  indican la mayor calidad de dispersión (Shah et al., 2014). La mayoría de los investigadores reconocen valores de  $IPD \leq 0.3$  como valores óptimos; sin embargo, los valores  $\leq 0.5$  también son aceptables. Experimentalmente se obtuvieron resultados de IPD y TP, que nos indican que, al aumentar la concentración de tensioactivo en las formulaciones, el IPD disminuyó, indicando mayor calidad de la dispersión al presentarse menor distribución del tamaño de partícula.

Un resultado similar al obtenido experimentalmente fue obtenido por Blandón y Vázquez, quienes elaboraron una síntesis electroquímica de nanopartículas de plata en presencia de un

surfactante neutro, donde al aumentar la concentración de tensioactivo Pluronic® en la formulación mejora la estabilidad coloidal del sistema y las nanopartículas disminuyen notablemente su tamaño, garantizando tamaños menores a 50 nm e índices de polidispersión bajos (Blandón et al., 2015).

De igual manera los resultados experimentales coinciden con lo reportado por Shah y colaboradores en 2014, donde para la preparación de sistemas nanoparticulados, encontraron que el tamaño de partícula disminuía después de la adición de Span® 80 como co-tensioactivo a un sistema estabilizado por Tween® 20, y al mismo tiempo al aumentar la cantidad de tensioactivo en las formulaciones, se observó una reducción en los valores de IP, lo cual plantearon como lógico, ya que la combinación de co-tensioactivos y la adición de mayores cantidades de tensioactivo tienden a producir un producto más estable y disperso (Shah et al., 2014).

El uso de dos tensioactivos como estabilizantes, es muy común, ya que es eficiente para prevenir la aglomeración de las partículas y retarda el tiempo de aparición de las transiciones polimórficas de los triglicéridos que conforman la matriz de las nanopartículas. Con el uso de dos agentes tensioactivos se presenta un efecto sinergista que facilita la formación de una película interfacial con mayor cobertura superficial y mayor viscosidad, dificultando el acercamiento de las partículas y estabilizando la emulsión al disminuir la velocidad de coalescencia. (Serra y Fernández, 2009). El uso de dos tensioactivos promueve la estabilización estérica (Ver Figura 19) el cual es un mecanismo que explica el uso de distintos surfactantes capaces de inhibir la coagulación, hace referencia a la modificación de la superficie de las partículas coloidales de manera que se extiendan estructuras moleculares enlazadas hasta la fase continua por encima de la partícula. Estas extensiones evitan físicamente la aproximación entre dos partículas. Usualmente se utilizan surfactantes no iónicos con cadenas afines al agua, de manera que estos aditivos se adhieren a las partículas, lo que produce una capa adsorbida con un espesor determinado, y cuando dos partículas se aproximan lo suficiente, las capas adsorbidas pueden superponerse o comprimirse, lo que genera una fuerza repulsiva intensa, es esta repulsión la que separa las partículas y promueve la estabilidad. (Hubbe et al., 2015)



**Figura 19.** Ejemplificación de la estabilización estérica.(Luna y Mendoza, 2008).

En esta experimentación el sistema que presentó un tamaño de partícula promedio menor, fue el de Tween<sup>®</sup> 80- Span<sup>®</sup> 80 al 3% m/v presentando NLS de 183nm con un IPD 0.3, que indica una estrecha distribución del tamaño. Resultado similar al reportado por Shtay, Tan y Schwarz en 2018 en su propuesta de condiciones de preparación de NLS de manteca de cacao, encontraron que al utilizar Tween<sup>®</sup> 20 a una concentración de 1.5% m/v se obtienen nanopartículas de 112.7 nm, concluyendo que al utilizar como tensioactivos Tween<sup>®</sup> y Span<sup>®</sup>, no son necesarias grandes concentraciones para producir partículas finas y cubrir la superficie de las nanopartículas efectivamente y, de esta manera, prevenir la aglomeración durante el proceso (Shtay et al., 2018). Similar también a lo que reporta Ponce Andrade como resultado de su experimentación al utilizar diferentes concentraciones de Tween<sup>®</sup> 80 y manteca de cacao, donde reporta que a medida que incrementa la concentración de Tween<sup>®</sup> 80 decrece el tamaño de partícula y a su vez mejora su estabilización estérica, concluyen que la concentración de surfactante es una variable de importancia ya que ésta afecta directamente al tamaño de partícula, estabilidad y rendimiento de las nanopartículas (Ponce, 2017).

Como puede observarse en la Tabla 8, el tamaño de partícula disminuye considerablemente entre los sistemas PVAL, Pluronic<sup>®</sup> y Tween<sup>®</sup> 80- Span<sup>®</sup> 80, pasando de valores de 709.2 a 183.3 nm considerando el valor más alto y el más bajo respectivamente, esto se atribuye a la forma de adición de los tensioactivos, la cual juega un papel determinante en las características de las NLS. Cuando se adicionan en la fase lipídica, el tamaño de partícula resulta ser significativamente menor que cuando se adicionan en el agua (Wang et al, 2005).

Esto debido a la mayor velocidad de disgregación de la grasa y a la rapidez con que las gotas se recubren con el tensioactivo, la cual debe competir con la velocidad de coalescencia de las partículas lipídicas no recubiertas. La dispersión de los tensioactivos en la matriz lipídica facilita la formación de la película protectora, al orientar la parte hidrofílica del tensioactivo hacia la superficie. Este proceso es menos eficiente cuando los tensioactivos están disueltos en el agua, ya que estarían en menor concentración respecto al lípido, cuestión que no favorecería su adsorción en las nuevas superficies formadas durante la homogeneización, dando lugar a partículas más grandes (Garzón et al., 2009). Por lo tanto, es justificado que se obtengan partículas de menor tamaño al agregar Tween<sup>®</sup> 80 en la fase acuosa y Span<sup>®</sup> 80 en la fase lipídica al momento de la preparación.

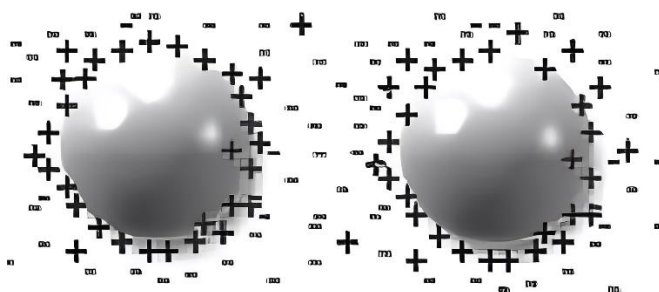
### 3.2.2 Potencial zeta y estabilidad.

El potencial zeta, que puede ser de polaridad positiva o negativa dependiendo de la química de las partículas, es un potencial eléctrico creado por la presencia de una carga en la superficie de la partícula. El potencial zeta, es un indicador del grado de repulsión entre partículas con carga similar en la formulación (Shah et al., 2014). Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera la repulsión y se forman flóculos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial zeta se estabilizan eléctricamente, mientras que los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular o flocular (Mayoral et al., 2014).

Experimentalmente, al medir el potencial zeta de cada una de las formulaciones realizadas, se encontró que para las NLS de manteca de cacao la carga es esencialmente negativa, esto atribuido a la presencia de grupos funcionales ácidos en la estructura misma de la manteca. Las nanopartículas con un potencial zeta fuera del rango  $\pm 30$  mV han demostrado ser estables en suspensión, debido a que la carga superficial evita la agregación de las partículas (Mayoral et al., 2014). La formulación más estable, es decir con un potencial zeta mayor, se obtuvo utilizando Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 80 como agentes estabilizantes al 3% m/v, y la formulación que presentó menor estabilidad, es decir un potencial zeta menor, la que usó Polivinil alcohol 3% m/v como estabilizante (ver Tabla 8), estas diferencias coinciden con lo reportado

estadísticamente, ya que en la Tabla 9 se puede observar que el tipo y concentración de tensioactivo en la formulación resultan significativos para la obtención de nanopartículas lipídicas solidas.

Resultados similares a los experimentales fueron reportados por Shah, Eldridge, Palombo y Harding, quienes en 2014 realizaron diferentes formulaciones para obtener NLS utilizando diferentes concentraciones de ácido esteárico y Tween<sup>®</sup> 20, reportaron que al medir el potencial zeta de sus formulaciones estos fueron consistentemente negativos, en un rango de -11 a -17 mV, rango dentro del cual se obtuvieron los resultados experimentales de la formulación con Tween<sup>®</sup> 80 para la obtención de NLS de manteca de cacao. En dicha investigación se menciona que las nanopartículas lipídicas solidas que son perfectamente cubiertas por un tensioactivo no iónico como Tween<sup>®</sup> 20 tienden a permanecer estables incluso al tener un potencial zeta bajo, esto debido a una mayor estabilización estérica y una menor estabilización electrostática (Shah et al., 2014). Sin embargo, la naturaleza de Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 80 es la que permite su uso y buen desempeño como estabilizante en la formulación propuesta, ya que al ser tensioactivos de tipo no iónico, al estar en disolución acuosa no ionizan el medio, sin embargo la carga superficial de las partículas de manteca de cacao que por su estructura molecular contienen grupos ácidos permiten una estabilidad electrostática (Ver Figura 20) inferida por repulsión electromagnética entre las partículas y el medio que contiene grupos hidroxilo provenientes de las partículas de Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 80 que confieren una carga negativa estructural, lo que evita coagulaciones entre las nanopartículas por repulsión.



**Figura 20.** Ejemplificación de la estabilización electrostática. (Luna y Mendoza, 2008)



Lo contrario al uso de Polivinil alcohol y Pluronic® en las formulaciones propuestas, ya que estructuralmente presentan menor cantidad de grupos hidroxilo, originando un potencial zeta bajo, reflejando una reducción en la repulsión de cargas, lo que permite la floculación y agregación de partículas. Ambos tensioactivos imparten estabilización estérica porque conforman bloques solubles e hinchables que forman una capa que se extiende hacia la solución acuosa, mientras que la porción insoluble forma una masa fundida en la superficie de la nanopartícula de manteca de cacao (Martinez, 2019). A concentraciones altas de estos tensioactivos, la interacción hidrófoba entre las moléculas del estabilizante se vuelve más fuerte, lo que lleva a la auto asociación del estabilizante, produciendo una mayor adsorción en la superficie de las nanopartículas que conduce a la formación de múltiples capas, lo que conduce a la estabilización experimental de nanopartículas, sin embargo, el potencial zeta no es lo suficientemente grande para garantizar una estabilidad óptima. Por las razones anteriores es que los tensioactivos no-poliméricos y no-iónicos son más fácilmente adsorbidos en la superficie oleosa que los estabilizantes poliméricos sintéticos como el alcohol polivinílico (PVAL) y el Pluronic®, así como otros con cadenas de igual longitud, son altamente efectivos en términos de tamaño de partícula, aunque de utilidad limitada en la coalescencia por la deficiente estabilidad que brindan electrostáticamente. (Serra y Fernández, 2009).

### 3.3 Efecto de la concentración (%m/v) de manteca de cacao en la formulación.

El análisis de varianza ANOVA revela valores  $p \leq 0.05$ , lo que demuestra diferencia significativa entre sistemas en su Tamaño de partícula (TP) , Índice de polidispersión (IPD) y potencial zeta ( $\zeta$ ) al variar la concentración de manteca de cacao en las diferentes formulaciones.

**Tabla 10.** Valores P obtenidos al aplicar ANOVA a los datos obtenidos por cada concentración % de manteca de cacao utilizada.

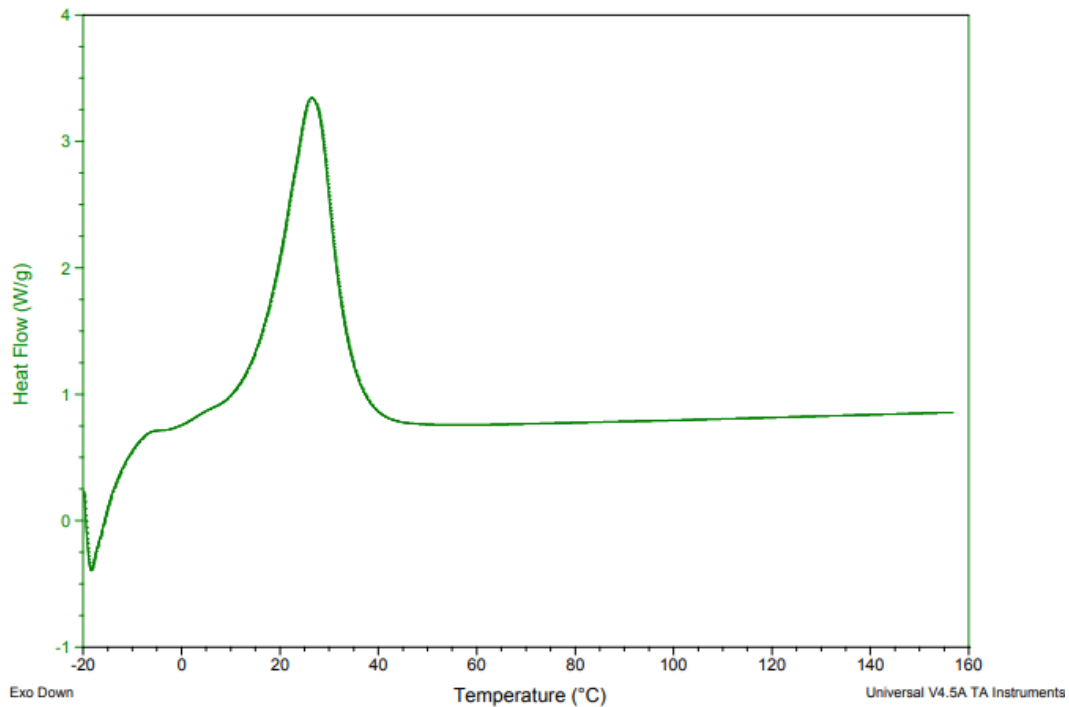
<b>TP</b>	<b>IPD</b>	<b><math>\zeta</math></b>	<b>REFERENCIA</b>
0.001	0.000	0.010	0.05
Significante	Significante	Significante	$p \leq 0.05$

### 3.3.1. Tamaño de partícula (TP) e índice de Polidispersión (IPD).

Experimentalmente al analizar las concentraciones de lípido utilizadas 3 y 5% m/v de manteca de cacao se encuentra que en los sistemas estabilizados por Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 80, al aumentar la concentración de manteca de cacao, aumenta el tamaño de las nanopartículas, dicho fenómeno puede explicarse por un aumento de la viscosidad de la fase interna, que afecta la capacidad de cizallamiento del agitador, por lo que la reducción de tamaño de las nanopartículas se dificulta y como resultado, las partículas tienden a aumentar de tamaño (Shtay et al., 2018), lo cual coincide con lo reportado por Lippacher y colaboradores, que al formular dispersiones con altas concentraciones de lípido mostraron tamaños de partícula mayores que al hacer formulaciones con cantidades menores de lípido, concluyendo que, al aumentar la cantidad de lípido en la formulación, el tamaño de partícula aumentará proporcionalmente (Lippacher, 2001) Sin embargo para los sistemas estabilizados por PVAL y Pluronic<sup>®</sup> se encuentra un comportamiento contrario, al aumentar la concentración de lípido, el tamaño de las nanopartículas disminuyó, esto contrasta con lo reportado por Lippacher y colaboradores en el año 2001.

### 3.4 Calorimetría Diferencial de Barrido.

Experimentalmente se hizo el estudio de calorimetría diferencial de barrido tanto a la manteca de cacao, como a las nanopartículas lipídicas solidas obtenidas con cada formulación para determinar a través de un análisis de los termogramas si hubo cambios en la estructura de la manteca de cacao en las diferentes formulaciones. Esto se analiza ya que se encuentra reportado que las transiciones polimórficas ocurren durante el almacenamiento y provocan cambios en la forma de las nanopartículas lipídicas (de esferoide a disco), lo que da como resultado un aumento del área de superficie de la partícula, formando cristales altamente ordenados que pueden aumentar el tamaño de partícula, lo que aumenta su susceptibilidad a la agregación y gelificación (Ramos de la Peña et al., 2021).

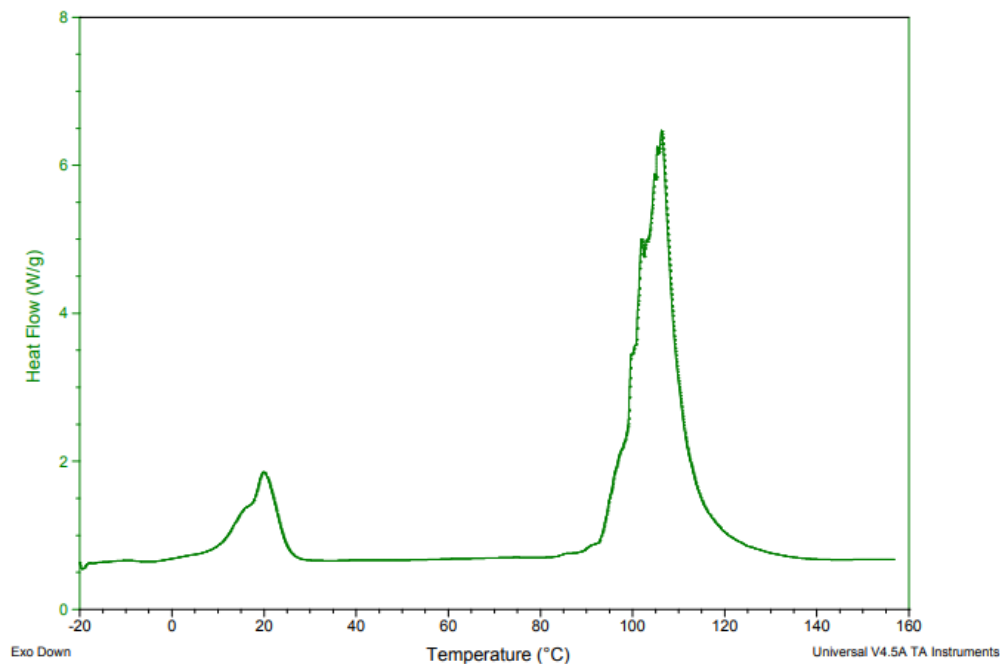


**Figura 21.** Termograma obtenido para la manteca de cacao utilizada para la formación de NLS.

El termograma obtenido de manteca de cacao (Figura 21) nos permite identificar el pico característico del material en fusión 34.1 °C, es importante aclarar que cuando las curvas presentan flujo de calor  $> 0$  pertenecen a un proceso endotérmico, de lo contrario representan un proceso exotérmico, por lo que el proceso endotérmico, que necesitó energía para poder transformar su estado material (Rostamkalaei et al., 2019) Por el punto de fusión encontrado en la manteca de cacao, se puede atribuir que se trata del polimorfo V ( $\beta_2$ ).

En cuanto al termograma obtenido de las NLS de manteca de cacao 5% m/v utilizando PVAL (Figura 22), se identifican dos picos endotérmicos, el primero correspondiente a la fusión de la manteca de cacao, característica de un rango comprendido entre los 30 a 34°C, sin embargo, en el termograma se presenta en la temperatura de 22°C y un segundo pico correspondiente a la evaporación de la fase acuosa que contuvo el alcohol polivinílico. Información similar se refleja en el termograma obtenido para NLS en conjunto con Pluronic® (Figura 23) en donde el primer pico endotérmico es correspondiente a la fusión de

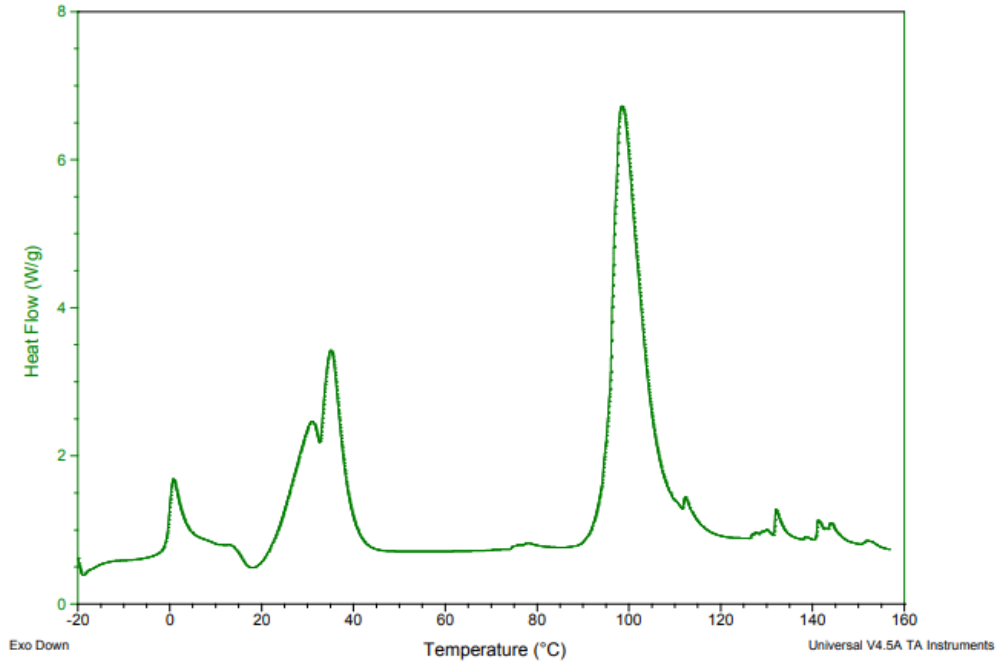
manteca de cacao, y el segundo a la evaporación de la fase acuosa, que a su vez contiene el tensioactivo.



**Figura 22.** Comportamiento térmico obtenido para las NLS con PVAL 5% m/v.

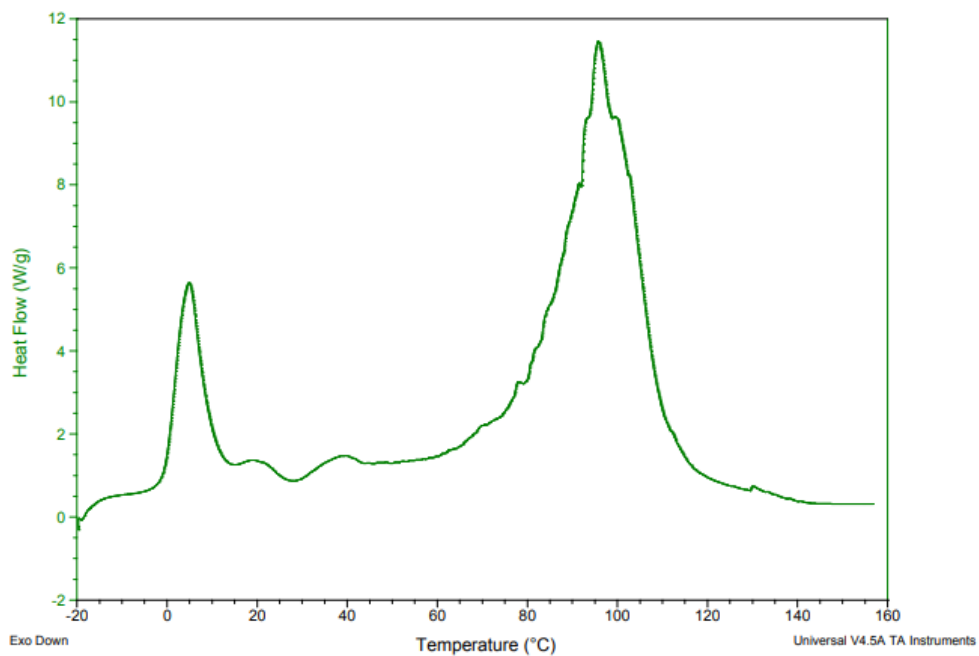
Las nanopartículas estabilizadas con Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 80 presentaron un termograma (Figura 24) en donde el primer fenómeno endotérmico de fusión es correspondiente al de Span<sup>®</sup> 80 ya que tiene un punto de fusión de 0.98°C, de igual manera el pico representa la fusión de manteca de cacao, y posteriormente el pico que se presenta a 100°C correspondiente a la fase acuosa que contiene de igual manera el Tween<sup>®</sup> 80.

En los tres sistemas se presenta una disminución del punto de fusión correspondiente a la manteca de cacao, esto es atribuible al proceso de formación de las nanopartículas, cuando la materia prima se transforma en NLS se deprime el punto de fusión.



**Figura 23.** Comportamiento térmico obtenido para las NLS con Pluronic® 5% m/v.

La disminución de la temperatura se puede atribuir a un efecto del tamaño muy pequeño de las nanopartículas (Jannin, 2009). En principio, la temperatura de fusión de un material a granel no depende de su tamaño. Sin embargo, a medida que el tamaño de un material disminuye hacia el tamaño nanométrico y se acerca a la escala atómica su temperatura de fusión disminuye (Gao y Gu, 2016).

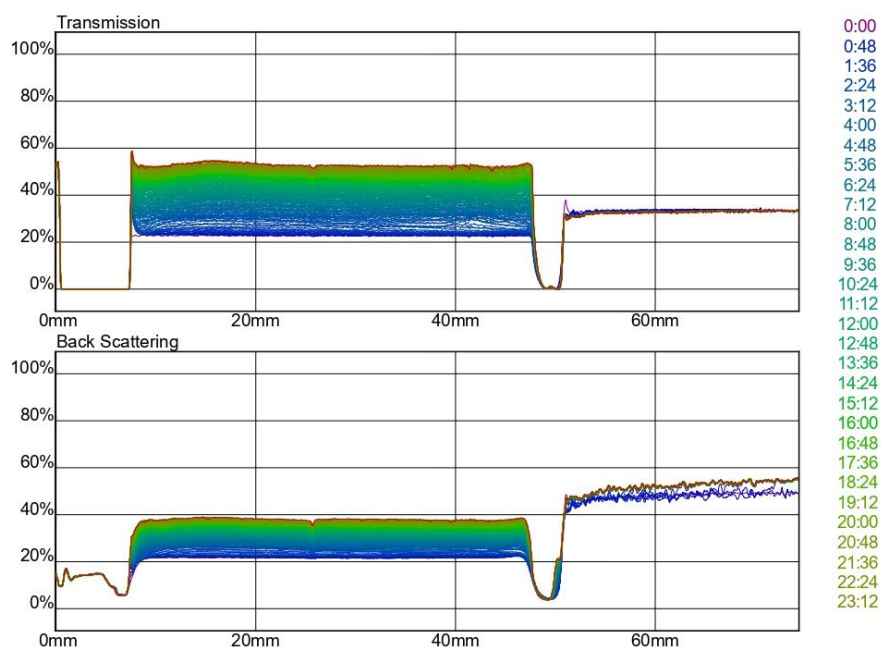


**Figura 24.** Comportamiento térmico obtenido para las NLS con Tween®/ Span® 5% m/v.

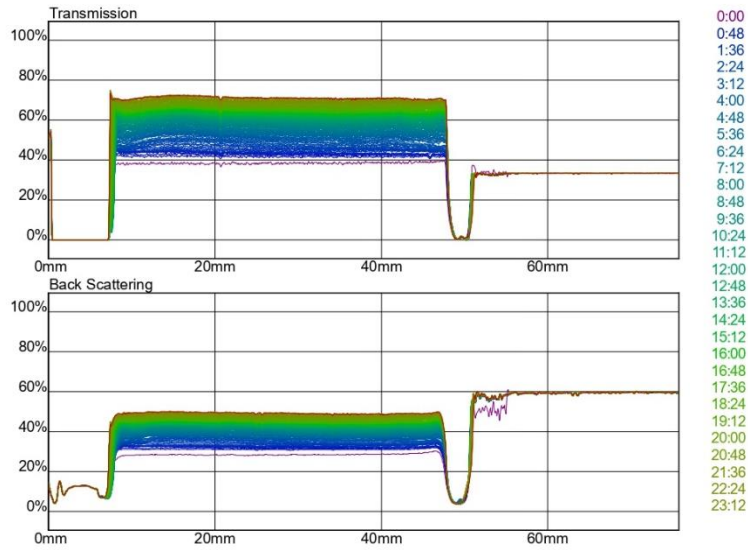
Con lo anterior puede justificarse que las partículas de menor tamaño fueron las que obtuvieron un punto de fusión más bajo. Esto sin dejar de considerar que los picos se presentaron en puntos de fusión característicos para cada material en las diferentes termogramas presentados.

### 3.5 Reflectancia Difusa.

Las Figuras 25 y 26, muestra los cambios en los perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (con una concentración de manteca de cacao de 5%) y PVAL y Pluronic® (ambos al 5%) respectivamente. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras en términos de transmisión, perfiles de retrodispersión y espesor máximo das por la naturaleza del estabilizante.

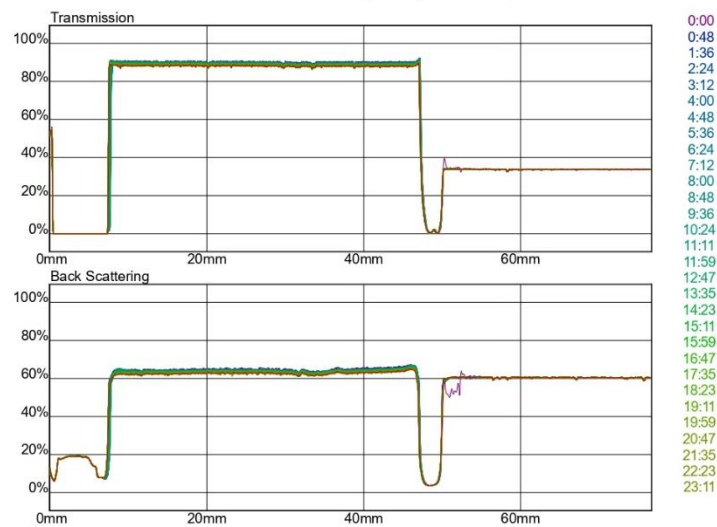


**Figura 25.** Perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (Manteca de cacao 3% y PVAL 5%) evaluados por reflectancia difusa.



**Figura 26.** Perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (Manteca de cacao 3% y Pluronic® 5%) evaluados por reflectancia difusa.

La Figura 27, muestra los perfiles de transmisión y retrodispersión obtenidos para las nanopartículas lipídicas sólidas elaboradas con manteca de cacao al 3% m/v y Tween®/Span® 5% m/v.



**Figura 27.** Perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanopartículas lipídicas sólidas (Manteca de cacao 3% m/v y Tween®/Span® 5% m/v) evaluados por reflectancia difusa.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras en términos de espesor máximo (lo que indicaría un fenómeno de sedimentación. Los resultados

revelan una alta estabilidad física de las muestras que es dependiente de la naturaleza del estabilizante utilizado y se correlaciona directamente con pequeños cambios en el tamaño de partícula y potencial zeta.



## CONCLUSIONES

El método de preparación de nanopartículas por rotor estator permitió obtener nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao utilizando diferentes concentraciones tanto de lípido como de tensioactivo, dichas nanopartículas presentaron tamaños dentro de la escala nanométrica, característica que permite concluir que el método utilizado presentó óptimos resultados.

Las 6 formulaciones propuestas generan nanopartículas sólidas de manteca de cacao, con un tamaño óptimo nanométrico de entre 183.3 nm y 709.2 nm independientemente de la concentración de manteca, de tensioactivo y tipo de tensioactivo que se utilice.

De las 6 formulaciones propuestas, la variación en la concentración de manteca de cacao nos permite identificar que al manejar 3% m/v de manteca de cacao se obtienen las partículas de menor tamaño, mayor potencial zeta y mayor estabilidad, respecto a las formuladas con 5% de manteca de cacao.

La variación de tensioactivos en las 6 formulaciones nos permite establecer que para formular nanopartículas lipídicas sólidas de manteca de cacao con el tamaño más pequeño, mayor estabilidad y mayor potencial zeta es óptimo el uso de tensioactivos de naturaleza no iónica, y una mezcla de tensioactivos, Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 80 para que ejerzan un efecto estérico mayor en la estabilización y prevengan fenómenos de agregación.

En cuanto a la concentración de tensioactivo utilizada para las diferentes formulaciones, se concluye que un 3% m/v de tensioactivo y co-tensioactivo para nanopartículas de manteca de cacao concentración 3% m/v de lípido es la que resultó con mayor estabilidad y menor tamaño de partícula, ya que no se necesitan grandes cantidades de estos tensioactivos para lograr un buen desempeño como estabilizantes.

Mantener la temperatura controlada y constante al momento de la preparación de nanopartículas permitió formar nanopartículas que no revelen cambios de fase al momento de analizar su calorimetría diferencial de barrido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aditya, N. P., & Ko, S. (2015). *Solid lipid nanoparticles (NLSs): Delivery vehicles for food bioactives*. *RSC advances*, 5(39), 30902-30911.
- Arista, B. (2019). *Desarrollo, caracterización y optimización de un sistema de nanopartículas lipídicas sólidas con ácido glicirricínico*. [Tesis de Grado Universidad Nacional Autónoma de México].
- Bayés, L., Cuevas, Á., y Calvet Pallàs, M. T. (2017). *Deliciosos polimorfos*. *Tierra y tecnología*, 2017, num. 49.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., y Bashir, K. (2017). *Status, supply chain and processing of cocoa-A review*. *Trends in food science & technology*, 66, 108-116.
- Blandón, L., Vázquez, M. V., Boannini, E., y Ballarin, B. (2015). *Síntesis electroquímica de nanopartículas de plata en presencia de un surfactante neutro*. *Afinidad*, 72(569).
- Bunjes, H., Koch, M. H., y Westesen, K. (2003). *Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(7), 1509-1520.
- Codini, M., Vélez, F. D., Ghirardi, M., & Villavicencio, I. (2004). *Obtención y utilización de la manteca de cacao*. *Invenio*, 7(12), 143-148.
- Declerck, A., Nelis, V., Danthine, S., Dewettinck, K., y Van der Meeren, P. (2021). *Characterisation of fat crystal polymorphism in cocoa butter by time-domain NMR and DSC deconvolution*. *Foods*, 10(3), 520.
- Doporto, C. (2013). *Cacao, coberturas y chocolate*. *Materias Primas* <http://gastroproductos.blogspot.com/2013/01/cacao-coberturas-y-chocolates.html>
- Fernández, M. (2007). *Polimorfismo: diamante, hielo, fármacos y chocolate*. *100cias UNED*, (10), 63-68.
- Gao, F., y Gu, Z. (2016). *Melting temperature of metallic nanoparticles*. In *Handbook of Nanoparticles* (pp. 661-690). Springer, Cham.
- Garzón, M., Hernández, A., Vázquez, M. L., Villafuerte, L., y García, B. (2008). *Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (NLS), y de Acarreadores lipídicos*

- nanoestructurados (NLC)*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(4), 50-66.
- Garzón, M., Vázquez, M., Villafuerte, L., García, B., y Hernández, A. (2009). *Effect of Formulation Components on the Properties of Solid Lipid Nanoparticles*. *Revista Mexicana De Ciencias Farmacéuticas*, 2, 26-40.
- Ghazani, M., y Marangoni, G. (2021). *Molecular origins of polymorphism in cocoa butter*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12, 567-590.
- González, M., Quintanar, D., Del Real, A., Piñon, E., y Zambrano, L. (2018). *Effect of sucrose concentration and pH onto the physical stability of  $\beta$ -carotene nanocapsules*. *LWT - Food Science and Technology*, 90(June 2017), 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.044>
- González, M., Quintanar, D., Flores, J., Gutiérrez, E., y Zambrano, L. (2015). *Nanocapsules of  $\beta$ -carotene: Thermal degradation kinetics in a scraped surface heat exchanger (SSHE)*. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 124-130.
- Helgason, T., Awad, T. S., Kristbergsson, K., McClements, D. J., y Weiss, J. (2008). *Influence of polymorphic transformations on gelation of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 501-511.
- Hernández, R. (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 Grado. Universidad Nacional Autónoma de México].
- Hubbe, M. A., Rojas, O. J., y Lucia, L. A. (2015). *Green Modification of Surface Characteristics of Cellulosic Materials at the Molecular or Nano Scale: A Review*. *BioResources*, 10(3).
- Jannin, V. (2009). *Lauroyl polyoxylglycerides, functionalized coconut oil, enhancing the bioavailability of poorly soluble active substances*. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 16(4-5-6), 267-272.
- Juárez, C. (2016). *Estructuras tipo emulsiones lipídicas y liposomas. dipalmitoilfosfatidil colina, colesterol, tween 20-span 20 o tween80-span 80 en medio acuoso*. [Tesis de Grado. Universidad Nacional Autónoma de México].

- Kim, B. D., Na, K., y Choi, H. K. (2005). *Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (NLS) made of cacao butter and curdlan*. European journal of pharmaceutical sciences, 24(2-3), 199-205.
- Lippacher, A. (2001). *Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 214, 9–12. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(00\)00623-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(00)00623-2).
- Luna, C., y Mendoza, R. (2008). *Formación de partículas nanométricas en soluciones sobresaturadas*. Ciencia UANL, 11(3).
- Martinez, L. (2019). *Desarrollo y evaluación del efecto lubricante de nanopartículas lipídicas sólidas de estearato de magnesio, compritol®ato 888 (behenato de glicerilo) y gelucire®44/14 (glicéridos de lauroil polioxil-32) como excipientes del proceso de compresión farmacéutica*. [Tesis de Grado. Universidad Nacional Autónoma de México].
- Mayoral, J. B., Moreno, A. C., y Martínez, E. S. M. (2014). *Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas*. Latin-American Journal of Physics Education, 8(4), 19.
- Müller, R. H., Mäder, K., y Gohla, S. (2000). *Solid lipid nanoparticles (NLS) for controlled drug delivery—a review of the state of the art*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 50(1), 161-177.
- Padilla, F., Mendoza, L., Franco, B., Anaya, F., Ponce, P., y Flores, A. (2018). *El mundo micro en el mundo nano: importancia y desarrollo de nanomateriales para el combate de las enfermedades causadas por bacterias, protozoarios y hongos*. Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología, 11(21), 15-28.
- Patidar, A., Thakur, D. S., Kumar, P., y Verma, J. (2010). *A review on novel lipid based nanocarriers*. Int J Pharm Pharm Sci, 2(4), 30-35.
- Ponce, M. (2017). *Desarrollo de micropartículas de manteca de cacao para la encapsulación y liberación controlada de fármacos*. [Tesis de Grado. Universidad San Francisco de Quito].

- Ramos de la Peña, M., Aguilar, O., y González, J. (2021). *Progress in nanostructure understanding of edible crystalline fats and their application in nano-delivery systems: Cocoa butter as a model*. Food Research International, 147, 110561.
- Rostamkalaei, S. S., Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., y Nokhodchi, A. (2019). *Topical gel of Metformin solid lipid nanoparticles: A hopeful promise as a dermal delivery system*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 175, 150-157.
- Salager, L. (2002). *Surfactantes tipos y usos*. Cuaderno FIRP, S300A, 1-54.
- Salas, P. (2013). *Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato y recubiertas con acrilatos para uso como vehículo de doxorubicina*. [Tesis de Grado. Universidad Nacional Autónoma de México].
- Salminen, H., Stübler, A. S., y Weiss, J. (2020). *Preparation, characterization, and physical stability of cocoa butter and tristearin nanoparticles containing  $\beta$ -carotene*. European Food Research and Technology, 246, 599-608.
- Sandoval, A., Rodríguez E., y Fernández, A. (2005). *Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón*. Dyna, 72(146), 45-53.
- Sato, K. y Garti, N (1988). *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*. M. Dekker.
- Serra, G., y Fernández, G. (2009). *Las nanopartículas sólidas lipídicas y los acarreadores lipídicos nanoestructurados en usos terapéuticos*. Razón y Palabra, (68), 1-14.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., y Harding, I. (2014). *Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential*. Journal of physical science, 25(1).
- Shtay, R., Tan, C. P., y Schwarz, K. (2018). *Development and characterization of solid lipid nanoparticles (NLSs) made of cocoa butter: a factorial design study*. Journal of Food Engineering, 231, 30-41.
- Soto, F. (2018). *Estudio electroquímico para la determinación de la concentración micelar crítica del bromuro de cetiltrimetilamonio, dodecilsulfato sódico, tween 80, pluronic f127 y tritón x-100*. [Tesis de Grado. Universidad Nacional Autónoma de México].
- Tadros, F. (2014). *An introduction to surfactants*. Walter de Gruyter.
- UNIQUIM. (2016a). Unidad de Informática del Instituto de Química. *Acido Palmítico*.

- UNIQUIM. (2016b). Unidad de Informática del Instituto de Química. *Ácido Esteárico*.
- UNIQUIM. (2016c). Unidad de Informática del Instituto de Química. *Ácido Oléico*.
- Villafuerte, L., García, B., de Lourdes Garzón, M., Hernández, A., y Vázquez, M. L. (2008). *Nanopartículas lipídicas sólidas*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 39(1), 38-52.
- Wang, Y., Deng, Y., Mao, S., Jin, S., Wang, J., y Bi, D. (2005). *Characterization and body distribution of  $\beta$ -elemene solid lipid nanoparticles (NLS)*. Drug development and industrial pharmacy, 31(8), 769-778.
- Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T., y Awad, T. (2008). *Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components*. Food biophysics, 3, 146-154.

## Anexos.

### Anexo 1. Propiedades Físicoquímicas.

#### Anexo 1.1 Propiedades físicoquímicas del Polivinil alcohol.

Estructura química	
Funcionalidad	Agente estabilizante, agente que incrementa la viscosidad
Fórmula condensada	(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub>
Masa molecular	20,000 – 200, 000
Apariencia	Polvo granular inodoro de coloración blanca a crema.
Solubilidad	Altamente soluble en agua y etanol. (95%) Insoluble en solventes orgánicos.
Punto de fusión	180-228°C
HLB	18

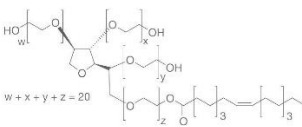
#### Anexo 1.2 Propiedades físicoquímicas del Pluronic<sup>®</sup>.

Estructura química	
Nombre IUPAQ	Poloxámero
Funcionalidad	Agente dispersante, emulsificante y co-emulsificante
Fórmula condensada	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.

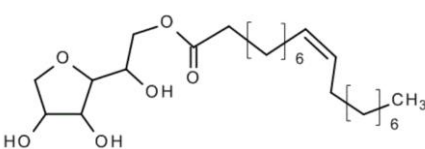


Solubilidad	Soluble en agua y etanol. Insoluble en solventes orgánicos
Punto de fusión	56°C

### Anexo 1.3 Propiedades fisicoquímicas del Tween® 80.

Estructura química	
Nombre IUPAQ	Polisorbato 80
Funcionalidad	El Tween 80 es un surfactante hidrofílico. No iónico
Fórmula condensada	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>
Masa molecular	1309.7
Apariencia	Líquido oleoso límpido, o ligeramente opalescente, incoloro o amarillo pardusco
Solubilidad	Soluble en agua, etanol y metanol. Insoluble en disolventes orgánicos.
Punto de fusión	-20°C
HLB	15

### Anexo 1.4 Propiedades fisicoquímicas del Span® 80.

Estructura química	
Funcionalidad	Emulsificante no iónico

Fórmula condensada	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>
Masa molecular	428.62
Punto de fusión	0.986°C
HLB	4.3

Anexo . Ecuaciones utilizadas para calcular las cantidades de manteca de cacao a pesar según la concentración deseada de NLS.

Manteca de Cacao al 3%

$$3g \text{ de Manteca de Cacao sólida} \rightarrow 100 \text{ mL Solución}$$

Manteca de Cacao al 5%

$$3g \text{ de Manteca de Cacao sólida} \rightarrow 100 \text{ mL Solución}$$

## Anexo 2

. Ecuaciones utilizadas para calcular las cantidades de estabilizantes a pesar según la concentración deseada en la solución de NLS.

Polivinil Alcohol (PVAL). 5%

$$\frac{5g \text{ de PVAL} \times 100 \text{ mL agua destilada}}{100 \text{ mL solución}} = 5\%$$

Pluronic®. 5%

$$\frac{5g \text{ de Pluronic} \times 100 \text{ mL agua destilada}}{100 \text{ mL solución}} = 5\%$$

Tween 80. 5%

$$\frac{5g \text{ de Tween 80} \times 100 \text{ mL agua destilada}}{100 \text{ mL solución}} = 5\%$$

Span 80. 5% en NLS 5%

$$\frac{5 \text{ g manteca de Cacao} - 100\%}{x \text{ g manteca de Cacao} - 5\%} = 5\%$$

Span 80. 5% en NLS 3%

$$\frac{3 \text{ g manteca de Cacao} - 100\%}{x \text{ g manteca de Cacao} - 5\%} = 3\%$$

Anexo 3. Análisis estadístico ANOVA utilizado para el tratamiento de los datos obtenidos.

### 3.1 Análisis de Varianza Tamaño de partícula.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Estabilizante	2	385751	192875	21.79	0.000
[%]	1	146449	146449	16.54	0.001
Error	14	123930	8852		
Falta de ajuste	2	121275	60638	274.13	0.000
Error puro	12	2654	221		
Total	17	656129			

### Análisis de varianza índice de polidispersión.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Estabilizante	2	0.13875	0.069375	8.52	0.004
[%]	1	0.35448	0.354482	43.52	0.000
Error	14	0.11403	0.008145		
Falta de ajuste	2	0.08795	0.043976	20.23	0.000
Error puro	12	0.02608	0.002173		
Total	17	0.60726			

Análisis de varianza Potencial zeta.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Estabilizante	2	523.036	261.518	56.23	0.000
[%]	1	41.012	41.012	8.82	0.010
Error	14	65.118	4.651		
Falta de ajuste	2	62.341	31.171	134.73	0.000
Error puro	12	2.776	0.231		
Total	17	629.165			